

杨钰楚, 王晨曦, 周雪珂, 等. A 型塞内卡病毒 RT-LAMP 检测方法的建立及应用[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(4): 868-873.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2019.04.017

## A 型塞内卡病毒 RT-LAMP 检测方法的建立及应用

杨钰楚<sup>1</sup>, 王晨曦<sup>1</sup>, 周雪珂<sup>2</sup>, 赵 军<sup>3</sup>, 徐志文<sup>1,2</sup>, 朱 玲<sup>1,2</sup>

(1. 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130; 2. 四川大学生命科学学院, 四川 成都 611130; 3. 四川农业大学动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130)

**摘要:** 为建立一种利用逆转录环介导等温核酸扩增 (RT-LAMP) 快速检测 A 型塞内卡病毒 (SVA) 的方法, 从 SVA 细胞培养液中提取总 RNA, 根据 SVA VP1 基因序列, 设计一套对应目的片段 6 个区域的 4 条特异性引物进行核酸扩增, 建立 RT-LAMP 检测方法。利用建立的 RT-LAMP 检测方法对口蹄疫病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪瘟病毒、猪伪狂犬病病毒与塞内卡病毒进行特异性试验。将 SVA VP1 质粒 10 倍梯度稀释液作为模板 ( $1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^7$  拷贝) 进行 RT-LAMP 和 RT-PCR 反应, 测试 RT-LAMP 检测方法的灵敏性。采集疑似发病猪的鼻腔拭子和水疱液共 126 份样品, 应用 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测, 加入 SYBR Green I 进行可视化鉴定。结果表明, 与传统 RT-PCR 相比, RT-LAMP 检测方法灵敏度高 1 000 倍, 且与其他病毒无交叉反应, 具有高度敏感性和特异性。临床样品检测结果显示, 鼻腔拭子样本 SVA 阳性率为 29.6%, 水疱液样本 SVA 阳性率为 100.0%, 2 种方法检测结果一致, 符合率为 100%。综上所述, 本研究建立的 RT-LAMP 检测方法准确、简便、经济有效, 尤其适用于现场和基层实验室对 SVA 的快速诊断。

**关键词:** A 型塞内卡病毒; RT-LAMP; 快速检测

**中图分类号:** Q939.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)04-0868-06

## Development and application of a reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for detection of Senecavirus A (SVA)

YANG Yu-chu<sup>1</sup>, WANG Chen-xi<sup>1</sup>, ZHOU Xue-ke<sup>2</sup>, ZHAO Jun<sup>3</sup>, XU Zhi-wen<sup>1,2</sup>, ZHU Ling<sup>1,2</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 611130, China; 3. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** The objective of this study is to establish a method for detecting Senecavirus A (SVA) simply and quickly by reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) technology. A set of four primers specific to six regions within the SVA VP1 gene was designed for the RT-LAMP assay using total RNA extracted from SVA cell culture. To evaluate the specificity of the RT-LAMP assay, viruses related to foot-and-mouth disease virus (FMDV) or known of porcine common virus, including pseudorabies virus (PRV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), classical swine fever virus (CSFV), were tested together with SVA. To assess the detection sensitivity, 10 fold serial dilutions of RNA template ( $1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^7$  copies) were used in

RT-PCR and RT-LAMP. To evaluate the application value of this method, a total of 126 nasal swab and vesicular fluid samples were collected from suspected sick pigs to detect by RT-LAMP and RT-PCR, and SYBR Green I was added to visualize the detection. The results showed that the sensitivity of RT-LAMP detection method was 1 000

收稿日期: 2019-05-15

基金项目: 四川省科技支撑计划项目 (2015NZ0072); “十三五” 育种攻关计划课题 (2016NY20052)

作者简介: 杨钰楚 (1998-), 女, 成都人, 本科, 主要研究方向为猪病病原分子诊断技术。王晨曦、周雪珂为共同第一作者。

通讯作者: 朱 玲, (E-mail) abtczl72@126.com

times higher than that of traditional RT-PCR. And there was no cross reaction with other viruses, so it had high sensitivity and specificity. The results of clinical samples detection showed that the positive rates of SVA in nasal swab samples and vesicular fluid samples were 29.6% and 100.0%, respectively. The results of the two methods were consistent and the coincidence rate was 100%. In conclusion, the RT-LAMP assay established in this study is rapid, simple and cost-effective, especially suitable for rapid diagnosis of SVA in the field and basic laboratory.

