网络出版时间:2025-07-18 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.01.014

基于重组酶介导恒温核酸扩增技术快速检测犬传染性肝炎方法的建立

宋绍征[1],顾乐盈[1],武颖超[2],于康英[1],孟雅琴[1]
(1 无锡太湖学院 健康与护理学院 基础医学系,江苏 无锡 214064;
2 江阴市领峰宠物医院,江苏 无锡 214400)

[摘 要] 【目的】建立一种基于重组酶介导恒温核酸扩增(RAA)技术快速检测犬传染性肝炎疾病的方法。【方法】以犬传染性肝炎病原体 1 型犬腺病毒(CAV-1)的 *E*3 基因序列作为靶标序列,设计合成引物和荧光探针,构建重组质粒作为标准品,进行 RAA 基础检测来筛选引物,确立 RAA 荧光反应体系。应用不同含量(10^5,10^4,10^3,10^2,10,1,0.1 COPY/μL)的质粒标准品作为模板,进行 RAA 检测,分析 RAA 检测的灵敏度;分别以 CAV-1、2 型犬腺病毒(CAV-2)、犬细小病毒(CPV)、犬瘟热病毒(CDV)、犬冠状病毒(CCV)、犬副流感病毒(CPIV)的基因组作为模板,进行 RAA 检测,分析 RAA 检测的特异性;选择同批次和不同批次的质粒标准品作为模板,进行 RAA 检测,分析 RAA 检测的重复性。选取经 RT-qPCR 检测为阳性和阴性的临床血液样本各 40 份,进行 RAA 检测,验证 2 种方法的符合情况。【结果】成功扩增到约 419 bp 的 *E*3 基因;构建了阳性质粒标准品 p18TC1,其质量浓度为 200 ng/μL,质粒含量为 5.74×10^{10} COPY/μL。经筛选确立以 CAV-F4/CAV-R3 为引物、以 CAV-P 为探针的 RAA 荧光反应体系,反应温度恒定为 39 ℃,反应时间为 15 min,检测灵敏度为 1 COPY/μL,与 CAV-2、CPV、CDV、CCV、CPIV 等病毒无任何交叉反应,且批内重复试验的变异系数小于 1.00%,批间重复试验的变异系数小于 2.00%。临床样本检测结果表明,建立的基于 RAA 的检测方法与 RT-qPCR 法的符合率为 100%。【结论】建立了基于 RAA 技术的犬传染性肝炎快速检测方法,该方法具有检测快速、灵敏度高、特异性强、重复性好等优点。

[关键词] 犬传染性肝炎;1 型犬腺病毒;重组酶;恒温核酸扩增
[中图分类号] S852.65+5 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)01-0140-08

Establishment of a rapid detection method for canine infectious hepatitis based on recombinase aided isothermal nucleic acid amplification technology

SONG Shaozheng[1],GU Leying[1],WU Yingchao[2],YU Kangying[1],MENG Yaqin[1]
(1 *Department of Basic Medicine,School of Health and Nursing,Wuxi Taihu University,Wuxi,Jiangsu* 214064,*China*;
2 *Jiangyin Lingfeng Pet Hospital,Wuxi,Jiangsu* 214400,*China*)

Abstract:【Objective】This research aimed to establish a rapid detection method for canine infectious hepatitis disease based on recombinase aided isothermal nucleic acid amplification(RAA) technology.【Method】The *E*3 gene sequence of canine infectious hepatitis pathogen canine adenovirus 1 type(CAV-1) was used as the target sequence,and the primers and fluorescent probes were designed and synthesized. The recombinant plasmids were constructed as standard samples for RAA basic detection to screen primers

[收稿日期] 2024-09-11 [修回日期] 2024-10-24
[基金项目] 江苏省高校“青蓝工程”优秀青年骨干教师项目(苏教师函[2021]11 号);江苏省高校自然科学基金项目(19KJB180030,23KJD180008);企业委托横向课题(23WURD088)
[作者简介] 宋绍征(1984—),江苏宿迁人,副教授,博士,主要从事临床兽医学及转基因生物医药与胚胎工程研究。E-mail:ssz0610@163.com

and establish the RAA fluorescence reaction system. Plasmid standards with different concentrations (10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10, 1, 0.1 COPY/μL) were used as templates, to perform RAA detection and analyze the sensitivity of RAA detection. Virus genomes such as CAV-1, canine adenovirus 2 type(CAV-2), canine parvovirus(CPV), canine distemper virus(CDV), canine coronavirus(CCV) and canine parainfluenza virus (CPIV) were used as templates, to perform RAA testing and analyze the specificity of RAA detection. Plasmid standards from the same batch and different batches were used as templates to perform RAA testing and analyze the repeatability of RAA detection. 40 clinical blood samples with positive and negative results detected by RT-qPCR were selected for RAA testing to verify the compliance of the two methods. 【Result】 *E*3 gene of approximately 419 bp was successfully amplified. A positive plasmid standard p18TC1 was constructed, with a mass concentration of 200 ng/μL and a plasmid content of 5.74×10^{10} COPY/μL. After screening, the RAA fluorescence reaction system was established with CAV-F4/CAV-R3 as primers and CAV-P as probes. The reaction temperature was constant at 39 ℃, the reaction time was 15 minutes, and the detection sensitivity was 1 COPY/μL. There was no cross reaction with viruses such as CAV-2, CPV, CDV, CCV, CPIV, etc. The coefficient of variation for intra-batch repeated trials was less than 1.00%, while the coefficient of variation for inter batch repeated trials was less than 2.00%. The clinical sample testing results showed that the established RAA based detection method had a 100% agreement rate with RT-qPCR method. 【Conclusion】 The rapid detection of canine infectious hepatitis based on RAA technology successfully established in this study can be used as a clinical rapid detection kit, with advantages such as fast detection, high sensitivity, strong specificity, and good repeatability.

