

猪圆环病毒 2 型实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

于 静, 劳秀杰, 陈彦永, 何小江, 代 兵, 赵阿勇, 王晓杜, 宋厚辉

(浙江农林大学 动物科技学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 猪圆环病毒 2 型 (porcine circovirus 2, PCV2), 是感染猪 *Sus scrofa domestica* 的一种单链 DNA 病毒。建立一种快速、灵敏的检测方法, 对于 PCV2 感染猪的筛选和疾病预防非常重要。根据 PCV2 *ORF2* 基因保守区, 设计了荧光定量聚合酶链式反应 (PCR) 引物, 利用 SYBR Green 作为荧光染料建立了一种定量检测 PCV2 的 PCR 方法。结果表明: 该方法具有灵敏度高、特异性强和重复性好的优点, 每微升的最低检测限低至 10^1 拷贝 DNA。利用该方法对 34 份 PCV2 阳性临床样本进行检测, 检测符合率为 100%, 明显高于普通 PCR 方法的 50.0%。因此, 本研究建立的 PCV2 实时荧光定量 PCR 检测方法为该疾病的预防和控制提供一种有效的检测工具。图 4 表 4 参 26

关键词: 动物学; 猪; 猪圆环病毒 2 型; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S852.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2016)02-0357-07

A real-time PCR method for detection of porcine circovirus 2

YU Jing, LAO Xiujie, CHEN Yanyong, HE Xiaojiang, DAI Bing, ZHAO Ayong, WANG Xiaodu, SONG Houhui

(School of Animal Science and Technology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To develop an accurate and rapid detection method for disease screening and prevention with porcine circovirus type 2 (PCV2), a single-strand DNA virus that infects pigs, primers targeted to the *ORF2* fragment of the PCV2 conserved region were designed. A real time polymerase chain reaction (PCR) method was developed using SYBR Green as a fluorescent dye and serial dilutions of *ORF2* recombinant plasmid to construct a standard curve for an absolute quantification. Results showed that the detection limit was obtained with 10^1 copy DNA per microliter. This method exhibited 1 000 times higher sensitivity than conventional PCR, only specific identification of PCV2, and better repeatability with the less than 2% variation coefficient of intra- or inter-assay experiments. A total of 34 PCV2 positive clinical samples were confirmed using this real time PCR method, demonstrating 100% agreement in comparison with the conventional PCR having only 50% agreement. This real time PCR method could provide a valuable tool for PCV2 prevention and control. [Ch, 4 fig. 4 tab. 26 ref.]

Key words: zoology; porcine; porcine circovirus 2; real-time PCR

猪圆环病毒 2 (porcine circovirus 2, PCV2), 是最小的 DNA 病毒, 断奶仔猪 *Sus scrofa domestica* 多系统衰竭综合征 (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 的主要病原, 成为严重阻碍养猪业发展的主要病原之一^[1-3]。国内外针对 PCV2 致病机制、诊断方法以及疫苗研制等方面开展了大量的研究^[1,4]。然而, PCV2 依然阻碍着养猪业的发展, 主要原因可能是其临床发病与亚临床感染猪群中病毒量的不同, 检测过程容易造成漏检, 导致错误诊断。因此, 发展一种高灵敏度、快速检测 PCV2 的方法尤为重要。

收稿日期: 2015-04-19; 修回日期: 2015-06-22

基金项目: 浙江省科学技术公益项目(2014C32061); 浙江农林大学人才启动项目(2011FR025, 2013FR077); 浙江省自然科学基金资助项目(LQ14C010007); 浙江农林大学大学生科技创新训练计划项目(201301017); 浙江农林大学面上基金项目(2013FK001)

作者简介: 于静, 讲师, 博士, 从事畜禽遗传与疾病控制研究。E-mail: yujing_2009@163.com。通信作者: 宋厚辉, 研究员, 博士, 从事动物疫病防控和公共卫生研究。E-mail: songhh@zafu.edu.cn

