DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2021.019

·技术与方法专题·

可视化核酸检测技术RPA-LFD的研究和应用进展

于灵芝，陶凌云，魏晓锋
(上海实验动物研究中心, 上海 201203)

[摘要] 重组酶聚合酶扩增技术（recombinase ploymerase amplication，RPA）是一种新型恒温核酸扩增技术，与PCR相比，操作简便，反应快速，灵敏度高，特异性强，无需精密仪器，是一种可以替代PCR的核酸检测技术，被认为是目前最有潜力成为快速分子诊断的工具。RPA与横向流动试纸条（lateral flow dipstick， LFD）结合的RPA-LFD技术，可实现扩增产物的可视化检测，在病原体现场核酸快速检测中具有良好的应用前景，这为实验动物的质量监督检验提供了一种新的方法。本文对RPA-LFD这一新型核酸检测方法的技术原理、研究现状、技术瓶颈及用于现场核酸提取的研究进展进行综述。

[关键词] 重组酶聚合酶扩增技术； 横向流动试纸条； 现场核酸提取； 动物疫病现场监测
[中图分类号] Q95-33；R-332 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817（2021）06-0547-07

Research and Application Progress in Visualized RPA-LFD Nucleic Acid Detection Technology

YU Lingzhi, TAO Lingyun, WEI Xiaofeng
(Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China)
Correspondence to: WEI Xiaofeng, E-mail: wei.xf@outlook.com

[Abstract] Recombinase polymerase amplification (RPA) is a novel isothermal nucleic acid amplification technology. Compared to PCR, it features ease of use, high efficiency, high sensitivity, high specificity, and does not need specific instruments, which allows it as an alternative to PCR and the most promising tool for rapid molecular diagnosis. RPA combined with lateral flow dipstick (LFD) (RPA-LFD) enables visual detection of amplified products and has promising applications for rapid nucleic acid detection of pathogens on site. The novel technique provides a new method for quality supervision and inspection of laboratory animals. In this paper, we reviewed the principle, research status, and technical difficulties of RPA-LFD, as well as the progress in rapid extraction of nucleic acid on site.

[Key words] Recombinase polymerase amplification; Lateral flow dipstick; Rapid extraction of nucleic acid on site; Surveillance and control of animal epidemic diseases on site

重组酶聚合酶扩增技术（recombinase ploymerase amplication， RPA）是2006年由Piepenburg等发明的一种新型恒温（37～42 ℃）核酸扩增技术[1]，既可以扩增DNA也可以扩增RNA，省去了额外的cDNA合成步骤，整个过程进行得非常快，一般可在10 min内获得可检出水平的扩增产物[2]。与PCR相比，整个过程不需要高温变性和低温退火，不依赖于精密的温控设备PCR仪。RPA对仪器的要求大大降低，反应时间明显缩短，简单、快速、高效，灵敏度高，特

[基金项目] 上海市科技创新行动计划(18140900703)
[作者简介] 于灵芝(1980—), 女, 博士, 主要从事横向流动试纸条研发和分子生物学研究。E-mail: yulingzhi@slarc.org.cn
[通信作者] 魏晓锋(1980—), 男, 硕士, 副研究员, 主要从事实验动物质量控制研究。E-mail: wei.xf@outlook.com

异性强，因此被认为是一种可以替代PCR的核酸检测技术[3]。

RPA扩增结果可以通过凝胶电泳、实时荧光和侧流层析试纸条等多种方法读取。RPA-LFD检测简单快速，设备便于携带，结果可肉眼判读，可以真正实现病原体快速现场核酸检测，为病原体监测和疾病防控提供了技术手段。但是，作为一项新的病原体检测技术，目前RPA-LFD尚未得到广泛研究。近年来，在人、畜、禽及水产动物上已有RPA-LFD研究报告，而在实验动物病原体检测方面的研究较少。本文对RPA-LFD检测病毒、细菌和寄生虫等病原体核酸的研究现状进行综述，提示该方法对实验动物病原体能快速现场检测，从而在进行快速有效的实验动物质量监督中具有重要的应用前景，值得进一步推广。