**Key words:** Senecavirus A; reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP); rapid detection

塞内卡病毒 A (Senecavirus A, SVA) 是一种阳性的单链 RNA 病毒, 也被称为塞内卡谷病毒 (Seneca valley virus, SVV)<sup>[1-3]</sup>。SVA 是猪原发性水疱病 (Porcine idiopathic vesicular disease, PIVD) 的病原体, 感染此病的病猪会出现跛行, 皮肤充血, 鼻吻和蹄冠部产生水疱继而发生破溃现象, 但一般情况下难以通过症状与口蹄疫、猪传染性水疱病、猪水疱性皮疹、猪水疱性口炎等疾病区分<sup>[4]</sup>。SVA 基因组包含一个开放阅读框 (Open reading frame, ORF), 它编码 1 个多聚蛋白, 该蛋白经病毒 2A、3C 蛋白酶 (3C<sub>pro</sub>) 和宿主蛋白酶水解, 产生 3 种结构蛋白和 8 种非结构蛋白, 其中结构蛋白 (vp0、vp3 和 vp1) 形成病毒衣壳, 而非结构蛋白在病毒复制以及与病毒宿主的相互作用中均扮演着重要作用。另有研究指出, SVA 表现出一种溶瘤特性, 可靶向清除神经内分泌癌细胞<sup>[5-8]</sup>, 目前它已被确认为一种能有效抵抗多种人类癌症的溶瘤病毒<sup>[6,8-9]</sup>。然而由于 SVA 是近年新发现的病毒, 关于它的致病机制仍需开展大量相关研究。

研究人员于 2002 年首次在受污染的 PER.C6 细胞系中检测到 SVA<sup>[10]</sup>。而目前, SVA 已在加拿大、巴西、美国和中国等多个国家陆续被发现<sup>[1,11-13]</sup>。据报道, SVA 引发的猪原发性水疱病已传入中国境内, 甚至在一些地区呈散发趋势<sup>[13]</sup>。因此亟需建立一种快速、简便、高效、准确的方法来鉴定其病原体, 以便尽早开展相应防控措施, 避免重大经济损失。

逆转录-聚合酶链反应 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 和实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative-polymerase chain reaction, RT-qPCR) 和巢式聚合酶链反应 (nested-polymerase chain reaction, nested-PCR) 技术已被广泛应用于 SVA 的检测<sup>[14-17]</sup>, 但它们均依赖熟练的技术人员和精密的仪器, 不适合在基层实验室及养殖场

进行即时的 SVA 检测。

逆转录环介导等温扩增技术 (Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP) 是一种能快速检测多种病原体的扩增技术<sup>[18-19]</sup>。该方法不需要昂贵的仪器和试剂, 操作简便。然而目前尚未有报道使用 RT-LAMP 来检测 SVA, 因此本研究提出针对 SVA VP1 基因, 利用 RT-LAMP 技术建立一种能快速、高效、准确检测临床样本中 SVA 病毒的检测方法。这种检测方法无需分离核酸, 只需要一个简单的恒温装置即可完成, 能帮助我们快速区分 SVA 和其他造成水疱类疾病的病毒, 从而更及时地进行疾病预防和治疗, 为临床快速诊断 SVA 感染提供了一种新的选择。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒

SVA 毒株 SC 由动物生物技术中心分离鉴定并保存。口蹄疫病毒 (FMDV)、猪伪狂犬病病毒 (PRV) 毒株 Fa、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 毒株 SC-NJ、猪瘟病毒 (CSFV) 毒株 C 均由动物生物技术中心提供。从四川省不同地区养殖场采集水疱液和鼻腔拭子样品共 126 份。