猪圆环病毒(PCV)分为 PCV1 和 PCV2 等 2 种基因型, 它们基因组结构相似, 均含有 *ORF1* 和 *ORF2* 等 2 个主要的开放阅读框。*ORF1* 是引起 PCV1 和 PCV2 抗原交叉反应的主要原因, 其变异很小, 同源性高达 85%; 而 *ORF2* 基因是 PCV2 的重要抗原基因, 编码病毒衣壳蛋白(Cap 蛋白)^[5], 其变异较大, 在两型 PCV 之间不存在抗原交叉反应, 被视为 PCV1 和 PCV2 的特异性鉴别抗原^[6-8], 并在临床检测中取得了良好的效果。基于 *ORF2* 的较大变异, 可以设计特异性引物对 PCV 的 2 个基因型进行鉴定, 已成为 PCR 方法鉴定 PCV2 的重要靶基因^[9]。基于 *ORF2* 的这些优势, 本研究也选择 *ORF2* 作为鉴定引物设计的首选基因。聚合酶链式反应(PCR)方法简单、方便、快速、敏感, 在疾病检测中广泛应用, 但其高假阳性和易污染的缺点依然存在。PCV2 的抗体检测, 敏感性和特异性都比较好, 但是价格昂贵, 技术要求较高。像多重 PCR、巢式 PCR 等技术, 虽然也可以达到很高的灵敏度, 但是却不能定量。实时荧光定量 PCR 方法, 不仅操作简便、敏感性高、重复性好、省时和可定量分析等优点, 是病毒检测的重要方法。因此, 本试验利用实时荧光定量 PCR 技术构建快速、灵敏检测 PCV2 的方法, 以适应实验室和临床中对 PCV2 的实时定量检测。

1 材料与方法

1.1 材料和临床病料

PCV2, 猪蓝耳病毒(PRRSV, lelystad virus), 猪细小病毒(porcine parvovirus, PPV)和猪瘟病毒(CSFV, hog cholera virus)等菌株由浙江农林大学动物预防医学与公共卫生实验室保存。19 份病灶样品采自杭州国茂生态农业科技开发有限公司(简称: 国茂), 11 份阳性病料和 4 份阴性对照由杭州检疫中心(杭州国正检测技术有限公司, 简称: 国正)惠赠。

1.2 引物设计与合成

ORF2 是 PCV2 的主要免疫原基因, 也是主要用于 PCR 鉴别的基因^[9]。根据 GenBank 公布的 PCV2 *ORF2* 基因序列, 应用 Primer 5.0 软件设计 *ORF2* 基因全长克隆、普通 PCR 以及实时荧光定量 PCR 引物, 并通过 BLAST 对其特异性进行分析。引物由上海生工生物工程公司合成, 引物序列详见表 1。

表 1 实验中所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物类型	引物名称	引物序列(5'→3')	产物大小/bp
<i>ORF2</i> 克隆引物	ORF2-F	ATGACGTATCCAAGGAGGCGTTAC	702
	ORF2-R	TTAAGGGTTAAGTGGGGGCTCTTTAAG	
实时荧光定量引物	qP1	GAGCAGGGCCAGAATTCAACC	149
	qP2	AACASCCGCCTCTCCCGCAC	

1.3 阳性质粒的制备与稀释

将扩增的 *ORF2* 片段与 pZERO-blunt 载体连接, 转化大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α , 提取重组质粒, 并进行测序。用紫外分光光度计测定重组质粒的吸光度 $D(260)$ 和 $D(280)$, 计算出重组质粒的拷贝数, 用 EASY Dilution 试剂将阳性重组质粒稀释到 10^{10} 拷贝 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 再进行 10 倍梯度稀释, 以 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 拷贝 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 9 个拷贝数梯度作为标准模板, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冻存备用。质粒质量浓度($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) = $D(260) \times 50 (\text{g}\cdot\text{L}^{-1}) / 1\ 000 \times$ 准模板稀释倍数。

拷贝数计算公式: 拷贝数(拷贝 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) = 质粒浓度($\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) \times 阿弗加德罗常数 / 重组质粒分子量。