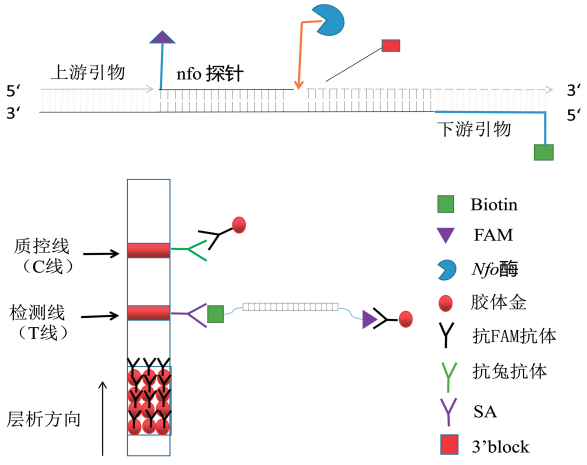
1 RPA-LFD技术介绍

1.1 RPA-LFD的检测原理

RPA-LFD是一项将重组酶聚合酶扩增、胶体金标记（三明治夹心法）、分子杂交和侧向流层析等方法相结合，且结果可视化的核酸检测技术。目前研究中使用最多的是英国TwistDX Inc公司设计的TwistAmp nfo试剂盒（*Nfo*为核酸外切酶Ⅳ）。其检测原理如图1所示。首先，上游引物和含有3’端生物素（biotin）标记的下游引物在重组酶和聚合酶的作用下进行扩增，含有羧基荧光素（FAM）标记的特异性探针与扩增产物进行扩增反应，形成5’端为FAM标记，3’端为生物素标记的产物。将该产物加到侧向流动试纸条的样品孔中，通过毛细作用层析至结合垫（固定有标记抗FAM抗体的胶体金颗粒），该产物中的5’端FAM与抗FAM抗体的胶体金颗粒结合形成复合物。该复合物层析到检测线（T线）时，因T线固定有链霉亲和素（SA），含有生物素标记的扩增产物被链霉亲和素捕获显红色；没有被捕获的复合物继续向上层析至质控线（C线）时，因C线固定有特异性抗体，被特异性抗体捕获显红色。此时结果为阳性。该方法一般在5 min内便可通过肉眼读取检测结果[3]。

1.2 RPA-LFD的优点

RPA-LFD不需要复杂的热循环，只需要简单的加热设备（如人体腋下夹持），37～42 ℃恒温10～30 min便可完成核酸扩增；之后将扩增产物滴在侧向层析试纸条上，大约5 min后即可肉眼观测到结果。因此，该方法操作简单、快速，而且检测结果的特异度和灵敏度与qPCR相当，不必依赖于实验室和精密仪器，无需专业人员，



注：Biotin为生物素，FAM为羧基荧光素，*Nfo*为核酸外切酶Ⅳ，SA为链霉亲和素，3’block为聚合酶延伸封闭基团（磷酸化基团）。

图1 重组酶聚合酶扩增技术-横向流动试纸条（RPA-LFD）的检测原理

Figure 1 Detection principle of recombinase ploymerase amplication-lateral flow dipstick (RPA-LFD)

即可轻松实现病原体的现场快速检测。

1.3 RPA-LFD技术难点

目前，RPA-LFD的一个重要技术瓶颈是其引物和探针既没有明确的设计原则，也没有专业的设计软件。英国TwistDX Inc公司对RPA-LFD引物和探针的设计给出了简单的指导建议：RPA引物设计长度一般为35 bp，引物的5’末端应避免鸟嘌呤重复，GC含量应控制在30%～70%；引物的3’末端的任何一个碱基错配都会严重影响RPA扩增效率，下游引物和探针序列之间叠加易形成二聚体，降低扩增效果。探针设计长度为46～52 bp，5’末端含有抗原标记（如FAM），3’末端含有聚合酶延伸封闭基团（如磷酸化基团），中部含有一个四氢呋喃基团（tetrahydrofuran，THF）；而且5’末端到THF位点含有不少于30个碱基，3’末端到THF位点含有不少于15个碱基，扩增时THF可被*Nfo*酶切割，DNA聚合酶可以在该羧基端位点进行延伸，与生物素（biotin）标记的下游引物一起扩增出含有FAM和biotin双标记的扩增产物。

研究者通常需要手动设计不同的引物和探针。探针长度以及探针相对于引物的最佳位置并没有固定的设计规则，这导致有很多种可能的组合，无疑会增加该方法中引物和探针合成及筛选的成本。因此，应严格按照指导建议进行设计，高质量的引物和探针才可以使该方法的灵敏度和特异度得到保证[4]。随着RPA-LFD技术的广泛研究和应用，不久的将来必然会开发出一种软件来设计引物和探针，那么该技术的应用成本将大大降低。

