综述 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003613

猴痘病毒实验室检测技术研究进展

周　建，任雪梅，王　馨，李　卓
（西安医学院第一附属医院检验科，西安　710077）

【摘　要】目前猴痘病毒疫情传播已打破地域流行的规律，呈现世界范围内流行的特点。因此猴痘疫情的防控成为全世界关注的焦点问题，而引入有效的实验室检测方法则是疫情防控的关键。目前针对猴痘病毒的检测已有一套完备的方法，包括病毒分离培养，抗原抗体检测以及核酸检测等，其中用于核酸检测的技术手段又包括聚合酶链式反应、等温扩增以及新兴的CRISPR/Cas技术等。本文主要针对当前猴痘病毒实验室检测技术的原理、特点和缺陷进行综述分析，期望为猴痘病毒疫情防控提供参考依据。

【关键词】猴痘病毒；实验室检测；CRISPR/Cas
【中图分类号】R446　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2023-11-02

Research advances in laboratory detection techniques for monkeypox virus

Zhou Jian, Ren Xuemei, Wang Xin, Li Zhuo
(*Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University*)

【**Abstract**】At present, the spread of monkeypox virus epidemic breaks the law of regional prevalence and shows the characteristics of worldwide prevalence. Therefore, precontrol of monkeypox epidemic has become a key issue around the world, and an effective laboratory virus detection method is the key to epidemic prevention and control. There is currently a set of complete procedures for the detection of monkeypox virus, involving virus isolation and culture, detection of antigens and antibodies, and nucleic acid detection with the methods such as polymerase chain reaction, isothermal amplification, and the emerging CRISPR/Cas nucleic acid detection technique. This article reviews the principles, characteristics and defects of the laboratory detection of monkeypox virus, so as to provide a reference for the prevention and control of monkeypox virus epidemic.

【**Key words**】monkeypox virus; laboratory detection; CRISPR/Cas

猴痘病毒（monkeypox virus，MPXV）属于痘病毒科正痘病毒属[1]，目前发现了5种可感染人类的痘病毒，包括天花病毒（ariola virus）、牛痘病毒（cowpox virus）、痘苗病毒（vaccinia viruse）、猴痘病毒等[2]。1958年首次在丹麦从进口的非洲绿猴体内分离到猴痘病毒，研究表明其具有感染啮齿类、灵长类以及其他哺乳动物的能力[2-3]，认为MPXV是一种人畜共患病，但是其自然宿主依旧不清楚。1970年首次从1例9月龄罹患天花样疾病的男婴体内分类到猴痘病毒[4]，之后认为猴痘病毒主要在非洲国家和地区流行，2022年5月英国报道了猴痘病例之后，世界其他各地也相继报道猴痘病例，感染病例出现了爆发式增长。2022年7月23日WHO将猴痘疫情确定为“国际关注的突发公共卫生事件”[3]。截至目前约有猴痘感染病例8万多例，死亡病例149例。猴痘病毒疫情严重威胁着人类的健康和生命，为了有效预防疫情的传播，必须建立有效的检测方法为疫情防控提供可靠的依据。本文重点回顾分析猴痘病毒实验室标本采集保存，以及检测技术的原理特点和优缺点，期望为MPXV疫情防控提供一定的参考依据。

作者介绍：周　建，Email：zhoujian715412@126.com，研究方向：疾病分子诊断。
通信作者：李　卓，Email：lizhuo721@163.com。
基金项目：中国博士后科学基金资助项目（编号：2020M670074ZX）；西安市创新能力强基计划-医学研究资助项目（编号：22YXYJ0126）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20241114.1819.006（2024-11-18）