### 1.2 RT-LAMP 和 RT-PCR 引物的设计

根据 GenBank 上已发表的 SVA 核酸序列 (登录号: KY618836), 选择编码 VP1 蛋白的序列作为 RT-LAMP 和 RT-PCR 的靶序列, 运用 Primer Explorer V4 软件 (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>) 设计一组引物, 包括外引物 F3、B3, 内引物 FIP、BIP。使用 Primer 5 软件设计引物 (F, R) 对 VP1 基因进行 RT-PCR 扩增。本研究所使用的引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。引物序列见表 1。

### 1.3 病毒核酸提取

SVA 细胞培养液、鼻腔拭子浸出液和水疱液样

本3 000 g 低速离心 10 min 后取上清液,使用 TRIzol 试剂(Invitrogen, USA)从 200  $\mu$ l 的上述上清液中提取病毒 RNA,将 RNA 溶解于 20  $\mu$ l DEPC 处理水中。采用 TaKaRa 试剂盒进行反转录制备 cDNA 作为模板。反应产物储存于-70  $^{\circ}$ C 备用。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

检测方法	引物	序列(5'→3')	位置
RT-LAMP	SVV F3	CCGATCTCGACTACT-GAATG	2 866~2 886
	SVV B3	GAGAACGCCACTGT-CAGAC	3 017~3 036
	SVV FIP	CATCGTCTGCTGTG-CACCT-AGAAGACGC-CGTCTTCC	2 881~2 941
	SVV BIP	TTCTAACACCCCGC-CCAACA-TTGACGTA-CAGGCCGAAAC	2 953~3 013
RT-PCR	SVV F	TACAGTTTGGCCT-GTTTCACT	3 063~3 083
	SVV R	CGCCAGTAAAGTGG-TAGGG	3 010~3 030
VP1	SVV VP1 F	TCCACCGACAACGC-CGAGAC	2 733~2 753
	SVV VP1 R	TTGCATCAGCATCTTCT-GCT	3 505~3 525

#### 1.4 建立 RT-LAMP 反应体系

反应混合物中各组分如下:cDNA 50 ng,F3 和 B3 各 0.2  $\mu$ mol/L,FIP 和 BIP 各 1.6  $\mu$ mol/L,甜菜碱 3.00  $\mu$ l(8 U/ $\mu$ l),dNTPs 1.4 mmol/L,*Bst* DNA 聚合酶 1.00  $\mu$ l(8 U/ $\mu$ l),M-MuLV 反转录酶 0.75  $\mu$ l(200 U/ $\mu$ l),RNA 酶抑制剂 0.50  $\mu$ l(40 U/ $\mu$ l),LAMP buffer 12.50  $\mu$ l。其中 LAMP buffer 各组分:20 mmol Tris-HCl(pH 8.8),8.0 mmol  $MgSO_4$ ,10 mmol KCl,10 mmol  $(NH_4)_2SO_4$ ,0.1% Triton X-100。补 DEPC 处理水至 25  $\mu$ l 反应体积。通过对反应条件的优化,确定反应温度为 65  $^{\circ}$ C,水浴加热反应 45 min,最后 80  $^{\circ}$ C 反应 10 min,取扩增产物 5  $\mu$ l 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定结果,并取剩余 20  $\mu$ l 加入 SYBR Green I 在紫外光下观察。

#### 1.5 RT-PCR 反应体系

采用 10.0  $\mu$ l 反应体系:2 $\times$ Taq PCR Master Mix (TaKaRa, Dalian, PR China) 5.0  $\mu$ l,正、反向引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ l,cDNA 1.0  $\mu$ l,最后补齐 DEPC 处理水。反应程序为:95  $^{\circ}$ C 5 min;95  $^{\circ}$ C 30 s,56  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,循环 35 次,72  $^{\circ}$ C 10 min。

