

# 非洲马瘟病毒检测技术概述

赵晓娜<sup>1</sup>, 龙云凤<sup>1</sup>, 艾军<sup>2</sup>, 陆冠亚<sup>1</sup>, 周萍<sup>1</sup>, 朱悦<sup>1</sup>, 戴晓蓉<sup>2</sup>, 姜焱<sup>1</sup>, 祝贺<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>南京海关动植物与食品检测中心, 江苏 南京

<sup>2</sup>昆明海关技术中心, 云南 昆明

收稿日期: 2023年9月7日; 录用日期: 2023年10月6日; 发布日期: 2023年10月12日

## 摘要

非洲马瘟是由非洲马瘟病毒引起的具有急性或亚急性的虫媒传染病, 死亡率高达95%, 有明显的季节性和地域性。目前对于患病马匹无有效治疗措施, 发生可疑病例时, 必须进行检测、扑杀和隔离, 才能阻断病毒的传播, 因此亟需建立简便、快速、有效的检测方法。通过介绍当前使用的非洲马瘟病毒的检测方法, 归纳出各种方法的优缺点, 并对非洲马瘟病毒检测技术的发展方向进行阐述。

## 关键词

非洲马瘟, 非洲马瘟检测技术, 聚合酶链式反应(PCR), 重组酶聚合酶扩增技术(RPA), 环介导等温扩增(LAMP)

# Overview of African Horse Sickness Virus Detection Technology

Xiaona Zhao<sup>1</sup>, Yunfeng Long<sup>1</sup>, Jun Ai<sup>2</sup>, Guanya Lu<sup>1</sup>, Ping Zhou<sup>1</sup>, Yue Zhu<sup>1</sup>, Xiaorong Dai<sup>2</sup>, Yan Jiang<sup>1</sup>, He Zhu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Animal, Plant, and Food Inspection Center of Nanjing Customs, Nanjing Jiangsu

<sup>2</sup>Technical Center of Kunming Customs, Kunming Yunnan

Received: Sep. 7<sup>th</sup>, 2023; accepted: Oct. 6<sup>th</sup>, 2023; published: Oct. 12<sup>th</sup>, 2023

## Abstract

African horse sickness is a kind of infectious disease caused by African horse sickness virus. It is acute or subacute insect-borne infectious diseases, fatality rate is as high as 95%, and it is obviously seasonal and regional. At present, there is no specific treatment for infected horses. Test, culling and isolation are necessary when disease outbreak. Therefore, there is also a need to es-

\*通讯作者。

文章引用: 赵晓娜, 龙云凤, 艾军, 陆冠亚, 周萍, 朱悦, 戴晓蓉, 姜焱, 祝贺. 非洲马瘟病毒检测技术概述[J]. 农业科学, 2023, 13(10): 910-917. DOI: 10.12677/hjas.2023.1310126

establish nucleic acid detection methods which are simple, fast and efficient. This paper introduces several methods of detecting African horse sickness virus which are widely spread, and summarizes the advantages and disadvantages of these methods. It also illustrates the development direction of the detection technology of African horse sickness virus.

## Keywords

African Horse Sickness, African Horse Sickness Detection Technology, Polymerase Chain Reaction, Recombinase Polymerase Amplification, Loop-Mediated Isothermal Amplification

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

非洲马瘟(African Horse Sickness, AHS)是由非洲马瘟病毒(African Horse Sickness Virus, AHSV)感染马科动物引起的一种非接触性传染的疾病。以呼吸系统和循环系统功能变化为特征,主要临床症状表现为发热、皮下水肿和脏器出血[1],被世界动物卫生组织(WOAH)列为必须报告的动物疫病,我国将其列为一类动物疫病[2]。非洲马瘟病毒(African Horse Sickness Virus, AHSV)属于呼肠孤病毒科环状病毒属,病毒无囊膜,直径约 75 nm,基因组由 10 个双链 RNA 片段组成,分别编码 7 种结构蛋白(VP1-7) [3] [4] 和 4 种非结构蛋白(NS1-3、NS3A) [5]。根据病毒中和试验,AHSV 分为 9 个血清型,血清型之间有交叉反应[6],但与其他环状病毒无交叉反应。

