

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.01.12

新型检测技术在犬猫主要病原检测中的应用进展

宋新宇¹, 朱明哲^{1,2}, 陈紫昱¹, 印春生¹, 夏应菊¹, 刘业兵^{1*}

(1. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 2. 青岛农业大学, 山东青岛 266109)

[收稿日期] 2022-06-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 01-0087-08 [中图分类号] S852.6

[摘要] 犬猫传染性疾病严重影响犬、猫健康, 甚至威胁人类生命健康。随着新型材料和科学技术的发展, 在传统检测方法的基础上建立了多种快速、灵敏、特异的检测技术。针对研究较多的快速检测方法如等温扩增技术、基因芯片技术、时间分辨免疫荧光层析技术以及免疫微球分离检测技术等多种新型检测技术, 从检测时间、优缺点及在犬猫主要病原检测的研究进展等多角度予以综述, 旨在在不同的检测环境下选择适合犬猫病原检测技术及产品研发提供参考。

[关键词] 新型检测技术; 犬; 猫; 检测方法

Application Progress of New Detection Technology in the Detection of Main Pathogens of Dogs and Cats

SONG Xin-yu¹, ZHU Ming-zhe^{1,2}, CHEN Zi-yu¹, YIN Chun-sheng¹, XIA Ying-ju¹, LIU Ye-bing^{1*}

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Corresponding author: LIU Ye-bing, E-mail: zjsliuiebing@163.com

Abstract: Infectious diseases of dogs and cats seriously affect their health, and even threaten the safety of human life. With the development of new materials and science and technology, a variety of rapid, sensitive and specific detection techniques have been established on the basis of traditional diagnostic methods. This paper focuses on the review of the application of new detection techniques such as isothermal amplification technology, gene chip technology, time-resolved immunochromatographic fluorescent assay and immunomagnetic beads separation technology in dogs and cats, and compares these detection methods from multiple perspectives such as detection time, advantages and disadvantages, as well as the research progress in detection of major pathogens in dogs and cats in order to provide reference for the selection of diagnostic techniques and development of products suitable for the detection of pathogens in dogs and cats under different detection environments.

Key words: new detection technology; dogs; cats; detection method

基金项目: 国家重点研发计划“畜禽重大疫病防控与高效安全养殖综合技术研发”重点专项“宠物疾病诊疗与防控新技术研究”资助项目(2016YFD0501004)

作者简介: 宋新宇, 硕士研究生, 从事兽医微生物及免疫学研究。

通讯作者: 刘业兵。E-mail: zjsliuiebing@163.com

犬猫作为人类伴侣动物,备受人们喜爱,同时在疫病方面受到越来越多的关注。犬瘟热和犬细小病毒病是犬常见的传染病,临床上都表现为高热、呕吐和腹泻等相似症状^[1-2]。犬冠状病毒病是一种急性、肠炎型传染病,鉴别诊断与以稀便为主的肠炎疾病相似,尤其区分轮状病毒或细小病毒感染,这些具有相似症状的传染病给诊断带来了困扰。猫杯状病毒常引起猫科动物上呼吸道症状和口腔溃疡,具有较高的感染率,目前还未研制出有效的疫苗,该病原严重威胁猫的健康^[3]。引起猫呼吸道疾病的另一常见病原是疱疹病毒,患病猫常出现发热,打喷嚏,鼻、眼中流出分泌物等临床症状,主要威胁仔猫的健康,发病率可达 100%。猫泛白细胞减少症又称猫瘟热,是由细小病毒引起的传染病,幼猫的感染率和死亡率较高^[4],白细胞显著减少是患该病的一个重要特征。此外,大肠杆菌和结核分枝杆菌等引发的细菌病以及弓形虫、旋毛虫、钩端螺旋体等寄生虫病,都是威胁犬猫健康的重要病原。其中,部分疫病为人畜共患病,如狂犬病、弓形虫病和钩端螺旋体病等,存在病原的跨物种传播的风险,对人类公众健康构成了重大威胁。因此,建立早期快速而准确的检测方法,对控制犬猫疾病的流行具有重要意义。