用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对产物进行分析,并用 Goldview 染色。

#### 1.6 RT-LAMP 敏感性试验

利用 pGEM-T Easy Vector (Promega) 对 SVA VP1 基因进行回收、纯化,并将其克隆到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中,提取重组质粒 DNA。再用 *Nde* I 酶酶切线性化,T7RNA 聚合酶体外转录合成 cRNA,纯化后测定浓度并于-70  $^{\circ}$ C 保存。使用 10 倍倍比稀释的 RNA 模板( $1\times 10^0$  拷贝 $\sim 1\times 10^7$  拷贝)进行 RT-PCR 和 RT-LAMP 扩增。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后加入 SYBR Green I,在紫外光照射下观察荧光变化。

#### 1.7 RT-LAMP 特异性试验

利用建立的 RT-LAMP 检测方法对猪口蹄疫病毒(FMDV)及一些猪常见病毒(PRV、PRRSV、CSFV)进行检测,DEPC 处理水作为阴性对照。产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,GoldView 染色后紫外灯下观察。

#### 1.8 临床样品检测

2017 年至 2018 年,在四川省不同地区养猪场(成都、眉山、遂宁、绵阳、德阳和内江)共采集了 126 份鼻腔拭子和水泡液样本。采用本研究建立的 RT-LAMP 和常规 RT-PCR 进行检测。

## 2 结果与分析

#### 2.1 RT-LAMP 引物鉴定

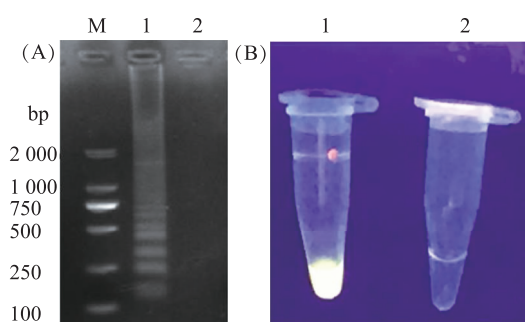
通过优化试验,确定了最佳反应时间和反应温度,RT-LAMP 反应在 65  $^{\circ}$ C 下进行 45 min,然后 80  $^{\circ}$ C 持续 10 min 以灭活 DNA 聚合酶,产物用琼脂糖凝胶电泳进行分析,并用溴化乙锭染色。如图 1A 所示,阳性对照显示出 1 条梯状条带,而阴性对照没有条带出现。同样地,如图 1B 所示,只有阳性对照管发出荧光,阴性对照管无变化。

#### 2.2 特异性试验

由图 2 可知,只有 SVA 重组质粒模板经 RT-LAMP 扩增可见梯形条带,相反,其他病毒未出现条带,结果表明,该 RT-LAMP 检测方法具有较高的特异性。

#### 2.3 敏感性试验

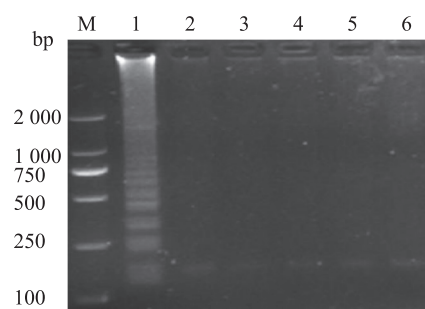
图 3 表明,RT-LAMP 在稀释度为  $1\times 10^1$  拷贝时仍可以检测到,而 RT-PCR 只能检测  $1\times 10^4$  拷贝的 SVA。反应混合物中加入 SYBR Green I,荧光强度随病毒数量降低而降低,显色情况如图 3A。



