

DOI: 10.3969/j.issn.2095-9869.20250113001

http://www.yykxjz.cn/

张磊, 王津津, 廖立珊, 薛霖朗, 吴江, 朱鹏, 张子怡, 辛卓润, 朱裕敏, 孙敬锋, 姜敬哲, 刘荭, 孙洁. 基于 RAA-CRISPR/Cas13a 的鲤春病毒血症病毒快速检测方法的建立. 渔业科学进展, 2025, 46(6): 241–248

ZHANG L, WANG J J, LIAO L S, XUE L L, WU J, ZHU P, ZHANG Z Y, XIN Z R, ZHU Y M, SUN J F, JIANG J Z, LIU H, SUN J. Rapid detection method for spring viremia of carp virus based on RAA-CRISPR/Cas13a. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(6): 241–248

基于 RAA-CRISPR/Cas13a 的 鲤春病毒血症病毒快速检测方法的建立*

张磊¹ 王津津² 廖立珊² 薛霖朗² 吴江² 朱鹏² 张子怡²
辛卓润² 朱裕敏² 孙敬锋¹ 姜敬哲³ 刘荭² 孙洁^{2①}

(1. 天津农学院水产学院 天津 300384; 2. 深圳海关动植物检验检疫技术中心 广东 深圳 518045;
3. 中国水产科学研究院南海水产研究所 广东 广州 510300)

摘要 鲤春病毒血症病毒(spring viremia of carp virus, SVCV)是一种高致病性病原,对鲤科鱼类造成巨大危害,被世界动物卫生组织列为必须通报疫病。2002 年,鲤春病毒血症(spring viremia of carp, SVC)在中国首次检出后,迅速在全国蔓延,给我国鲤鱼养殖业造成巨大威胁。因此,我国农业农村部将其列为二类动物疫病。迄今为止,早期、快速、准确的诊断仍然是控制其传播和流行的重要手段。本研究基于 CRISPR/Cas13a 系统结合重组酶介导等温核酸扩增技术(recombinase-aided amplification, RAA),通过对 GenBank 上登录的 SVCV 全基因序列比对,针对 SVCV 聚合酶 L 基因高度保守的区域设计了一组 RAA 扩增引物和相应 crRNA;建立了一种可用于 SVCV 现场快速检测的 RAA-CRISPR/Cas13a 的方法,可以覆盖 SVCV 的 4 种不同基因型(Ia、Ib、Ic 和 Id)。按照世界动物卫生组织推荐的检测方法验证程序,经实验验证该检测方法有较好的重复性,最低检出限为 115 copies/μL,与其他病原之间不发生交叉反应。通过对实验室分离保存的 60 份来自进出境水生动物疫病监测、国内重大水生动物疫病监测以及攻毒实验的样本进行检测,RAA-CRISPR/Cas13a 检测结果与实时荧光定量 PCR、套式 RT-PCR 和病毒分离培养结果完全一致,诊断灵敏度和诊断特异性均达到 100%。采用本研究建立的方法在 4 个不同实验室开展比对,在相同条件下对 20 份样本进行检测,4 个实验室的检测结果一致。结果表明,本研究建立的方法重现性良好,为首次采用 CRISPR-Cas13a 系统进行 SVCV 检测的研究,对 SVCV 快速诊断和防控具有重要现实意义。

关键词 鲤春病毒血症病毒; 恒温扩增; CRISPR; 重组酶介导等温核酸扩增技术

中图分类号 S943 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)06-0241-08

鲤春病毒血症病毒(spring viremia of carp virus, SVCV)是鲤科鱼类一种重要的病毒性病原。最初在欧洲的鲤鱼养殖中广泛传播,造成了巨大的经济损失。随着时间的推移, SVCV 逐渐蔓延到美洲和亚洲

* 海关总署科研项目(2024HK026; 2022HK007)和广东省“生物安全技术”专项重点研发项目(2022B1111030001)共同资助。张磊, Email: 2667267852@qq.com

① 通信作者: 孙洁, 正高级兽医师, Email: 48579659@qq.com

收稿日期: 2025-01-13, 收修改稿日期: 2025-02-10

(Padhi *et al*, 2008)。1998年,英国从中国北京出口的金鱼(*Carassius auratus*)和锦鲤(*Cyprinus carpio*)中首次检测到 SVCV (Stone *et al*, 2003)。2004年,我国首次发生 SVCV 感染疫情,也是迄今为止唯一的一次大规模暴发。鉴于其危害,农业农村部启动《国家水生动物疫病监测计划》,对 SVCV 感染展开全国性监测。随着全球化贸易的发展,此后在多个地区均有 SVCV 感染疫情的报道。