Key words: canine infectious hepatitis; canine adenovirus 1 type; recombinase; isothermal nucleic acid amplification

犬传染性肝炎(infectious canine hepatitis, ICH)是一种以肝炎为主要临床特征的犬全身性急性败血性传染病，多发生于 1 周岁以内的幼犬，成年犬较少发病[1]。ICH 的病原体为 1 型犬腺病毒(canine adenovirus 1 type, CAV-1)，我国于 1984 年首次分离到该病毒，幼犬感染 CAV-1 的死亡率达到 40%左右，严重威胁着我国犬科动物养殖业和皮毛动物养殖业，也给广大的养宠爱好者造成了巨大的经济损失[2]。近年来，随着 ICH 疫苗的广泛使用，该病群发风险有所下降，但仍然无法避免临床单发病例的出现，且易与犬细小病毒、犬瘟热病毒等发生混合感染，症状更加凸显，导致动物多器官衰竭，难以治疗。有研究表明，早期正确的鉴别诊断，对于 ICH 的临床治疗具有重要意义[3-5]。因此，为了更好地防治 ICH，积极探究和建立一种准确、特异、灵敏的检测方法至关重要。

ICH 的临床症状常以急性坏死性肝炎和出血、角膜浑浊为主，初期症状与犬瘟热或犬钩端螺旋体病极为相似，单凭临床症状和病理变化难以进行正确的鉴别诊断，因此需要进行实验室特异性诊断，例如病毒分离、ELISA、皮内变态反应、血凝抑制试验、PCR 检测等[6-7]。但是，上述这些方法存在操作繁杂、检测耗时长、灵敏度低、仪器设备成本高等缺陷，且容易产生误诊和漏诊的现象。随着分子生物学检测技术的飞速发展，近年来，重组酶介导恒温核酸扩增(recombinase aided isothermal nucleic acid amplification, RAA)检测技术应运而生，该技术是一种新型核酸检测方法，可替代 PCR 技术，能够在恒温条件下，20 min 内便可实现对目标核酸片段快速扩增，且结合荧光探针可进行即时检测，具有检测便捷、快速、灵敏、精准等优点，现已开始逐步应用于各种动物疫病病原体的检测工作中[8-10]。

为了满足快速、精准地检测 ICH 的需要，本研究选取 CAV-1 的 *E*3 基因保守序列进行引物和荧光探针设计，优化反应条件，建立了一种基于 RAA 的 ICH 快速检测方法，旨在为 ICH 的快速鉴别诊断提供新的技术手段。

1　材料与方法

1.1　材　料

1.1.1　生物材料　CAV-1、CAV-2、犬细小病毒(canine parvovirus, CPV)、犬瘟热病毒(canine distemper virus, CDV)、犬冠状病毒(canine coronavirus, CCV)、犬副流感病毒(canine parainfluenza vi-

rus,CPIV)等病毒组织样品,由江阴市领峰宠物医院提供。经 RT-qPCR 鉴定为阳性和阴性的临床血液样本各 40 份,均收集于江苏省各宠物医院。含 CAV-1 *E*3 保守序列基因片段的重组质粒菌种,由本实验室构建和保存。大肠杆菌感受态细胞 DH5α,购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂 病毒基因组 DNA 抽提试剂盒,OMEGA 公司产品;质粒提取试剂盒,Invitrogen 公司产品;等温核酸扩增检测试剂盒,乐尚生物科技有限公司产品;pMD™18-T 载体、dNTPs、DNA 聚合酶、连接酶、各种限制性内切核酸酶、DL2000 DNA Marker,TaKaRa 公司产品;琼脂糖、TAE 电泳缓冲液,Hyclone 产品。其他试剂均购自国药集团和北京索莱宝科技有限公司。

1.1.3 引物与探针 根据 GenBank 中公布的 CAV-1 基因序列(登录号为 KJ451612.1),选择其保守基因序列 *E*3 作为模板设计引物和探针,引物和探针序列由上海生工生物工程有限公司合成,具体信息见表 1。