1　猴痘病毒

MPXV病毒形态为类似砖状，大小200～250 nm[5]。病毒由1个长约197 kb的线性双链DNA构成，见图1A，包含190多个开放阅读框（open reading frame，ORFs），基因组由中央区、可变区和反向末端重复序列（inverted terminal repeats，ITRs）构成，其中中央区的长度约为101 476 bp，其在病毒的进化过程中相对比较保守，主要编码病毒复制过程中的必须酶和结构蛋白，如D1 R～D13 R。ITRs位于基因组的末端，长约6 379 bp，可变区和ITRs主要编码与宿主相互作用的蛋白，见图1B[6]。MPXV的生活周期都在宿主胞浆内完成，病毒转录和复制所需的酶和蛋白都由病毒自身基因编码[5]。MPXV成熟过程中，形成2种不同的病毒颗粒：胞外囊膜病毒（extracellular enveloped virus，EEV）和胞内成熟病毒（intra-

cellular mature virus，IMV）[6]，IMV 和 EEV 都有感染宿主细胞的能力。MPXV 自从报道以来，主要在中非（刚果盆地）和西非地区以人畜共患模式呈地方性流行[7]。

1.1　猴痘病毒的分类

随着研究的深入，发现猴痘病毒主要来自于两个分支，分别是Ⅰ进化分支（刚果盆地或中非）和Ⅱ进化分支（西非进化支），其中Ⅰ分支具有较强传染性和致病性，其致死率大约为 11% 左右[3]，分支Ⅱ是致病性和传染性相对较低。目前研究认为引起世界大流行主要是由Ⅱ分支引起[8]。

1.2　猴痘病毒的传播途径

研究表明猴痘病毒是一种人畜共患病，可通过动物传给人，也可人传人。猴痘病毒侵入的主要途径，皮肤、黏膜、呼吸道分泌物、血液等。其主要传播方式直接或间接接触感染者污染物、飞沫传播[7,9]。此外，妊娠期间可通过胎盘发生垂直传播，导致先天性猴痘感染。临床常见的潜伏期一般为 6~13 d。

2　标本类型和标本保存

依据 WHO 指南猴痘病毒标本分为以下几种类型：皮肤病变材料，病变渗出液、病变组织和病变结痂组织、口咽拭子、直肠或生殖器拭子、尿液、精液、全血、血清或血浆[9]。WHO 推荐实验室确诊采用口咽拭子。MPXV 标本采集后 1 h 内冷藏（2 ~ 8 ℃）或冷冻（-20 ℃或以下）。如果运输时间超过 7 d，样品应保存在-20 ℃或以下，如果长期保存标本建议置于-70 ℃。标本的运输应符合国家和/或国际法规，疑似或确诊的 MPXV 病例标本（包括临床标本、病毒分离物和培养物）应作为 A 类“可感染人类的感染性物质”（UN2814）运输包装标准。