SVCV 属于弹状病毒科(Rhabdoviridae)鲤春病毒属(*Sprivirus*),是一种负链 RNA 病毒(Abonyi *et al*, 2024),病毒粒子的长度一般在 80~180 nm 之间,直径在 60~90 nm 之间。基因组长度约为 11 kb (Walker *et al*, 2022),包含 5 个主要的开放阅读框(ORFs),分别编码核蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、糖蛋白(G)和 RNA 聚合酶(L)。基于 SVCV G 基因初步系统发育分析,将 SVCV 分为 4 个不同的亚型: *Ia*、*Ib*、*Ic* 和 *Id* (Warg *et al*, 2007),其中,亚洲、欧美主要是 *Ia* 亚型,东欧主要是 *Ib* 和 *Ic* 亚型, *Id* 亚型主要存在于英国和一些欧洲国家。

SVCV 主要感染鲤科鱼类,通常在春季水温为 11~17 °C 时暴发,引起内出血、神经紊乱和脑积水等症状(Zhang *et al*, 2024)。成鱼和幼鱼都可能感染 SVCV, 鱼苗和 1 龄以下的幼鱼最容易感染,死亡率高达 90%。在 4~31 °C 温度范围内, SVCV 能在鱼类和哺乳动物的多种细胞中实现高效复制(Ahne *et al*, 2002)。SVCV 具有高度传染性,因此,被世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health, WOA)列为必须通报的疫病,被我国农业农村部列为二类动物疫病(Souto *et al*, 2024)。由于没有特效的药物或疫苗,做好前期预防成为降低该病危害的关键措施。

针对 SVCV 的常用检测方法包括病毒的分离培养、套式 PCR、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)以及环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测技术等(么宝兰等, 2023)。这些方法大多需要特定扩增设备来完成检测,且对环境、设备、人员要求高,检测周期长,对条件设施简陋的水产养殖基地和普通养殖户来说很难快速完成有效的日常检测。重组酶介导等温核酸扩增技术(recombinase-aided amplification, RAA) (吕蓓等, 2010),在恒温条件下就能够实现核酸的扩增,操作方便。其原理是通过重组酶、重组酶加载因子和单链结合蛋白与引物和靶序列的相互作用,完成核酸靶序列指数式的体外扩增,反应可在 37~42 °C 恒温条件下 30 min 内完成(朱裕敏等, 2022)。近年来,有报道将规律成簇的间隔短回文重

复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及其相关蛋白(Cas)系统,如 CRISPR-Cas12 和 CRISPR-Cas13 结合等温扩增技术检测 RNA 病毒(Huang *et al*, 2022),进一步提高检测的特异性和灵敏度。该技术的显著特点是恒温、反应速度快、小型化,适合现场快速诊断和定期检测。

鲤春病毒血症(spring viremia of carp, SVC)是 WOA 收录疫病,在国际贸易和国家水生动物检疫和防控中,都需遵循 WOA 所要求的准则和推荐的标准(张翔等, 2023)。WOA 规定的检测方法验证流程包括 4 个阶段:第 1 阶段是对可重复性、分析特异性、分析灵敏度等性能特点进行验证;第 2 阶段是对检测方法的诊断灵敏度、诊断特异性进行验证;第 3 阶段是对同一批样品在不同国家或不同地区的若干实验室中使用同一检测方法测试时,结果的可重现性验证;第 4 阶段为实施情况的验证。目前已发表的 SVCV 检测方法均只完成了第 1 或第 2 阶段的验证工作。

本研究团队作为 WOA 认定的 SVCV 国际参考实验室,一直和英国的 SVCV 参考实验室合作,开展核酸快速检测方法的筛选、比较和优化。本研究把 RAA 与 CRISPR/Cas13a 系统相结合,拟建立 SVCV 的 RAA-CRISPR/Cas13a 快速检测方法。研究设计的检测方法的验证完全按照 WOA 方法验证章节的要求,完成了第 3 阶段的验证。这是首次采用 CRISPR/Cas13a 系统检测 SVCV 的研究。该方法最大限度地减少复杂的操作,缩短反应时间,可以满足现场快速检测的需求,为 SVCV 的诊断和防控提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 病原样品