表 1 引物和探针序列

Table 1 Primer and probe sequence

引物/探针名称 Primer/Probe Name	序列(5′→3′) Sequence (5′→3′)
CAVE3-F	CTGCCACCAGATGCCGTATGA
CAVE3-R	ACAATGTGGTCTCTCCCGACA
CAV-F1	TGGCTGGTAAAATGCAGCCATAACAAAACTT
CAV-F2	ATGCAGCCATAACAAAACTTTCTTTCTGCC
CAV-F3	AACTTTCTTTCTGCCATTTGTTCTAGACTCT
CAV-F4	TGCCATTTGTTCTAGACTCTGCAAAAAGTGCT
CAV-F5	TAGACTCTGCAAAAAGTGCTCCCATTATTATGA
CAV-R1	TTGTCAAGACTTCTGGGTCCTGTGTCTCTAT
CAV-R2	TCTGGGTCCTGTGTCTCTATGTCCACAAGGGC
CAV-R3	TGTCTCTATGTCCACAAGGGCCCCCTCTTCCCA
CAV-R4	GTCCACAAGGGCCCCCTCTTCCCAACTTTGA
CAV-R5	CTCTTCCCAACTTTGATACTTCCACTTGTGT
CAV-P	ACATTTCCATGATATTTTTAATTGTAAGCCTGCTAACCTTTCTAAATGT

1.2 方 法

1.2.1 质粒标准品的制备 无菌采集 ICH 病犬的血液,用病毒基因组 DNA 抽提试剂盒提取 CAV-1 基因组 DNA。以 CAV-1 基因组 DNA 作为模板,用引物 CAVE3-F 和 CAVE3-R PCR 扩增 *E*3 基因。PCR 反应体系(50 μL):5 μL 10×PCR Buffer,2 μL 50 mmol/L $MgCl_2$,1 μL dNTPs,2 μL 上游引物,2 μL 下游引物,0.5 μL *Taq* DNA 聚合酶,2 μL 模板,35.5 μL 灭菌超纯水。反应条件:95 ℃预变性 2 min;94 ℃变性 40 s,48 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 50 s,共 32 个循环;72 ℃继续延伸 5 min,4 ℃静置 20 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后,割胶纯化回收目标片段,按照常规分子生物学方法进行 T-A 克隆,与 pMD™18-T 载体连接构建重组质粒,42 ℃热激法将其导入大肠杆菌感受态细胞 DH5α,冰浴静置 3 min,加入细菌液态培养液中,37 ℃下 200 r/min 振荡培养 2 h,接种培养板,筛选阳性克隆菌株。将阳性克隆菌株扩大培养,提取质粒 DNA,进行 *Eco* l47I 双酶切(2 个位点均为 *Eco* l47I 酶切位点)鉴定和测序(测序由上海生工生物工程有限公司完成)鉴定。对鉴定正确的阳性克隆菌株进行保种,置于-40 ℃保存,其质粒作为阳性质粒标准品(命名为 p18TC1),测定质粒 DNA 质量浓度,计算质粒含量。

1.2.2 引物筛选 采取矩阵法筛选表 1 中的上、下游引物,首先随机选取一条上游引物 CAV-F1,分别与下游引物 CAV-R1、CAV-R2、CAV-R3、CAV-R4、CAV-R5 进行配对组合,以 10^7 COPY/μL 阳性质粒标准品作为模板,进行 RAA 检测,筛选下游引物。然后选择扩增效果较好的下游引物再分别与上游引物 CAV-F1、CAV-F2、CAV-F3、CAV-F4、CAV-F5 进行配对组合,进行 RAA 检测,筛选上游引物。取出基础反应单元冻干粉,依次向冻干粉反应管中加入 25 μL 反应单元缓冲液、2 μL 上游引物、2 μL 下游引物、2 μL 质粒标准品 p18TC1 模板、1 μL 500 mmol/L 醋酸镁,补充灭菌超纯水至 50 μL,立刻混匀,充分溶解后,转移至 37 ℃恒温水浴锅孵育 30 min。同时,以灭菌超纯水代替上下游引物作为阴性对照,其余反应体系相同。待反应结束后,向每管中加入 50 μL 体积比为 1∶1 的苯酚/氯

仿混合液，充分振荡混匀，12 000 r/min 离心 3 min，提取 DNA。使用微量移液器轻轻吸取上清液 9 μL，转移至另一洁净的离心管中，添加 1 μL 10× Loading Buffer，反复抽吸混匀后，用含 EB 染液的 1%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.2.3　RAA 荧光反应体系的配制　参考等温核酸扩增检测试剂盒说明书，配制 RAA 荧光反应体系。在荧光反应单元冻干粉中依次添加 25 μL 反应单元缓冲液、2 μL 上游引物、2 μL 下游引物、1 μL 荧光标记探针 CAV-P、2 μL 质粒标准品 p18TC1 模板、1 μL 500 mmol/L 醋酸镁，补充灭菌超纯水至 50 μL。待所有溶液添加结束后，迅速溶解混匀，1 500 r/min 离心 20 s，然后转移至核酸扩增荧光检测仪器中，设置温度为 39 ℃，运行 20 min，观察荧光扩增曲线情况，并记录荧光信号值，判定结果。试验设以灭菌超纯水代替模板 DNA 的处理为阴性对照。

1.2.4　RAA 的灵敏性检测　对构建的阳性质粒标准品 p18TC1 依次进行 10 倍倍比稀释，形成 10^5，10^4，10^3，10^2，10，1 和 0.1 COPY/μL 等 7 个梯度的样本模板，同时选择灭菌超纯水作为阴性对照模板，采用 1.2.3 节建立的 RAA 荧光反应体系进行试验，观察其荧光扩增曲线情况，并记录荧光信号值。