另外，由于RPA-LFD方法具有高效扩增的高灵敏度，在开管盖、取样、上样以及样本在侧向流动试纸条上层析的过程中，气体与样本液面摩擦可能产生核酸气溶胶污染，在下一次实验时容易出现假阳性结果。所以，RPA-LFD检测应尽量在通风性好、空旷的环境条件下操作[5]。

1.4 RPA-LFD应用于现场核酸提取

现场分子诊断需要解决3个关键问题，包括样品准备、扩增及检测，而样品准备是其中最大的挑战[6]。杨洋等[3]同时试验了cell-to-cDNA裂解液和基于磁珠的两种核酸提取方法。孙魁等[2]建立了碱裂解法结合纸基核酸纯化的样本处理体系，整个过程只需10～15 min。以上方法均摆脱了核酸提取过程中离心机的束缚，其与RPA-LFD方法联用，可以使分子诊断中的样品准备、扩增和检测同时摆脱实验室束缚，使得RPA-LFD方法真正应用于临床样本的快速现场诊断。

2 RPA-LFD研究现状

RPA-LFD方法由于操作方便、快速、高效，已在人类、畜禽及实验动物的病原体检测中进行了较多的研究。

2.1 RPA-LFD在人类和畜禽上的研究进展

2.1.1 用于病毒检测

Lau等[7]优化了一种快速检测严重急性呼吸综合征冠状病毒2（severe acute respiratory syndrome coronavirus 2，SARS-CoV-2）的反转录（reverse transcription，RT）-RPA-LFD方法，RT-RPA在37 ℃恒温浴中反应20 min，在LFD上反应5 min即肉眼可见结果。对78例阳性和35例阴性鼻咽标本进行敏感性和特异性分析，结果显示RT-RPA-LFD和反转录定量PCR（reverse transcription-quantitative PCR，RT-qPCR）的检测限值分别为7.7和5.0拷贝/μL RNA，且均与其他病毒无交叉反应。RT-RPA的临床敏感度和特异度分别为98%和100%。

Xiong等[8-9]建立了检测登革热病毒（Dengue virus，DENV）的RT-RAA-LFD（RAA同RPA）方法。RT-RAA在37 ℃恒温浴中反应20 min，扩增子在LFD上反应3 min即肉眼可见结果。RT-RAA-LFD方法的检测限值为10拷贝/μL RNA，特异度高。RT-RAA-LFD与商业化的RT-qPCR相比，在247例临床样本中检测一致性系数为0.957。

Gao等[10]采用RPA-LFD方法对猪德尔塔冠状病毒（porcine delta-coronavirus，PDCoV）进行了研究，PDCoV在37 ℃扩增10 min，结果表明其检测限值为1×10^2拷贝/μL，灵敏度比普通PCR高10倍，且与猪的其他病毒无交叉反应，阳性检出率（26.47%）也比普通PCR（23.53%）高。

此外，研究者对流感A和B病毒[11]、卡萨奇病毒[12]、猪塞尼卡谷病毒[4]、非洲猪瘟[13]、鸡传染性喉气管炎病毒[14]、腺病毒[15]、新城疫

病毒[16]、禽流感H9N2及H7N9[17-18]、猫细小病毒[19]、南美蓝对虾浓核病毒[20]、鲤鱼水肿病毒[21]和锦鲤疱疹病毒-3[21]进行了RPA-LFD方法的研究，结果均显示RPA-LFD方法检测快速，结果可靠，敏感度和特异度高，优于PCR方法，可用于现场快速诊断。

2.1.2 用于细菌检测

Peng等[22]建立了检测类鼻疽伯克氏菌的RPA-LFD方法，该方法能在30 min内裸眼看到结果，最低检测限值达20 fg（约25.6个拷贝），灵敏度与qPCR相当，而且与其他类鼻疽菌群复合物无交叉扩增反应。

Zhao等[23]建立了检测禽分枝杆菌副结核亚种的RPA-LFD方法，在39 ℃扩增30 min即可肉眼观察结果，最低检出限值是每个反应8个拷贝，与PCR相当，且对其他5种分枝杆菌无交叉反应。与qPCR相比，RPA-LFD检测的敏感度为100%，特异度为97.63%。