起初,非洲马瘟因起源于非洲而得名,主要流行于撒哈拉以南的非洲南部地区,在非洲的东部和南部发现 AHSV 的所有血清型,而非洲西部和北部仅发现部分血清。从当地零星爆发,然后传至地中海沿岸国家[7]。历史上曾爆发本病的国家还有西班牙和葡萄牙[8],近期 2004 年和 2019 年,赞比亚和博茨瓦纳与喀麦隆分别报道了 AHS 的爆发。2020 年 3 月,泰国暴发了非洲马瘟[9],同年 8 月 6 日,马来西亚暂停“AHS 无疫国状态”。目前,我国虽还未发现非洲马瘟疫情,但周边国家的疫情情况为我们敲响了警钟。非洲马瘟为虫媒传染病,主要通过库蠓等吸血昆虫的叮咬在易感动物间传播,我国境内存在超过 300 种库蠓属昆虫,加之各国马匹贸易不断增长,AHSV 传入我国的风险极大。对非洲马瘟实验室检测方法进行阐述和评价,为我国边防口岸的防疫工作提供参考,保障我国畜牧业健康发展。

目前,AHS 的检测方法较多,对疑似患病动物可根据临床症状进行初步诊断,尽管其临床症状和病理变化较为典型,但仍可与其他疾病相混淆,需通过实验室诊断技术对其进行确诊。在 AHS 的多种实验室诊断技术中,病毒分离、病毒中和试验、补体结合试验、ELISA 和 RT-PCR 方法均为 WOAH 推荐的实验室检测方法。VP7 蛋白为 AHSV 主要的内衣壳蛋白,在各血清型中高度保守,利用这一特性,国内外学者设计相应引物建立了特异性的 RT-PCR 检测方法,通过蛋白的表达及单克隆或多克隆抗体的制备建立了 ELISA 检测方法。国际上唯一的检测 AHSV 抗体的商品化试剂盒也是基于 VP7 蛋白建立的竞争 ELISA 方法。针对不同实验室建立的 AHSV 检测方法,WOAH 组织 AHS 参考实验室开展了多种 RT-PCR 方法或 ELISA 方法检测抗原或抗体的对比试验,结果说明实验室自建的方法与商业化试剂盒的结果符合率较高,在 2015 年国际比对试验中,WOAH 明确指出 Agüero 针对 VP7 蛋白建立的实时 RT-PCR 方法是最好的检测方法之一,陆生动物诊断试验与疫苗手册中详细列出了试验程序。在 AHS 诊断中,根据实际情况综合分析确定检测方法。

## 2. 血清学检测方法

自然感染存活的马在感染后 8~12 天内产生 AHSV 特异性抗体, 可用一些血清学方法加以验证, 如补体结合试验(Complement Fixation Test, CFT)、病毒中和试验(Virus Neutralization Test, VNT)和酶联免疫吸附试验(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA)。

### 2.1. 补体结合试验

CFT 是一种传统的免疫学技术, 用免疫溶血机制做指示系统, 用于检测样品中的抗原或抗体的试验, 在试验过程中, 补体效价的测定是试验成败的关键。针对 AHSV 的检测, CFT 可适用于各种用途的检测, 但并非是 WOAHP 推荐的检测方法。早在 70 年代, Mc Collum 通过补体结合试验进行了非洲马瘟和马动脉管炎的鉴别诊断。CFT 在布鲁氏菌病的检测中应用较广, 在支原体、衣原体的检测中也有应用, 但由于 CFT 实验步骤多, 操作要求严格, 影响结果的因素复杂, 试验结果观察主要依据肉眼观察判断, 存在主观意识强, 不敏感等缺点。随着科技的进步, 其被敏感性高、操作更为简便的 ELISA 方法所取代。目前, 实验室较少单纯使用 CFT 来检测病原, 也未见对 AHSV 检测的报道, 而主要是采用与其他检测技术相结合的方法来应用, 如李曼研究的与微流控芯片技术的结合。

### 2.2. 病毒中和试验

中和试验是在体外将病毒与血清混合后接种细胞, 通过判定病毒是否具有感染性从而检测血清中是否含有中和抗体的方法, 在本方法中, 病毒的用量非常关键, 过多或过少都影响结果的判断。对于 AHSV 的检测, 根据 WOAHP 建议, 此方法适用于疫苗接种后动物个体免疫状态的确认, 亦可用于血清学分型。1990 年, House 利用 VNT 检测血清特异性抗体, 同时评价了 5 种诊断 AHSV 的方法, 说明了 CFT 和 ELISA 方法与 VNT 方法无差异。VNT 方法不常用于初诊, 因在疫病感染初期, 特异性抗体水平低, 但在疫病流行地区, 特别是多种血清型同时感染的情况下, 对疫病的分型监测有重要意义。虽然该方法特异性较强, 但对实验室要求较高, 首先实验室需有标准的参考毒株和特定型的血清, 其次 AHSV 的操作需要在生物安全三级的实验室进行, 试验的操作步骤较繁琐, 耗时长。因此, 目前国际上较少采用该方法进行快速检测, 但与其他方法相比, 仍是 AHSV 分离株血清分型的“金标准”。