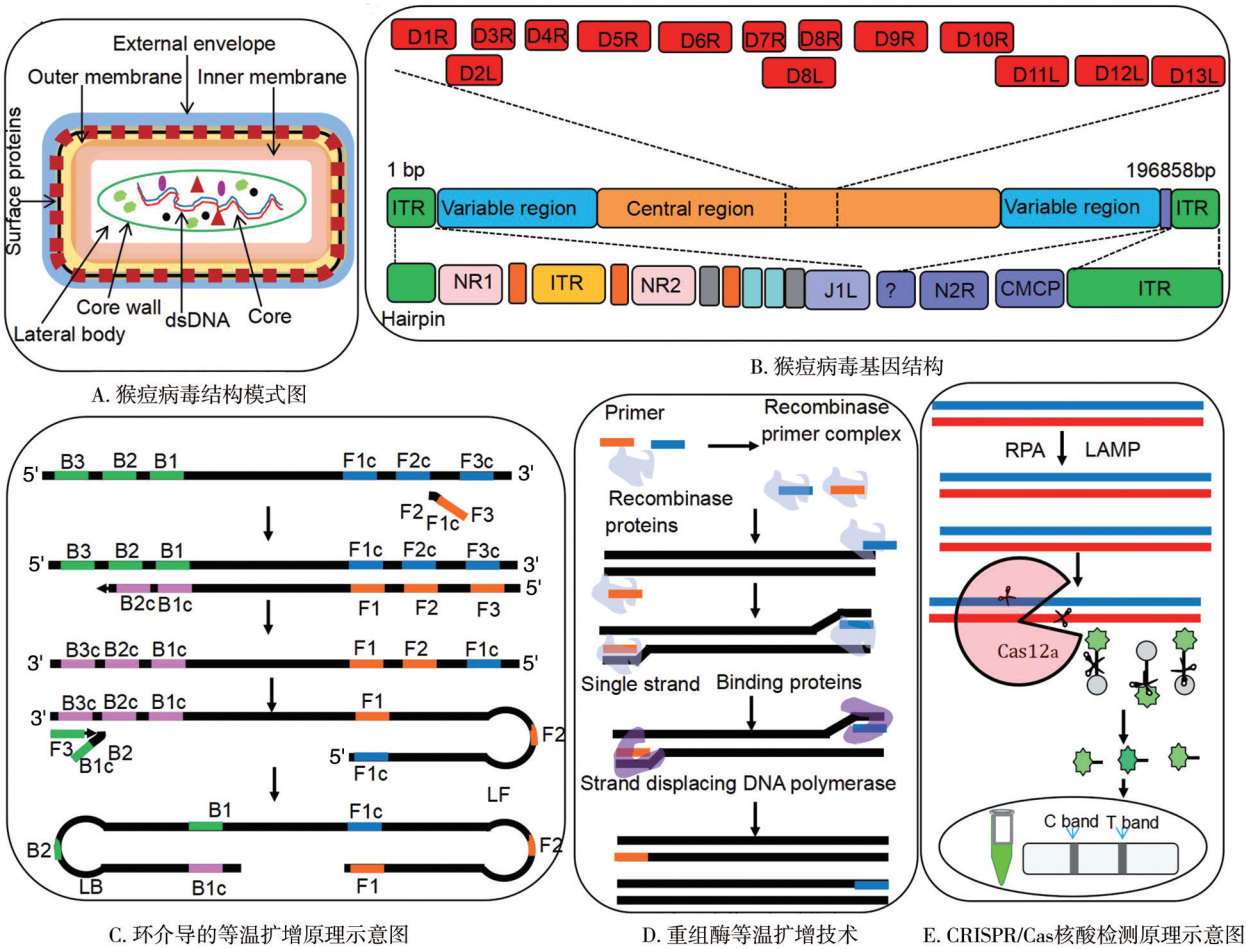
3　猴痘病毒实验室检测方法

3.1　猴痘培养分离

猴痘病毒可以接种在鸡绒毛尿囊膜（chick chorioallantoic membrane，cAM）上形成肉眼可见的病变（称为痘痘），痘的大可以区分不同的痘病毒感染，其形态学特征可以用显微镜观察。猴痘病毒分离株可以在兔肾细胞系生长，在感染细胞后的 24~48 h 观察到细胞病变[10]。培养不适合大规模的检测应用，耗时长，需要实验室的安全级别为 3 级（BSL3），存在一定获得性感染风险[11]。