此外，RPA-LFD检测猪胞内劳森氏菌与普通PCR结果的符合率为100%[24]。Gao等[25]建立了检测贝类沙门氏菌的RPA-LFD方法，在40 ℃只需扩增8 min就能达到检测阈值，每个反应（20 μL）可检测到100 fg DNA，其实际性能优于qPCR。

2.1.3 用于寄生虫检测

Sun等[5]建立了检测日本血吸虫*SjR2*基因的LFD-RPA检测方法，在25～45 ℃条件下，反应15～20 min后可通过肉眼判定粪便样品的检测结果，最低检测限值为5 fg，这与qPCR相同。与金标准Kato-Katz法相比，LFD-RPA检测的敏感度为92.68 %，特异度为100 %，一致性系数为0.947；而酶联免疫吸附法检测的敏感度为85.71 %，特异度为93.55 %，一致性系数为0.793；间接血凝试验的检测敏感度为78.57 %，特异度为83.87 %，一致性系数为0.600。

此外，有学者建立了针对人恶性疟原虫[26]和犬吉氏巴贝斯虫[27]等的LFD-RPA检测方法，结果均表明该方法具有敏感、特异、快速的优势。

2.1.4 用于支原体检测

Zhao等[28]用RPA-LFD方法检测了442个牛支原体样本，39 ℃扩增30 min即可观察检测结果；同时与qPCR结果比较，RPA-LFD检测的灵敏度为99.00%，特异度为95.61%，一致性系数是0.902，最低检测限值为每个反应20个拷贝。

2.2 RPA-LFD在实验动物的研究进展

国家标准GB/T 14926[29]规定了实验动物微生物学检测方法，多采用培养法、酶联免疫吸附法、免疫荧光实验、血凝抑制实验等。北京和黑龙江等地方标准[30-32]进一步规定了实验用牛、实验用羊、实验用猪等实验动物的微生物学检测方法，包括抗原检测、抗体检测和核酸检测。上述标准中的方法检测时间少则数小时，多则数周；如果发现可疑结果，还需要重新检测，耗时耗力。近年来，实验动物团体标准[33-35]采用了荧光定量PCR方法对螺杆菌、肺支原体和小鼠肝炎病毒等一系列微生物进行检测，证明该方法快速、灵敏、特异，但需要专业技术人员、精密仪器和实验室操作环境。

对于国家标准和地方标准需要排除的微生物，包括口蹄疫病毒、山羊/绵羊痘病毒、山羊关节炎-脑炎病毒、伪狂犬病病毒、多杀性巴氏杆菌和布鲁氏菌等，目前也有了一些应用RPA-LFD检测的研究结果。例如，Wang等[36-37]建立了检测口蹄疫病毒的RPA-LFD方法，38 ℃扩增20 min即可观察到结果；同时与qPCR比较，该方法对质粒DNA的最低检测限值为每个反应3个拷贝，对病毒RNA的最低检测限值为每个反应50个拷贝，对其他气泡性病变的病毒无交叉反应。通过126例临床样本检测，发现RPA-LFD与qPCR检测结果的一致性为98.41%。同时，通过对不一致阳性结果的分析发现，RPA-LFD方法比qPCR更敏感。

Tu等[38]建立了检测山羊关节炎-脑炎病毒的RPA-LFD方法，37 ℃、30 min完成反应，最低检测限值为80 pg总DNA和10个拷贝质粒DNA，与羊痘和牛白血病等病毒无交叉反应。Yang等[39]建立了检测山羊/绵羊痘病毒的RPA-LFD方法，38 ℃下温浴20 min完成反应，与小反刍兽疫和口蹄疫等病毒无交叉反应。针对107例临床标本的评价结果表明，该方法能特异性检测羊组织和血液中的山羊/绵羊痘病毒，与实时qPCR对比无差异。

此外有研究发现，采用RPA-LFD方法在39 ℃反应20 min可快速检测出伪狂犬病病毒[40]、布鲁氏菌[41]和多杀性巴氏杆菌[42]，经与实时定量PCR方法或实时RPA方法比较，以及临床样本验证，结果显示RPA-LFD检测方法快速、灵敏、特异。