### 2.3. 酶联免疫吸附试验

酶联免疫吸附试验(ELISA)的基本原理是将特异性反应系统、间接放大系统和显示系统结合起来, 该方法在检测抗体和抗原方面发挥着重要的作用, 在建立 ELISA 方法时, 抗体的浓度、孵育时间及环境温度等因素都对结果有较大的影响。ELISA 方法具有快速、准确、重复性好等优点, 是 WOAHP 推荐的检测方法和国际贸易规定的试验方法, 也是目前应用最为广泛的 AHS 诊断方法之一。现已证明, 基于可溶性 AHSV 抗原或重组蛋白 VP7 抗原的间接和竞争阻断 ELISA [10]可用于检测 AHSV 群特异性抗体, 特别适用于大规模样品筛查[11]。应用 ELISA 法检测非洲马瘟病毒, 可以在早期检测出带有非洲马瘟病毒的动物。

酶联免疫吸附试验(ELISA)于 1971 年首次建立, 根据其性质分为间接 ELISA、夹心 ELISA、竞争 ELISA、阻断 ELISA 等。经过不断改进, 特异性和敏感性逐渐提高, 因其具有操作简便, 快速, 适于大批量检测等优点, 在细菌或病毒疾病的诊断方面得到了迅速的发展和广泛应用。目前, ELISA 也是 AHS 诊断应用最为广泛的检测方法之一, 根据 WOAHP 诊断手册在非洲马瘟章节的建议, ELISA 广泛应用于确认动物群体有无感染、监测 AHSV 流行感染率, 还可以应用于动物运输前有无感染、临床病例确诊和免疫后个体免疫状态确认等方面。研究显示, 国内外学者建立了很多基于 VP7 蛋白的 ELISA 检测方法

VP7 为主要的内衣壳蛋白, 在 9 个血清型的病毒中最为保守, 目前, 国内外学者利用杆状病毒系统表达 VP7 蛋白已建立了多种可检测 AHSV 抗体的 ELISA 方法。1996 年 House [12] 等人基于 VP7 蛋白建立了 AHSV 的阻断 ELISA 方法。2003 年 Chang Hee Kweon [13] 等制备 VP7 的单克隆抗体, 同时建立了间接 ELISA 和竞争性 ELISA 方法, 通过分析比较, 表明竞争 ELISA 更具特异性。2005 年, Sonja Maree [14] 建立的用于检测马血清中 VP7 IgG 抗体的间接 ELISA 方法, 通过与传统的血清学检测相比, 表明建立的间接 ELISA 在检测感染马的早期免疫反应和马驹的母体免疫水平下降方面更加敏感。2008 年, 高志强等采用人工拼接的方式拼接了含有绝大多数线性抗原表位的 VP7 编码基因片段, 并以此建立了间接 ELISA 方法, 与 INGENASA 公司生产的商品化试剂盒的 AHSV 阻断 ELISA 方法进行比较, 结果两种方法结果完全吻合[15]。随后, 曹琛福和潘佳亮等人都针对 VP7 蛋白建立了 AHSV 的间接 ELISA 方法[16] [17]。2014 年, 郑小龙等利用大肠杆菌表达了良好抗原性的 VP7 蛋白多克隆抗体, 建立了 IgM 捕获 ELISA 检测方法, 可用于早期 AHSV 感染产生的 IgM 的检测, 此方法特异性高, 与其他 3 种马病病毒阳性血清无交叉反应, 通过与进口试剂盒比较, 符合率为 97.7% [18]。