尽管病原体的分离和鉴定是诊断的金标准,但是某些病原为人畜共患病原体存在安全隐患,因此,在宠物门诊和医院实施较为困难。随着分子生物学诊断技术的进步,相关检测技术不断优化,出现操作简单、灵敏度高、特异性强的新型检测技术,如实时荧光定量 PCR 技术、等温扩增技术和基因芯片等核酸检测技术,胶体金免疫层析技术、时间分辨荧光免疫层析技术、荧光微球免疫学检测技术、化学发光免疫分析技术和免疫生物传感器等免疫学检测技术和基于 CRISPR/Cas 的核酸检测系统等其他新型检测技术,可以满足在多种环境下快速检测病原的需求,本文现针对犬猫主要病原的新型检测技术的应用和研究现状作以下总结概述。

1 基于核酸分子杂交的检测技术

聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 技术主要针对病原基因组高度保守的序列,将微量的核酸分子进行大量扩增,是现代应用较为广泛的病原检测手段之一,但是也存在缺点,需要提取样品 DNA,并且检测结果只能依赖于凝胶电泳的定性分析。实时荧光 PCR 系统可以满足定量分析^[5],目前,已经建立了猫星状病毒^[6]、犬流感病毒^[7]、犬肝片吸虫^[8]、犬钩虫^[9]和犬钩端螺旋体^[10]等多种常见犬猫病原的实时荧光定量 PCR 方法。该技术是宠物医疗检测平台的首选技术,但由于检测结果需要依赖于昂贵的仪器设备,且对操作人员有一定要求,所以只能在设备全面的实验室中进行。此外,基于 PCR 反应原理,衍生出操作简单的等温扩增技术和可实现高通量的基因芯片技术等。

1.1 环介导等温扩增技术

环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是由日本学者 Notomi 等^[11]建立的体外恒温扩增核酸的技术,1 h 之内即可对靶基因进行高效扩增。

国内外已有利用 LAMP 技术进行检测的报道。关玮琨等^[12]根据犬细小病毒 (Canine parvovirus, CPV) VP2 基因设计引物建立了 LAMP 方法,最低检出量为 2.1×10^{-2} TCID₅₀,敏感性是 PCR 技术的 100 倍,在临床样品进行检测中,其与 PCR 检测结果符合率达 100%。目前,已有犬细小病毒^[13]、犬瘟热病毒^[14]和猫泛白细胞减少症病毒^[15]等 LAMP 的检测方法,该技术还运用到犬马鞭毛虫^[16]、犬带绦虫^[17]、犬孢子虫^[18]等多种犬寄生虫病的检测。值得注意的是,LAMP 技术已经广泛应用于食源性致病菌的检测^[19-20],但在犬猫细菌性疾病检测研究较少。相比于普通 PCR,LAMP 技术只需要简单的恒温水浴即可完成对微量病原的高效扩增,但是还未出现检测犬猫病原的商品化试剂盒。该技术尚有设计引物较难的缺点,引物之间常存在二聚体结构,进而导致结果的假阳性。

1.2 重组酶聚合酶扩增技术

重组酶聚合酶扩增 (Recombinase polymerase amplification, RPA) 是 Piepenburg 等^[21]于 2006 年研发出的核酸等温扩增