1.2.5　RAA 的特异性检测　选择 CAV-1 及其他临床常见或与 ICH 症状类似的其他犬病相关病毒 CAV-2、CPV、CDV、CCV、CPIV 等组织样本，提取病毒基因组核酸作为模板，按照已建立的 RAA 荧光反应体系进行检测，同时设置灭菌超纯水代替模板的处理作为阴性对照，选择 10^3 COPY/μL 质粒标准品作为阳性对照样本，评价该方法检测 ICH 的特异性。

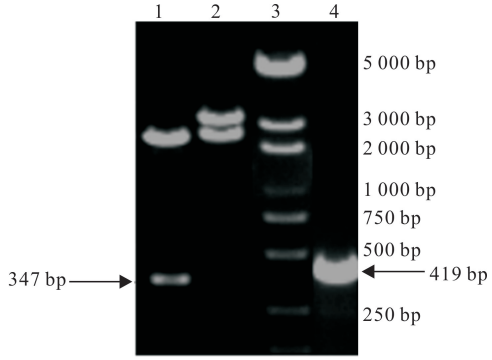
1.2.6　RAA 的重复性检测　选择同批次 10^5，10^3 和 10 COPY/μL 的 p18TC1 阳性质粒标准品作为 RAA 检测模板，每个样本检测 4 次，观察和记录荧光信号，计算其组内变异系数。同时，选择不同批次的 p18TC1 阳性质粒标准品进行试验，计算组间变异系数。通过统计学分析，评价 RAA 法检测 CAV-1 的重复性情况。

1.2.7　临床样本检测验证　选择临床收集的经 RT-qPCR 鉴定的 40 份 ICH 阳性和 40 份 ICH 阴性血液样本的 DNA 作为扩增模板，应用本研究建立的 RAA 技术体系进行快速检测，设置质粒标准品代替 DNA 的处理为阳性对照，灭菌超纯水代替 DNA 的处理为阴性对照，观察和记录检测结果。

2　结果与分析

2.1　阳性质粒标准品的鉴定

使用 CAVE3-F 和 CAVE3-R 引物组合对 CAV-1 *E*3 基因进行 PCR 扩增，经 1%琼脂糖凝胶电泳分析，其扩增产物电泳条带大小约为 419 bp，与目的基因相符（图 1）。构建的 p18TC1 质粒经 *Eco* l47I 限制性内切酶双酶切后，在 1%琼脂糖凝胶电泳上显示出一条大小约为 347 bp 的特异性电泳条带，而未经酶切的原 p18TC1 质粒在电泳中并未出现这一条带，与预期结果一致（图 1）。构建的 p18TC1 质粒经割胶纯化回收后测序，结果显示其目标基因序列与 CAV-1 保守区域 *E*3 基因序列完全一致，同源性达 100%，经鉴定 p18TC1 阳性质粒标准品完全正确，质粒 DNA 质量浓度为 200 ng/μL，质粒含量为 5.74×10^{10} COPY/μL。



1. 重组 p18TC1 质粒 *Eco* l47I 限制性内切酶双酶切产物；2. 重组质粒 p18TC1；3. 5K DNA Marker；4. CAV-1 *E*3 基因序列的 PCR 扩增。

1. Recombinant p18TC1 plasmid was digested by *Eco* l47I restriction endonuclease; 2. Recombinant plasmid p18TC1; 3. 5K DNA Marker; 4. PCR amplification of the CAV-1 *E*3 gene sequence.

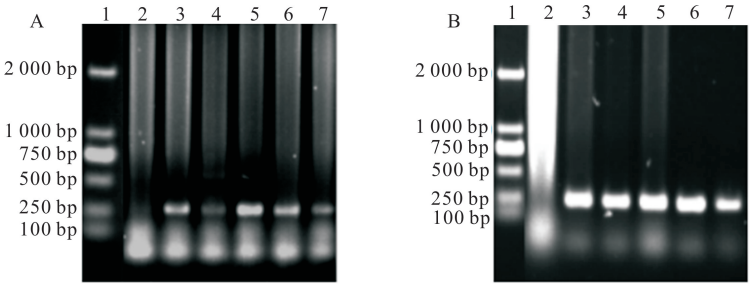
图 1　质粒标准品构建与鉴定的电泳图谱

Fig. 1　Electrophoretic map for the construction and identification of plasmid standards

2.2　引物配对组合筛选分析

下游引物筛选如图 2-A 所示，除了阴性对照未扩增出任何条带外，其余各种引物配对组合均可扩增出明显的条带，其中引物 CAV-F1/CAV-R3 配对组合的 RAA 检测效果较好，电泳条带最亮，灵敏度高，特异性强，因此确定下游最佳引物为 CAV-R3。上游引物筛选如图 2-B 所示，阴性对照没有扩增出任何条带，其余各引物组合均能够扩增出明显的特异性条带，其中引物 CAV-F4/CAV-R3 配对组合扩增效果较好，条带较明亮，因此确定上游最佳引物为 CAV-F4。结果表明，试验最佳引物组合为 CAV-

F4/CAV-R3。



A. 上游引物 CAV-F1 与不同下游引物配对组合扩增结果,1. DL2000 DNA Marker,2. 阴性对照,3～7. 分别为引物 CAV-F1 与 CAV-R1、CAV-R2、CAV-R3、CAV-R4、CAV-R5 组合的扩增产物。B. 下游引物 CAV-R3 与不同上游引物配对组合扩增结果,1. DL2000 DNA Marker,2. 阴性对照,3～7. 分别为引物 CAV-F1、CAV-F2、CAV-F3、CAV-F4、CAV-F5 与 CAV-R3 组合的扩增产物。

A. Amplification results of upstream primer CAV-F1 paired with different downstream primers,1. DL2000 DNA Marker,2. Negative control,3－7. The amplification products are the combinations of primer CAV-F1 with CAV-R1,CAV-R2,CAV-R3,CAV-R4,and CAV-R5.