### 3. 分子生物检测方法

#### 3.1. PCR 技术(聚合酶链式扩增)

聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)是一种将微量 DNA 特异性放大扩增的分子生物学技术, 由诞生至今已经发展到第三代技术。该技术敏感性高、特异性强, 操作简便、快速, 对扩增的样品要求不高, 仅含微量目的 DNA 即可, 样品可以是新鲜或陈旧, 对于疫病中病原的活性也无要求, 判断 PCR 方法能否对目的基因进行扩增的关键在于引物的设计, 因此对微生物保守基因的分析至关重要。该试验灵敏度高, 控制污染也是实验中常遇到的问题。基于琼脂糖凝胶电泳的常规 PCR 方法广泛应用于感染动物血液及组织中 AHSV 的检测, 通过扩增产物测序, 可进一步对病毒进行基因遗传分析。1994 年, Marschat [19] 等人基于 NS2 蛋白 S8 基因建立了 AHSV 的 RT-PCR 检测方法, 其检测灵敏度为 101~102 copies/ $\mu\text{L}$ , 在临床样品的检测中发现 RT-PCR 技术比病毒分离更早检测到病毒。同年 Mizukoshi [20]、Zientara [21] 和 Sakamoto [22] 分别针对 NS1 基因、VP7 第 7 片段和 VP3 建立了检测 AHSV 的 RT-PCR 方法。随后, Zientara [23] [24] 基于基因组片段 7 和 10 建立了检测 AHSV 的 RT-PCR 方法, 与竞争性 ELISA 结果进行了比较, 用该方法检测证实了 AHSV1987 年 7 月首次出现在西班牙中部, 可在非洲马病(AHS)动物流行开始的潜伏期检测 AHSV 核酸, 也可用于临床症状不明显的物种的流行病学调查。2004 年, Koekemoer [25] 建立了 AHSV 9 种血清型基因组片段 2 的 RT-PCR 方法。2009 年, Imadeldin [26] 建立了 AHSV 的巢式 RT-PCR 方法, 并将 PCR 检测的灵敏度提高了至少 1000 倍。2011 年, Narender S [27] 等人针对 VP2 蛋白的保守区域设计引物建立了 RT-PCR, 与中和试验相比, 非常显著地提高了检测的速度和可靠性, 随后, Schalkwyk [28] 等人也针对 VP2 蛋白建立了 RT-PCR 方法以区分疫苗和野毒感染。2012 年和 2015 年, Guthrie [29] 和 Camilla [30] 等人建立了多重 RT-PCR 方法, 并与病毒分离进行了对比, 检测一致率为 100%。2015 年, WOA 曾组织 AHS 参考实验室进行了试验比对, 评估了 10 种不同的常规 RT-PCR 方法, 证实试验结果一致, 其中特别指出 2008 年 Agüero 和 2013 年 Ggthrie 建立的方法敏感性最高。

#### 3.2. Real-time PCR 技术(实时荧光定量 PCR)

实时荧光定量 PCR 比常规 PCR 方法敏感性更好, 检测所需时间更短, 在检测动物是否感染 AHSV 最常用。2008 年, Montserrat [31] 和 Koekemoer [32] 基于 VP7 蛋白分别建立了可检测 AHSV 9 种血清型的实时荧光 RT-PCR 检测方法和双重荧光 RT-PCR 方法。2010 年, Quan [33] 等人针对 VP7 蛋白和 NS2 建

立了双重荧光 RT-PCR 方法, 检测灵敏度 132 拷贝/反应, 并且该方法比 BHK-21 细胞上的病毒分离的灵敏度至少高 10 倍。随后, Monaco [34] 等人针对 VP2 蛋白建立了荧光 RT-PCR 方法, 检测灵敏度达 0.71 copies/ $\mu\text{L}$ 。2014 年, Katarzyna [35] 等人针对 VP1 蛋白的 Seg-1 和 Seg-3 建立了实时 RT-PCR 检测方法, 可检测 AHSV 的 9 中血清型, 与 VP2 蛋白的 Seg-2 特异性检测结果一致。国内, 2013 年, 赵文华[36] 基于 AHSV 基因组 S7 片段设计一对特异性引物, 建立了 AHSV 染料法(SYBR Green I)实时荧光定量 RT-PCR 快速检测方法, 可对 9 个血清型的灭活疫苗毒 RNA 进行很好的检测, 另外, 赵文华[37] 又设计 2 套位于 AHSV 基因组 S7 片段的特异性引物及探针, 合起来能够检测 9 个血清型的 AHSV。荧光 PCR 具有引物和探针的双重特异性, 因此实时荧光定量 PCR 比常规 PCR 具有更强的特异性, 此方法通过荧光值直接反应检测结果, 操作更简便, 省去琼脂糖凝胶电泳步骤, 更不易污染。