1.4 实时荧光定量反应条件

实时荧光定量 PCR 反应采用 20 μL 体系, 其组分如下: SYBR[®] Premix Ex Taq GC(2 \times) 10 μL , qP1 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.4 μL , qP2 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.4 μL , ROX Reference Dye II (50 \times) 0.4 μL , 双蒸水 7.8 μL , 模板 1 μL 。PCR 扩增条件: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 30 s, 按 95 $^\circ\text{C}$ 10 s, 60 $^\circ\text{C}$ 20 s, 72 $^\circ\text{C}$ 30 s, 进行 40 个循环。

1.5 标准曲线的建立

以重组质粒为标准品, 进行 10 倍梯度稀释, 取 $10^8\sim 10^0$ 拷贝 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 质粒为模板, 用优化的实时荧光定量 PCR 体系及程序进行检测, 同时设空白对照, 每个标准品及空白对照均为 3 个平行重复。以起始

模板拷贝数为 x 轴, 循环阈值(C_t)值为 y 轴做回归曲线, 建立 PCV2 实时荧光定量 PCR 检测的标准曲线。

1.6 实时荧光定量 PCR 方法的重复性分析

对不同比例的标准品 DNA 10^4 , 10^3 和 10^2 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 进行批间和批内重复性试验。样本有 3 个平行重复(批内重复), 分别进行 3 次重复(批间重复)。对所得 C_t 值的平均值、标准差和变异系数进行分析。

1.7 敏感性和特异性分析

敏感性分析: 以不同梯度标准品为模板, 分析最低检出限, 比较常规 PCR 与实时荧光定量 PCR 的敏感性差别。特异性分析: 用所建立的实时荧光定量 PCR 方法对已知阳性样品猪圆环病毒 2(PCV2), 猪细小病毒(PPV), 猪瘟病毒(CSFV)和猪蓝耳病毒(PRRSV)病毒 DNA(或 cDNA)进行检测, 确定该方法的特异性。

1.8 临床样本的检测

对采集的 34 份临床样品进行检测。用试剂盒提取 DNA, 用上述建立的方法进行检测。

2 结果与分析

2.1 标准质粒的制备

以 PCV2 DNA 为模板, *ORF2* 全长引物 ORF2-F 与 ORF2-R 进行 PCR 扩增, 目的片段大小为 702 bp, 连接到 pZERO-blunt 载体上, 并用载体上的酶切位点进行双酶切, 出现载体片段和目的基因片段大小与预期一致, 表明重组质粒构建正确(图 1)。测序结果与目的片段序列也完全一致。抽提重组质粒, 并梯度稀释为 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 9 个比例的质粒为标准模板。

2.2 实时荧光定量 PCR 标准曲线的建立

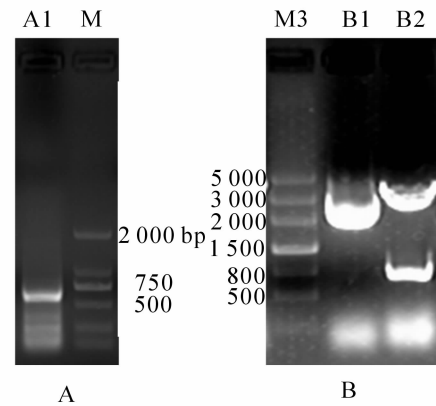
以梯度稀释重组质粒为模板进行标准曲线的制作。根据 PCV2 扩增动力学曲线, 系统自动生成标准曲线, 拷贝数(x)与循环阈值(C_t)之间的线性关系曲线表达式(图 2C)为: $C_t = -3.38 \times \lg x + 35.98$, 其斜率为 -3.38 , 相关系数(R^2)为 1, 表明该标准曲线的线性度较好; PCR 的扩增效率为 97.6%, 且表明实时荧光定量 PCR 最低检测线为 10^1 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。扩增曲线平滑(图 2A), 每个样品之间间隔均匀, 阳性样品 C_t 值均在 33 以下, 阴性对照样品没有扩增, 最低检出限为 10^1 , 因此, 可以认为 C_t 值为 33 时是阴性样品和阳性样品的临界值, 即 $C_t \leq 33$ 可判为阳性, $C_t > 33$ 判为阴性。溶解曲线分析可以反映扩增产物的正确性, 是否有非特异性以及荧光信号是否由引物二聚体造成。本实验溶解曲线(图 2B)特征峰单一, T_m 值(解链温度)在 86°C 左右, 表明是特异扩增。由此可以证明本研究建立的实时荧光定量 PCR 检测 PCV2 方法完全可信, 可用于后续实验分析。

