

猪圆环病毒2型感染诊断技术研究进展

邓启霞¹, 吕其壮^{1,2*}, 张琦¹, 卓严玲¹, 邓家华¹

(1. 玉林师范学院生物与制药学院, 广西 玉林 537000; 2. 广西农产资源化学与生物技术重点实验室, 广西 玉林 537000)

摘要:猪圆环病毒2型(Porcine circovirus type 2, PCV2)是一种可引起猪呼吸疾病综合征、猪皮炎和肾病综合征、断奶仔猪多系统衰竭综合征等多种疾病的主要病原体。PCV2与不同的病毒或细菌混合感染引发的疾病具有不同的临床特征, 导致其病难以检测, 无法提前预防和及时阻断传染, 继而导致养猪业经济损失惨重。因此, 先进的PCV2感染诊断技术对于PCV2的预防、诊断及预后显得尤为重要, 本文综述了近几年PCV2感染诊断技术的研究现状及发展趋势, 以期为今后PCV2感染诊断技术的研发指明方向。

关键词:猪圆环病毒2型; 检测; 防控

中图分类号: S855.3

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2021)05-0071-05

Research Progress of the Diagnosis Techniques for Porcine Circovirus Type 2 Infection

DENG Qixia¹, LYU Qizhuang^{1,2*}, ZHANG Qi¹, ZHUO Yanling¹, DENG Jiahua¹

(1. College of Biology & Pharmacy, Yulin Normal University, Yulin 537000; 2. Guangxi Key Laboratory of Agricultural Resources Chemistry and Biotechnology, Yulin 537000, China)

Abstract: Porcine circovirus type 2 (PCV2) is a major pathogen causing porcine respiratory disease complex (PRDC), porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS), postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), etc. The diseases caused by mixed infection of PCV2 with different viruses or bacteria have different clinical characteristics, which makes it difficult to detect the etiological factors and unable to prevent and block the infection in advance, and thereby leading to enormous economic losses in the pig industry. Therefore, advanced diagnostic techniques of PCV2 infection is particularly important for the prevention, diagnosis and prognosis of PCV2. This paper summarizes the research status and development trend of the diagnosis techniques of PCV2 infection in recent years, in order to indicate the direction for the future research and development of the diagnosis techniques of PCV2 infection.

Key words: Porcine circovirus type 2 (PCV2); Detection; Prevention and control

PCV2是一种无囊膜单股环状DNA病毒,属于圆环病毒科,呈二十面体对称,直径为17~20 nm,是目前所知的最小动物病毒之一^[1]。PCV2被认为是猪圆环病毒相关疾病(PCVAD)中最主要的病原体,现在已发现的PCV2基因亚型有PCV2a、

PCV2b、PCV2c、PCV2d、PCV2e、PCV2f、PCV2g和PCV2h^[2],其中PCV2b是最主要的流行毒株。

猪是PCV2的天然宿主,PCV2可以感染各年龄段、不同性别的猪,哺乳期和育成期的猪最易被感染,特别是5~12周期的乳猪^[3]。在流行感染过的猪群中,其发病率和死亡率并不高,最后造成高死亡率的原因主要是猪感染PCV2后常诱发多重病毒和(或)细菌的交叉感染,严重破坏被感染动物的免疫系统,使其免疫应答能力下降。因此,及早发现并积极预防和治疗PCV2的感染仍然是猪场疫病防控工作的重中之重。本文针对PCV2实验室诊断技术的研究进展展开综述,以期PCV2的临床检测提供可行性参考。

收稿日期: 2019-05-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860708); 广西自然科学基金项目(2017GXNSFBA198025); 玉林师范学院大学生创新创业训练计划项目(202110606040)