鲤春病毒血症病毒、狗鱼弹状病毒(pike fry rhabdovirus, PFRV)、病毒性出血败血症病毒(viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)、传染性造血器官坏死病病毒(infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV)、鳊弹状病毒(*Siniperca chuatsi* rhabdovirus, SCRv)、牙鲆弹状病毒(hirame rhabdovirus, HRV)、草鱼出血病病毒(grass carp hemorrhagic virus, GCHV)等鱼类病毒毒株均由本实验室分离、收集和保存。临床样本来自进出境水生动物监测,国家水生动物疫病监测,WOA 鲤春病毒血症参考实验室,英国环境、渔业和水产养殖科学中心(Centre For Environment, Fisheries and Aquaculture Science, CEFAS)赠送的欧洲分离株及本实验室采集的样品和攻毒实验样品(表 1)。

表 1 样品信息
Tab.1 Sample information sheet

样品名称 Sample name	样本来源 Sample source	基因型 Genotype	样品数量 Sample number
SVCV	河南 Henan	Ia	6
SVCV	北京 Beijing	Ia	2
SVCV	湖北 Hubei	Ia	1
SVCV	湖南 Hunan	Ia	1
SVCV	江苏 Jiangsu	Ia	3
SVCV	山西 Shanxi	Ia	3
SVCV	上海 Shanghai	Ia	4
SVCV	天津 Tianjin	Ia	2
SVCV	重庆 Chongqing	Ia	16
SVCV	山东 Shandong	Ia	5
SVCV	英国 CEFAS 赠送 Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science	Ib	2
SVCV	英国 CEFAS 赠送 Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science	Ic	2
SVCV	英国 CEFAS 赠送 Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science	Id	2
SVCV	丹麦能力验证 Danish Proficiency Testing	Id	1
SVCV	实验室攻毒样品 Laboratory challenge samples	Ia	10
PFRV	德国慕尼黑大学 Ludwig Maximilian University of Munich, Germany	/	1
IHNV	甘肃省水生动物防疫检疫中心 Gansu Provincial Aquatic Animal Epidemic Prevention and Quarantine Center	/	1
VHSV	丹麦能力验证 Danish proficiency testing	/	1
SCRV	中国科学院水生生物研究所 Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences	/	1
HRV	山东 Shandong	/	1
GCHV	中国科学院水生生物研究所 Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences	/	1

注: /表示未知基因型。
Note: / indicates unknown genotype.

1.2 主要试剂

核酸提取试剂盒购自西安天隆科技有限公司, RT-RAA 核酸扩增试剂(荧光型)购自杭州众测生物科技有限公司, Cas13a 反应试剂盒(荧光型)购自深圳易致生物科技有限公司。

1.3 引物设计与合成

通过分析比对 GenBank 上登录的 SVCV 全基因组序列(AJ318079.1、U18101.2、EU177782.1、MT675953.1、KT321307.1、KR012466.1、MG663513.1), 根据 RAA

和 CRISPR 引物探针设计原理,使用在线软件 OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) 和 Cas13design (<https://cas13design.nygenome.org/>)等, 针对 SVCV 的 L 基因设计 1 对 RAA 引物及 10 个 crRNA (表 2)。引物和 crRNA 均送至生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 RAA-CRISPR/Cas13a 反应体系及反应条件

RAA 反应体系按照众测 RT-RAA 核酸扩增试剂盒(荧光型)说明书配制:反应干粉 1 管、A Buffer 25 μL、上下游引物(10 μmol/L)各 2.0 μL、ddH₂O 13.5 μL、模

板 5 μL 、B Buffer 2.5 μL ，置于等温扩增仪中 39 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min，收集荧光信号。

SVCV 阳性样本核酸经 RAA 扩增后，以 RAA 产物为模板参考 Cas13a 反应试剂盒(荧光型)说明书配置体系：Cleavage Buffer (10 $\times$) 4 μL 、Trans Mix (5 $\times$) 8 μL 、Reporter 1.2 μL 、T7 RNA Polymerase (40 $\times$) 1 μL 、Cas13a Protein (2 $\mu\text{mol/L}$) 4 μL 、crRNA 2 μL 、RAA

扩增产物 3 μL 、ddH₂O 16.8 μL ，置于等温扩增仪中，37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。

1.5 引物筛选

以 RAA 扩增产物为模板加入到 CRISPER/Cas13a 反应体系中，对 10 个 crRNA 引物进行筛选，通过扩增曲线的相对荧光值及起峰时间，选择最佳的 crRNA 引物。