A: RT-LAMP 产物琼脂糖电泳检测结果; B: 加入溴化乙锭荧光检测结果。图 A 与图 B 中, 1 表示阳性对照, 2 表示阴性对照。

图 1 验证 SVA RT-LAMP 反应

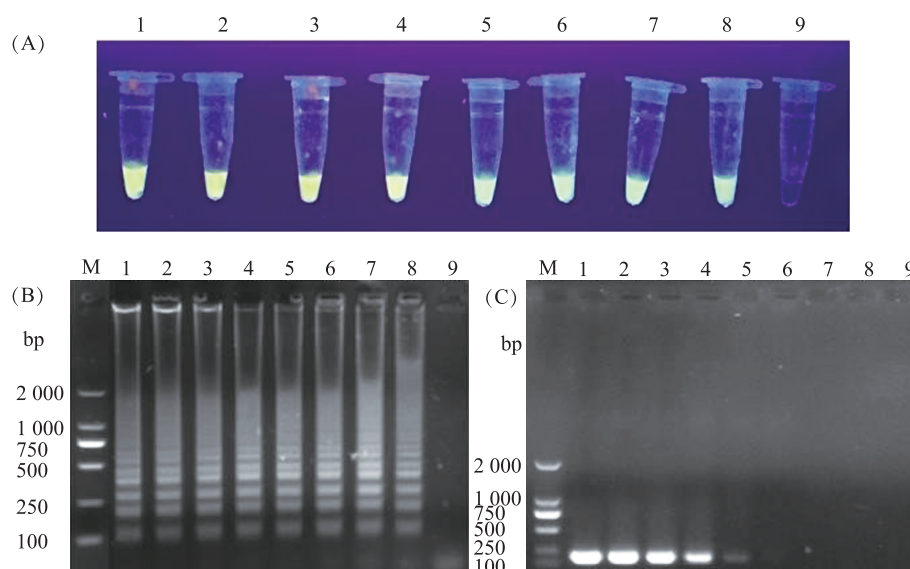
Fig.1 Verification of SVA RT-LAMP



M: DNA 分子质量标准; 1~6: 分别为 SVA、FMDV、PRV、PRRSV、CSFV、阴性对照。

图 2 不同病原 RT-LAMP 检测结果

Fig.2 Detection of different pathogens by RT-LAMP



A: LAMP-SYBR Green I 显色; B: LAMP 电泳结果; C: RT-PCR 电泳结果。M: DNA 分子质量标准; 1~8:  $1 \times 10^7$  拷贝  $\sim 1 \times 10^0$  拷贝; 9: 阴性对照。

图 3 RT-LAMP 敏感性试验结果

Fig.3 Sensitivity tests using the RT-LAMP

## 2.4 临床样品检测

利用 RT-LAMP 法和常规 RT-PCR 法对 126 份临床样品进行了检测, 结果见表 2。结果显示, 115 份鼻腔拭子样品中有 34 份呈 SVA 阳性; 11 份水疱液样品有 11 份呈 SVA 阳性, 2 种方法符合率为 100%, 结果完全一致。

## 3 讨论

SVA 是一种阳性的单链 RNA 病毒, 美国第一次发现这种病毒会引发猪水疱病, 在过去十年中, 全球各地陆续在猪体内检测到<sup>[11]</sup>。2015 年底, 中国爆

发猪原发性水疱病, 给养猪业造成了巨大的经济损失<sup>[20]</sup>。最终鉴定该病病原体为 SVA, 而 SVA 的病症容易与 FMD 混淆造成误判, 所以建立一种灵敏、快速、准确的鉴定 SVA 的方法具有重要的意义, 就此, 本研究首次建立了 RT-LAMP 法检测 SVA。

SVA 存在于鼻腔分泌物形成的水疱液中, 如若出现水疱表明猪群已被感染。水疱是病变特征, 其中病毒载量极高, 所以使用水疱液样本检测病毒最为准确。来自眉山和遂宁养殖场的样本 SVA 检出率最高, 分别为 46.9% (15/32) 和 51.5% (17/33), 而内江养殖场的 SVA 检出率最低, SVA 阳性率仅为



表 2 临床样本检测结果

Table 2 Detection results of clinical sample

样品来源	样品	样品数	RT-LAMP 检测结果(阳性率)	RT-PCR 检测结果(阳性率)
眉山	鼻腔拭子	29	12/29(41.4%)	12/29(41.4%)
	水疱液	3	3/3(100.0%)	3/3(100.0%)
遂宁	鼻腔拭子	29	13/29(44.8%)	13/29(44.8%)
	水疱液	4	4/4(100.0%)	4/4(100.0%)
绵阳	鼻腔拭子	24	4/24(16.7%)	4/24(16.7%)
	水疱液	1	1/1(100.0%)	1/1(100.0%)
德阳	鼻腔拭子	14	3/14(21.4%)	3/14(21.4%)
	水疱液	2	2/2(100.0%)	2/2(100.0%)
内江	鼻腔拭子	19	2/19(10.5%)	2/19(10.5%)
	水疱液	1	1/1(100.0%)	1/1(100.0%)
总数	鼻腔拭子	115	34/115(29.6%)	34/115(29.6%)
	水疱液	11	11/11(100.0%)	11/11(100.0%)