需要强调的是，本文介绍的RPA-LFD检测方法不需要非常专业的人员，不依赖于实验室，可现场检测，30 min左右即可目测得到结果，这为实验动物微生物监测提供了一种快速、便携、灵敏和特异的替代工具，也为国家标准、地方标准和团体标准提供一种新的检测手段。

3 展望

近年来，RPA-LFD技术作为一种快速的恒温核酸扩增技术，以其独特的优越性引起了研究者们的广泛重视。它同时满足以下所有快速分子诊断的标准：快速临床确诊，非实验人员操作，较低的检测成本，快速进行所有检测，可以接受的检测效果，以及与金标准相当或者更低的成本效率[43-44]。随着该技术的不断成熟和发展，RPA-LFD可以真正实现便携式的快速核酸检测，这将对实验动物质量的监督检测，保证实验动物安全生产和使用具有非常重要的作用，从而有效避免动物疫病带来的重大经济损失。

参考文献：

[1] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins[J]. PLoS Biol, 2006, 4(7): e204. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040204.

[2] 孙魁. 基于LFD-RPA的核酸可视化检测技术的建立及应用[D]. 北京: 解放军军事医学科学院, 2017.

[3] 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.

[4] 樊晓旭, 宋蓟远, 赵永刚, 等. 塞尼卡谷病毒重组酶聚合酶扩增-侧流层析试纸条检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(5):406-410. DOI:10.3969/j.issn.1008-0589.201708027.

[5] SUN K, XING W W, YU X L, et al. Recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow dipstick for rapid and visual detection of *Schistosoma japonicum*[J]. Parasit Vectors, 2016, 9: 476. DOI: 10.1186/s13071-016-1745-5.

[6] JAMES A, MACDONALD J. Recombinase polymerase amplification: Emergence as a critical molecular technology for rapid, low-resource diagnostics[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2015, 15(11):1475-1489. DOI: 10.1586/14737159.2015.1090877.

[7] LAU Y L, ISMAIL I B, MUSTAPA N I B, et al. Development of a reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid and direct visual detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)[J]. PLoS One, 2021, 16(1):e0245164. DOI:10.1371/journal.pone.0245164.

[8] XIONG Y F, LUO Y S, LI H, et al. Rapid visual detection of dengue virus by combining reverse transcription recombinase-aided amplification with lateral-flow dipstick assay[J]. Int J Infect Dis, 2020, 95: 406-412. DOI:10.1016/j.ijid.2020.03.075.

[9] XI Y, XU C Z, XIE Z Z, et al. Rapid and visual detection of dengue virus using recombinase polymerase amplification method combined with lateral flow dipstick[J]. Mol Cell Probes, 2019, 46: 101413. DOI:10.1016/j.mcp.2019.06.003.

[10] GAO X, LIU X S, ZHANG Y G, et al. Rapid and visual detection of porcine *Deltacoronavirus* by recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow dipstick[J]. BMC Vet Res, 2020, 16(1): 130. DOI: 10.1186/s12917-020-02341-3.

[11] SUN N, WANG Y, YAO X, et al. Visual signal generation for the detection of influenza viruses by duplex recombinase polymerase amplification with lateral flow dipsticks[J]. Anal Bioanal Chem, 2019, 411(16):3591-3602. DOI:10.1007/s00216-019-01840-z.

[12] XIE J, YANG X H, DUAN L, et al. One-step reverse-transcription recombinase polymerase amplification using lateral flow strips for the detection of coxsackievirus A6[J]. Front Microbiol, 2021, 12: 629533. DOI:10.3389/fmicb.2021.629533.

[13] ZHAI Y, MA P, FU X, et al. A recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick for rapid and specific detection of African swine fever virus [J]. J Virol Methods, 2020, 285:113885. DOI:10.1016/j.jviromet.2020.113885.

[14] 马国和, 高冬生, 王增, 等. 鸡传染性喉气管炎病毒RPA-LFD检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(12): 1128-1132. DOI: 10.3969/j. issn. 1008-0589.201802034.

[15] 孙魁, 邢微微, 徐东刚, 等. 基于重组酶聚合酶扩增结

合侧流层析技术的B、E型腺病毒快速可视化检测方法的研究与评价[J]. 军事医学, 2017, 41(7):547-551. DOI:10.7644/j.issn.1674-9960.2017.07.001.