作者简介: 邓启霞(1997-),女,在读本科,主要从事分子病原学与免疫学研究。

通讯作者: 吕其壮,男,博士,副教授,E-mail: lvqizhuang062@163.com

1 分子生物学检测技术

1.1 PCR技术

1.1.1 常规PCR

常规PCR具有快速、简便、特异的优点,是一种常用诊断方法,原理是根据目的片段设计引物在DNA聚合酶和相应仪器作用下体外扩增部分或全部目的片段。李英^[4]根据PCV2 ORF2设计特异性引物对猪场出现PMWS典型症状的猪进行PCR检测,结果成功检测出PCV2病毒感染,这为圆环病毒的快速准确诊断提供了科学依据。

1.1.2 多重PCR

多重PCR是指在一个PCR反应体系中,同时加上两种以上的引物,同时扩增出多个核酸片段的PCR技术。由于PCV2常与其他病原体混合感染引起严重的综合病征,而多重PCR可以一次扩增出多个核酸片段,因此可节省检测的时间,为临床和防疫提供了便利。单重PCR费时费力,血清学诊断准确度较低,而多重PCR技术不仅特异性强、敏感度高,而且能够同时检测多种病原体^[5],因此近些年基于PCV2和其他病原体临床检测的多重PCR技术不断涌现。王立娇等^[6]成功建立同时检测PCV1和PCV2的双重PCR方法,具有较高的敏感性和特异性,通过对15个猪场的血清样品进行检测,发现猪场中PCV2比PCV1感染率高。罗宁等^[7]成功建立可以同时检测PRRSV、CSFV、PRV、PCV2、PPV和PCMV的多重PCR,使用此方法对来自山东省各猪场的145份临床发病样品进行检测,总阳性率为83.45%,2种以上病毒混合感染阳性率为69.66%,结果表明建立的多重PCR敏感性好、应用广泛、实用性强。

1.1.3 竞争PCR

Dezen等^[8]成功建立竞争性聚合酶链反应(cPCR)和SYBR Green real-time PCR这两种方法来进行PCV2 DNA的检测,发现cPCR更容易出现假阳性,且费时费力、操作繁琐,因此目前临床上很少使用cPCR进行PCV2检测。

1.1.4 套式(巢式)PCR

早期曾出现不少用于检测PCV2的巢式PCR方法的研究报道,但其敏感性试验不够完善,未能确定最低检出限。2015年,于静等^[9]成功建立新的巢式PCR方法,其灵敏度与已报道的荧光定量PCR检测方法相近,比普通PCR灵敏度高、简便,虽与之前建立的巢式PCR类似,但此次建立的巢式PCR有其明确的最低检出限。Kim等^[10]在

多重PCR的原理上成功建立双重巢式RT-PCR,可以同时检测PCV2和PRRSV,经过对两者病毒最低检出限的对比,表明该方法一致性良好。

1.1.5 荧光定量PCR

实时荧光定量PCR技术是根据荧光信号强度的变化来监测整个PCR的进程,旨在能够对未知模板进行定量分析。目前此技术主要包括两大类:(1)使用特异双链DNA结合燃料的燃料法荧光定量PCR;(2)建立在荧光共振能量转移原理上使用荧光标记探针的探针法荧光定量PCR。师小潇等^[11]成功建立实时荧光定量PCR和常规PCR检测方法,通过对使用这两个方法对猪血清样品进行检测的结果进行比较,发现荧光定量PCR结果直观、敏感性更好、特异性更强,但因其价格昂贵、操作要求高,故不宜在基层推广。

1.1.6 数字PCR技术

目前,可将数字PCR(Digital PCR, dPCR)技术分为微孔式数字PCR、微滴式数字PCR和微腔式数字PCR三种,其中微滴式数字PCR应用最为广泛,其工作原理是将DNA分子稀释到一定浓度,生成一定数目的微滴,再进行PCR扩增,读取阳性微滴数目。无需借助标准品和标准曲线,通过直接检测样品中核酸的原始浓度便可以实现DNA的定性定量检测^[12]。该技术比传统荧光定量PCR的灵敏度和精确性更高,而且成本更加低廉。赵珊^[13]通过建立一种新型PCV2微滴式数字PCR定量检测方法,将其应用于检测种猪血清样品、PCV2疫苗半成品和猪内脏组织中PCV2的病毒含量情况,并与TaqMan荧光定量PCR方法进行比较验证,成功获得了满足出入境检验检疫需求的PCV2检测方法,该方法灵敏度高、重复性好、稳定性高,可用于后期检测多种临床样品。