技术。该技术主要依赖于多种酶和蛋白参与,通过模拟 DNA 体内扩增,以实现 DNA 特定区域的指数扩增。

近年来,许多研究工作都报道了应用 RPA 技术实现对病原快速且灵敏的检测。Wang 等^[22]针对犬瘟热病毒核衣壳基因设计三种引物和探针,筛选后选出最佳组合,建立 RPA 快速检测方法,该方法与实时 RT-PCR 诊断符合率为 100%,但相比之下,RPA 方法更加省时方便,检测时间为 3~12 min。Hu 等^[23]建立猫冠状病毒的 RPA 检测方法,在 39℃ 条件下,15 min 即可特异性检测出该病毒的膜基因,最低检测限为 233 拷贝。目前,已建立起猫疱疹病毒^[24]、狂犬病病毒^[25]和犬细小病毒^[26]等 RPA 检测方法,结果均具有较高的灵敏性和特异性,但目前尚未有关于犬猫病原检测的 RPA 产品完成研发与上市。RPA 技术的优势主要在于体外 37~42℃ 恒温扩增,反应时间只需 5~20 min,可以实现及时准确的检测。该技术还存在不足,如没有专门的软件设计引物和探针,只能通过消耗大量的时间和成本,筛选效果良好的引物和探针。此外,RPA 扩增后需要对其进行纯化,否则在琼脂糖凝胶电泳时会导致结果模糊。

1.3 基因芯片技术 基因芯片又称 DNA 微阵列,基于核酸杂交技术原理将靶基因固定到固体支持物上,随后将处理后的样品与靶基因进行特异性结合,以实现对所测样品基因的大规模定量检验^[27],因其高通量的特点而被应用于各个领域。

基因芯片技术不仅能区分多种病原的种属,甚至可以同时跨物种检测,极大的缩短了操作时间。李健等^[28]建立了犬冠状病毒、猫冠状病毒和猫传染性腹膜炎病毒的三种病毒的基因芯片技术,为病原的快速检测提供了便利。Wu 等^[29]利用芯片技术原理同时检测五种犬病毒,这些病毒包括犬瘟热、犬细小病毒、犬副流感病毒、犬腺病毒和狂犬病毒,通过靶向每种病毒的保守基因组区域来实现测定特异性,对临床 75 个样本进行检测,结果显示与普通 PCR 技术检测结果的符合率为 100%。基

因芯片检测病原技术成功的关键在于提高杂交特异性和降低干扰背景,但其检测结果多依赖于专业扫描仪器,成本较高。目前,该技术在犬猫疫病检测方面尚处于实验研究阶段。

2 基于抗原抗体反应的免疫学检测技术

由于病原标识性抗原筛选技术、单克隆抗体、多克隆抗体以及重组抗体等生物技术的快速发展,使得基于抗原抗体特异性结合的免疫学诊断技术,以胶体金作为指示剂的层析技术,可以实现对待测样品的直观快速的检测^[30],已研究出犬细小病毒^[31]、犬猫弓形虫^[32]、猫冠状病毒^[33]和猫泛白细胞减少症病毒^[34]检测试纸条,根据国家兽药基础数据库查询可知,目前已有约 13 种已经批准上市的犬猫胶体金检测试纸条,由于操作简单,结果只需肉眼观察,被宠物医院和基层单位的现场广泛使用,但胶体金免疫层析试纸条检测病原只能定性或是半定量,且准确性低于 PCR 技术。在此基础上,新的免疫学检测技术相继出现,如时间分辨免疫分析技术、免疫微球检测技术、化学发光免疫分析技术和免疫生物传感器等。

2.1 时间分辨免疫荧光层析技术 时间分辨免疫荧光层析技术 (Time-resolved immunochromatographic fluorescent assay, TRIFA) 是基于免疫层析和时间分辨荧光分析相结合的定量检测技术^[35],利用荧光的镧系元素或稀土粒子标记抗原或抗体,使抗原抗体在硝酸纤维膜上发生反应,用简单配套的设备来测定荧光强度,从而实现定量分析待测样本中的浓度。

TRFIA 技术的主要标记物为镧系元素,因其特殊的发光特性可以有效减低外界荧光和非特异性荧光的干扰,增强检测的灵敏度。Chen 等^[36]将犬细小病毒抗体与铕 (Eu^{3+}) 偶联标记,建立双抗体夹心式的时间分辨免疫层析技术以检测犬细小病毒的含量,灵敏度达 1.15 mEu/mL。韩阳瑞等^[37]建立了检测弓形虫感染的血清中抗体的时间分辨免疫层析技术,结果通过统计学的分析,显示该方法与 ELISA 之间具有较好的一致性,且具有足够的