2.3 实时荧光定量 PCR 方法的重复性分析

实验重复性是方法稳定性的标志。为了验证本研究建立的实时荧光定量 PCR 的重复性, 我们以不同比例的标准品 DNA 10^4 , 10^3 和 10^2 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 进行批间重复性试验, 3 份模板的 3 次批内(表 2)和批间(表 3)重复检测的 C_t 值误差均不到 0.5, 变异系数均小于 2%, 结果表明该方法具有较高的重复性。

2.4 特异性分析

PCR 扩增易出现假阳性, 会造成误检, 给生产带来负面效应。因此, 我们对本研究建立的实时荧光定量 PCR 方法特异性进行分析, 结果表明(图 3): 经实时荧光定量 PCR 检测, 只有 PCV2 在 C_t 为 18 左右出现特异性扩增曲线, 而检测的猪细小病毒(PPV), 猪瘟病毒(CSFV), 猪蓝耳病毒(PRRSV)等样品 C_t 值均大于 33 或无扩增, 被判定为阴性。以上结果证明: 本研究建立的实时荧光定量 PCR 检测 PCV2 的方法特异性高, 可以用于后续临床样品分析。



A. *ORF2* 基因克隆(A1 是 *ORF2* 片段, M 为 DL2000); B. 重组质粒验证(M3 为标记物 III, B1 为重组质粒, B2 为重组质粒消化验证)

图 1 *ORF2* 基因克隆和重组质粒验证
Figure 1 Clone of *ORF2* and verification of recombinant plasmid

