

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.08.12

犬细小病毒检测方法研究进展

孙明洁¹,董国英²,张雪竹¹,胡桂学^{1*}

(1.吉林农业大学 动物科学技术学院,长春 130118; 2.北京师范大学 全球变化与地球系统科学研究院,北京 100875)

[收稿日期] 2018-04-18 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 08-0068-06 [中图分类号] S852.65

[摘要] 随着犬细小病毒变异亚型毒株的增多及所呈现的复杂的流行态势,提高犬细小病毒(CPV)检测方法的实用性、敏感性、特异性和简单快捷性迫在眉睫。通过对传统分子生物学和免疫学检测方法的优化改进,相继衍生出了 MT-PCR、iiPCR、IC-LAMP、CPV-GIA、PCR-RFLP 和 RPA 等新型方法,明显提高了检测的时效性及便捷性。就衍生出的多种新型检测方法优势特点进行了综述,以期 CPV 的临床和实验室快速检测提供参考。

[关键词] 犬细小病毒;检测方法;分子生物学;免疫学

Progress of Diagnostic Methods for Canine Parvovirus Disease

SUN Ming-jie¹, DONG Guo-ying², ZHANG Xue-zhu¹, HU Gui-xue^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Global Change and Earth System Academy, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Corresponding author: HU Gui-xue, E-mail: Huguixue901103@163.com

Abstract: With the increase of the variant subtypes of canine parvovirus (CPV) and the complicated epidemic situations, it is imminent to improve the practicability, sensitivity, specificity and simplicity of the detection methods of CPV. By optimizing the traditional molecular biology and immunological detection methods, new methods such as MT-PCR, iiPCR, IC-LAMP, CPV-GIA, PCR-RFLP and RPA have been consecutively derived, which improve the timeliness and convenience of the detection obviously. The advantages and characteristics of various new detection methods were summarized in order to provide an authentic reference for clinical and laboratory rapid detection of CPV.

Key words: canine parvovirus; detection methods; molecular biology; immunology

基金项目:十三五国家重点研发项目(2017YFD0501703, 2016YFD0501002)

作者简介:孙明洁,硕士研究生,从事动物病毒学研究。

通讯作者:胡桂学。E-mail: Huguixue901103@163.com

[11] 郝毫刚,高录军,张积慧,等. 基于兽药电子追溯的兽药大数据平台建设研究[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(3): 4-10.

electronic trace [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(3): 4-10.

Hao H G, Gao L J, Zhang J H, et al. Research on construction of veterinary drugs big data platform based on veterinary drugs

犬细小病毒(Canine Parvovirus, CPV)是一种引起犬科和多种野生食肉动物的接触性传染病的病原体,以胃肠炎和心肌炎为主要临床症状。其中2~4月龄的幼犬感染风险最大,发病率和致死率均可达到70%左右。CPV为细小病毒科,细小病毒属,基因组全长5.3 kb,是自主复制的线性单链负股DNA病毒,基因遗传进化关系显示CPV与猫细小病毒(FPLV)、水貂肠炎病毒(MEV)和蓝狐细小病毒(BFPV)亲缘关系较近^[1]。CPV有两个开放阅读框(ORF)1和2,其中ORF1编码两个非结构蛋白NS1和NS2,ORF2由VP1和VP2组成。VP2蛋白是病毒衣壳的主要成分,在抗原性与宿主范围等方面起着重大作用^[2]。1978年CPV被首次发现,至今近40年的时间,基因和抗原不断发生变异,相继出现了CPV-2a、CPV-2b和CPV-2c等变异毒株^[3]。CPV VP2极易发生变异,CPV-2抗原性变体(CPV-2a、CPV-2b和CPV-2c)相比CPV-2在VP2蛋白上有4至5个氨基酸残基差异。这种新变异毒株在抗原性和基因序列上发生明显变化,从而使CPV的检测方法发生了改变。因此对CPV的实验室诊断和临床诊断的新型检测方法进行综述,以期对CPV诊断提供有效的检测技术。