精度、分析灵敏度和准确度。我国已有研究人员基于 TRFIA 技术对犬冠状病毒^[38]和猫杯状病毒^[39]实现定量检测,但未有针对犬猫病原检测的商品用试剂盒。该技术既保留了胶体金免疫层析技术的反应快速、操作简单的特点,通过荧光技术实现了对试验结果的定量分析,但是实验结果的荧光信号需依赖于配套的仪器设备。

2.2 免疫微球分离检测技术 免疫微球分离技术 (Immunomagnetic beads separation technology, IMBS) 是将磁珠的磁性、响应性和抗原抗体的特异性反应相结合的一项技术^[40],将特异性抗原(或抗体)偶联在磁性微球表面,从而与待检样品的抗体(或抗原)特异性结合,达到分离浓缩的目的。

IMBS 主要与其他检测技术相结合以避免样品中的其他成分对检测的干扰,使检测结果更加高效、特异。唐毓等^[41]利用表达并纯化的犬细小病毒中 VP2 基因的重组蛋白作为抗原与纳米微球偶联,建立了一种快速检测犬细小病毒抗体的间接凝集方法,对临床 40 份犬血清进行检测,结果显示,不仅检测时间比 ELISA 用时短,而且与 ELISA 检测方法的符合率达 97%。Chen 等^[42]将磁珠免疫微球技术和化学发光层析技术相结合建立检测犬血清中的犬细小病毒抗体的方法,1 h 通过采集光度即可分析结果,可运用该方法定量检测犬细小病毒抗体的浓度和疫苗免疫效果的评价。相较于传统的免疫学诊断技术,该技术可实现免疫分离与微量富集结合为一体,降低非特异性结合可能性,使检测结果更加高效、特异。使用 IMBS 进行高效富集的关键在于抗体的特异性和敏感性,但是受到样品基质的复杂性生物干扰,因此,IMBS 的应用性能还需要进一步研究。

2.3 化学发光免疫分析技术 化学发光免疫分析技术 (Chemiluminescence immunoassay, CLIA) 是以化学发光相关物质为示踪信号标记抗原(或抗体),利用抗原抗体特异性结合的原理,通过化学发光强度对待测物定量分析^[43]。由于发光强度与待测物的浓度呈正相关,可以通过仪器测定发光强度,便

可对待测物进行定量分析。

吖啶酯是常见的化学发光物质,其发光效率在 1 s 内即可完成,成本低,适合各种检测机构使用。Gašior 等^[44]将吖啶酯与二抗 (IgG) 和 SAG2 - GRA1 - ROP1L 嵌合抗原连接起来,建立检测血清中弓形虫特异性抗体的化学发光免疫分析方法,以 ROC 曲线来分析的 IgG CLIA 与 IgG ELISA 测定的诊断价值,使用相同用量的二抗测得 AUC (ROC 曲线下的面积)的结果分别是 0.966 和 0.985,结果表明,IgG CLIA 比 IgG ELISA 的检测结果更加敏感。Chen 等^[45]利用犬细小病毒重组蛋白为包被抗原,以吖啶酯标记二抗,建立检测犬细小病毒抗体的 CLIA 检测方法,1 h 后即可收集化学发光强度,检测限为 0.36 ng/mL。杨富强等^[46]利用碱性酶对犬瘟热病毒抗原进行标记,以吖啶酯类作为发光底物,设计并发明检测犬瘟热病毒抗体。该方法具有即时诊断特点,37 ℃ 孵育半小时即可。其在灵敏度、稳定性和检测效率上明显优于 ELISA 测定方法。虽然该技术目前在犬猫病原检测方面未有面向市场的产品,但在 2021 年完成了第一个动物用化学发光试剂盒的审批注册^[47],该技术不需要外界的激发光源,降低了背景的荧光信号,可以在较宽的线性范围检测极低浓度的样品,具有较高的敏感性,但是其检测结果依赖于专业的实验设备和对操作人员具有一定的要求,因此,在基层推广还是有一定限制。