B. Amplification results of downstream primer CAV-R3 paired with different upstream primers,1. DL2000 DNA Marker,2. Negative control,3－7. The amplification products are the combination of primers CAV-F1,CAV-F2,CAV-F3,CAV-F4,CAV-F5 and CAV-R3.

图 2 不同引物配对组合的 RAA 产物凝胶电泳检测

Fig. 2 Gel electrophoresis detection of RAA products with different primer pairs

2.3 RAA 检测方法的灵敏度分析

对含 CAV-1 *E*3 基因序列的阳性质粒标准品进行 10 倍梯度稀释后作为模板,进行 RAA 检测,结果如图 3 所示。

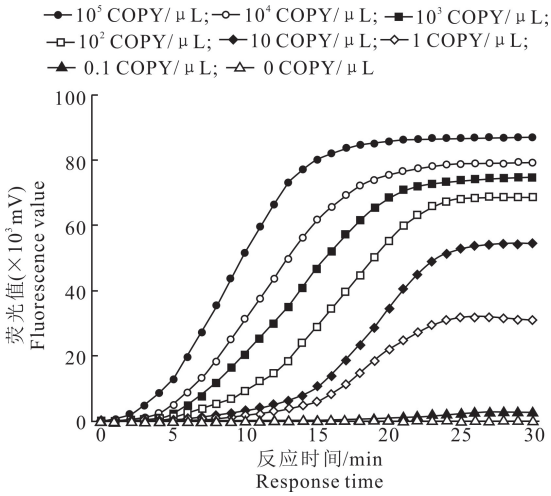


图 3 RAA 检测 CAV-1 的灵敏度试验

Fig. 3 Sensitivity test of RAA detection for CAV-1

图 3 表明,p18TC1 标准品质粒含量为 10^5,10^4,10^3,10^2,10,1 COPY/μL 时,均可在 15 min 内观察到明显的荧光曲线,但是曲线峰值强度随着 p18TC1 标准品质粒含量的减小而逐渐降低,起峰时间也相应地延迟。0.1 COPY/μL 的 p18TC1 质粒标准品和灭菌超纯水经 RAA 检测未见任何明显的荧光曲线出现。结果表明,本试验建立的基于 RAA 技术的 ICH 快速检测方法的最低检出限为 1 COPY/μL,即检测灵敏度为 1 COPY/μL。

2.4 RAA 检测方法的特异性分析

由图 4 可知,CAV-1 和阳性质粒标准品 p18TC1 在 15 min 内出现明显的荧光曲线,其他样本和灭菌超纯水均未出现明显的荧光曲线。结果表明,本试验建立的 RAA 法检测 ICH 具有良好的特异性,可对 CAV-1 基因组 DNA 进行特异性扩增,与其他临床常见病毒无交叉反应。

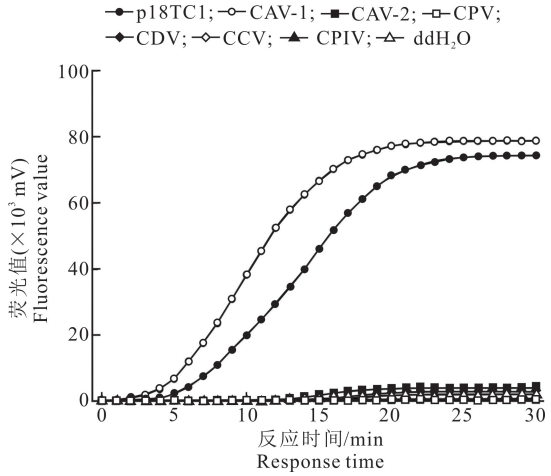


图 4 RAA 检测 CAV-1 的特异性试验

Fig. 4 Specific test of RAA detection for CAV-1

2.5 RAA 检测方法的重复性分析

由表 2 可知,RAA 法检测 CAV-1 的组内变异系数均小于 1.00%(CV 值分别为 0.69%,0.73%和 0.85%),表明同一批次内的检测重复性能良好;组间变异系数均小于 2.00%(CV 值分别为 1.48%,1.16%和 0.92%),表明不同批次间的检测重复性

能良好。

表 2　RAA 检测 CAV-1 的组内和组间重复性试验（$n=4$）

Table 2　Intragroup and intergroup repeatability tests of RAA detection for CAV-1（$n=4$）

质粒含量/（COPY·μL^{-1}） Plasmid content	组内重复试验 Intra-assay		组间重复试验 Inter-assay	
	荧光强度 Fluorescence intensity	变异系数/% Coefficient of variation	荧光强度 Fluorescence intensity	变异系数/% Coefficient of variation
10^5	86 834±596	0.69	87 090±1 290	1.48
10^3	75 151±549	0.73	74 851±870	1.16
10	53 716±459	0.85	54 456±502	0.92