表 2 引物序列
Tab.2 Primer sequences

引物 Primer	引物序列 Primers sequence (5'~3')
crRNA-4	GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACUCUUAACAGAUUAGAAGCACUC
crRNA-8	GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACUUGAAAUAUUCAGAGCUGCCGGA
crRNA-10	GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACAUUUGGUUUUGAAUUGUGUCUGC
crRNA-14	GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACAUAUUCAGAGCUGCCGGAUCCUC
crRNA-16	GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACAAUAUUCAGAGCUGCCGGAUCCU
crRNA-19	GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACUUGGUUUUGAAUUGUGUCUGCUG
crRNA-20	GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACUAUUCAGAGCUGCCGGAUCCUCG
crRNA-21	GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACUGGUUUUGAAUUGUGUCUGCUGU
crRNA-24	GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACGGUUUUUGAAUUGUGUCUGCUGUC
crRNA-29	GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACCAGAUACUCCGCUGCCUCCCGGA
RAA-L-F1	GGCAAGATTTCAGACCAGAACACATACCTAA
RAA-L-T-R3	TAATACGACTCACTATAGGG-CTCAAGAATCGTGGGAAGAAAGGTTCAATA
SVCV-F1	TCTTGGAGCCAAATAGCTCARRTC
SVCV-R2	AGATGGTATGGACCCCAATACATHACNCAY
SVCV-F1	TCTTGGAGCCAAATAGCTCARRTC
SVCV-R4	CTGGGGTTTCCNCCTCAAAGYTGY
SVCV-F	CAATGGGAATGAGTGCTTCT
SVCV-R	TGATTGGTTTTGAATTGTRTC
SVCV-P	FAM-AGACAGAGGTRAAAGGACATCTGAT-BHQ1

1.6 分析特异性和灵敏度实验

以 SVCV、IHN_V、SCRV、PFRV、VHSV、HRV 和 GCHV 病毒核酸分别作为模板，应用于本研究建立的 RAA-CRISPER/Cas13a 方法中，同时设置阴性对照，对该方法的特异性进行评估。

用 ddH₂O 将 SVCV 核酸样本 10 倍梯度稀释成 8 个浓度(10⁰~10⁻⁷)，分别作为模板，用本研究建立的方法进行扩增，分析该方法的灵敏度。

1.7 重复性实验

选取 10⁰、10⁻¹、10⁻² 三个不同浓度的核酸样本分别进行重复实验，每组设置 3 个平行，对该方法的稳定性和重复性进行评估。

1.8 诊断灵敏度和诊断特异性

应用本实验建立的 RAA-CRISPER/Cas13a 方法对实验室分离保存的 60 份样本进行检测。同时和病

毒分离、套式 RT-PCR、RT-qPCR 方法比较，评估该方法的诊断灵敏度和诊断特异性，引物序列见表 2。病毒分离和套式 RT-PCR 参考《水生动物疾病诊断手册》(WOAH, 2024)鲤春病毒血症章节所推荐的方法。

1.9 重现性实验

从实验室保存的 60 份样本中抽取 20 份(阳性 15 份，阴性 5 份)，在深圳海关动植物检验检疫技术中心实验室、广州机场海关技术中心实验室、青岛海关技术中心实验室及中国海关科学技术研究中心实验室进行诊断测试，评估该方法的重现性。

2 结果

2.1 引物筛选

以 SVCV 毒株核酸为模板，经 RAA 扩增后，分别与 10 个 crRNA 引物进行反应，结果显示(图 1)，

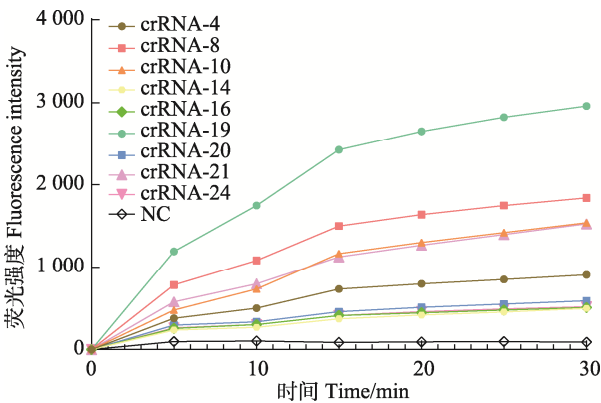


图 1 RAA-CRISPER/Cas13a 引物筛选实验结果

Fig.1 Experimental results of RAA-CRISPER/Cas13a primer screening

10 个 crRNA 引物均能在 5 min 内起峰检测到荧光信号, crRNA-19 引物与其他相比, 起峰时间最早、荧光值最高, 因此, 选择 crRNA-19 引物用于后续实验。