1 分子生物学检测

1.1 传统PCR技术 聚合酶链式反应(PCR)作为第一代PCR技术一直延续至今,已成为核酸诊断的“金标准”被广泛应用到病原体检测等方面^[4]。PCR检测技术以灵敏、特异和易操作等特点,作为CPV检测的主要手段被实验室应用。刘雪燕等将PCR扩增技术和细胞定位技术相结合建立了一种F81细胞CPV原位PCR检测方法,并应用该方法与常规免疫组化方法进行比较分析,结果显示原位PCR阳性率较高且更精准的表明病毒感染细胞的位置及程度。然而,原位PCR方法并不能大范围的推广,为了实现商品化应用,刘忠华等学者在2002年,设计一对CPV特异引物并开发了CPV PCR诊断试剂盒,最低可检测10 ng CPV DNA,并实现商品化应用。随着自然选择与疫苗免疫的驱动,CPV基因不断的变异导致当前全世界普遍流行

着4种(CPV-2、CPV-2a、CPV-2b和CPV-2c)抗原类型毒株。因此传统PCR检测方法已不能满足对这4种抗原类型的精准鉴定,因此有学者陆续建立多种PCR优化改进方法。Meggiolaro建立了一种MT-PCR方法检测粪便中的CPV-2毒株,该方法高度敏感可检测较低病毒水平的核酸,但是通过拷贝数或Ct值区别CPV-2疫苗株或野生毒株较难实现^[5]。为此,有学者为了实现多种病原的快速检测,开发了一种MT-PCR检测方法,该方法可检测CPV、猫冠状病毒、犬瘟热、犬冠状病毒、沙门氏菌、贾第虫等12种病原体,在2014年被应用到悉尼大学兽医病理诊断部对小型动物病原体进行检测^[6]。有研究也建立了一种三重PCR/RT-PCR同时检测CDV、CPV和CaKoV,不仅具有较高的特异性和敏感性且可同时对易感染犬的主要病毒进行鉴定,这种方法避免了材料的浪费,降低了污染造成的假阳性结果^[7]。为了实现对CPV临床现场快速检测的要求,有学者建立了一种iiPCR检测方法可满足快速准确的PON检测,并且iiPCR检测方法的敏感性可与实验室内Real-Time PCR相同,90 min即可获得检测结果,可满足研究者临床检测的需求^[8]。虽然不断的对传统CPV PCR检测方法进行优化,但是仍不能满足当前的临床需求。

1.2 荧光定量PCR(Real-Time PCR, qPCR)

qPCR是1996年由美国ABI公司首先开发的第二代PCR技术,分为染料法(SYBR Green)和探针法(TaqMan)。qPCR不仅特异性、敏感性和重复性都优于传统的PCR,而且探针法可设计多种探针实现多重检测,可满足CPV多种亚型的一次鉴别,省时省力被广泛应用于实验室检测。有研究建立了一种CPV多重qPCR检测方法,该方法可对当前多种CPV亚型毒株进行鉴别诊断,为精准治疗提供最有效的检测结果^[9]。曹雪峰等也建立了一种快速准确的检测方法,即CPV新型原液qPCR检测方法,此方法可省略核酸提取步骤进行快速qPCR反应,且特异性好,重复性稳定,离散程度小,批内及批间变异系数均不超过1.3%,该方法与核酸qPCR均最低可检测10 copies/ μ L,但是新型原液qPCR方法

不仅节约检测成本且效率更高^[10]。然而, qPCR 方法需要昂贵的仪器设备, 很难开展大范围的临床应用, 只可满足实验室的检测及分析。

1.3 环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) LAMP 是由日本学者在 2000 年开发的一种核酸扩增技术, 其通过在靶 DNA 链 6 个不同区段设计 4 条特异引物在链置换 DNA 聚合酶作用下进行扩增反应。该方法特异性高, 操作简单只需恒温水浴锅即可在 1 h 内完成, 且只需根据扩增物的有无即可完成诊断。2010 年郭伟开发了 CPV LAMP 检测方法, 并在不断优化的过程发现, 镁离子为 8 mmol/L 扩增效率最高, 特异性好, 最低可检测 5.7 个拷贝, 相比普通 PCR 敏感 100 倍^[11]。Parthiban 曾在 2012 年建立了可快速现场诊断的 CPV LAMP 检测技术, 该方法相比普通 PCR 和巢式 PCR 更敏感准确, 被认为是最具潜力的 CPV 诊断方法^[12]。但是 LAMP 方法易因污染造成假阳性结果, 一直备受争议。因此有学者在 LAMP 方法反应体系中加入荧光染料 SYBR Green I, 并利用国内首台恒温荧光检测仪 Deaou-308C 实现全程封闭检测, 可在 63 °C 45 min 完成检测, 最低敏感度为 3.72 copies/ μ L, 并成功应用到大熊猫 CPV 检测诊断, 具有极高的实际应用价值^[13]。尽管许多高效和快捷的 CPV 检测方法陆续应用到临床检测试验中, 但是仍面临着因病毒含量较低而误判结果。因此有研究者又对 LAMP 检测方法进行改进, 利用免疫捕获可浓缩病毒粒子技术建立了 CPV IC-LAMP 检测方法, 并与 ELISA 和 LFD 试验相结合, 检测的敏感性均为 10^{-1} TCID₅₀, 并可省略 DNA 提取步骤, 在 90 min 内即可用肉眼直接判定检测结果而被广泛认可^[14]。随着 LAMP 技术不断的优化改进, 使该检测方法不仅成本低、操作简便、敏感性高, 而且可直接应用于临床现场检测, 是当前应用于宠物医院临床诊断中最具潜力的检测方法。