3.2　猴痘病毒免疫学诊断

免疫学诊断作为一种常见的病毒诊断方式。如血球凝集测试是一种简单而便宜的方法，其检测的基本原理是基于红细胞在病毒存在下凝集作用[12]。另外一种基于血球凝集



A. 猴痘病毒结构模式图　　B. 猴痘病毒基因结构

C. 环介导的等温扩增原理示意图　　D. 重组酶等温扩增技术　　E. CRISPR/Cas核酸检测原理示意图

图 1　猴痘病毒和基因结构以及检测方法的原理结构示意图

原理的血球凝集抑制（hemagglutination，HI）测定方法，主要应用病毒特异性抗体和抗原检测[13]。目前已经使用血球凝集和HI检测MPXV[14]。此检测方法不能区分MPXV与天花病毒和痘苗病毒，但可以区分牛痘和MPXV，此方法可以用来评估毒株的进化关系。目前基于侧向流技术（lateral flow technology，LFE）建立一种抗原检测商业化正痘病毒（orthopox virus，OPV）的检测方法，其检测病毒的载量为10^4 PFU/mL[15]。酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）是一种广泛蛋白检测方法。以MPXV病毒表面的A27蛋白为靶标蛋白建立ELISA方法测定猴痘病毒，检测限的范围10^3 PFU/mL[16]。A27蛋白具有很强的抗原捕获能力，基于此建立了抗体免疫分析柱（antibody immuno column for analytical processes，ABICAP）快速检测猴痘病的方法，其检测的限为10^3 PFU/mL，检测时间为45 min[17]。研究人员建立的蛋白质阵列斑点印迹技术（dot immunoassay），在39 min内检测MPXV病毒，检测范围为10^3~10^4 PFU/mL[18]。基于侧向流技术（lateral flow assay，LFA）建立的猴痘快速检测方法，20 min内完成唾液中10^4~10^5 PFU/mL的猴痘病毒检测[19]。基于免疫法建立痘病毒检测方法，是一种快速，简单猴痘病毒检测方法，部分方法可实现30 min内完成病毒的检测，可以实现自我检测，但是免疫学检测由于方法学本身缺陷，存在特异性差的问题。

3.3 基因组测序检测

基因组测序是鉴定新毒株或发现变异毒株最有效方法，为传染病防控提供更为有效和准确的手段。目前已经建立一系列商业化的猴痘病毒基因组测序平台，截至目前NCBI数据库中已经收录6 190个MPXV毒株基因的参考序列（NCBI Monkeypox genome sequences）。这些基因序列来自于流行国家和地区。全基因组测序是一个耗时的过程，需要昂贵的仪器、训练有素的技术人员和熟练的生物信息人员进行计算分析，不适合临床大规模应用。

3.4 基于PCR的猴痘病毒检测

聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）是核酸检测的金标准，已经应用到许多的领域，如病毒的核酸检测，癌症基因突变检测等。随着猴痘疫情不断蔓延，WHO指南将PCR检测确定为猴痘病毒核酸检测的标准方法[9]。传统PCR方法，首先通过PCR扩增目标片段，然后通过限制性内切酶消化目的片段，然后电泳分析目标分子。研究人员构建MPXV毒株血凝素PCR（hemagglutinin PCR，HA-PCR）法[20]。HA-PCR可以区分不同的MPXV分离株，提高的PCR检测的准确性，此方法使用一系列的限制性内切酶，鉴定分离毒株，但是该方法实验操作过程复杂，容易造成实验室的污染等。基于传统的PCR存在的问题，建立了实时荧光定量PCR，其具有快速、灵敏等优点。但MPXV实时荧光定量PCR检测过程中也存在一系列问题，MPXV病毒基因组本身的特点，GC含量比较低，与其他病毒基因组的同源性比较高，导致了PCR引物和检测探针设计具有一定的挑战性。研究人员开发了一种基于微沟结合蛋白（minor-groove-binding protein-based，MGB）探针的PCR检测技术，该方法极大的提高探针与模版之间的稳定性，增加了检测的灵敏度和特异性，此方法可以应用于MPXV单核苷酸多态性检测[21]，检测限10 ng。基于西非和刚果盆地2个流行毒株毒力的显著差异，然而2个分支基因序列同源性接近99%，对PCR引物和探针设计提出了很大的挑战[22]。为了克服探针设计的困难，通过对2个主要流行分支基因序列进行对比分析，发现G2R基因位于西非分支末端区域，因此在G2R区域设计探针和引物，命名为西非MPXV特异性检测探针（G2R-WA），然而在刚果盆地分支分析发现C3L蛋白基因为其特异性，是针对刚果盆地MPXV进行检测[23]。另外一种基于多重PCR可以显著减少共存病原体的识别序列的错误，可以检测天花病毒、水痘-带状疱疹病毒和MPXV多重检测方法，特异性为100%，检测限为每个反应20个拷贝[24]。基于荧光定量PCR的检测技术，已经被WHO推荐为猴痘病毒检测的金标准，可有效实现猴痘病毒检测，提高检测效率，约需4~6 h但需要专业实验室和专业的技术人员。基于传统PCR设备耗时长，研究人员开发硅基PCR芯片技术，5 min可完成40 PCR扩增，该设备携带方便，操作方便[25]，有望成为一种新的猴痘病毒核酸检测设备。