2.2 分析特异性和灵敏度实验

用本研究建立的 RAA-CRISPER/Cas13a 检测方法分别对 SVCV、IHNV、SCRV、PFRV、VHSV、HRV 和 GCHV 病毒核酸进行扩增, 同时设置阴性对照, 分析该检测方法的特异性。结果如图 2 所示, 仅 SVCV 出现扩增曲线, IHNV、SCRV、PFRV、VHSV、HRV 和 GCHV 及阴性对照均无检测信号, 表明该方法特异性强, 不与其他病原发生交叉反应。

用 ddH₂O 将 SVCV 病毒核酸稀释成 8 个浓度进行灵敏度实验, 结果显示, 本研究建立的方法最低可检测到稀释梯度为 10⁻⁶ (图 3), 对应病毒浓度为 115 copies/μL, 表明 RAA-CRISPER/Cas13a 方法最低检出限为 115 copies/μL。

2.3 重复性实验

通过对 3 种不同浓度 SVCV 核酸样本的组间、组内变异系数分析, 其 CV 值均在 5% 以下(表 3), 表明本研究建立的方法具有较高的重复性和稳定性。

2.4 诊断灵敏度和特异性

应用建立的 RAA-CRISPER/Cas13a 方法, 对实验

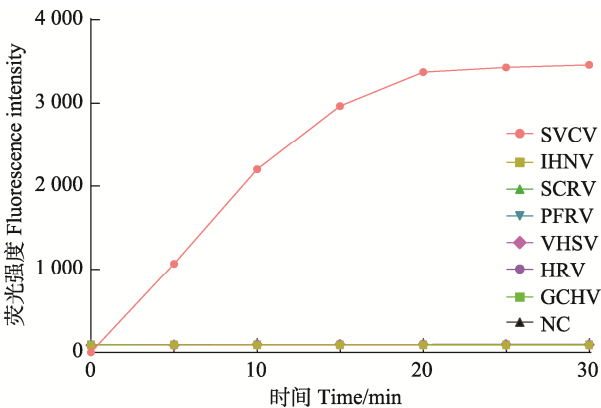


图 2 RAA-CRISPER/Cas13a 分析特异性实验结果

Fig.2 Results of the analytical specificity test of RAA-CRISPR/Cas13a

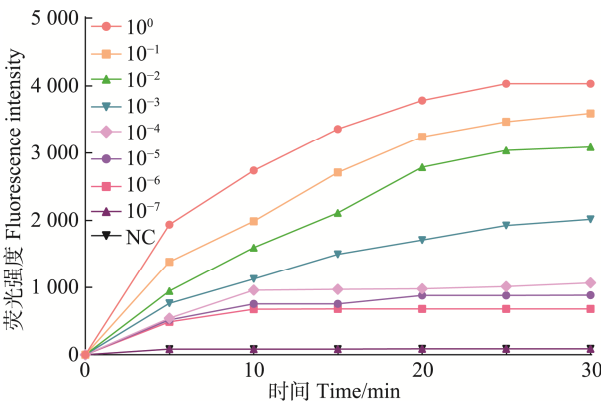


图 3 RAA-CRISPER/Cas13a 分析灵敏度实验结果

Fig.3 Results of the analytical sensitivity test of RAA-CRISPR/Cas13a

室保存的 60 份样本进行检测, 样本包含 SVCV 四种不同基因型。同时与病毒分离、套式 PCR、RT-qPCR 方法进行比较, 结果显示(表 4), RAA-CRISPR/Cas13a 检测到 50 份阳性样本和 10 份阴性样本, 与病毒分离、套式 RT-PCR、RT-qPCR 一致性为 100%, 经实验验证, 该方法诊断特异性、诊断灵敏度良好。

2.5 可重现性实验

在 4 个不同实验室, 用本研究建立的方法在相同条件下对抽取的 20 份样本进行检测, 4 个实验室检测结果一致, 表明本研究建立的方法重现性良好(图 4)。

表 3 RAA-CRISPR/Cas13a 重复性实验结果

Tab.3 Results of the reproducibility test of RAA-CRISPR/Cas13a

浓度 Concentration	组内重复实验 Intra-assay reproducibility		组间重复实验 Inter-assay reproducibility	
	平均数±标准差 X±SD	变异系数 CV/%	平均数±标准差 X±SD	变异系数 CV/%
10 ⁰	3 969.93±62.55	1.58	3 972.80±69.41	1.75
10 ⁻¹	3 571.87±86.67	2.45	3 466.73±109.08	3.15
10 ⁻²	2 994.29±88.4	2.95	2 987.83±101.46	3.40