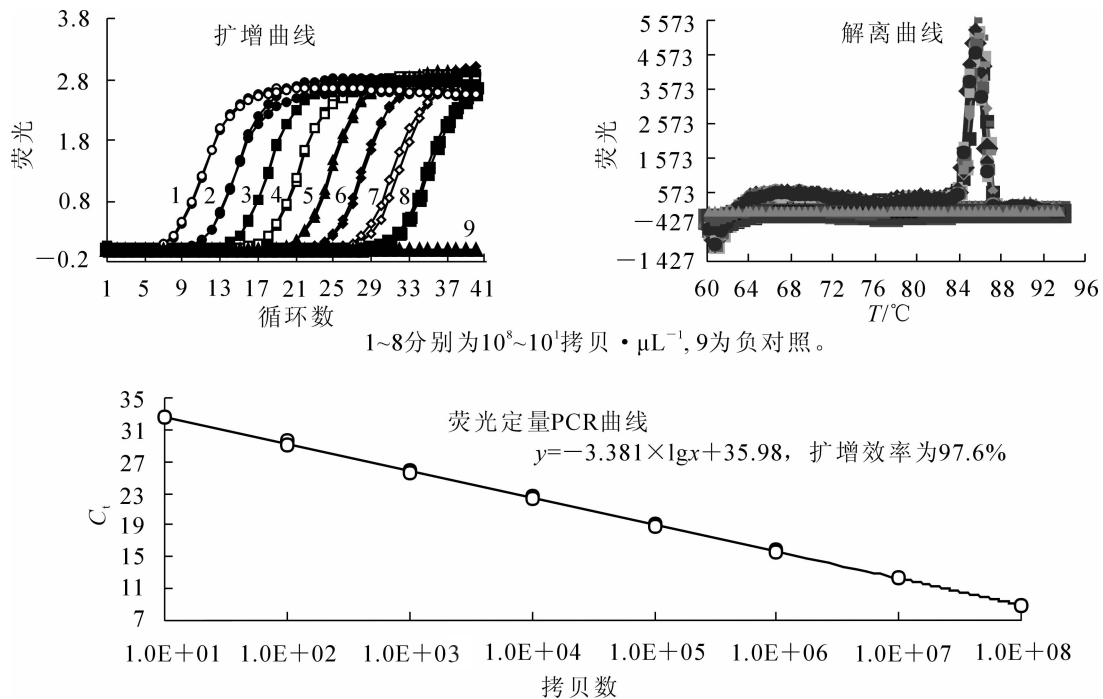


图2 实时荧光定量PCR标准曲线的建立

Figure 2 Development of standard curve of real-time PCR method

表2 实时荧光定量PCR方法的批内重复性实验结果

Table 2 Repetitive experimental results of intra-assay of real-time PCR method

拷贝数	重复1	重复2	重复3	平均值	标准差	变异系数/%
10^2	29.72	29.63	28.95	29.43	0.42	1.43
10^3	26.03	25.93	25.70	25.89	0.17	0.65
10^4	22.63	22.54	22.35	22.51	0.14	0.64

表3 实时荧光定量PCR方法的批间重复性实验结果

Table 3 Repetitive experimental results inter-assay of real-time PCR method

拷贝数	重复1	重复2	重复3	平均值	标准差	变异系数/%
10^2	22.93	22.60	22.41	22.65	0.26	1.16
10^3	26.49	25.99	25.76	26.08	0.37	1.43
10^4	29.92	29.69	29.02	29.54	0.47	1.58

2.5 敏感性分析

敏感性对评价检测方法的灵敏性非常重要,因此,我们分析了普通PCR和实时荧光定量PCR这2种方法的敏感性。结果发现:普通PCR有扩增条带的模板浓度为 10^4 拷贝 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$,而实时荧光定量PCR方法在模板比例为 10^1 拷贝 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (图4)时有扩增,也就表明实时荧光定量PCR检测PCV2的敏感性比普通PCR的敏感性高1000倍。以上结果表明:本研究建立的实时荧光定量PCR检测PCV2的方法敏感性高。

2.6 临床样本的检测

临床样品检测是技术推广的前提。本研究从杭州周围猪场采集的34份样品,其中阳性病灶样品30份,阴性样品4份,通过检测发现普通PCR检测方法符合率为50.0%,实时荧光定量PCR检测符合率为100%(表4),且带病样品的拷贝数为 $10^1\sim 10^4$ 拷贝 $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。以上结果表明:本研究建立的实时荧光定量PCR检测PCV2方法比普通PCR方法灵敏度高,能完全适合猪场疾病的检测,且能够定量分析样品的病毒量。

3 讨论

Ⅱ型猪圆环病毒可以引起断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS),育肥猪皮炎与肾病综合征(PDNS),增生性坏死性肺炎(PNP),猪呼吸道综合征,怀孕母猪的繁殖障碍、新生仔猪的先天性震颤(CT)和新生仔猪腹泻病等疾病^[2, 10-14]。中国很多地方猪养殖场PCV2阳性率高达100%,仔猪死亡率高达30%。目