3.5 基于等温扩增技术检测猴痘病毒

伴随着分子生物学技术的不断发展，极大推进了等温扩增技术的发展。目前已经报道或应用于临床的等温扩增方法有多种。环介导的等温扩增（loop-mediated isothermal amplification，LAMP）和重组酶聚合酶扩增（recombinase polymerase amplification，RPA）是基于等温核酸扩增的病毒检测方法见图1C和D[26]。LAMP技术一般需要3对引物，在60~65 ℃完成体外扩增[27]。目前已经建立了西非猴痘病毒等温扩增技术（West African LAMP，W-LAMP）和刚果猴痘病毒（Congo Basin MPXV C-LAMP）测定平台，采用核酸电泳和限制性内切酶分析扩增产物[28]。目前建立的另一种LAMP快速检测猴痘病毒方法，该检测平台采用硅基芯片技术，可在5 min内完成40个扩增循环，设备携带方便，操作简便等优势[25]，其是一种很有希望的核酸等温检测技术，反应时间~6 min。重组酶聚合酶扩增（recombinase polymerase amplification，RPA）[29]检测过程需要一对反应引物，检测温度大约在37~42 ℃完成体外扩增的过程。目前基于RPA建立的MPXV-RPA检测方法，42 ℃体外扩增，3~10 min完成检测，检测限为16 copies/μL，经过临床标本的验证，特异性为100%，灵敏度为95%[29]。目前针对猴痘病毒核酸检测建立等温扩增如LAMP和RPA，可有效检测MPXV。

3.6 基于CRISPR/Cas技术的猴痘核酸检测

随着对CRISPR/Cas12研究的深入，发现CRISPR/Cas12不仅仅可以用于基因编辑还可以用于基因的检测。目前已有基于CRISPR/Cas12建立的MPXV核酸检测系统，即利用CRISPR/Cas12联合RPA等温扩增建立的MPXV核酸检测技术（CRISPR/Cas12a-mediated recombinase polymerase amplification，CRISPR-RPA），见图1E。CRISPR-RPA是一种可视化的MPXV检测方法：首先采用重组酶等温扩增技术靶标区域核酸序列进行扩增，然后CRISPR/Cas12a在引导RNA（guide RNA，gRNA）的引导下识别靶向DNA序列并激活Cas12a的靶向和非靶向切割DNA作用，非靶向切割荧光标记的单链DNA（signal strand DNA，ssDNA）序列产生荧光信号。该技术的检测限为10 copies/反应，45 min内完成D14L和

ATI基因的检测[30]。CRISPR-RPA系统实现实时可视化检测读取检测信号的能力。基于CRISPR/Cas12在痘病毒核酸检测的能力，Chen Q等[31]建立了CRISPR/Cas12联合RPA快速检测猴痘病毒的方法（CRISPR/Cas12a-mediated recombinase polymerase amplification monkeypox virus，CRISPR/Cas12a-MPXV），针对猴痘病毒的B7R基因区设计RPA引物和gRNA。gRNA引导下CRISPR/Cas12a识别靶向序列，激活Cas12a靶向切割双链DNA（double strand DNA）和非靶向切割双荧光标记ssDNA的能力产生荧光信号，通过荧光酶标仪或紫外灯光下肉眼读取荧光信号。CRISPR/Cas12a-MPXV检测猴痘病毒系统，微孔法的检测限为22.4 amol/L（13.5 copies/μL），肉眼可视化读取信号，两步法检测限为75 amol/L（45 copies/μL），一步法检测限为25 amol/L（15 copies/μL）。其为一种敏感而精确的视觉检测方法，检测时间约35 min[31]。CRISPR/Cas12a-MPXV是一种可靠、便宜的MPXV核酸检测方法[31-32]。基于CRISPR/Cas12a的猴痘病毒核酸检测方法，具有检测速度快，操作简单等优点。