[16] 刘志香. 新城疫病毒新型可视化RPA-LFD检测方法建立与初步应用[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.

[17] WANG Z, YANG P P, ZHANG Y H, et al. Development of a reverse transcription recombinase polymerase amplification combined with lateral-flow dipstick assay for avian influenza H9N2 HA gene detection[J]. Transbound Emerg Dis, 2019, 66(1): 546-551. DOI:10.1111/tbed.13063.

[18] MA S W, LI X, PENG B, et al. Rapid detection of avian influenza A virus (H7N9) by lateral flow dipstick recombinase polymerase amplification[J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41(12): 1804-1808. DOI: 10.1248/bpb. b18-00468.

[19] WANG Z H, WANG X J, HOU S H. Development of a recombinase polymerase amplification assay with lateral flow dipstick for rapid detection of feline parvovirus[J]. J Virol Methods, 2019, 271:113679. DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.113679.

[20] JAROENRAM W, OWENS L. Recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow dipstick for discriminating between infectious *Penaeus stylirostris* densovirus and virus-related sequences in shrimp genome[J]. J Virol Methods, 2014, 208: 144-151. DOI:10.1016/j.jviromet.2014.08.006.

[21] SOLIMAN H, EL-MATBOULI M. Rapid detection and differentiation of carp oedema virus and cyprinid *Herpes virus*-3 in koi and common carp[J]. J Fish Dis, 2018, 41(5):761-772. DOI:10.1111/jfd.12774.

[22] PENG Y, ZHENG X, KAN B, et al. Rapid detection of *Burkholderia pseudomallei* with a lateral flow recombinase polymerase amplification assay[J]. PLoS One, 2019, 14(7): e0213416. DOI: 10.1371/journal. pone.0213416.

[23] ZHAO G M, WANG H M, HOU P L, et al. Rapid visual detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow dipstick[J]. J Vet Sci, 2018, 19(2): 242-250. DOI: 10.4142/jvs. 2018.19.2.242.

[24] WU Y, TIAN K, ZHANG Y, et al. Rapid and visual detection of Lawsonia intracellularis with an improved recombinase polymerase amplification assay combined with a lateral flow dipstick[J]. BMC Vet Res, 2019, 15(1):97. DOI:10.1186/s12917-019-1841-9.

[25] GAO W, HUANG H, ZHU P, et al. Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick for equipment-free detection of Salmonella in shellfish[J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2018, 41(5): 603-611. DOI:10.1007/s00449-018-1895-2.

[26] KERSTING S, RAUSCH V, BIER F F, et al. Rapid detection of *Plasmodium falciparum* with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis[J]. Malar J, 2014, 13: 99. DOI: 10.1186/1475-2875-13-99.

[27] CUI J, ZHAO Y N, SUN Y L, et al. Detection of *Babesia* gibsoni in dogs by combining recombinase polymerase amplification (RPA) with lateral flow (LF) dipstick[J]. Parasitol Res, 2018, 117(12): 3945-3951. DOI:10.1007/s00436-018-6104-3.

[28] ZHAO G M, HOU P L, HUAN Y J, et al. Development of a recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow dipstick assay for rapid detection of the *Mycoplasma bovis*[J]. BMC Vet Res, 2018, 14(1): 412. DOI:10.1186/s12917-018-1703-x.

[29] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 实验动物 微生物学检测方法: GB/T 14926[S].

[30] 北京市质量技术监督局. 实验动物 微生物学等级及监测: DB11/T 1459—2017[S].

[31] 黑龙江省质量技术监督局. 实验动物 羊微生物学等级及监测: DB23/T 2057.10—2017[S].

[32] 黑龙江省质量技术监督局. 实验动物 牛微生物学等级及监测: DB23/T 2057.5—2017[S].

[33] 中国实验动物学会. 实验动物 螺杆菌PCR检测方法: T/CALAS 24—2017[S].

[34] 中国实验动物学会. 实验动物 肺支原体PCR检测方法: T/CALAS 40—2017[S].

[35] 中国实验动物学会. 实验动物 肺支原体PCR检测方法: T/CALAS 25-2017[S].

[36] WANG H M, HOU P L, ZHAO G M, et al. Development and evaluation of serotype-specific recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick assays for the diagnosis of foot-and-mouth disease virus serotype A, O and Asia1[J]. BMC Vet Res, 2018, 14(1): 359. DOI: 10.1186/s12917-018-1644-4.