2.4 免疫生物传感器 生物传感器是分子生物学、电化学、微生物学等多学科相互渗透的新型技术,由分子识别元件即敏感元件(如酶、抗原、细胞器、核酸、细胞受体、生物膜等)和信号转换器(如半导体、光电转换、热敏电阻、压电晶体等)组成^[48],可以与靶标物质发生生化反应并且将其浓度转换为可测量的电信号或光信号,达到定量定性分析的目的。

生物传感器的种类众多,其中免疫生物传感器在病原检测方面是可靠手段,具有特异性、长期稳定性、快速反应性等特点。Jiang 等^[49]先将巯氨酸在 nafion - 石墨烯修饰的电极上电聚合形成生物敏感膜,在膜上固定弓形虫特异性抗原,基于双抗体

夹心法的原理,构建了一种用于检测弓形虫特异性 IgM 的新型电化学免疫传感器,结果表明,电流与 IgM 浓度具有正相关性,检测限为 0.016 AU/mL ($S/N=3$)。Kim 等^[50]设计出检测犬细小病毒的石英晶体微天平生物传感器,将特定抗体嵌合在金涂层的石英晶体表面,通过抗原抗体相结合的频率变化以检测犬细小病毒的含量。该生物传感器具有纳米级的敏感度,通过对临床 261 份粪便样本分析,结果显示,与 PCR 相比,具有 95.4% 的敏感度和 98% 的特异性。基于免疫学的生物传感器技术具有特异、灵敏、快速的优势,但是也存在缺点,如抗体结合到生物传感器易失活,稳定性较差;非特异性吸附会影响结果的准确性等。目前针对犬猫病原检测的免疫生物传感器方法仍停留在科研实验室阶段,还未出现可应用的商品。

3 其他新型检测技术

成簇规律间隔的短回文重复序列 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 以及相关蛋白 (CRISPR-associated protein, Cas) 组成的 CRISPR/Cas 系统是广泛存在于古细菌和细菌中的获得性免疫系统^[51],用于抵御外来病毒的入侵。由于 CRISPR/Cas 系统具有较高特异性和灵敏度,可作为新型的核酸检测平台,其中 Cas 蛋白作为高特异性的序列识别靶标元件,可以与信号读取方法相结合,进行核酸的定量检测。

基于 CRISPR/Cas 系统的核酸检测方法主要由三个步骤构成,包括核酸扩增、特异性核酸序列识别以及检测结果读取。Khan 等^[52]将重组酶介导的扩增技术与 CRISPR-Cas13a 检测系统相结合,建立快速、特异检测犬细小病毒的荧光报告系统,该系统可在 30 min 内检测到 100 amol/L CPV-2 DNA。该方法具有较高的特异性,通过与其他犬类病毒(犬瘟热病毒、犬冠状病毒、犬副流感病毒)进行检测,结果显示,犬细小病毒的平均荧光值显着更高。CRISPR/Cas 系统可以与荧光信号、免疫层析试纸条等方法相结合,便可实现现场操作,可在宠物医院和大型养殖场推广使用。但该技术还存

在缺点:如脱靶效应,可能会在检测过程中出现假阳性的结果;RNA 酶广泛存在,可能会使 CRISPR 检测体系的重要组分向导 RNA 被降解,影响检测结果的稳定性。目前该系统在人类疾病领域出现商品化诊断试剂^[53],但在犬猫病原检测研究尚少。

4 小结及展望

近年来,各种新型检测技术在准确度、灵敏度及操作时间都有跨越式发展,但大多数的核酸检测技术依赖精密甚至昂贵的仪器设备和专业的操作人员,不能在基层大规模普及。鉴于荧光检测系统和侧向流动分析技术可提供一个简单的可视化结果分析,因此可以考虑将多个技术联合使用,发挥各技术的优势,从而实现优势互补以实现快速、灵敏的检测。在免疫检测技术中,标记物是影响灵敏度和检测效率的重要因素,与传统的基于金纳米颗粒标记相比,使用彩色微球、量子化、镧系元素和胶体碳等新型材料标记可以进一步提高灵敏度和检测效率,可能使得免疫层析技术更快速、灵敏、准确,在犬猫病原检测方面具有良好的应用前景。尤其是近年来,成熟应用于人类临床医学的化学发光免疫层析技术,已开始于动物疫病检测方面从研究走向市场,未来就需要有条件的企业或科研平台加大科研投入,以促进成果转化,相信在犬猫病原检测方面将会有巨大的市场。