15.0%(3/20)。而 SVA 的高检出率说明 SVA 已在四川地区普遍存在。

LAMP 反应先由外部引物扩增出起始反应物模板,接着由内部引物引导合成靶基因 DNA 片段,由于内部引物扩增的 DNA 片段含有与该引物 5' 端 DNA 片段的反向互补序列,因而这些反向互补序列之间杂交形成茎环结构,另外一条内部引物与其互补链退火杂交后引导链置换合成反应,在扩增 DNA 片段的另外一端产生了新的茎环结构,共同形成哑铃结构。然后以形成的哑铃结构为起始反应物模板,进行循环扩增,最后形成花椰菜状的片段。LAMP 反应由于其特殊的扩增原理,在临床检测中体现出许多优势。

病原体的检测通常采用 RT-PCR、RT-qPCR 和巢式 PCR 技术,需要 1.5~2.0 h 才能完成,而 LAMP 是恒温扩增反应,避免了 PCR 反应中的退火、复性、延伸过程,一般在 30~60 min 内即可完成反应过程,在本研究中,RT-LAMP 法仅需作用 45 min,表明其具有较高效率。

对某些病原体检测,LAMP 检测方法达到甚至超过实时荧光定量 PCR 的检测水平<sup>[21]</sup>,比传统的 PCR 方法高 2~5 个数量级,有报道指出最低可检测 10 个拷贝或更低<sup>[22]</sup>。本研究比较了 RT-LAMP 法和 RT-PCR 法检测 SVA 的敏感性,传统 RT-PCR 可以在  $1 \times 10^4$  拷贝的最低稀释度下检测 SVA,而 RT-LAMP 法在稀释度  $1 \times 10^1$  拷贝时也能检测到 SVA,

比 RT-PCR 灵敏度高 1 000 倍,证明比常规方法具有更好的敏感性。于四川省收集的 126 份鼻拭子和水疱液样本中,通过 RT-LAMP 法检出 35.7% (45/126) 的 SVA 阳性,而常规 RT-PCR 也检测出 45 份 SVA 阳性样本。2 种方法的灵敏度相差 1 000 倍,但得到的检测率却是相同的,说明该方法可靠有效。这是由于 LAMP 反应针对靶基因序列上 6 个区域设计了 4 条顺序相连的特异性引物,任何一处不匹配皆不能进行反应,极少出现非特异性扩增的情况,且不受 PCR 抑制剂的影响,所以 RT-LAMP 法具有高特异性的特点。此外,与常规 RT-PCR 不同,RT-LAMP 检测仅需一个简单的恒温仪器,不需要复杂昂贵的热循环仪,且无需分离,可直接对病变组织进行扩增,大大降低了成本,简化了操作步骤,便于应用推广。

综上,RT-LAMP 法是一种灵敏、快速检测 SVA 的方法。该方法简单、高效,能满足现场采集样品进行即时 SVA 检测的需求。同时,本研究建立的方法能向基层实验室及养殖场工作人员推广,可简单地实现 SVA 的快速鉴定,将在 SVA 的预防和治疗中发挥着重要的指导作用。

#### 参考文献:

- [1] BLOMSTRÖM A L, HAKHVERDYAN M, REIDS M, et al. A one-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for simple and rapid detection of swine