### 3.3. 重组酶聚合酶扩增(RPA)

重组酶聚合酶扩增(Recombinase Polymerase Amplification, RPA)是一种新兴的技术, 采用 PCR 原理, 在常温条件下快速扩增目标 DNA 序列。该技术由英国 TwistDxInc 公司于 2006 年研发, 虽然起步较晚, 但发展迅速, 被称为是可以替代 PCR 的核酸检测技术, 该技术关键在于扩增引物和探针的设计, 其引物比 PCR 引物长, 设计技术不像传统 PCR 那样成熟。RPA 技术的优势在于 DNA 的扩增可在 37~42 $^{\circ}\text{C}$ , 20 min 内完成, 与 PCR 相比, 时间大大缩短。此外该方法不需要昂贵的设备, 结果读取多元化可电泳法、荧光探针法和测流层析试纸条法等, 特别适合用于基层的现场诊断。2022 年, 史卫军等[38] 依据 AHSV 的 S7 基因保守区建立了 RPA 检测方法, 该方法的最低检测为  $2.36 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ , 用时仅 20 min, 对 60 份临床样品进行了检测, 符合了 100%。梅明珠[39] 等针对不同血清型间 VP7 中的保守序列设计引物和探针, 建立非洲马瘟病毒核酸的 RT-RAA 检测方法, 对非洲马瘟病毒阳性质粒的检测灵敏度达到  $10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ , 检测结果与 WOH 推荐的荧光 RT-PCR 检测结果一致。RPA 有诸多优点, 可作为 PCR 方法的补充, 随着 RPA 技术在各领域的持续快速, 未来应用会更成熟。

### 3.4. LAMP 检测技术

环介导等温扩增技术(Loop-Mediated Isothermal Amplification Method, LAMP)也是 2000 年后一种新兴的核酸扩增方法, 同 RPA 方法类似, LAMP 方法对仪器要求低, 扩增过程不需要温度的变化, 可在 60~65 $^{\circ}\text{C}$  温度下进行, 检测时间约 40 min。两者的不同在于 LAMP 方法需要 2 对引物或者 3 对引物, 其结果检测仅需用肉眼或试比浊检测。这种简单、方便、快速、的方法最初由日本学者 Notomi [40] 提出, 现已在检验检疫、疫病防控和食品安全等多个领域应用, 虽然 LAMP 技术非常简单, 但其引物设计较为复杂苛刻, 正确的引物设计与高质量关键酶的选择是成功进行 LAMP 扩增的必要条件。2016 年, 英国 Fowler 等首次建立 AHSV RT-LAMP 检测方法, 与 rRT-PCR 相比其检测敏感性为 96.1% [41]。2017 年姜睿姣建立了 AHSV 可视化 RT-LAMP 检测方法, 灵敏度测试表明传统 RT-PCR 的检测极限为  $1 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$ , 而用 RT-LAMP 检测方法检测量为  $1 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ , RT-LAMP 的灵敏度为传统 RT-PCR 的 1000 倍, 与马属动物易感的 4 种疫病进行特异测试, 未见交叉反应[42]。2020 年李富祥等人建立了 AHSV 的可视化 RT-LAMP 现场检测方法, 该方法最低可检测到  $3.2 \times 10^{-9}$  ng/ $\mu\text{L}$  的 RNA, 敏感性是普通 RT-PCR 方法的 1000 倍, 用建立 RT-LAMP 方法和普通 RT-PCR 方法对 35 份马血和 5 份驴血样同时进行了临床样品的测试, 结果表明符合率为 100% [43]。

LAMP 产物最开始的检测方式是肉眼观察和电泳检测结果, 随着荧光 PCR 的出现, LAMP 扩增荧光检测系统随后被开发出来, 同 PCR 扩增一样需要 95 $^{\circ}\text{C}$ , 5 min 的预变性过程, 发展到通过添加两条环引物来提高扩增效率。LAMP 其独特的恒温扩增模式, 快速反应且通常比 PCR 反应较高的灵敏性, 使得其

在核酸检测上具有极大的优势。此外还有 LAMP 与微流体技术的联用[44], LAMP 与微芯片的技术联用[45]以及 LAMP 与最近新兴的基因编辑技术联用[46]。与各种技术的联用更是增加了检测的方式和扩大了检测的多样性。因此 LAMP 检测方法会有更加广阔的应用前景。

#### 4. 结论

自上世纪五十年代中非发现 AHS 以来,国内外学者对 AHSV 进行了研究,建立了许多检测方法。虽然针对 AHSV 无统一的国际诊断试剂和检测标准,但通过 WOA 组织的 AHS 参考实验室比对结果,证明了实验室建立的不同方法检测符合率较高。此外,陆生动物诊断试验与疫苗手册对 AHS 实验室诊断方法及用途做了详细的介绍,根据目的不同选择相应的 AHSV 检测方法,国内有 GB/T 21675-2008 和 SN/T 2856-2011 发布的病原分离鉴定、ELISA、RT-PCR 和血清中和试验方法的具体检测方法步骤可供参考。