2.6　临床样本检测情况分析

应用本试验建立的 RAA 法对 40 份 ICH 临床阳性样本和 40 份 ICH 临床阴性样本的血液基因组 DNA 进行检测，结果显示，40 份 RT-qPCR 检测阳性样本全部检测为阳性，阳性率为 100%；40 份 RT-qPCR 检测阴性样本均检测为阴性，阴性率为 100%。RAA 检测 ICH 的结果与 RT-qPCR 检测结果完全一致，检测结果符合率为 100%。

3　讨　论

犬是人类最早驯养的哺乳动物之一，据联合国统计数据，目前全球饲养的犬只大约有 6 亿只[11-14]。ICH 属于动物二类传染病，病犬和带毒犬是本病的主要传染源，消化道感染和胎盘感染是主要的传播方式[3]。本病发生一般无明显季节性，幼犬一旦感染病死率极高，甚至数小时内便可导致死亡[5]。因此，早期临床的正确诊断对于该病的防治起着至关重要的作用。目前，ICH 的检测方法除了临床症状和血象分析外，实验室常用的检测方法主要有 ELISA、皮内变态反应、红细胞凝集和血凝抑制试验、PCR 等，但这些方法存在灵敏度和鉴别诊断可靠性不高的问题，极容易误诊、漏诊[4,15]。因此，建立一种灵敏度高、特异性强的临床检测方法，对于该病的正确诊断和精准防控具有十分重要的临床意义[16-17]。随着现代诊断技术和生命科学技术的不断发展，常规 PCR 技术已无法满足当前动物疫病的检测需求。近年来，疫病检测领域出现了 RAA 检测方法，可替代常规 PCR，具有温度恒定、操作便捷、检测时间短、反应灵敏、特异性强等特点[18-22]，受到很多国内外检测工作者和临床兽医师的广泛青睐。目前，RAA 用于疫病检测已有一些文献报道，例如 PAENKAEW 等[20]建立了犬立克次氏体 RAA 检测方法，其检测温度恒定在 37 ℃，检测时间 20 min 内，灵敏度达到 100 COPY/μL，且与其他病原体没有交叉反应。XIAO 等[21]建立了基于 RAA 检测犬 2 型腺病毒的方法，该方法可以在 39 ℃恒定温度条件下，15 min 内检测出犬 2 型腺病毒，检测灵敏度为 214 COPY/μL，且与 CDV、CCV、CPV 等病毒无交叉反应。COERTSE 等[22]利用逆转录 RAA 方法检测狂犬病病毒，灵敏度为 562 COPY/μL，时间仅需要 20 min，特异性强，临床样本验证诊断狂犬病病毒的符合率达到 100%。但是，将 RAA 检测技术应用于 ICH 疾病诊断中的相关研究，至今国内外尚鲜见报道。

ICH 是由 CAV-1 所引起的一种犬科动物急性败血性传染病，CAV-1 是哺乳动物腺病毒属中致病性最强的病毒之一[23-24]，由 252 个壳粒呈 20 面体对称排列组成，衣壳里包含一条长度为 36 kb 的线状双链 DNA 分子，基因组包含病毒复制相关基因 $E1\sim E4$ 和病毒颗粒组装相关基因 $L1\sim L5$ 等成份[25]。有研究表明，病毒复制相关基因 $E3$ 的核苷酸序列具有高度保守性[26-28]。因此，本研究选择 $E3$ 基因序列作为目的基因，建立了基于重组酶介导恒温核酸扩增技术的 ICH 快速检测方法，该方法反应温度恒定为 39 ℃，反应时间为 15 min，检测灵敏度为 1 COPY/μL，与 CAV-1、CAV-2、CPV、CDV、CCV、CPIV 等病毒无任何交叉反应，且批内、批间重复试验的变异系数较小，与 RT-PCR 检测结果完全一致。关于 CAV-1 分子检测方法，目前主要有 PCR 技术和 LAMP 技术，温书坤等[29]建立了 PCR 方法，曹丙蕾等[30]建立了 LAMP 快速检测方法，但其检测灵敏度均远远低于本研究结果。表明本研究建立的 RAA 法用于 ICH 检测具有良好的性能，灵敏度高、特异性强、重复性好，优于国内外其他相关文献报道[5,30]。

本研究采用矩阵法筛选引物，先选择一条上游引物与不同的下游引物进行配对组合，筛选出性能最佳的下游引物，再将其与不同的上游引物配对组合进行试验，最终仅需要进行 10 个配对组合即可筛选出最佳引物组合，简化了操作流程，节省了人力和成本。同时，本研究还选择了构建重组载体质粒作为阳性标准品，这是由于质粒具有相对分子量小、便

于分离和操作、不受核基因组控制可进行独立复制、携带质粒含量高、性能稳定等优点,常用于各类PCR及核酸扩增检测方法的对照标准品[31-33]。

本研究成功建立了基于重组酶介导恒温核酸扩增技术快速检测ICH的方法,该方法具有检测速度快、灵敏度高、特异性强、重复性好等优点,值得推广应用。本研究结果为ICH的快速检测提供了技术手段,并为其他宠物疫病精准、快速诊断方法的建立提供了新的思路。

[参考文献]

[1] PEREIRA F M,DE OLIVEIRA A R,MELO E S,et al. Naturally acquired infectious canine hepatitis in two captive maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) puppies[J]. Journal of Comparative Pathology,2021,186:62-68.