表 4 实际样品检测结果
Tab.4 Detection results of actual samples

基因型 Genotype	数量 Number	病毒分离 Virus isolation	套式 RT-PCR Nested RT-PCR	实时荧光定量 PCR RT-qPCR	RAA-CRISPER/Cas13a
Ia	53	阳性(+)43/阴性(-)10	阳性(+)43/阴性(-)10	阳性(+)43/阴性(-)10	阳性(+)43/阴性(-)10
Ib	2	阳性(+)2/阴性(-)0	阳性(+)2/阴性(-)0	阳性(+)2/阴性(-)0	阳性(+)2/阴性(-)0
Ic	2	阳性(+)2/阴性(-)0	阳性(+)2/阴性(-)0	阳性(+)2/阴性(-)0	阳性(+)2/阴性(-)0
Id	3	阳性(+)3/阴性(-)0	阳性(+)3/阴性(-)0	阳性(+)3/阴性(-)0	阳性(+)3/阴性(-)0

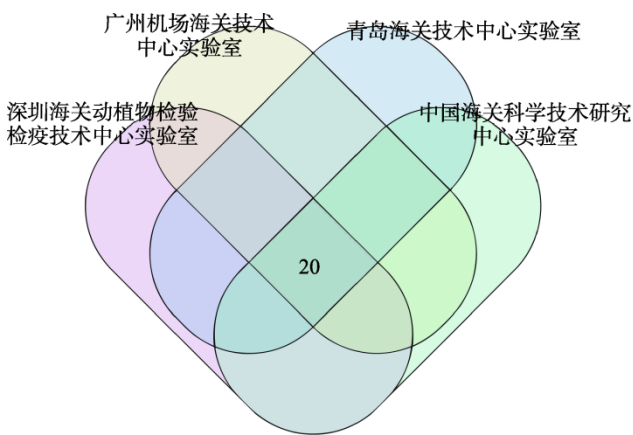


图 4 实验室内比对结果
Fig.4 Results of inter-laboratory comparison

3 讨论

SVCV 在中国首次检出后，迅速在全国蔓延，给鲤鱼养殖业带来了巨大威胁，对出口鲤科观赏鱼类造成严重影响。SVCV 可以感染所有年龄的鲤，尤其幼鱼感染后死亡率极高(Liu *et al*, 2004)。由于目前没有有效的方法从受感染池塘中根除 SVCV，严格的卫生措施与灭杀相结合是控制该病的基本策略(Ortega *et al*, 2019)。因此，在感染早期快速诊断对控制 SVCV 传播极为重要。

SVCV 常用的诊断方法是病毒的分离培养鉴定和血清学检测，病毒分离培养是 WOA 推荐的适用于 SVCV 监测的金标准(WOA, 2024)，但完成检测需要 7~14 d，既费力又繁琐。在核酸检测方面，Koutná 等(2003)开发了逆转录 PCR (RT-PCR)与套式 PCR 相结合的方法可检测 SVCV。Liu 等(2008)根据 SVCV 糖蛋白 G 基因、IHNV 核蛋白 N 基因和 VHSV 糖蛋白 G 基因的保守区域，开发了一种新的多重实时定量 RT-PCR (MQRT-PCR)方法，用于同时检测、鉴定和定量这 3 种病毒。虽然这些技术显著提高了检测的灵敏度和效率，但仅能在实验室内完成，均需要使用实时荧光定量 PCR 仪，检测时间大于 70 min。LAMP 虽能实现恒温扩增，但该方法扩增靶序列不超过 300 bp，扩增产

物是长短不一的片段，无法进行测序分析(史秀杰等, 2014)。本研究采用 RAA 等温扩增结合 CRISPR/Cas13a，建立了一种快速、灵敏、特异的 SVCV 检测方法。该方法在经过 RAA 等温扩增后，利用病原特异的 crRNA 结合 RAA 扩增产物通过 CRISPR/Cas13a 反应，可以实现对 SVCV 的快速检测。其扩增产物纯净，便于进行测序分析，检测耗时在 60 min 以内，最低病毒检出限达 115 copies/μL，且与其他病原体之间无交叉反应，显示出较强的检测特异性。临床样本检测结果表明，本研究建立的方法与套式 RT-PCR 和 RT-qPCR 检测效果一致，但检测时间更短，且只需要便携的恒温设备就能实现对病原的检测。该方法可以在多种场景下应用：适合条件简陋的中小型养殖基地和散养户对病原的早期筛查；疫情暴发时，需快速确诊、划定疫区、防止扩散，可以使用该方法进行现场筛查，随后用 RT-qPCR 确认，便于及时扑杀或隔离，减少经济损失；进出口检疫需要高特异性和符合国际标准的方法，若本研究建立的方法通过验证，可以提供更快速的现场检测，减少延误，避免贸易纠纷。