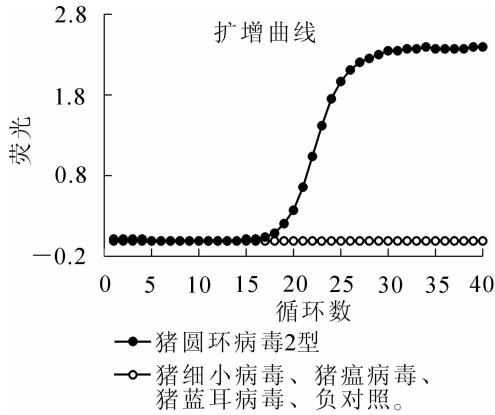


图 3 特异性实验结果
Figure 3 Result of specific analysis

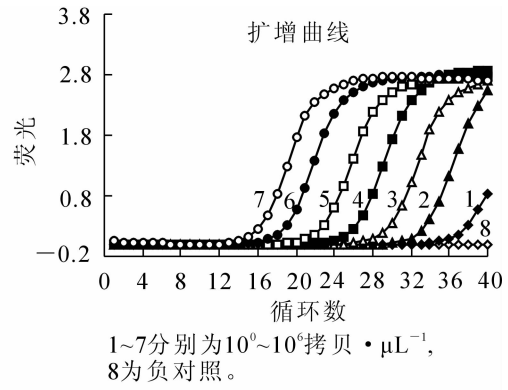


图 4 敏感性实验结果
Figure 4 Results of sensitivity analysis

表 4 临床样品检测结果

Table 4 Analysis of clinical samples

样品来源	阳性样品	阴性样品	普通 PCR		实时荧光定量 PCR	
			阳性数(阴性)	符合率/%	阳性数(阴性)	符合率/%
国茂	19	0	7(12)	36.8	19(0)	100
国正	11	4	6(9)	66.7	11(4)	100
总计	30	4	13(21)	50.0	30(4)	100

前，对 PCV2 引起疾病的诊断标准、致病机理以及对病毒本身的防治研究还不清晰^[15]。PCV2 引起疾病的预防主要通过注射疫苗，但是免疫效果不理想。

PCV2 引起疾病的诊断主要采用临床症状、病理剖解和实验室诊断等，这些方法诊断结果准确，但耗时长、工作量大，实际生产中难以推广应用^[16]。此外，这些方法对亚临床感染猪的诊断经常会遭遇困难。为了解决这些问题，实验室开展了血清中和实验、ELISA、胶体金试纸和 PCR 等方法用于检测 PCV2^[17-21]。研究发现，猪圆环病毒 2-dCap-ELISA 抗体检测试剂盒在检测 PCV2 中具有成本低、不需要特殊仪器且能满足基层需要的优点^[18]，但是操作过程比较繁琐，中间环节可能会带来污染。而琼脂扩散试验和圆环病毒抗体胶体金试纸条检测 PCV2 的方法，虽然特异性、稳定性、符合率等都很高^[17]，但是依然存在较高假阳性问题。近年来，实时荧光定量 PCR 方法在疾病检测方面的应用，进一步提高了检测的灵敏度，缩短了检测时间。

本研究根据 PCV2 *ORF2* 基因设计实时荧光定量 PCR 引物。*ORF2* 编码病毒的核衣壳蛋白(Cap)，该蛋白可引起感染猪产生高含量的抗体，且在 2 个血清型(PCV1 和 PCV2)之间无交叉反应性，是检测病毒抗体水平的良好抗原^[22]。因此，*ORF2* 也成为 PCR 鉴别 PCV2 的重要基因^[9]。郭慧娟等^[23]根据 *ORF2* 设计 *TaqMan* 实时荧光定量 PCR 引物，建立了 PCV2 检测方法，其灵敏度高达到 4.53×10^2 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ ，而曹伟伟等^[16]*TaqMan* 实时荧光定量 PCR 方法的最低检测限度为 5.06 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。而 SYBR Green I Real-time PCR 检测方法的灵敏度基本在 10~100 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ ，比普通 PCR 检测方法检测灵敏度提高 100~1 000 倍^[24-25]。

本研究建立的实时荧光定量 PCR 检测 PCV2 的方法能够对处于亚临床状态猪进行检测，可以为该病的治疗抢得宝贵时间。本研究建立的实时荧光定量 PCR 方法与普通 PCR 相比，灵敏度提高了 1 000 倍，和已报道实时荧光定量 PCR^[16, 23, 25-26]检测 PCV2 的灵敏度相似。总体来说，实时荧光定量 PCR 方法检测费用较高，所需仪器和操作环境要求较高。但是，本研究建立的实时荧光定量 PCR 检测 PCV2 的方法重复性和特异性高，不会造成错诊，会大大减少因病毒蔓延导致的猪场经济损失。此外，本研究建立的实时荧光定量 PCR 还可以对 PCV2 进行准确定量，对感病猪的早期诊断和猪场分类防治管理提供了重要的依据。