1.4 重组聚合酶扩增反应 (Recombinase Polymerase Amplification, RPA) RPA 是核酸恒温扩增技术中的一种新型检测方法, 该方法首先通过能结合单链核酸的重组酶与引物形成蛋白-引物复合物并与

引物的同源性双链 DNA 靶标序列进行互补配对, 随后在单链结合蛋白的作用下进行 DNA 链交换反应形成稳定的 DNA 单链, 最终启动链置换 DNA 聚合酶进行指数式核酸扩增反应^[15]。RPA 在 37~42 °C 恒温条件并能在 15 min 即可完成结果判定, 该方法省略了 PCR 技术中变性、退火和延伸 3 个变温步骤, 真正实现了便携式恒温扩增反应而被称为可以替代 PCR 检测的新技术^[16]。RPA 在 Basic-RPA 技术之上又延伸发展了探针法 RPA 和侧流层析试纸条 RPA, 实现了用肉眼直观判定检测结果的便捷性。Liu 等基于 CPV VP2 基因开发了一种可视且无需设备的 LFS RPA 检测方法, 在拳头内以体热封闭 15 min 后, 并在 5 min 内即可在 LFS 肉眼判定结果。该检测方法不仅实现了 CPV-2a、CPV-2b 和 CPV-2c 等多种亚型 CPV 的检测, 且可最低检测 1×10^2 拷贝每个反应, 具备了与 qPCR 的检测敏感度^[17]。Geng 等建立了一种基于 exo 探针的实时 RPA CPV-2 检测方法, 该方法快速、简单 12 min 即可读取结果且最低可检测 10 拷贝每个反应, 实现了在条件限制的野外检测, 为检疫站、港口和基层兽医工作者提供了便携且高效的 CPV-2 检测技术^[18]。RPA 检测技术现已广泛应用于多种病毒检测, 然而因其成本较高还不能大范围推广, 但是该方法的特异性、敏感性和便携性都较传统 PCR 技术更优越, 因此该方法将会成为 CPV 检测的新标准。

2 免疫学检测

2.1 血凝及血凝抑制试验 血凝 (HA) 及血凝抑制 (HI) 试验是免疫学试验中最简单且最廉价的检测方法, 基于某类病毒或病毒的血凝素能选择的与动物红细胞发生凝集的现象, 而 HI 试验是利用特异性抗体与病毒结合, 使其失去凝集红细胞能力, 抑制血凝发生的试验。该实验直观可靠, 已广泛应用于禽流感病毒、新城疫病毒和犬细小病毒等检测试验中。CPV 可凝集猪、仓鼠、恒河猴、猫和马等红细胞, 并与醛化的猪红细胞凝集更显著。通过 HA 和 HI 试验同时可反映病毒的血凝滴度及犬血清中抗体的血凝抑制效价, 但是该方法受多种外源因素影响如血细胞种类、新鲜度等。该方法敏感性及其特