1.2 限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)

PCR-RFLP利用限制性内切酶识别位点造成位点增加或缺失而改变酶切性质这一特点,通过直接或间接基因诊断得出结果。Hamel等^[14]利用自己设计的引物分别从PCV1和PCV2毒株中扩增出长度为438 bp的基因片段,经限制性片段长度多态性(RFLP)分析后PCV2毒株的基因型极易被鉴定和区分。Fenaux等^[15]根据已有的PCV株的基因序列,利用PCR快速有效扩增猪圆环病毒的微量DNA,再使用RFLP区分PCV1和PCV2,继而对猪圆环病毒感染做出鉴定。

1.3 原位杂交技术(ISH)

原位杂交是基于核酸单链之间某些碱基序列可以互补配对而建立的检测技术。Seo等^[16]利用ISH对经石蜡包埋和福尔马林固定且患有断奶后仔猪多系统衰竭综合征的淋巴组织进行PCV2检测,不仅成功检测到PCV2病毒核酸,而且较之于基于多克隆和单克隆抗体的IHC方法,ISH更易于区分PCV2a和PCV2b基因亚型感染,但由于IHC操作要求比ISH简单得多,因此目前IHC仍比ISH更适合于PCV2感染的临床诊断。

1.4 DNA芯片技术

DNA芯片技术又称基因芯片,是近年来分子生物学与微电子学等多学科交叉融合而成的一项利用碱基互补配对的原理进行核酸杂交的高新技术。姜永厚等^[17]在PCV2保守序列复制酶基因内设计了两对特异的核苷酸探针,成功建立基因芯片检测技术,该技术可准确鉴别PCV基因型,其灵敏度是凝胶电泳的5倍,表明寡核苷酸基因芯片技术可有效地应用于PCV感染的临床诊断和分子流行病学检查。此外,PCV2和其他病毒混合感染情况也可用DNA芯片技术进行诊断,但最近几年基因芯片技术的研究相对于其他PCV2检测技术的研究报道并不多。

1.5 环介导等温扩增技术(LAMP)

环介导等温扩增技术是在2000年发展起来的一种核酸诊断技术,可以在常温下进行检测,基因的扩增和产物的检测可以一步完成,扩增效率和特异性高,检测结果可直接判断。Chen等^[18]成功建立了一种快速、简便的PCV2 LAMP检测方法,与普通PCR相比灵敏度高,与PCV1、PRRSV和PRV均无交叉性,体现较好特异性。

1.6 重组酶聚合酶扩增技术

重组酶聚合酶扩增(Recombinase polymerase amplification, RPA)技术是2006年首次出现的有望替代PCR的全新核酸等温扩增技术。在体外模拟生物体内DNA复制,在37℃~42℃恒温条件下20 min即可对目的片段完成扩增,37℃是最适反应温度。该方法特别适用于兽医、食品安全、生物安全、农业等领域的体外快速检测^[19]。Wang等^[20]成功建立了检测PCV2的实时荧光定量RPA方法,最低可检测100个PCV2基因组,其灵敏度较普通PCR提高了10倍。总之,RPA是一种快速、简便、高效、性价比高的诊断方法,可以在此基础上建立RPA-ELISA、on-chip RPA等扩增技术,最大可能提高检测效率,在动物疾病早期诊

断、产地检测、进出口快速检疫等方面具有巨大的应用前景和市场^[21]。

2 血清学检测技术

2.1 酶联免疫吸附试验(ELISA)