4 参考文献

- [1] GRAU-ROMA L, FRAILE L, SEGALES J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2 [J]. *Vet J*, 2011, **187**(1): 23 – 32.
- [2] ALLAN G M, ELLIS J A. Porcine circoviruses: a review [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2000, **12**(1): 3 – 14.
- [3] 陈溥言, 华修国. 断奶仔猪多系统消耗综合征[J]. 畜牧与兽医, 2002, **34**(7): 33 – 35.
CHEN Puyan, HUA Xiuguo. Postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. *Anim Husb & Vet Med*, 2002, **34**(7): 33 – 35.
- [4] 田晓婷, 李宝玉, 柳纪省. 猪圆环病毒的分子生物学与检测方法的研究现状[J]. 中国农学通报, 2012, **28**(14): 66 – 72.
TIAN Xiaoting, LI Baoyu, LIU Jixing. A review for the molecular biology characteristics and molecular diagnosis methods of porcine circovirus [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2012, **28**(14): 66 – 72.
- [5] NAWAGITGUL P, MOROZOV I, BOLIN S R, *et al.* Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein [J]. *J Gen Virol*, 2000, **81**(9): 2281 – 2287.
- [6] BLANCHARD P, MAHE D, CARIOLET R, *et al.* An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome [J]. *Vet Microbiol*, 2003, **94**(3): 183 – 194.
- [7] 陈陆, 杨霞, 王江辉, 等. 猪圆环病毒 2 型(PCV2)河南分离株进化分析及 ORF2 基因的表达[J]. 农业生物技术学报, 2009, **17**(4): 561 – 566.
CHEN Lu, YANG Xia, WANG Jianghui, *et al.* Phylogenetic analysis of porcine circovirus 2 (PCV2) isolated from Henan province and expression of the ORF2 gene in *Escherichia coli* [J]. *J Agric Biotechnol*, 2009, **17**(4): 561 – 566.
- [8] 王子馨, 李坤, 刘金朋, 等. PCV2 ORF2 基因与猪 IL-18 基因共表达 DNA 疫苗的免疫原性[J]. 中国兽医学报, 2013, **33**(4): 532 – 537.
WANG Zixin, LI Kun, LIU Jinpeng, *et al.* Enhancement of DNA vaccine potency against PCV2 by coexpression of PCV2 ORF2 and IL-18 genes [J]. *Chin J Vet Sci*, 2013, **33**(4): 532 – 537.
- [9] CHEUNG A K. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2 [J]. *Virology*, 2003, **305**(1): 168 – 180.
- [10] BRUNBORG I M, FOSSUM C, LIUM B, *et al.* Dynamics of serum antibodies to and load of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs in three finishing herds, affected or not by postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. *Acta Vet Scand*, 2010, **52**: 22 – 31.
- [11] GUO Longjun, LU Yuehua, WEI Yanwu, *et al.* Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China [J]. *Virol J*, 2010, **7**(1): 273 – 285.
- [12] KURTZ S, GRAU-ROMA L, CORTEY M, *et al.* Pigs naturally exposed to porcine circovirus type 2 (PCV2) generate antibody responses capable to neutralise PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins [J]. *Vet Res*, 2014, **45**: 29 – 38.
- [13] OPRIESSNIG T, MENG Xiangjin, HALBUR P G. Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2007, **19**(6): 591 – 615.
- [14] XIAO C T, HALBUR P G, OPRIESSNIG T. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d [J]. *J Gen Virol*, 2015, **96**: 1830 – 1841.
- [15] STEINER E, BALMELLI C, GERBER H, *et al.* Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs [J]. *BMC Vet Res*, 2009, **5**(1): 45 – 57.
- [16] 曹伟伟, 郭抗抗, 许信刚, 等. 猪圆环病毒 II 型 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, **41**(1): 13 – 18.
CAO Weiwei, GUO Kangkang, XU Xingang, *et al.* Establishment and application of Taq Man real-time fluorescent quantitative PCR for detecting porcine circovirus type II [J]. *J Northwest A & F Univ Nat Sci Ed*, 2013, **41**(1): 13 – 18.
- [17] 苗丽娟, 刘玉茹, 李静姬, 等. II 型猪圆环病毒 Cap 蛋白琼脂扩散试验检测方法的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013, **46**(9): 105 – 106.