随着科技技术的发展,检测的智能化、数字化和便携化趋势越来越明显,快速、高效、准确的快速检测方法,是犬猫等动物检测的发展趋势。人工智能提供了一个准确分析数据的平台,高分辨率的摄像头和精确的计算能力,可弥补目测带来的不准确性,实现对病原含量客观、精准的阅读,减少操作人员的主观错误判断。

同时,多种病原同步检测技术也是临床检测的发展趋势,尤其是对于处于潜伏期感染的动物,需要在疾病发生早期进行病原筛查,这就需要实现多种病原的多重扩增,对宠物病原来讲,目前仍然是一个挑战。

未来,犬猫等宠物病原检测技术会朝着多种检

测技术互相融合、高通量、高灵敏度、高准确度、快速检测、可普及推广及可商品化的方向发展,以便满足在不同检测环境下的快速检测,为犬猫的健康和公共生物安全保驾护航。

参考文献:

- [1] Duque Valencia J, Sarute N, Olarte Castillo X, *et al.* Evolution and interspecies transmission of canine distemper virus – an outlook of the diverse evolutionary landscapes of a multi – host virus[J]. *Viruses*, 2019, 11(7): 582.
- [2] Dong B, Zhang G, Zhang J, *et al.* A systematic literature review and meta – analysis of characterization of canine parvoviruses 2 prevalent in mainland China[J]. *Virol J*, 2020, 17(1): 195.
- [3] Di Martino B, Lanave G, Di Profio F, *et al.* Identification of feline calicivirus in cats with enteritis [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67(6): 2579 – 2588.
- [4] Barrs V R. Feline panleukopenia: a re – emergent disease[J]. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2019, 49(4): 651 – 670.
- [5] Wang R, Zhang W, Ye R, *et al.* One – step multiplex TaqMan probe – based method for real – time PCR detection of four canine diarrhea viruses[J]. *Mol Cell Probes*, 2020, 53: 101618.
- [6] Dong G, Wang Q, Niu J, *et al.* Development and application of a TaqMan – based real – time PCR assay for specifically detecting feline astrovirus[J]. *Mol Cell Probes*, 2021, 57: 101729.
- [7] You X, Hao Y, Cui S, *et al.* Development of SYBR Green I real – time PCR for the detection of canine adenovirus[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2019, 27(6): 29 – 34.
- [8] Li Y, Wang C, Allen K E, *et al.* Diagnosis of canine *Hepatozoon spp.* infection by quantitative PCR[J]. *Vet Parasitol*, 2008, 157(1/2): 50 – 58.
- [9] Geiselhardt F, Peters M, Jo W K, *et al.* Development and validation of a pan – genotypic real – time quantitative reverse transcription – PCR assay to detect canine distemper virus and phocine distemper virus in domestic animals and wildlife[J]. *J Clin Microbiol*, 2022, 60(5): e0250521.
- [10] Massetti L, Colella V, Zendejas P A, *et al.* High – throughput multiplex qPCRs for the surveillance of zoonotic species of canine hookworms[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2020, 14: e0008392.
- [11] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop – mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: E63.
- [12] Guan W, He L, Feng Y, *et al.* Development of a loop – mediated isothermal amplification for detection of canine parvovirus [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2013, 43(04): 407 – 411.
- [13] Wang L. Primer set, the fluorescence visualization LAMP kit and method for rapid detection of canine parvovirus: China, CN111394515B[P]. 2021 – 07 – 06.
- [14] Wang L. Primer set, fluorescence visualization RT – LAMP kit and method for rapid detection of canine distemper virus: China, CN111254226A[P]. 2020 – 06 – 09.
- [15] Lu T, Primer set, the fluorescence visualization LAMP kit and method for rapid detection of feline panleukopenia virus: China, CN109136410B[P]. 2021 – 09 – 28.
- [16] Chua A, Galay R L, Tanaka T, *et al.* Development of a loop – mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting the citrate synthase gene for detection of in dogs[J]. *Vet Sci*, 2020, 7(4): 156.
- [17] Feng K, Li W, Guo A, *et al.* Development of LAMP assays for the molecular detection of taeniid infection in canine in Tibetan rural area[J]. *J Vet Med Sci*, 2017, 79: 1986 – 1993.
- [18] Mahittikorn A, Thammasonthijarern N, Roobthaisong A, *et al.* Development of a loop – mediated isothermal amplification technique and comparison with quantitative real – time PCR for the rapid visual detection of canine neosporosis [J]. *Parasit Vectors*, 2017, 10(1): 394.
- [19] Kreitlow A, Becker A, Ahmed M F E, *et al.* Combined loop – mediated isothermal amplification assays for rapid detection and one – step differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in meat products[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 668824.
- [20] Martzy R, Kolm C, Brunner K, *et al.* A loop – mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of *Enterococcus spp.* in water[J]. *Water Res*, 2017, 122: 62 – 69.
- [21] Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, *et al.* DNA detection using recombination proteins[J]. *PLoS Biol*, 2006, 4(7): e204.
- [22] Wang J, Wang J, Li R, *et al.* Rapid and sensitive detection of canine distemper virus by real – time reverse transcription recombinase polymerase amplification[J]. *BMC Vet Res*, 2017, 13(1): 241.
- [23] Hu X, Xiao L, Cong X, *et al.* Development of a recombinase polymerase amplification fluorescence assay to detect feline