酶联免疫吸附试验在检测PCV2的血清学方法中使用最广泛,具有易于自动化、操作简单、敏感性高、适合大规模诊断的优点,主要包括竞争ELISA、间接ELISA、阻断ELISA、双抗体夹心ELISA和抗原捕获ELISA等五种方法,其中间接ELISA相比于其他四种方法不能有效分辨出PCV1和PCV2,所以其在应用方面受到极大限制。在血清学检测技术中,病毒中和试验测定法(VN)、IFA和IPMA等被广泛应用于检测PCV2抗体,但这些方法费时、劳动强度大,且会带来多种病毒感染风险,而ELISA可以避免这些问题,适合大规模检测。Walker等^[22]利用PCV2的特异性抗体成功建立竞争ELISA方法,并使用该方法对来自美国、法国的484份血清样本进行检测,其检出敏感性和特异性结果分别达到99.58%和97.14%,比IFA表现出更高的敏感性,可用于PCV2感染的大规模快速检查。杨香林^[23]通过使用抗PCV2 Cap蛋白单克隆抗体5H7,建立了一种检测PCV2特异性抗体的阻断ELISA方法,此方法敏感性高、重复性好,且与其他几种猪病的阳性血清无交叉反应,可以用于PCV2感染或疫苗免疫猪血清的快速检查。Sun等^[24]以ORF2-E作为抗原建立的间接ELISA,具有特异性强、敏感性高、成本低、快速、简便等特点,可以区分血清样本中的PCV1和PCV2感染。此外,目前有学者试图通过使用PCV2的非结构蛋白基因建立间接ELISA方法并用于PCV2检测,如李春燕等^[25]利用ORF3蛋白作为包被抗原成功建立PCV2间接ELISA诊断方法,该方法与PCR检测具有很好的一致性,可用于临床上鉴别疫苗抗体与野毒感染抗体。

2.2 间接免疫荧光(IFA)

间接免疫荧光常用于细菌、病毒等微生物的检测和肾炎活检、皮肤活检的免疫病理检查,如PCV分离效果鉴定及其病变组织的检测、猪源细胞PCV2感染情况的检测等。此方法具有成本低、简便、快速、特异性高、非特异性荧光染色少的优点,但因其操作复杂繁琐、敏感性偏低,很少用于现场临床诊断。芦银华等^[26]利用猪肾传代细胞系PK-15增殖的PCV2标准毒株作为包被抗原成功建立了检测PCV2抗体的IFA方法,并对来自

中国多个地区的血清样品进行了检测,结果血清样品抗体阳性率达到 59%,并且所检测的 PPV、PRV 和 PRRSV 抗体均未见任何特异性荧光,说明该法具有良好的特异性,为猪场的疾病诊断和猪源细胞的净化提供了有效手段。宫婷等^[27]通过利用外源表达的 PCV2 Cap 蛋白制备的多克隆抗体成功建立了检测 PCV2 的一步间接免疫荧光试验(OS-IFA)并用于对广东省各地猪场采集的 79 份病料样品的 PCV2 检测,检测结果与 PCR 结果的总符合率达到 83.54%,说明该方法可以用作调查 PCV2 流行病学和监测猪场 PCV2 感染,且相对于传统的 IFA 更简便、快速,相比于传统的 PCR 方法成本更低廉,为 PCV2 的净化和感染防控提供了有效手段。

2.3 免疫组织化学技术(IHC)

免疫组织化学技术(IHC)是检测抗原或抗体在组织细胞内存在部位的一门新技术,尤其适合于病毒和病毒抗原在组织培养和机体细胞内生长繁殖定位的观察。目前,国内外许多学者利用多抗或单抗建立了许多可用于检测 PCV2 抗原的 IHC 方法,如徐恒^[28]利用其自制的 PCV2 特异性单抗建立了检测 PCV2 的 IHC 方法并用于扬州地区某一屠宰场猪腹股沟淋巴结样品的检测,结果显示 IHC 检测比 PCR 检测的符合率更高,说明 IHC 具有较高的灵敏度,且可以最大限度保存组织或细胞内待检物质的抗原性。由于该方法操作比较繁琐,耗时长,且要去除过氧化物酶的干扰,因此 IHC 大多只应用于需要对携带抗原的细胞及组织的大体形态进行评价的研究中。