#### 5. 展望

AHS 是马类疾病中致死率最高的一种疾病,虽然地域性较强,但近年来全球一体化进程加剧,疫病流行范围急剧扩大。虽然目前我国马病的整体防控较好,但周边邻国紧张的疫情形势对我国严防境外 AHS 传入工作提出更高的要求。目前,虽然有商品化的单价或多价弱毒非洲马瘟疫疫苗可用于预防,但有效的防控仍是防止疫病进入的最有效措施,因此对进境马匹及其制品的 AHSV 检测是关键。

实验室诊断对于 AHSV 的确诊有至关重要的意义,目前 AHSV 实验室检测方法主要有病毒分离鉴定,病毒核酸的 PCR 检测,病毒抗原或抗体的 ELISA 检测等方法。对于进境的动物及其制品可用 RT-PCR 方法或 ELISA 方法进行快速初步检测,后期确诊可选用动物的血液或脾、肺和淋巴结等组织进行病毒分离。AHS 疫情爆发时,可采用 RT-PCR 方法或病毒中和试验进行分型检测,依据分型结果选取疫苗接种健康动物。对于动物接种疫苗后免疫状态的确认,一般选用 ELISA 方法和病毒中和试验。对于养殖场等试验条件差的适合现场检测的方法,可选用操作方便、反应时间短的 RPA 方法和 LAMP 方法。总之,可根据具体情况选择不同的检测方法进行 AHSV 的检测。根据目前非洲马瘟流行情况,现场检测要求通量大和快速简便,有时需要对结果定量分析,因此检测方法应向兼顾定性定量、高通量方向发展。为提高诊断结果的可靠性,最好采用一种以上的试验方法来对样品进行检测,特别是对于首发病例更应如此。

#### 基金项目

海关总署科研项目(2021HK175)。

#### 参考文献

- [1] Zer, J.A.W., Thomson, G.R. and Tustin, R.C. (1994) *Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*. Oxford University Press, New York, 460-475.
- [2] Barnard, B.J. (1993) Circulation of African Horse Sickness Virus in Zebra (*Equus burchelli*) in the Kruger National Park, South Africa, as Measured by the Prevalence of Type Specific Antibodies. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **60**, 111-117.
- [3] Oellerman, R.A., Els, H.J. and Erasmus, B.J. (1970) Characterisation of African Horse Sickness Virus. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, **29**, 163-174. <https://doi.org/10.1007/BF01249302>
- [4] Martinez-Torrecuadrada, J.L. and Casal, J.I. (1995) Identification of a Linear Neutralisation Domain in the Protein VP2 of African Horse Sickness Virus. *Virology*, **210**, 391-399. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1355>
- [5] Laviada, M.D., Roy, P., Sanchez-Vizcaino, J.M. and Casal, J.I. (1995) The Use of African Horse Sickness NS3 Protein Expressed in Bacteria, as a Marker to Differentiate Infected from Vaccinated Horses. *Virus Research*, **38**, 205-218. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(95\)00061-T](https://doi.org/10.1016/0168-1702(95)00061-T)
- [6] Sanchez-Vizcaino, J.M. (2004) Control and Eradication of African Horse Sickness with Vaccine. *Developmental Biology*, **19**, 255-258.