异性均低于分子检测方法,因此常作为检测的辅助手段及病毒分型鉴定方法。

2.2 ELISA ELISA 法因其操作简单、灵敏便捷被认为是当前疾病检测的主要方法之一。ELISA 不仅可以进行抗原检测,还可应用于免疫抗体的检测及评价,是多样品检测的最好试验方法之一,广泛应用于流行病学调查。Elia 利用昆虫-杆状病毒表达系统的 CPV VP2 蛋白作为间接 ELISA 的包被抗原,构建 CPV 的间接 ELISA 方法,使用该方法可用于检测母源抗体对幼崽的干扰阈值^[19]。赵国星首次利用杆状病毒/昆虫细胞表达的 CPV 病毒样颗粒作为包被抗原,建立了一种检测 CPV 抗体的间接 ELISA 方法,该方法特异性强,重复性好,标准阳性血清 1 : 640 稀释仍能检出阳性,可适用于大量样本检测并作为流行病学调查的可靠方法^[20]。近年来,相继建立了 CPV 竞争 ELISA 法、双抗体夹心 ELISA 法、Dot-ELISA 法等,这些方法都已被应用到血清学抗体检测及制成商品化试剂盒^[21]。ELISA 检测方法因其稳定、简便、可批量样品检测等优势,已成为免疫学检测技术中应用最广泛的方法之一。

2.3 免疫层析技术 免疫层析技术被广泛应用于快速检测卡制备,已建立多种病毒的检测卡如犬瘟热病毒、猪流行性腹泻病毒和犬细小病毒等。该方法应用胶体金标记技术使抗原抗体特异性结合更直观,更准确。当前研究制备的检测试纸条是兽医临床一线和宠物医院必备的疾病诊断工具,可快速的读取结果,是作为诊断治疗的重要辅助手段。朱军等测试了 3 种商品化 CPV 快速检测卡的临床使用效果并与 PCR 诊断相比对,共计检测了 213 份粪便样品,3 种检测卡的敏感性在 66.4%~72.2%,特异性在 96%以上,符合率为 95.8%~99.5%之间,表明当前商品化快速检测卡基本无差异,检测结果真实可靠,虽然相比 PCR 方法敏感性低,但是其快速、经济、简单,获得使用者的一致认可,也为诊断治疗争取了宝贵的时间^[22]。Tinky 等研究者利用 IC 试纸条与 PCR 方法同时进行粪便样品检测,结果显示 IC 试纸条相对 PCR 敏感性为 72.22%,特异性为 92.86%,使用 McNemar 统计分析显示两种方

法差异不显著($P>0.5$),因此 IC 试纸条可作为临床快速诊断的有效工具^[23]。但是当前使用的商品化试纸条价格普遍偏高,不适于大量样本的快速诊断,因此马辉等学者为了降低免疫层析试纸条的使用成本,制备了可稳定产生 CPV 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 3E2,建立了一种免疫胶体金层析试纸条,该方法特异性强,重复性好,具备较高的市场应用价值^[24]。随着免疫胶体金技术的快速发展,有研究建立了双抗体夹心法 CPV 胶体金试纸条(CPV-GIA),利用该方法评价 CPV 疫苗免疫效果,依据可使免疫试纸条消失的最高血清稀释倍数判断 CPV 的抗体 HI 效价,数据显示血清最高稀释倍数乘以 4 即为 HI 效价,该方法与 HI 检测效价符合率为 90.7%,CPV-GIA 可作为犬 CPV 抗体水平评价快捷且简单的方法^[25]。目前,免疫胶体金试纸条技术成熟稳定可直接采集肛门拭子进行测试,并在 10 min 内即可读取结果,已成为宠物医院 CPV 检测的主要方法。

3 其他检测方法

随着试验和临床检测的要求越来越高,CPV 检测技术也在不断更新进步,当前为了满足多类型 CPV 毒株的检测,如快速微型测序方法可实现毒株快速分型,可广泛应用于精准诊断和流行病学调查^[26];PCR-RFLP 应用于 CPV 和 MEV 的检测及鉴别^[27]。同时为了评价疫苗免疫后 CPV 抗体水平,有学者建立了 CPV IgM-IgG 双重快速测定法^[28];Thomas 同时也利用截短的 VP2 蛋白构建了乳胶凝集试验(LAT)评价血清中 CPV 中和抗体^[29]。根据当前不同的试验需求,研究者不断的将新型检测技术应用到 CPV 检测中,并开发出具有多种功能的新检测方法。

4 结语

CPV 基因突变率与 RNA 病毒相当,形成 CPV-2、CPV-2a、CPV-2b、CPV-2c 等变异毒株,促使实验室和兽医临床检测技术需要不断创新以满足科研与生产的需要。分子生物学检测技术是实验室范围内最敏感,最准确的检测手段,但是因其需要昂贵的实验设备、费时及专业的操作人员,并不能大