[37] WANG H M, ZHAO G M, HOU P L, et al. Rapid detection of foot-and-mouth disease virus using reverse transcription recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow dipstick[J]. J Virol Methods, 2018, 261: 46-50. DOI: 10.1016/j. jviromet. 2018.07.011.

[38] TU P A, SHIU J S, LEE S H, et al. Development of a recombinase polymerase amplification lateral flow dipstick (RPA-LFD) for the field diagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infection[J]. J Virol Methods, 2017, 243: 98-104. DOI: 10.1016/j. jviromet. 2017.01.023.

[39] YANG Y, QIN X D, ZHANG X L, et al. Development of real-time and lateral flow dipstick recombinase polymerase amplification assays for rapid detection of goatpox virus and sheeppox virus[J]. Virol J, 2017, 14 (1):131. DOI:10.1186/s12985-017-0792-7.

[40] YANG Y, QIN X D, ZHANG W, et al. Development of an isothermal recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of pseudorabies virus[J]. Mol Cell Probes, 2017, 33: 32-35. DOI: 10.1016/j. mcp. 2017.03.005.

[41] 于博, 李博宇, 赵博, 等. 布鲁氏菌RPA-LFD检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(12): 1233-1237. DOI:10.3969/j.issn.1008-0589.201904037.

[42] ZHAO G M, HE H B, WANG H M. Use of a recombinase polymerase amplification commercial kit for rapid visual detection of *Pasteurella multocida*[J]. BMC Vet Res, 2019, 15(1): 154. DOI: 10.1186/s12917-019-1889-6.

[43] DRAIN P K, HYLE E P, NOUBARY F, et al. Diagnostic point-of-care tests in resource-limited settings[J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14(3): 239-249. DOI:10.1016/S1473-3099(13)70250-0.

[44] KOZEL T R, BURNHAM-MARUSICH A R. Point-of-care testing for infectious diseases: past, present, and future[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(8): 2313-2320. DOI:10.1128/JCM.00476-17.

（**收稿日期：2021-01-20　修回日期：2021-05-06**）

****

《实验动物与比较医学》有关实验动物福利伦理内容的说明

本刊是我国实验动物科学与比较医学领域的一本专业学术期刊，严格遵守国家实验动物相关法律、法规和标准，包括但不局限于《实验动物管理条例》（2017年3月1日修订版）和《实验动物 福利伦理审查指南》（GB/T 35892—2018）等，同时参考借鉴国际生物医学期刊关于动物实验研究报告的相关指南共识（如ARRIVE 2.0、IGP 2012、IAVE Guidelines 2010等）。因此，本刊对所有涉及动物实验的来稿均需审查实验动物福利与伦理相关内容。现将一些具体要求说明如下：

1. 涉及动物实验的来稿，需提供实验动物生产许可证和质量合格证，以及动物实验场所的实验动物使用许可证。以上证明须与使用动物种类及动物实验单位名称相匹配，并在正文中列出其对应的许可证编号。

2. 涉及动物实验的来稿，需在考虑3R（替代、减少和优化）原则的基础上设计动物实验，并提供作者单位实验动物福利伦理委员会（或相关机构）出具的实验动物福利伦理审查批件。批件中所列内容须与投稿文章相吻合，并在正文中列出对应的批准编号。

3. 实验动物的用药，尤其是麻醉镇痛用药必须优先使用药用级麻醉剂，特别是当涉及存活手术的动物实验时。鉴于无法确定非药用级麻醉剂（如三溴乙醇、水合氯醛等）的相关性状及对实验动物的影响，从而不能保障实验动物福利及研究结果的可靠性，而且目前已有更优的市售麻醉药剂可供选择，因此本刊不建议使用上述试剂。如确需使用，请提供充足理由说明及相应的批准文件。

4. 涉及肿瘤动物模型的研究，本刊参考国内及国际通用准则，建议单个肿瘤体直径不超过20 mm（小鼠）或40 mm（大鼠）且不出现明显的肿瘤溃疡。如投稿文章有超出上述标准的研究内容，需提交作者单位相关肿瘤动物模型研究的指导原则文件，以及从科学角度判断投稿文章中肿瘤体积合理性的依据材料。

《实验动物与比较医学》编辑部