4 结 论

MPXV病毒现已全球传播，及时有效的检测方法是控制疫情的关键，因此需要建立有效的病毒检测手段。目前在传染性病毒实验室检测方面，已经有一系列的传统方法（表1），但均因各种问题制约了其实际应用，例如：①病毒分离培养方法，需要在3级实验室中进行，因此限制了其应用，不作为猴痘病毒诊断的常规方法；②电子显微镜病毒形态分析法，多用于科学研究，尚不能作为病毒检测的常规手段；③抗体检测法，虽然诊断病毒感染具有一定的灵敏度，但对MPXV的特异性较差；④抗原检测方法，虽然快速、经济，但检测灵敏度较低，因此限制了其临床大规模应用。

分子生物学的快速发展极大推动了病毒检测技术的革新，近年来涌现出一系列新技术新方法（表1），但也都各有优劣，例如：①PCR方法，作为核酸检测的传统金标准，其在病毒核酸的检测过程中也存在一系列缺陷，而且难以实现床旁快速检测（POCT）；②等温扩增核酸检测技术[33]，理论上讲可以应用于MPXV的诊断，但LAMP检测技术需要用到3对引物，生物信息学设计复杂，对技术要求很高；③RPA技术，虽然可以装备智能手机用于POCT检测且反应条件温和，但是和PCR技术一样，其反应过程可被高浓度的基因组DNA所抑制，且多重检测过程中不同基因或目标的RPA引物会竞争RPA蛋白质，从而抑制扩增效率。④CRISPR/Cas12a技术，其检测过程需要CRISPR-Cas12a联合RPA技术共同开发猴痘病毒检测平台，极大提高了检测速度和效率，然而应用CRISPR/Cas12a的核酸检测过程中，Cas12a和DNA聚合酶因竞争靶向DNA链而抑制RPA的扩增效率，因此需要对CRISPR/Cas12a系统进行不断优化。

随着传染性疾病的反复出现，研究人员开发出了一些可穿戴设备，应用到传染性疾病检测过程中并实现了居家检

表1 猴痘病毒检测方法

项目	扩增方法	扩增时间	检测总时间	R	靶标	特异性	检测限	信号	参考文献
病毒培养	N	N	24~48 h	N	N	N	-	显微镜	[10]
侧向流技术	N	N	15~30 min	N	-	-	10^4空斑形成单位/mL	侧向流技术	[15]
ELISA	N	N	~5 h	N	A27	-	10^3空斑形成单位/mL	ELISA	[16]
ABICAP	N	N	45 min	N	A27	-	10^4 P空斑形成单位/mL	ELISA	[17]
斑点免疫分析法	N	N	39 min	N	-	-	10^3~10^4空斑形成单位/mL	斑点免疫分析法	[18]
侧向流技术	N	N	20 min	N	-	-	10^4~10^5空斑形成单位/mL	侧向流技术	[19]
MGB-PCR	PCR	-	-	-	B6R	100%	2 fg	荧光信号	[21]
G2R WA	PCR	-	-	-	G2R	84%	0.7 fg~1.7 fg	荧光信号	[23]
C3L	PCR	-	-	-	C3L	89%	9.46 fg	荧光信号	[23]
Multiplex-PCR	PCR	-	-	-	F3L	100%	20 copies/μL	荧光信号	[24]
Ultrafast PCR Equipment	PCR	10~15 min	-	0.997 2	DFV	-	-	荧光信号	[25]
Real-time PCR	PCR	1~1.5 h	2~4 h	-	B7R	-	50 copies/反应	荧光信号	[34]
Real-time PCR	PCR	1~1.5 h	2~4 h	-	N3R，F3L	100%	50~250 copies/μL	荧光信号	
Real-time PCR	PCR	1~1.5 h	2~4 h	0.997	G2R	99.8%	8.2~4.4 copies/μL	荧光信号	[34]
W-LAMP	环介导的等温扩增	约60 min	-	-	ATI	100%	10^3 copies/反应	电泳	[28]
C-LAMP	环介导的等温扩增	约60 min	-	-	D14L	100%	10^2~10^4 copies/反应	电泳	[28]
MPXV-RPA	重组酶等温扩增	3~10 min	15 min	-	G2R	100%	6 copies/μL	荧光信号	[37]
CRISPR/Cas12a- MPXV	重组酶等温扩增	35~60 min	-	0.990	B7R	-	22.4~75 amol/L	可视化	[31]
CRISPR-RPA	重组酶等温扩增	45 min	-	-	D14L，ATI	-	10 copies/反应	紫外灯下可视化	[30]