规模推广应用。免疫学技术可检测到血清中抗体,但是不能检测急性感染,因此免疫学检测方法常被用来做疫苗免疫后的抗体水平分析及为犬制定免疫计划。因此依据当前 CPV 检测需求,选择合理的诊断方法才能获得真实有效的检测结果。目前,实验室检测多使用高敏感性和特异性的多重 qPCR 实现 CPV 毒株类型精准鉴定。宠物医院等临床工作者更偏向使用免疫胶体金试纸条作为 CPV 快速诊断工具,并结合血常规等结果判定急性感染病例。但是有学者对 CPV 临床和实验室诊断技术可靠性进行评价分析,显示 PCR 和免疫试纸条对阳性病例的诊断并没有足够的敏感性^[30]。希望随着科学技术的发展,建立一种快速、敏感、低成本的检测技术,满足 CPV 实验室和临床检测需求,为当前细小病毒临床检测、基因变异、宿主范围扩展机制提供有效的试验方法。

参考文献:

- [1] Özkul A, Kele Y, Karaolu T, *et al.* Detection and RFLP analysis of canine parvovirus (CPV) DNA by polymerase chain reaction (PCR) in a dog[J]. Turkish Journal of Veterinary & Animalences, 2014, 26(5):1201-1203.
- [2] Phromnoi S, Sinsiri R, Sirinarumit T. Expression of recombinant VP2 protein of canine parvovirus in *Escherichia coli*[J]. Kasetsart Journal-Natural Science, 2010, 44(5):870-878.
- [3] Hoelzer K, Parrish C R. The emergence of parvoviruses of carnivores[J]. Veterinary Research, 2010, 41(6):39-51.
- [4] 孙亚茹,王建科,林鹏,等.犬细小病毒病实验室诊断方法研究进展[J]. 经济动物学报, 2017, 21(4):1-6.
Sun Y R, Wang J K, Lin P, *et al.* Advance in laboratory diagnostic methods for canine parvovirus disease[J]. Journal of Economic Animal, 2017, 21(4):1-6.
- [5] Meggiolaro M N, Ly A, Rysnik-Steck B, *et al.* MT-PCR panel detection of canine parvovirus (CPV-2): vaccine and wild-type CPV-2 can be difficult to differentiate in canine diagnostic fecal samples[J]. Mol Cell Probes, 2017, 33:20-23.
- [6] Stanley K K, Szewczuk E. Multiplexed tandem PCR: gene profiling from small amounts of RNA using SYBR Green detection [J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(20):e180.
- [7] Liu D, Liu F, Guo D, *et al.* One-step triplex PCR/RT-PCR to detect canine distemper virus, canine parvovirus, and canine kobuvirus[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2018, 13: 1-2.
- [8] Wilkes R P, Lee P Y, Tsai Y L, *et al.* An insulated isothermal PCR method on a field-deployable device for rapid and sensitive detection of canine parvovirus type 2 at points of need[J]. Journal of Virological Methods, 2015, 220:35-38.
- [9] Kaur G, Chandra M, Dwivedi P N, *et al.* Multiplex real-time PCR for identification of canine parvovirus antigenic types [J]. Journal of Virological Methods, 2016, 233:1-5.
- [10] 曹雪峰,弓超,王文博,等.犬细小病毒的新型原液荧光定量 PCR 方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2017, 47(02):135-142.
Cao X F, Gong C, Wang W B, *et al.* Establishment of one-step quantitation PCR methods for detection of canine parvovirus in clinical samples[J]. Veterinary Science China, 2017, 47(2): 135-142.
- [11] 郭伟.犬细小病毒分离鉴定及环介导等温扩增快速检测方法的建立[D]. 内蒙古农业大学, 2010.
Guo W. Isolation and Identification of canine parvovirus and development of a loop mediated isothermal amplification method [D]. Inner Mongolia Agricultural University, 2010.
- [12] Parthiban M, Divya K C, Kumanan K, *et al.* A rapid and highly reliable field-based LAMP assay of canine parvovirus [J]. Acta Virol, 2012, 56:71-74.
- [13] 陈珍容,陈进会,黄杰,等.犬细小病毒实时荧光环介导等温扩增检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2017(5):577-581.
Chen Z R, Chen J H, Huang J, *et al.* Development of a real-time fluorescent loop-mediated isothermal amplification for the detection of canine parvovirus [J]. Veterinary Science in China, 2017(5):577-581.
- [14] Sun Y L, Yen C H, Tu C F. Immunocapture loop-mediated isothermal amplification assays for the detection of canine parvovirus [J]. Journal of Virological Methods, 2017, 249:94-101.
- [15] 董德荣.一种新型核酸恒温扩增方法的研究及其在现场检测中的应用[D]. 中国人民解放军军事医学科学院, 2016.
Dong D D. A novel thermokinetic amplification method of nucleic acid and its application in field detection [D]. Academy of Military Medical Sciences, 2016.