2.4 免疫过氧化物酶单层细胞实验(IPMA)

刘长明等^[29]于 2007 年成功建立一种用于检测 PCV2 血清抗体的免疫过氧化物酶单层细胞实验(IPMA),并通过优化 IPMA 的反应条件进行优化后组装成了诊断试剂盒。用 IPMA 和 rcELISA 对 102 份猪血清进行检测,结果显示这两种方法的总复合率为 89.2%,且该 IPMA 诊断试剂盒批间和批内获得的检测结果一致,无批间批内差异,说明该试剂盒稳定可靠,可用于临床猪群血清抗体的检测,相比于传统 ELISA,IPMA 试剂盒制备工艺更简单,质量更容易控制,重复性更好。潘晓梅等^[30]又通过利用保存的 PCV2 淋巴组织毒建立了检测 PCV2 抗体的 IMPA 方法并用于对新疆各地猪场血清样品的检测,其结果与临床上 PCV2 感染导致的猪群发病的实际情况相符合,再次表明 IPMA 临床应用的可行性。

2.5 免疫胶体金技术(ICS)

免疫胶体金技术(ICS)是一种基于以抗体或抗原可用胶体金粒标记,检测未知抗原或抗体的方法^[31]。宋万杰等^[32]成功建立了 PCV2 抗体胶体金免疫层析方法,该方法具有快速、简便、稳定、敏感性高、特异性强、重复性好的特点,为实现 PCV2 快速诊断、流行病学调查和疫苗效果的评估奠定了基础,此实验过程分析了使用金标 Protein A、PCV2d Cap 蛋白包被检测线结果不理想的原因,为后续 PCV2 抗体胶体金检测试纸条的研制和应用提供了参考依据。时建立等^[33]通过使用柠檬酸三钠还原法制备胶体颗粒,成功建立检测 PCV2 抗体的胶体金免疫层析方法并组装检测卡,此检测卡可以极好地与 PCV2 阳性血清发生特异性反应,与传统 ELISA 试剂盒检测结果之间的总符合率大于 95%。该方法相比于 PCR、ELISA、IMPA 和 IFA 等更加简便、快速,且结果更直观,不需要专业人员操作,便于在基层推广。

3 病原学检测技术

病毒的分离培养和鉴定是临床上常用的病原学诊断技术,该方法是将病死猪组织如肺脏、肾脏、脾脏和淋巴结等进行研磨并与 PBS 混合成悬液(v/v=1:5),经 -20 °C 反复冻融 3 次后离心,取上清液进行过滤除菌,感染后取滤液接种于已长成单层且无 PCV1 污染的猪肾细胞(PK-15)或猪肺泡巨噬细胞(PAM)等适于 PCV2 病毒增殖的细胞,经 37 °C 吸附 1~2 h 后,加入含 2% FBS 的 DMEM 细胞维持液,37 °C 培养 24 h,倒掉细胞培养液并洗涤,更换新的含 2% FBS 的 DMEM 细胞维持液,37 °C 培养 48~72 h,然后将其传代培养 3 次以上,经 300 mmol/L D-氨基葡萄糖处理 30 min 后,借助 IFA 或者电镜技术进行 PCV2 抗原的检测或者 PCV2 病毒粒子的观察^[34]。该方法操作过程繁琐、费时费力,不适于 PCV2 感染的快速诊断,目前多应用于实验室研究。

4 现场快速检测技术

现场快速检测技术(POCT)是一种区别于传统实验室检测方法的新型检测技术,其测定类型分为干化学测定、免疫层析、生物传感器和生物芯片四种^[35]。与传统实验室检测方法相比,POCT 步骤精简、反应迅速、使用便捷、经济可行、结果精准,对于疾病的预防与诊治具有重要意义,适用于基层大范围推广,具有极大的经济价值和民生