[2] MATSUGO H,KOBAYASHI-KITAMURA T,KAMIKI H,et al. Establishment of a simple and efficient reverse genetics system for canine adenoviruses using bacterial artificial chromosomes[J]. Viruses,2020,12(7):767.

[3] POLOVITZER J,GUIJA-DE-ARESPACOCHAGA A,AUER A,et al. Successful treatment of coagulation disorders and hypoalbuminaemia in a puppy with infectious canine hepatitis[J]. Tierarztliche Praxis Ausgabe K,Kleintiere/Heimtiere,2022,50(4):302-307.

[4] 于春霞. 犬传染性肝炎症状及诊疗技术[J]. 中国畜禽种业,2022,18(6):42-43.
YU C X. Symptoms and diagnostic techniques of canine infectious hepatitis[J]. The Chinese Livestock and Poultry Breeding,2022,18(6):42-43.

[5] HORNSEY S J,PHILIBERT H,GODSON D L,et al. Canine adenovirus type 1 causing neurological signs in a 5-week-old puppy[J]. BMC Veterinary Research,2019,15(1):418.

[6] BALSEIRO A,ROYO L J,GAYO E,et al. Mortality causes in free-ranging Eurasian brown bears (*Ursus arctos arctos*) in Spain 1998—2018[J]. Animals,2020,10(9):1538.

[7] 吴思奇. 犬传染性肝炎的诊断与治疗措施[J]. 吉林畜牧兽医,2022,43(9):121-122.
WU S Q. Diagnosis and treatment of canine infectious hepatitis[J]. Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine,2022,43(9):121-122.

[8] TIAN J,CHEN B,ZHANG B,et al. A new auto-RPA-fluorescence detection platform for SARS-CoV-2[J]. Laboratory Medicine,2023,54(2):182-189.

[9] MIAO J,ZUO L L,HE D M,et al. Rapid detection of Nipah virus using the one-pot RPA-CRISPR/Cas13a assay[J]. Virus Research,2023,332:199130.

[10] DANTHANARAYANA A N,NANDY S,KOURENTZI K,et al. Smartphone-readable RPA-LFA for the high-sensitivity detection of Leishmania kDNA using nanophosphor reporters[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases,2023,17(7):e0011436.

[11] PALLOTTI S,PIRAS I S,MARCHEGIANI A,et al. Dog-human translational genomics:state of the art and genomic resources[J]. Journal of Applied Genetics,2022,63(4):703-716.

[12] CORSATO ALVARENGA I,PANICKAR K S,HESS H,et al. Scientific validation of cannabidiol for management of dog and cat diseases[J]. Annual Review of Animal Biosciences,2023,11:227-246.

[13] MILLS G. Dog bites more prevalent on hot and sunny days[J]. The Veterinary Record,2023,193(1):10-11.

[14] GIRAUDET C S E,LIU K,MCELLIGOTT A G,et al. Are children and dogs best friends? A scoping review to explore the positive and negative effects of child-dog interactions[J]. Peer J,2022,10:e14532.

[15] 谢长文,荣宗洋. 犬传染性肝炎的诊断与治疗[J]. 当代畜牧,2022(7):34-37.
XIE C W,RONG Z Y. Diagnosis and treatment of canine infectious hepatitis[J]. Contemporary Animal Husbandry,2022(7):34-37.

[16] YAN J Y,XU Z C,ZHOU H,et al. Integration of CRISPR/Cas12a and multiplexed RPA for fast detection of gene doping[J]. Analytical Chemistry,2022,94(47):16481-16490.

[17] UNO N,LI Z Y,LIU C C. Single-tube one-step gel-based RT-RPA/PCR for highly sensitive molecular detection of HIV[J]. Analyst,2023,148(4):926-931.

[18] LEI R,KUANG R R,PENG X Z,et al. Portable rapid detection of maize chlorotic mottle virus using RT-RAA/CRISPR-Cas12a based lateral flow assay[J]. Frontiers in Plant Science,2023,14:1088544.

[19] 黄强,张强强,顾沛雯. 葡萄霜霉病菌LFD-RPA检测体系的建立[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2024,53(4):1-9.
HUANG Q,ZHANG Q Q,GU P W. Establishment of LFD-RPA detection system for grape downy mildew[J]. Journal of Northwest A&F University(Natural Science Edition),2024,53(4):1-9.

[20] PAENKAEW S,JAITO N,PRADIT W,et al. RPA/CRISPR-cas12a as a specific,sensitive and rapid method for diagnosing *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Thailand[J]. Veterinary Research Communications,2023,47(3):1601-1613.

[21] XIAO L,ZHANG M D,TIAN Z G,et al. Development of a recombinase polymerase amplification fluorescence assay for the detection of canine adenovirus 2[J]. Frontiers in Veterinary Science,2021,8:596877.

[22] COERTSE J,WEYER J,NEL L H,et al. Reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of canine associated rabies virus in Africa[J]. PLoS One,2019,14(7):e0219292.