- vesicular disease virus[J]. *J Virol Methods*, 2008, 147: 188.
- [2] BRACHTA J, O'HEARNE S, FABIAN W A, et al. Real-time reverse transcription PCR assay for detection of senecavirus A in swine vesicular diagnostic specimens [J]. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0146211.
- [3] BURKE MJ. Oncolytic seneca valley virus: past perspectives and future directions[J]. *Oncolytic Virotherapy*, 2016, 5: 81.
- [4] CANNING P, CANON A, BATES J L, et al. Neonatal mortality, vesicular lesions and lameness associated with Senecavirus A in a U.S. sow farm[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2016, 63: 373-78.
- [5] FERONATO C, LEME R A, DINIZ J A, et al. Development and evaluation of a nested-PCR assay for Senecavirus A diagnosis[J]. *Trop Anim Health Pro*, 2017, 50: 1-8.
- [6] FOWLE R, VERONICA L, RUSSELL H RANSBURGH, et al. Development of a novel real-time RT-PCR assay to detect Seneca Valley virus associated with emerging cases of vesicular disease in pigs[J]. *J Virol Methods*, 2017, 239: 34.
- [7] GIMENEZ-LIROLA G L, RADEMACHER C, LINHARES D, et al. Serological and molecular detection of Senecavirus A associated with an outbreak of Swine idiopathic vesicular disease and neonatal mortality[J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54: 2082.
- [8] GUOB Q, PIÑEYROP E, RADEMACHER J, et al. Novel Senecavirus A in swine with vesicular disease, United States, July 2015 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(7): 1325-1327.
- [9] AGNOL A M, OTONEL R A A, LEME R A, et al. A TaqMan-based qRT-PCR assay for Senecavirus A detection in tissue samples of neonatal piglets [J]. *Mol Cell Probes*, 2017, 33: 28-31.
- [10] HALES L M, KNOWLES N L, REDDY P S, et al. Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus[J]. *J Gen Virol*, 2008, 89: 1265.
- [11] MORTON C L, HOUGHTON P J, KOLB E A, et al. Initial testing of the replication competent Seneca Valley virus (NTX-010) by the pediatric preclinical testing program [J]. *Pediatric Blood & Cancer*, 2010, 55: 295.
- [12] NOTOMI T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: 63.
- [13] POIRIER J T, DOBROMILSKAYA I, MORIARTY W F, et al. Selective tropism of seneca valley virus for variant subtype small cell lung cancer[J]. *J Natl Cancer I*, 2013, 105: 1059.
- [14] REDDY P S, BURROUGHS K D, HALES L M, et al. Seneca Valley virus, a systemically deliverable oncolytic picornavirus, and the treatment of neuroendocrine cancers [J]. *J Natl Cancer I*, 2007, 99: 1623.
- [15] RUDINC M, POIRIER J T, SENZER N N, et al. Phase I clinical study of Seneca Valley Virus (SVV-001), a replication-competent picornavirus, in advanced solid tumors with neuroendocrine features[J]. *Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2011, 17: 888.
- [16] SAENGCHUTO K, STOTTC J, WEGNER M, et al. The full-length genome characterization, genetic diversity and evolutionary analyses of Senecavirus A isolated in Thailand in 2016[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2018, 64: 32-45.
- [17] VANNUCCI F A, LINHARES D C L, Barcellos D E S N, et al. Identification and complete genome of Seneca Valley Virus in vesicular fluid and sera of pigs affected with idiopathic vesicular disease, Brazil[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2015, 62: 589-593.
- [18] WU Q, ZHAO X, BAI Y, et al. The first identification and complete genome of Senecavirus A affecting pig with idiopathic vesicular disease in China [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64: 1633.
- [19] YU L, BAXTER P A, ZHAO X, et al. A single intravenous injection of oncolytic picornavirus SVV-001 eliminates medulloblastomas in primary tumor-based orthotopic xenograft mouse models[J]. *Neuro-oncology*, 2011, 13: 14-27.
- [20] ZHAO X, WU Q, BAI Y, et al. Phylogenetic and genome analysis of seven Senecavirus A isolates in China [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64: 2075-2082.
- [21] SAITO R, MISAWA Y, MORIYA K, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* [J]. *J Med Microbiol*, 2005, 54(11): 1037-1041.
- [22] POON L L, LEUNG C S, TASHIRO M, et al. Rapid detection of the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a loop-mediated isothermal amplification assay[J]. *Clinical Chemistry*, 2004, 50(6): 1050-1052.

(责任编辑:陈海霞)