意义。近年来,人们越来越关注 POCT,并且开始尝试将智能手机应用于该技术,以期实现对病原体的定性定量快速检测,同时有望借助手机联网平台将相关疫情一并报告到省市乃至国家疾控中心,从而实现对疫情的智能监控和预防。

5 小 结

PCV2是引起 PCVAD 的主要病原体,PCVAD 极易在全世界范围内发生和流行,死亡率1%~30%不等。感染 PCV2后,病猪往往触发免疫抑制而导致机体对疫苗的免疫反应性差,进一步增加对其他传染病的易感性,使动物长期处于亚临床状态。截至目前,PCV2已经成为危害我国乃至全球规模化猪场养猪生产的重要病原。尽管 PCV2疫苗能够有效预防 PCVAD 的发生并降低猪体血清中的 PCV2病毒含量,但是无法消除 PCV2对猪体的隐性感染。因此,快速有效地检测出感染 PCV2的病猪对于全球养猪业的发展具有重大意义。近年来,分子生物学技术和现代免疫学技术发展迅速,针对 PCV2的检测方法是当今的研究热点,但这些检测方法均存在一定的局限性,例如:荧光定量 PCR 结果直观、敏感性强,却因为其成本高昂、操作繁琐而难以大面积推广;IHC 检测比 PCR 检测的符合率和灵敏度更高,并且最大限度地保存了待检物质的抗原性,但该方法需要去除过氧化物酶的干扰,操作繁琐耗时,因此该方法局限性高、不实用。综上所述,尽管目前国内外学者已经建立了多种 PCV2的实验室诊断方法,但这些检测方法都或多或少存在一定的自身局限性。如果能将以上的检测方法彼此融合,取长补短,特别是将检测方式与互联网平台结合起来,建立一种集简单、灵敏、快速、特异、稳定、经济、实用、适用于基层推广、便于智能实时监控于一体的检测技术将是未来的研发方向。

参考文献:

- [1] 杨莹莹.猪圆环病毒2型 Cap 蛋白原核表达及间接 ELISA 方法的建立[D].哈尔滨:东北林业大学,2015.
- [2] Franzo G, Segalés, Joaquim, et al. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology [J]. PLoS one, 2018, 13(12): e0208585.
- [3] 于新友,李天芝,李 峰,等.猪圆环病毒病流行与防治进展[J].猪业科学,2015,32(11):100-102.
- [4] 李 英.猪圆环病毒2型感染的 PCR 检测[J].中国动物检疫,2012,29(9):52-53.
- [5] 谢金文,苗立中,沈志强.分子生物学技术在猪流感诊断中的应用[J].吉林农业科学,2010,35(3):30-34.
- [6] 王立娇,胡胜云,张 雪,等.猪圆环病毒1型与2型双重 PCR 检测方法的建立及应用[J].北京农学院学报,2019,34(1):61-65.
- [7] 罗 宁,王冬冬,杨宗统,等.猪6种常见病毒多重 PCR 检测方法的建立及应用[J].动物医学进展,2016,37(12):1-6.
- [8] Dezen D, Rijsewijk F A, Teixeira T F, et al. Comparative evaluation of a competitive polymerase chain reaction(PCR)and a SYBR Green-based real-time PCR to quantify Porcine circovirus-2 DNA in swine tissue samples[J].Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2011, 23(6): 1160-1167.
- [9] 于 静,陈彦永,何小江,等.猪圆环病毒2型巢式 PCR 检测方法的建立与初步应用[J].中国畜牧兽医,2015,42(12):3173-3178.
- [10] Kim H K, Lyoo K S, Huynh T M L, et al. Duplex nested reverse transcriptase polymerase chain reaction for simultaneous detection of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 from tissue samples[J]. Journal of Veterinary Science, 2017, 18(2): 253-256.
- [11] 师小潇,潘晓梅,张 伟,等.实时荧光定量 PCR 与常规 PCR 方法检测猪圆环病毒2型的比较[J].黑龙江畜牧兽医,2016(24):133-135.
- [12] 吴 冰,蔡先全,郑传发,等.数字 PCR 技术及其在微生物检测中的应用[J].现代食品,2018(22):77-79.
- [13] 赵 珊.猪圆环病毒2型微滴式数字 PCR 检测方法的建立与初步应用[D].雅安:四川农业大学,2016.
- [14] Hamel A L, Lin L L, Nayar G P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs[J].Journal of Virology, 1998, 72(6): 5262-5267.
- [15] Fenaux M, Halbur P G, Gill M, et al. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus(PCV2) from pigs with postweaning-multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(7): 2494-2503.
- [16] Seo H W, Han K, Oh Y, et al. Evaluation of commercial polyclonal- and monoclonal-antibody-based immunohistochemical tests for 2 genotypes of Porcine circovirus type 2 and comparison with in-situ hybridization assays[J].Canadian Journal of Veterinary Research, 2014, 78(3): 233-236.
- [17] 姜永厚,商晗武,陈伟杰,等.猪圆环病毒检测与分型寡核苷酸芯片的建立及应用[J].中国兽医学报,2008,28(10):1174-1180.
- [18] Chen H T, Zhang J, Sun D H, et al. Rapid detection of porcine circovirus type 2 by loop-mediated isothermal amplification[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 149(2): 264-268.
- [19] 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.
- [20] Wang J, Wang J, Liu L, et al. Rapid detection of Porcine circovirus-2 by recombinase polymerase amplification [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2016, 28(5): 1-4.
- [21] 杨 洋.五种重要动物病毒快速恒温扩增检测技术的建立与应用[D].北京:中国农业科学院,2017.(下转第100页)