测。在未来研究过程中应该将传统的检测技术与AI技术相结合，实现操作简单、便携的猴痘病毒快速检测。

参考文献

[1] Kabuga AI, El Zowalaty ME. A review of the monkeypox virus and a recent outbreak of skin rash disease in *Nigeria*[J]. J Med Virol, 2019, 91(4): 533-540.

[2] Lai CC, Hsu CK, Yen MY, et al. Monkeypox: An emerging global threat during the COVID-19 pandemic[J]. J Microbiol Immunol Infect. 2022, 55(5): 787-794.

[3] Thornhill JP, Barkati S, Walmsley S, et al. Monkeypox virus infection in humans across 16 countries - april-june 2022[J]. N Engl J Med, 2022, 387(8): 679-691.

[4] Adler H, Gould S, Hine P, et al. Clinical features and management of human monkeypox: a retrospective observational study in the UK[J]. Lancet Infect Dis, 2022, 22(8): 1153-1162.

[5] Harapan H, Ophinni Y, Megawati D, et al. Monkeypox: a comprehensive review[J]. Viruses, 2022, 14(10): 2155.

[6] Hatmal MM, Al-Hatamleh MAI, Olaimat AN, et al. Comprehensive literature review of monkeypox[J]. Emerg Microbes Infect, 2022, 11(1): 2600-2631.

[7] Yinka-Ogunleye A, Aruna O, Dalhat M, et al. Outbreak of human monkeypox in *Nigeria* in 2017-18: a clinical and epidemiological report [J]. Lancet Infect Dis, 2019, 19(8): 872-879.

[8] Gul I, Liu CY, Yuan X, et al. Current and perspective sensing methods for monkeypox virus[J]. Bioengineering, 2022, 9(10): 571.

[9] 猴痘防控技术指南（2022年版）[J]. 中国病毒病杂志, 2022, 12(4): 245-254.

Technical guidelines for monkeypox prevention and control (2022 edition)[J]. Chinese Journal of Virology, 2022, 12(4): 245-254.

[10] Prier JE, Sauer RM. A pox disease of monkeys[J]. Ann N Y Acad Sci, 1960, 85: 951-959.

[11] Artika IM, Ma'roef CN. Laboratory biosafety for handling emerging viruses[J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2017, 7(5): 483-491.

[12] Zhu HL, Fohlerová Z, Pekárek J, et al. Recent advances in lab-on-a-chip technologies for viral diagnosis[J]. Biosens Bioelectron, 2020, 153: 112041.

[13] Hierholzer JC, Suggs MT, Hall EC. Standardized viral hemagglutination and hemagglutination-inhibition tests. Ⅱ. Description and statistical evaluation[J]. Appl Microbiol, 1969, 18(5): 824-833.

[14] Poland GA, Kennedy RB, Tosh PK. Prevention of monkeypox with vaccines: a rapid review. Lancet Infect Dis[J]. 2022, 22(12): e349-e358.

[15] Townsend MB, MacNeil A, Reynolds MG, et al. Evaluation of the Tetracore Orthopox BioThreat® antigen detection assay using laboratory grown orthopoxviruses and rash illness clinical specimens[J]. J Virol Methods, 2013, 187(1): 37-42.

[16] Stern D, Pauly D, Zydek M, et al. Development of a genus-specific antigen capture ELISA for orthopoxviruses-target selection and optimized screening[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0150110.