综上所述，本研究建立的 RAA-CRISPER/Cas13a 检测方法可快速检测 SVCV 病毒，具有较好的检测灵敏度和特异性，耗时较短，不依赖大型仪器设备，在快速检测、实时监测 SVCV 疫情等方面具有一定的潜力和应用空间。

参 考 文 献

ABONYI F, ESZTERBAUER E, BASKA F, *et al*. First experimental application of DNA-layered salmonid alphavirus-based replicon vaccine in non-salmonid fish: Induced early semi-specific protection against spring viraemia of carp virus (SVCV) in common carp (*Cyprinus carpio*). *Animals*, 2024, 14(18): 2698

AHNE W, BJORKLUND H V, ESSBAUER S, *et al*. Spring viremia of carp (SVC). *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, 52(3): 261–272

HUANG M Q, LIU S H, XU Y N, *et al*. CRISPR/Cas12a technology combined with RPA for rapid and portable SFTSV detection. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 754995

- KOUTNÁ M, VESELÝ T, PSIKAL I, *et al.* Identification of spring viraemia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, 55(3): 229–235
- LIU H, GAO L, SHI X, *et al.* Isolation of spring viraemia of carp virus (SVCV) from cultured koi (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*C. carpio carpio*) in P. R. China. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 2004, 24(4): 194–202
- LIU Z X, TENG Y, LIU H, *et al.* Simultaneous detection of three fish rhabdoviruses using multiplex real-time quantitative RT-PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 2008, 149(1): 103–109
- LÜ B, CHENG H R, YAN Q F, *et al.* Recombinase-aid amplification: A novel technology of *in vitro* rapid nucleic acid amplification. *Scientia Sinica (Vitae)*, 2010, 40(10): 983–988 [吕蓓, 程海荣, 严庆丰, 等. 重组酶辅助扩增: 一种新型体外快速核酸扩增技术. *中国科学(生命科学)*, 2010, 40(10): 983–988]
- ORTEGA C, CAÑAS-LOPEZ L, IRGANG R, *et al.* First detection of spring viraemia of carp virus in common carp (*Cyprinus carpio* L.) affected by a septicemic disease in Mexico. *Journal of Fish Diseases*, 2019, 42(5): 667–675
- PADHI A, VERGHESE B. Detecting positively selected codons in the glycoprotein of spring viraemia of carp virus (SVCV) isolates from the USA and China. *Journal of Fish Diseases*, 2008, 31(10): 785–791
- SHI X J, YU L, WANG J J, *et al.* The detection of infectious salmon anaemia virus using real-time fluorescent loop-mediated isothermal amplification. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(4): 51–58 [史秀杰, 于力, 王津津, 等. 传染性鲑鱼贫血症病毒实时荧光环介导等温扩增检测方法的建立. *渔业科学进展*, 2014, 35(4): 51–58]
- SOUTO S, LAMA R, MÉROUR E, *et al.* *In vivo* multiscale analyses of spring viremia of carp virus (SVCV) infection: From model organism to target species. *PLoS Pathogens*, 2024, 20(8): e1012328
- STONE D M, AHNE W, DENHAM K L, *et al.* Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and Pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, 53(3): 203–210
- WALKER P J, FREITAS-ASTÚA J, BEJERMAN N, *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Rhabdoviridae 2022. *The Journal of General Virology*, 2022, 103(6). DOI: 10.1099/jgv.0.001689
- WARG J V, DIKKEBOOM A L, GOODWIN A E, *et al.* Comparison of multiple genes of spring viremia of carp viruses isolated in the United States. *Virus Genes*, 2007, 35(1): 87–95
- WOAH (World Organization for Animal Health). Manual of diagnostic tests for aquatic animals 2024, Chap 2.3.9. Infection with spring viraemia of carp virus. www.oie.int/internationalstandard-setting/aquatic-manual/access-online/
- YAO B L, LI Y H. Research progress on detection methods of spring viremia of carp virus. *Scientific Fish Farming*, 2023(2): 50–52 [么宝兰, 李月红. 鲤春病毒血症病毒检测方法研究进展. *科学养鱼*, 2023(2): 50–52]
- ZHANG X, GU L, ZHENG Y D, *et al.* Survey of ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) susceptible hosts based on *in situ* LAMP technique. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(2): 174–185 [张翔, 谷莉, 郑玉东, 等. 基于原位 LAMP 技术的牡蛎疱疹病毒(OsHV-1)易感宿主调查. *渔业科学进展*, 2023, 44(2): 174–185]
- ZHANG Y J, GAO Y, LI C, *et al.* *Parabacteroides distasonis* regulates the infectivity and pathogenicity of SVCV at different water temperatures. *Microbiome*, 2024, 12(1): 128
- ZHU Y M, WU J, WANG J J, *et al.* Development of a real-time RT-RAA assay for rapid detection of viral nervous necrosis virus. *Chinese Veterinary Science*, 2022, 52(7): 824–829 [朱裕敏, 吴江, 王津津, 等. 病毒性神经坏死病毒实时荧光 RT-RAA 快速检测方法的建立. *中国兽医科学*, 2022, 52(7): 824–829]