- [7] Simon, C., Philip, S.M., Assane, G.F., *et al.* (2017) Horse Sickness Virus: History, Transmission, and Current Status. *Annual Review of Entomology*, **62**, 343-358. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035010>
- [8] Dennis, S.J., Meyers, A.E., Hitzeroth, I.I. and Rybicki, E.P. (2019) African Horse Sickness: A Review of Current Understanding and Vaccine Development. *Viruses*, **11**, Article 844. <https://doi.org/10.3390/v11090844>
- [9] King, S., Rajko-Nenow, P., Ashby, M., *et al.* (2020) Outbreak of African Horse Sickness in Thailand. *Transboundary and Emerging Diseases*, **67**, 1764-1767. <https://doi.org/10.1111/tbed.13701>
- [10] Maree, S. and Paweska, J.T. (2005) Preparation of Recombinant African Horse Sickness Virus VP7 Antigen via a Simple Method and Validation of a VP7-Based Indirect ELISA for the Detection of Group-Specific IgG Antibodies in Horse Sera. *Journal of Virological Methods*, **125**, 55-65. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.12.002>
- [11] Rubio, C., Cubillo, M.A., Hooghuis, H., *et al.* (1998) Validation of ELISA for the Detection of African Horse Sickness Virus Antigens and Antibodies. In: Mellor, P.S., Baylis, M., Hamblin, C., Mertens, P.P.C. and Calisher, C.H., Eds., *African Horse Sickness*, Springer, Vienna, 311-315. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6823-3\\_27](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6823-3_27)
- [12] House, J.A., Stott, J.L., Blanchard, M.T., *et al.* (1996) A Blocking ELISA for Detection of Antibody to a Subgroup-Reactive Epitope of African Horse Sickness Viral Protein 7 (VP7) Using a Novel  $\gamma$ -Irradiated Antigen. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **791**, 333-344. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb53540.x>
- [13] Kweon, C.H., Kwon, B.J., Ko, Y.J. and Kenichi, S. (2003) Development of Competitive ELISA for Serodiagnosis on African Horsesickness Virus Using Baculovirus Expressed VP7 and Monoclonal Antibody. *Journal of Virological Methods*, **113**, 13-18. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(03\)00217-9](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(03)00217-9)
- [14] Maree, S. and Paweska, J.T. (2005) Preparation of Recombinant African Horse Sickness Virus VP7 Antigen via a Simple Method and Validation of a VP7-Based Indirect ELISA for the Detection of Group-Specific IgG Antibodies in Horse Sera. *Journal of Virological Methods*, **125**, 55-65. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.12.002>
- [15] 高志强, 张鹤晓, 赖平安, 等. 非洲马瘟病毒 VP7 基因拼接、表达及重组 ELISA 方法的建立与初步应用[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(11): 1548-1553.
- [16] 曹琛福, 叶奕优, 宗卉, 等. 非洲马瘟间接 ELISA 方法的建立及初步应用[J]. 动物医学进展, 2012, 33(3): 6-9.
- [17] 潘佳亮. 非洲马瘟病毒 VP7 蛋白的原核表达及其间接 ELISA 方法的建立[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.
- [18] 郑小龙, 朱来华, 王群, 等. 非洲马瘟病毒 VP7 蛋白多克隆抗体的制备及 IgM 捕获 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2014, 31(5): 70-73.
- [19] Stone-Marschat, M., Carville, A., Skowronek, A. and Laegreid, W.W. (1994) Detection of African Horse Sickness Virus by Reverse Transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **32**, 697-700. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.3.697-700.1994>
- [20] Mizukoshi, N., Sakamoto, K., Iwata, A., *et al.* (1994) Detection of African Horse Sickness Virus by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Using Primers for Segment 5 (NS1 Gene). *Journal of Veterinary Medical Science*, **56**, 347-352. <https://doi.org/10.1292/jvms.56.347>
- [21] Zientara, S., Sailleau, C., Moulay, S. and Cruciere, C. (1994) Diagnosis of the African Horse Sickness Virus Serotype 4 by a One-Tube, One Manipulation RT-PCR Reaction from Infected Organs. *Journal of Virological Methods*, **46**, 179-188. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(94\)90102-3](https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)90102-3)
- [22] Sakamoto, K., Punyahotra, R., Mizukoshi, N., *et al.* (1994) Rapid Detection of African Horse Sickness Virus by the Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Using the Amplimer for Segment 3 (VP3 Gene). *Archives of Virology*, **136**, 87-97. <https://doi.org/10.1007/BF01538819>
- [23] Zientara, S., Sailleau, C., Moulay, S., *et al.* (1995) Application of the Polymerase Chain Reaction to the Detection of African Horse Sickness Viruses. *Journal of Virological Methods*, **53**, 47-54. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(94\)00175-G](https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)00175-G)
- [24] Zientara, S., Sailleau, C., Plateau, E., *et al.* (1998) Molecular Epidemiology of African Horse Sickness Virus Based on Analyses and Comparisons of Genome Segments 7 and 10. In: Mellor, P.S., Baylis, M., Hamblin, C., Mertens, P.P.C. and Calisher, C.H., Eds., *African Horse Sickness*, Springer, Vienna, 221-234. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6823-3\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6823-3_20)
- [25] Koekemoer, J.J.O. and van Dijk, A.A. (2004) African Horse Sickness Virus Serotyping and Identification of Multiple Co-Infecting Serotypes with a Single Genome Segment 2 RT-PCR Amplification and Reverse Line Blot Hybridization. *Journal of Virological Methods*, **122**, 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.08.002>
- [26] Aradaib, I.E. (2009) PCR Detection of African Horse Sickness Virus Serogroup Based on Genome Segment Three Sequence Analysis. *Journal of Virological Methods*, **159**, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.02.012>
- [27] Maan, N.S., Maan, S., Nomikou, K., *et al.* (2011) Serotype Specific Primers and Gel-Based RT-PCR Assays for 'Typ-