- (9): 14-20.
- [6] 宋小青, 欧阳竹. 中国耕地多功能管理的实践路径探讨[J]. 自然资源学报, 2012, 27(4): 540-551.
- [7] 施园园, 赵华甫, 郎文聚, 等. 北京市耕地多功能空间分异及其社会经济协调模式解释[J]. 资源科学, 2015, 37(2): 247-257.
- [8] Power A G. Ecosystem services and agriculture: tradeoffs and synergies[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2010, 365(1554): 2959-2971.
- [9] Costanza R, Groot R D, Sutton P, et al. Changes in the global value of ecosystem services[J]. Global Environmental Change, 2014, 26(1): 152-158.
- [10] 杨文杰, 刘丹, 巩前文. 2001-2016年耕地非农化过程中农业生态服务价值损失估算及其省域差异[J]. 经济地理, 2019, 39(3): 201-209.
- [11] 宋成舜, 匡兵, 罗丽, 等. 耕地综合价值视角下武汉城市圈耕地保护补偿标准[J]. 水土保持研究, 2017, 24(2): 330-335.
- [12] 杨晓彤, 刘慧平, 高啸峰, 等. 基于GIS的西藏无资料地区耕地历史经济价值评价方法[J]. 农业工程学报, 2016, 32(13): 273-278.
- [13] 祁欣欣, 许实, 方斌. 基于耕地非经济价值基础的省级耕地保护责任量配置[J]. 中国土地科学, 2015, 29(7): 89-96.
- [14] 王晓瑜, 胡守庚, 童陆亿. 团风县耕地资源价值及其空间分布[J]. 资源科学, 2016, 38(2): 206-216.
- [15] 赵青, 许皞, 郭年冬. 粮食安全视角下的环京津地区耕地生态补偿量化研究[J]. 中国生态农业学报, 2017, 25(7): 1052-1059.
- [16] 谢高地, 肖玉, 甄霖, 等. 我国粮食生产的生态服务价值研究[J]. 中国生态农业学报, 2005(3): 10-13.
- [17] 范业婷, 金晓斌, 项晓敏, 等. 苏南地区耕地多功能评价与空间特征分析[J]. 资源科学, 2018, 40(5): 980-992.
- [18] 柯新利, 马艳春, 宋小青, 等. 基于PCA的耕地功能冲突与协同识别—以湖北省为例[J]. 水土保持通报, 2018, 38(6): 329-336.
- [19] 蔡运龙, 霍雅勤. 中国耕地价值重建方法与案例研究[J]. 地理学报, 2006(10): 1084-1092.
- [20] 李茹茹. 地块尺度耕地多功能分异及价值核算[D]. 北京: 中国地质大学(北京), 2017.
- [21] 李恒哲, 郭年冬, 陈召亚, 等. 县域耕地资源价值综合评价及动态分析—以河北省黄骅市为例[J]. 土壤通报, 2015, 46(6): 1334-1340.
- [22] 王玉奇. 基于耕地价值的征地补偿标准研究[D]. 西安: 长安大学, 2016.
- [23] 韩会庆, 蔡广鹏, 陈思盈, 等. 我国西南喀斯特贫困乡村生态系统服务价值比较研究[J]. 东北农业科学, 2020, 45(4): 84-89.
- [24] 谢高地, 鲁春霞, 冷允法, 等. 青藏高原生态资产的价值评估[J]. 自然资源学报, 2003(2): 189-196.
- [25] 周洲. 我国粮食增产粮农不增收的原因: 基于粮食价格和生产成本关系的检验[J]. 河南工业大学学报(社会科学版), 2018, 14(6): 10-18.