(编辑 马瑾艳)

Rapid Detection Method for Spring Viremia of Carp Virus Based on RAA-CRISPR/Cas13a

ZHANG Lei¹, WANG Jinjin², LIAO Lishan², XUE Linlang², WU Jiang², ZHU Peng², ZHANG Ziyi²,
XIN Zhuorun², ZHU Yumin², SUN Jingfeng¹, JIANG Jingzhe³, LIU Hong², SUN Jie^{2①}

(1. College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;

2. Shenzhen Customs Animal and Plant Inspection and Quarantine Technology Centre, Shenzhen 518045, China;

3. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract Spring viremia of carp virus (SVCV) is highly pathogenic in cyprinid fishes, and spring

① Corresponding author: SUN Jie, Email: 48579659@qq.com

viremia of carp (SVC) has been listed as a notifiable disease by the World Organization for Animal Health. Spring viremia of common carp (*Cyprinus carpio*) is a viral infectious disease prevalent in Europe, Asia, and North America. In 2002, SVC was detected for the first time in China and spread rapidly throughout the country, posing a huge threat to the carp farming industry in China. It was listed as a second-class animal disease. So far, early, rapid, and accurate diagnosis remains an important means to control its spread and prevalence. At present, commonly used methods to detect SVCV require specific amplification equipment and temperature cycles and are prone to false negatives. Moreover, they have high equipment and personnel requirements and a long detection cycle. Fast and effective daily testing is also difficult to complete. Recombinase-aided amplification (RAA) is a rapid amplification technique of nucleic acid at constant temperature, which can achieve nucleic acid amplification at constant temperature and is easy to operate. Regular clustered interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and their associated proteins (Cas) systems, such as CRISPR-Cas12 and CRISPR-Cas13, are combined with isothermal amplification to improve the specificity and sensitivity of RNA virus detection. This technology is characterized by constant temperature, fast reaction speed, and miniaturization, and it is suitable for rapid diagnosis and regular monitoring in the field. As an SVC international reference laboratory recognized by WOAH, this research team has been cooperating with the SVC reference laboratory in the UK to carry out the screening, comparison, and optimization of nucleic acid rapid detection. Based on the CRISPR/Cas13a system and recombinase-mediated isothermal nucleic acid amplification technology, RAA amplification primers and corresponding crRNA primers were designed for the highly conserved region of SVCV polymerase L gene by aligning the whole gene sequence of SVCV registered on GenBank, and a preliminary RAA-CRISPR/Cas13a detection method was established for the rapid detection of SVCV in the field. It can cover four genotypes of SVCV (*Ia*, *Ib*, *Ic*, *Id*). In accordance with the detection and verification procedures recommended by the World Organization for Animal Health, results confirmed that some of the detection results were reproducible, the minimum detection concentration was 115 copies/ μ L, and it did not cross-react with other pathogens. The detection of 60 samples isolated and stored in the laboratory for the monitoring of inbound and outbound aquatic animal diseases, the monitoring of major aquatic animal diseases in China, and the challenge experiment indicated that the results of RAA-CRISPR/Cas13a detection are consistent with those of nested fluorescent RT-PCR. The results of RT-PCR and virus isolation and culture were also consistent, and the diagnostic sensitivity and specificity were both 100%. Under the same conditions, 20 samples were tested in four laboratories, and the results of the four laboratories were consistent. The results proved the good reproducibility of the study. This study is the first to use the CRISPR-Cas13a system for SVCV detection. The developed method could be applied in the rapid diagnosis and prevention of SVCV.

Key words Spring viremia of carp virus; Constant temperature amplification; Clustered regularly interspaced short palindromic repeats; Recombinase-aided amplification