[17] Stern D, Olson VA, Smith SK, et al. Rapid and sensitive point-of-care detection of Orthopoxviruses by ABICAP immunofiltration[J]. Virol J, 2016, 13(1): 207.

[18] Poltavchenko AG, Ersh AV, Filatov PV, et al. Rapid protocol of dot-immunnoassay for orthopoxviruses detection[J]. J Virol Methods, 2020, 279: 113859.

[19] Ulaeto DO, Lonsdale SG, Laidlaw SM, et al. A prototype lateral flow assay for detection of orthopoxviruses[J]. Lancet Infect Dis, 2022, 22(9): 1279-1280.

[20] Ropp SL, Jin Q, Knight JC, et al. PCR strategy for identification and differentiation of small pox and other orthopoxviruses[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(8): 2069-2076.

[21] Li Y, Olson VA, Laue T, et al. Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays[J]. J Clin Virol, 2006, 36(3): 194-203.

[22] Simpson K, Heymann D, Brown CS, et al. Human monkeypox - After 40 years, an unintended consequence of smallpox eradication[J]. Vaccine, 2020, 38(33): 5077-5081.

[23] Li Y, Zhao H, Wilkins K, et al. Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA[J]. J Virol Methods, 2010, 169(1): 223-227.

[24] Maksyutov RA, Gavrilova EV, Shchelkunov SN. Species-specific differentiation of variola, monkeypox, and varicella-zoster viruses by multiplex real-time PCR assay[J]. J Virol Methods, 2016, 236: 215-220.

[25] Zhang JL, Yang Z, Liu LY, et al. Ultrafast nucleic acid detection equipment with silicon-based microfluidic chip[J]. Biosensors, 2023, 13(2): 234.

[26] Soh JH, Balleza E, Abdul Rahim MN, et al. CRISPR-based systems for sensitive and rapid on-site COVID-19 diagnostics[J]. Trends Biotechnol, 2022, 40(11): 1346-1360.

[27] Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR?[J]. Cells, 2021, 10(8): 1931.

[28] Iizuka I, Saijo M, Shiota T, et al. Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections[J]. J Med Virol, 2009, 81(6): 1102-1108.

[29] Bai YM, Ji JC, Ji FD, et al. Recombinase polymerase amplification integrated with microfluidics for nucleic acid testing at point of care [J]. Talanta, 2022, 240: 123209.

[30] Yang XG, Zeng XY, Chen X, et al. Development of a CRISPR/Cas12a-recombinase polymerase amplification assay for visual and highly specific identification of the Congo Basin and West African strains of mpox virus[J]. J Med Virol, 2023, 95(5): e28757.

[31] Chen Q, Gul I, Liu CY, et al. CRISPR-Cas12-based field-deployable system for rapid detection of synthetic DNA sequence of the monkeypox virus genome[J]. J Med Virol, 2023, 95(1): e28385.

[32] Sui YT, Xu Q, Liu MS, et al. CRISPR-Cas12a-based detection of monkeypox virus[J]. J Infect, 2022, 85(6): 702-769.

[33] Pang B, Xu JY, Liu YM, et al. Isothermal amplification and ambient visualization in a single tube for the detection of SARS-CoV-2 using loop-mediated amplification and CRISPR technology[J]. Anal Chem, 2020, 92(24): 16204-16212.

[34] Shchelkunov SN, Shcherbakov DN, Maksyutov RA, et al. Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay[J]. J Virol Methods, 2011, 175(2): 163-169.

[35] Kulesh DA, Loveless BM, Norwood D, et al. Monkeypox virus detection in rodents using real-time 3′-minor groove binder TaqMan assays on the Roche lightcycler[J]. Lab Invest, 2004, 84(9): 1200-1208.

[36] Luciani L, Inchauste L, Ferraris O, et al. A novel and sensitive real-time PCR system for universal detection of poxviruses[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 1798.

[37] Davi SD, Kissenkötter J, Faye M, et al. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Monkeypox virus[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2019, 95(1): 41-45.

（责任编辑：周一青）