[23] MIRA F,PULEIO R,SCHIRÒ G,et al. Study on the canine adenovirus type 1 (CAdV-1) infection in domestic dogs in

southern Italy[J]. Pathogens，2022，11(11)：1254.

[24] SILVA M L，CAIAFFA M G，DA COSTA A L M，et al. Canine distemper virus and canine adenovirus type 1 co-infection in a free-living hoary fox (*Lycalopex vetulus*) from Brazil [J]. Brazilian Journal of Microbiology，2023，54(1)：587-595.

[25] BALBONI A，TERRUSI A，URBANI L，et al. Canine circovirus and canine adenovirus type 1 and 2 in dogs with parvoviral enteritis[J]. Veterinary Research Communications，2022，46(1)：223-232.

[26] ZHU Y Z，XU J F，LIAN S Z，et al. Difference analysis between canine adenovirus types 1 and 2[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology，2022，12：854876.

[27] BALBONI A，TRYLAND M，MØRK T，et al. Unique genetic features of canine adenovirus type 1 (CAdV-1) infecting red foxes (*Vulpes vulpes*) in northern Norway and Arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in Svalbard[J]. Veterinary Research Communications，2019，43(2)：67-76.

[28] CANUTI M，FRY K，DEAN CLUFF H，et al. Co-circulation of five species of dog parvoviruses and canine adenovirus type 1 among gray wolves (*Canis lupus*) in northern Canada[J]. Transboundary and Emerging Diseases，2022，69(5)：e1417-e1433.

[29] 温书坤，周爱军，崔言顺. PCR 检测犬传染性肝炎病毒方法的建立[J]. 山东畜牧兽医，2007，28(5)：1-2.
WEN S K，ZHOU A J，CUI Y S. Establishment of PCR method for detecting canine infectious hepatitis virus[J]. Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine，2007，28(5)：1-2.

[30] 曹丙蕾，凌宗帅，邱洪凯. LAMP 快速检测犬传染性肝炎方法的建立及应用[J]. 中国动物检疫，2014，31(8)：73-76.
CAO B L，LING Z S，QIU H K. Establishment and application of LAMP for the rapid detection of infectious canine hepatitis[J]. China Animal Health Inspection，2014，31(8)：73-76.

[31] LI X G，JIN J C，GUO Z Y，et al. Evolution of plasmid-construction[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2022，209(Pt A)：1319-1326.

[32] 高睿，徐伟，罗艳，等. 4 种致牛腹泻病毒多重荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2023，51(10)：20-28.
GAO R，XU W，LUO Y，et al. Establishment and application of multiple fluorescent quantitative PCR for detection of 4 bovine diarrhea viruses[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)，2023，51(10)：20-28.

[33] KIYOKAWA K，YAMAMOTO S，MORIGUCHI K，et al. Construction of versatile yeast plasmid vectors transferable by Agrobacterium-mediated transformation and their application to bread-making yeast strains[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering，2023，136(2)：142-151.

(责任编辑：马秋明)

(上接第 139 页)

[18] DURLINGER A L，GRUIJTERS M J，KRAMER P，et al. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary[J]. Endocrinology，2001，142(11)：4891-4899.

[19] VISSER J A，THEMMEN A P N. Role of anti-Müllerian hormone and bone morphogenetic proteins in the regulation of FSH sensitivity[J]. Molecular and Cellular Endocrinology，2014，382(1)：460-465.

[20] POOLE D H，OCÓN-GROVE O M，JOHNSON A L. Anti-Müllerian hormone (AMH) receptor type Ⅱ expression and AMH activity in bovine granulosa cells[J]. Theriogenology，2016，86(5)：1353-1360.

[21] UMER S，SAMMAD A，ZOU H Y，et al. Regulation of AMH AMHR-II and BMPs (2，6) genes of bovine granulosa cells treated with exogenous FSH and their association with protein hormones[J]. Genes，2019，10(12)：1038.

[22] DANG T T H，YUN J W. BMP10 positively regulates myogenic differentiation in C2C12 myoblasts via the SMAD1/5/8 signaling pathway[J]. Molecular and Cellular Biochemistry，2021，476(5)：2085-2097.

[23] FU Y X，WANG F M，OU-YANG X E，et al. Anti-Müllerian hormone regulates stem cell factor via cAMP/PKA signaling pathway in human granulosa cells by inhibiting the phosphorylation of CREB[J]. Reproductive Sciences，2020，27(1)：325-333.

[24] 张超思. PKA-CREB 介导食欲素 A 调节绵羊卵巢黄体化颗粒细胞分泌孕酮的研究[D]. 呼和浩特：内蒙古农业大学，2019.
ZHANG C S. PKA-CREB mediates orexin A to regulate progesterone secretion from ovine luteinized granulosa cells[D]. Hohhot：Inner Mongolia Agricultural University，2019.

[25] SOMERS J P，DELOIA J A，ZELEZNIK A J. Adenovirus-directed expression of a nonphosphorylatable mutant of CREB (cAMP response element-binding protein) adversely affects the survival，but not the differentiation，of rat granulosa cells [J]. Molecular Endocrinology，1999，13(8)：1364-1372.

(责任编辑：马秋明)