(责任编辑: 王昱)

(上接第75页)

- [22] Walker I W, Konoby C A, Jewhurst V A, et al. Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus-type 2 [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2000, 12(5): 400-405.
- [23] 杨香林. 猪圆环病毒2型单抗阻断ELISA方法的建立与核酸疫苗重组体的构建及免疫特性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [24] Sun S Q, Guo H C, Sun D H, et al. Development and validation of an ELISA using a protein encoded by ORF2 antigenic domain of porcine circovirus type 2[J]. Virology Journal, 2010, 7(1): 274-280.
- [25] 李春燕, 刘梦茜, 陈仕怡, 等. 基于ORF3蛋白的PCV2间接ELISA诊断方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2017, 47(4): 427-434.
- [26] 芦银华, 谈国蕾, 华修国, 等. 应用间接免疫荧光试验检测猪圆环病毒抗体[J]. 中国兽医科技, 2002, 32(8): 19-20.
- [27] 官婷, 扈荣良. 猪圆环病毒2型一步间接免疫荧光试验的建立及初步应用[J]. 中国动物传染病学报, 2017, 25(5): 11-16.
- [28] 徐恒. 猪圆环病毒2型单克隆抗体的研制和基于单抗的检测PCV2抗原的免疫组化法的建立及其初步应用[D]. 扬州: 扬州大学, 2018.
- [29] 刘长明, 张超凡, 危艳武, 等. 猪圆环病毒2型免疫过氧化物酶单层细胞试验抗体检测试剂盒的研制及应用[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(8): 621-624, 633.
- [30] 潘晓梅, 贺筭, 张伟, 等. 免疫过氧化物酶单层细胞试验检测猪圆环病毒II型抗体方法的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(13): 184-186, 282.
- [31] 贾蕊. 猪圆环病毒2型抗体检测试纸的研制[D]. 郑州: 郑州大学, 2017.
- [32] 宋万杰, 胡伯里, 金玉兰, 等. 猪圆环病毒2型抗体胶体金免疫层析方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2014, 44(7): 710-714.
- [33] 时建立, 徐胜男, 彭喆, 等. 圆环病毒2型抗体胶体金检测试纸条的初步研制及应用[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(2): 73-76.
- [34] 龙冬梅, 汤德元, 黄涛, 等. 猪圆环病毒病2型诊断技术的研究进展[J]. 猪业科学, 2017, 34(7): 113-117.
- [35] 高兵兵. 基于毛细力自驱动的微流控芯片及在POCT中的应用[D]. 南京: 东南大学, 2017.

(责任编辑: 刘洪霞)