- [16] 景志刚,董浩,狄栋栋,等.重组酶聚合酶扩增技术研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(6):47-53.
Jing Z G, Dong H, Di D D, *et al.* Research progress on recombinase polymerase amplification [J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(6):47-53.
- [17] L liu, 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]. *Molecular and Cellular Probes*, 2018, 4(1):1-6.
- [18] Geng Y, Wang J, Liu L, *et al.* Development of real-time recombinase polymerase amplification assay for rapid and sensitive detection of canine parvovirus 2[J]. *Bmc Veterinary Research*, 2017, 13(1):311.
- [19] Elia G, Desario C, Pezzoni G, *et al.* Recombinant ELISA using baculovirus-expressed VP2 for detection of antibodies against canine parvovirus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2012, 184(1):98-102.
- [20] 赵国星. 犬细小病毒性肠炎两种快速检测方法的建立与应用[D]. 吉林大学, 2015.
- Zhao G X. Establishment and application of two rapid detection methods for canine parvovirus enteritis [J]. *Jilin University*, 2015.
- [21] He J, Wang Y, Sun S, *et al.* Evaluation of chicken IgY generated against canine parvovirus viral-like particles and development of enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for canine parvovirus detection [J]. *Viral Immunology*, 2015, 28(9):489-494.
- [22] 朱军, 钟承, 王安琦, 等. 细小病毒抗原快速检测卡临床使用效果评价[J]. *中国兽医杂志*, 2017(4):71-73.
- Zhu J, Zhong C, Wang A Q, *et al.* Clinical effect evaluation of parvovirus antigen rapid test card[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2017(4):71-73.
- [23] Tinky S S, Ambily R, Nair S R, *et al.* Utility of a rapid immunochromatographic strip test in detecting canine parvovirus infection compared with polymerase chain reaction[J]. *Veterinary World*, 2015, 8(4):523-526.
- [24] 马辉, 权国辉, 乔宏兴, 等. 犬细小病毒单克隆抗体的制备及其在胶体金免疫层析试纸研发中的应用[J]. *动物医学进展*, 2016, 37(9):26-30.
- Ma H, Quan G H, Qiao H X, *et al.* Development of monoclonal antibody and colloidal gold immunochromatographic assay for detection CPV[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2016, 37(9):26-30.
- [25] 马永纓, 孙明, 申屠芬琴, 等. 犬细小病毒血凝抑制抗体效价胶体金免疫层析检测方法的建立及应用[J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(8):1983-1988.
- Ma Y Y, Sun M, Shen T F Q, *et al.* Establishment and application of colloidal gold immune chromatography test method for detection of canine parvovirus hemagglutination inhibition antibody titer[J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2016, 43(8):1983-1988.
- [26] Jyothi V P, Akila S, Selvam M K, *et al.* Direct typing of canine parvovirus (CPV) from infected dog faeces by rapid mini sequencing technique[J]. *Journal of Virological Methods*, 2016, 238:66-69.
- [27] Zhang C, Yu Y, Yang H, *et al.* Development of a PCR-RFLP assay for the detection and differentiation of canine parvovirus and mink enteritis virus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2014, 210:1-6.
- [28] Palma M, De I R N, Montón M, *et al.* Development of a duplex rapid assay for immunoglobulins M and G to evaluate the parvoviral immune status of clinically healthy dogs[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Inc*, 2016, 28(3):565-602.
- [29] Thomas J, Singh M, Goswami T K, *et al.* Determination of immune status in dogs against CPV-2 by recombinant protein based latex agglutination test[J]. *Biologicals*, 2017, 49:51-56.
- [30] Faz M, Martínez J S, Quijano-Hernández I, *et al.* Reliability of clinical diagnosis and laboratory testing techniques currently used for identification of canine parvovirus enteritis in clinical settings[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2017, 79(1):213-217.

(编辑:李文平)