- coronavirus[J]. Mol Cell Probes, 2020, 54: 101669.
- [24] Wang J, Liu L, Wang J, Sun X, *et al.* Recombinase polymerase amplification assay – a simple, fast and cost – effective alternative to real time PCR for specific detection of feline herpesvirus – 1 [J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0166903.
- [25] Faye M, Wahed A, Faye O, *et al.* A recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of rabies virus [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 3131.
- [26] Liu L, Wang J, Geng Y, *et al.* Equipment – free recombinase polymerase amplification assay using body heat for visual and rapid point – of – need detection of canine parvovirus 2 [J]. Mol Cell Probes, 2018, 39: 41 – 46.
- [27] Alonso A, Larraga V, Alcolea P J. The contribution of DNA microarray technology to gene expression profiling in *Leishmania* spp: a retrospective view [J]. Acta Trop, 2018, 187: 129 – 139.
- [28] Li J, Xiong W, Chen Q, *et al.* Development of gene clone and diagnostic gene chip for three coronaviruses in canine and feline [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2008, 28(11): 1284 – 1291.
- [29] Wu M, Cong F, Zhu Y, *et al.* Multiplex detection of five canine viral pathogens for dogs as laboratory animals by the luminex xTAG assay[J]. Front Microbiol, 2018, 9: 1783.
- [30] Meng K, Sun W, Zhao P, *et al.* Development of colloidal gold – based immunochromatographic assay for rapid detection of *Mycoplasma suis* in porcine plasma [J]. Biosens Bioelectron, 2014, 55: 396 – 399.
- [31] Shima F K, Gberindyer F A, Tion M T, *et al.* Diagnostic performance of a rapid immunochromatographic test kit for detecting canine parvovirus infection [J]. Top Companion Anim Med, 2021, 45: 100551.
- [32] Jiang W, Liu Y, Chen Y, *et al.* A novel dynamic flow immunochromatographic test (DFICT) using gold nanoparticles for the serological detection of *toxoplasma gondii* infection in dogs and cats [J]. Biosens Bioelectron, 2015, 72: 133 – 139.
- [33] Takano T, Hohdatsu T. Serological diagnosis of feline coronavirus infection by immunochromatographic test [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1282: 33 – 39.
- [34] Wang Y, Bai J J, Li Y F, *et al.* Development of monoclonal antibody – based colloidal gold immunochematographic assay for detecting feline panleukopenia virus [J]. Anhui Agric Sci, 2021, 49(15): 99 – 103.
- [35] Li X, Chen X, Wu J, *et al.* Portable, rapid, and sensitive time – resolved fluorescence immunochromatography for on – site detection of dexamethasone in milk and pork [J]. Foods, 2021, 10(6): 1339.
- [36] Chen C, Liang H, Hu B, *et al.* Determination of parvovirus antigen in the vaccine using time – resolved fluorescence immunoassay [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2021, 68(3): 597 – 602.
- [37] Han R. The expression of circulating antigen of *Toxoplasma gondii* and the development of the lanthanide – labeled fluorescent microspheres immunochromatographic strip for the serological detection of *Toxoplasma gondii* infection [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation, 2018.
- [38] Liu T T. Fluorescent immunochromatographic test strip for detection of canine coronavirus; China, CN213398585U [P]. 2021 – 06 – 08.
- [39] Sun L H. Fluorescent immunochromatographic test strip for detection of feline calicivirus; China, CN213813630U [P]. 2021 – 07 – 27.
- [40] Wei Y, Yang B, Li Y, *et al.* A rapid and quantitative fluorescent microsphere immunochromatographic strip test for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. J Vet Sci, 2020, 21(4): e68.
- [41] Tang Y, Su R H, Hou M J, *et al.* Establishment of immuno – colored nanospheres based agglutination test for detection the antibody against CPV – 2 [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2019, 41(6): 605 – 610.
- [42] Chen C, Guo X, Liang H, *et al.* Determination of parvovirus antibodies in canine serum using magnetic bead – based chemiluminescence immunoassay [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2019, 66: 586 – 590.
- [43] Halmann M, Velan B, Sery T, *et al.* Rapid identification and quantitation of small numbers of microorganisms by a chemiluminescent immunoreaction [J]. Appl Environ Microbiol, 1977, 34: 473 – 477.
- [44] Holec – Gařior L, Ferra B, Czechowska J, *et al.* A novel chemiluminescent immunoassay based on original acridinium ester labels as better solution for diagnosis of human toxoplasmosis than conventional ELISA test [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2018, 91(1): 13 – 19.
- [45] Chen C, Guo X, Liang H, *et al.* Determination of parvovirus antibodies in canine serum using magnetic bead – based