- ing' African Horse Sickness Virus: Identification of Strains from Africa. *PLOS ONE*, **6**, e25686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025686>
- [28] van Schalkwyk, A., Ferreira, M.L. and Romito, M. (2019) Using a New Serotype-Specific Polymerase Chain Reaction (PCR) and Sequencing to Differentiate between Field and Vaccine-Derived African Horse Sickness Viruses Submitted in 2016/2017. *Journal of Virological Methods*, **266**, 89-94. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.01.016>
- [29] Guthrie, A.J., Maclachlan, N.J., Joone, C., *et al.* (2013) Diagnostic Accuracy of a Duplex Real-Time Reverse Transcription Quantitative PCR Assay for Detection of African Horse Sickness Virus. *Journal of Virological Methods*, **189**, 30-35. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.12.014>
- [30] Weyer, C.T., Joone, C., Lourens, C.W., *et al.* (2015) Development of Three Triplex Real-Time Reverse Transcription PCR Assays for the Qualitative Molecular Typing of the Nine Serotypes of African Horse Sickness Virus. *Journal of Virological Methods*, **223**, 69-74. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.07.015>
- [31] Agüero, M., Gómez-Tejedor, C., Angeles Cubillo, M., *et al.* (2008) Real-Time Fluorogenic Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of African Horse Sickness Virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **20**, 325-328. <https://doi.org/10.1177/104063870802000310>
- [32] Koekemoer, J.J.O. (2008) Serotype-Specific Detection of African Horsesickness Virus by Real-Time PCR and the Influence of Genetic Variations. *Journal of Virological Methods*, **154**, 104-110. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.08.010>
- [33] Quan, M., Lourens, C.W., MacLachlan, N.J., Gardner, I.A. and Guthrie, A.J. (2010) Development and Optimisation of a Duplex Real-Time Reverse Transcription Quantitative PCR Assay Targeting the VP7 and NS2 Genes of African Horse Sickness Virus. *Journal of Virological Methods*, **167**, 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.03.009>
- [34] Monaco, F., Polci, A., Lelli, R., *et al.* (2011) A New Duplex Real-Time RT-PCR Assay for Sensitive and Specific Detection of African Horse Sickness Virus. *Molecular and Cellular Probes*, **25**, 87-93. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2011.01.006>
- [35] Bachanek-Bankowska, K., Maan, S., Castillo-Olivares, J., *et al.* (2014) Real Time RT-PCR Assays for Detection and Typing of African Horse Sickness Virus. *PLOS ONE*, **9**, e93758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093758>
- [36] 赵文华, 杨仕标, 李富祥. 非洲马瘟病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2013, 34(12): 11-16.
- [37] 赵文华, 杨仕标, 李富祥. 非洲马瘟病毒 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2013, 43(11): 1167-1174.
- [38] 史卫军, 林彦星, 黄超华, 等. 非洲马瘟病毒实时荧光 RT-RPA 快速检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2022, 39(7): 119-123.
- [39] 梅明珠, 陈茹, 刘志玲, 等. 非洲马瘟病毒 RT-RAA 快速检测方法的建立[J]. 中国口岸科学技术, 2022, 4(7): 45-51.
- [40] Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N. and Kanda, H. (2015) Loop-Mediated Isothermal Amplification (Lamp): Principle, Features, and Future Prospects. *Journal of Microbiology*, **53**, 1-5. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-4656-9>
- [41] Fowler, V.L., Howson, E.L.A., Flannery, J., *et al.* (2017) Development of a Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Rapid Detection of African Horse Sickness Virus. *Transboundary and Emerging Diseases*, **64**, 1579-1588. <https://doi.org/10.1111/tbed.12549>
- [42] 姜睿姣, 邬旭龙, 张鹏飞, 等. 非洲马瘟病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2017, 38(12): 1-5.
- [43] 李富祥, 赵文华, 杨仕标. 非洲马瘟病毒可视化 RT-LAMP 现场检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42(6): 579-583.
- [44] Zhang, H., Xu, Y., Fohlerova, Z., *et al.* (2019) Lamp-on-a-Chip: Revising Microfluidic Platforms for Loop-Mediated and Amplification. *Trends in Analytical Chemistry*, **113**, 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.015>
- [45] Safavieh, M., Kanakasabapathy, M.K., Tarlan, F., *et al.* (2016) Emerging Loop-Mediated Isothermal Amplification-Based Microchip and Microdevice Technologies for Nucleic Acid Detection. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **2**, 278-294. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00449>
- [46] Wu, H., He, J.S., Zhang, F., Ping, J.F. and Wu, J. (2020) Contamination-Free Visual Detection of *CaMV35S* Promoter Amplicon Using CRISPR/Cas12a Coupled with a Designed Reaction Vessel: Rapid, Specific and Sensitive. *Analytica Chimica Acta*, **1096**, 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.10.042>