- MIAO Lijuan, LIU Yuru, LI Jingji, *et al.* Establishment of Cap protein agar diffusion assay for detection of porcine circovirus type II [J]. *Heilongjiang Animal Sci Vet Med*, 2013, **46**(9): 105 – 106.
- [18] 赵玉龙, 焦玉兰, 郁宏伟, 等. 一种猪圆环病毒 II 型 ELISA 抗体检测试剂盒的临床应用[J]. 中国兽药杂志, 2011, **45**(3): 31 – 34.
- ZHAO Yulong, JIAO Yulan, YU Hongwei, *et al.* Clinical applications of antibody detection ELISA kit for porcine circovirus type 2 [J]. *Chin J Vet Drug*, 2011, **45**(3): 31 – 34.
- [19] 岳丰雄, 崔尚金, 冉多良, 等. PCV2, PPV, PRV 和 PRRSV 多重 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医科学, 2008, **38**(8): 691 – 696.
- YUE Fengxiong, CUI Shangjin, RAN Duoliang, *et al.* Establishment and application of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of PCV2, PPV, PRV and PRRSV [J]. *Chin Vet Sci*, 2008, **38**(8): 691 – 696.
- [20] YUE Fengxiong, CUI Shangjin, ZHANG Chaofan, *et al.* A multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, porcine pseudorabies virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens [J]. *Virus Gen*, 2009, **38**(3): 392 – 397.
- [21] LIU Changming, IHARA T, NUNOYA T, *et al.* Development of an ELISA based on the baculovirus-expressed capsid protein of porcine circovirus type 2 as antigen [J]. *J Vet Med Sci*, 2004, **66**(3): 237 – 242.
- [22] 郭官鹏, 刘畅, 陈龙彪, 等. 猪圆环病毒 2 型 *ORF2* 基因截断表达及 ELISA 抗体检测方法的初步建立[J]. 中国兽医学报, 2014, **34**(7): 1059 – 1064.
- GUO Guanpeng, LIU Chang, CHEN Longbiao, *et al.* Development of an indirect ELISA based on prokaryotic expression of truncated *ORF2* gene of porcine circovirus type 2 [J]. *Chin J Vet Sci*, 2014, **34**(7): 1059 – 1064.
- [23] 郭慧娟, 李秀丽, 张国伟, 等. 猪圆环病毒 2 型 *TaqMan* 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2014, **41**(5): 39 – 45.
- GUO Huijuan, LI Xiuli, ZHANG Guowei, *et al.* Establishment of *Taq-Man* real-time PCR for detection of porcine circovirus type II [J]. *China Anim Husb & Vet Med*, 2014, **41**(5): 39 – 45.
- [24] 张福良, 宋长绪, 杨鸣琦, 等. 猪圆环病毒 2 型荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2006, **26**(3): 248 – 250.
- ZHANG Fuliang, SONG Changxu, YANG Mingqi, *et al.* Development of fluorescent quantitative PCR assay for PCV2 detection [J]. *Chin J Vet Sci*, 2006, **26**(3): 248 – 250.
- [25] 李鹏, 郭军庆, 金前跃, 等. 猪圆环病毒 2 型荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 华北农学报, 2014, **29**(2): 66 – 70.
- LI Peng, GUO Junqing, JIN Qianyue, *et al.* Rapid detection of porcine circovirus type 2 using a SYBR Green I real-time PCR [J]. *Acta Agric Boreal-Sin*, 2014, **29**(2): 66 – 70.
- [26] 董林, 王艳萍, 魏凤, 等. 猪圆环病毒 2 型 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2013, **43**(10): 1073 – 1078.
- DONG Lin, WANG Yanping, WEI Feng, *et al.* Development and application of a SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR method for detection of type 2 porcine circovirus [J]. *Chin J Vet Sci*, 2013, **43**(10): 1073 – 1078.