- chemiluminescence immunoassay [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2019, 66(4): 586–590.
- [46] Yang F. A chemiluminescent immunoassay kit for detection of antibodies to canine distemper virus; China, CN109444409A [P]. 2019–03–08.
- [47] 中华人民共和国农业农村部公告第 402 号[EB/OL][2021–03–05]. <http://www.ivdc.cn/tzgg01/gg/20210305-52716.htm>.
- [48] Wu J, Liu Y, Cui Y, *et al.* A laser–induced breakdown spectroscopy–integrated lateral flow strip (LIBS–LFS) sensor for rapid detection of pathogen[J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 142: 111508.
- [49] Jiang S, Hua E, Liang M, *et al.* A novel immunosensor for detecting *Toxoplasma gondii*–specific IgM based on goldmag nanoparticles and graphene sheets [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 101: 481–486.
- [50] Kim YK, Lim SI, Choi S, *et al.* A novel assay for detecting canine parvovirus using a quartz crystal microbalance biosensor [J]. *J Virol Methods*, 2015, 219: 23–27.
- [51] Wang M, Zhang R, Li J. CRISPR/cas systems redefine nucleic acid detection: principles and methods[J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 165: 112430.
- [52] Khan H, Khan A, Liu Y, *et al.* CRISPR–Cas13a mediated nanosystem for attomolar detection of canine parvovirus type 2 [J]. *Chin Chem Lett*, 2019, 30(12): 2201–2204.
- [53] Broughton J P, Deng X, Yu G, *et al.* CRISPR–Cas12–based detection of SARS–CoV–2 [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 870–874.

(编辑:李文平)