

朱家平,肖琦,钱雯娟,等.猪圆环病毒 2 型和 3 型双重 PCR 方法的建立及在藏猪猪圆环病毒检测中的应用[J].江苏农业科学,2022,50(3):172-177.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.03.028

猪圆环病毒 2 型和 3 型双重 PCR 方法的建立 及在藏猪猪圆环病毒检测中的应用

朱家平^{1,2},肖琦²,钱雯娟^{1,2},赵霞玲^{1,2},张冯禧^{1,2},尹力鸿^{1,2},温立斌²,索朗斯珠¹,何孔旺²

(1. 西藏农牧学院动物科学学院,西藏林芝 860000;

2. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:为同时并快速检测和鉴别猪圆环病毒 2 型(PCV-2)与猪圆环病毒 3 型(PCV-3),并调查西藏林芝地区猪圆环病毒的感染情况,根据笔者所在实验室 PCV-2 和 PCV-3 单重 PCR 方法,建立检测 PCV-2 和 PCV-2 双重 PCR 的方法,构建标准质粒并经优化反应条件和反应体系后进行特异性和灵敏性的测定,并对西藏林芝周边地区藏猪粪便进行检测。结果显示,建立的 PCV-2 和 PCV-3 双重 PCR 检测方法对 PCV1、CSFV、PRRSV、PRV、PPV、PEDV 等常见猪源病原的检测结果均为阴性;并且建立的 PCV-2 和 PCV-3 双重 PCR 的灵敏度与 PCV-2 和 PCV-3 单一 PCR 的灵敏度一致,均能达到 10^1 拷贝数/ μL ;利用建立好的双重 PCR 方法对西藏藏猪临床样品进行检测,PCV-2、PCV-3 的阳性率分别为 38.3% (18/47)、12.8% (6/47),混合感染率为 10.6% (5/47),与单一 PCR 的符合度为 100%。由此可见,本研究建立的 PCR 方法方便、特异、准确,并有很高的敏感度,适于临床样品的检测,为 PCV-2 与 PCV-3 的诊断和防控提供理论依据。

关键词:猪圆环病毒 2 型;猪圆环病毒 3 型;双重 PCR 方法;藏猪;临床应用

中图分类号:S858.28 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)03-0172-06

猪圆环病毒(PCV)为单链负股环状且无囊膜的 DNA 病毒,属于圆环病毒科圆环病毒属,结构为 20 面对称体,是现已知的最小的动物病毒^[1]。猪圆环病毒可分为 4 个型:1974 年由 Tischer 等首次分离得到的无致病性的猪圆环病毒 1 型(PCV-1)^[2];Ellis 等在加拿大西部猪群中分离得到的 PCV-2^[3];2015 年美国北卡罗来纳州学者在猪群中发现的 PCV-3^[4];2019 年在湖南病猪中发现的新的圆环病毒,暂定为猪圆环病毒 4 型(PCV-4)^[5]。其中,PCV-2 能够引起严重的猪圆环病毒病,损害机体免疫系统,增大混合感染的概率^[6],且 PCV-3 与猪圆环病毒相关性疾病的发生联系紧密^[7]。在我国,于 2000 年郎洪武等首次分离得到

PCV-2^[8];PCV-3 于 2017 年首次被发现,之后在辽宁省、江西省、江苏省均有报道^[9,10]。猪圆环病毒病在世界各个国家都有报道,我国也是感染较为严重的国家,且存在 PCV-2 与 PCV-3 混合感染的情况^[11]。但目前检测 PCV-2 和 PCV-3 的 PCR 方法局限于单一 PCR,双重 PCR 同时检测 PCV-2 和 PCV-3 的报道还很少。藏猪是主要分布于我国青藏高原的小型猪种,具有适应性强、抗病耐粗的特点^[12];目前很少有关于西藏地区藏猪圆环病毒的报道。因此,建立一种快捷、灵敏、可靠的双重 PCR 方法检测并区分 PCV-2 和 PCV-3,对临床诊断和防控猪圆环病毒病具有深远意义。本试验旨在建立一种具有较高灵敏度的、能够同时检测 PCV-2 与 PCV-3 的双重 PCR 方法,并对西藏地区临床健康藏猪进行检测,从而为西藏地区 PCV 的流行病学调查提供依据。

1 材料与方法

1.1 病毒株、菌株与临床样品

大肠杆菌 Trans5 α 、PCV-2 和 PCV-3 阳性病料、PCV-1、猪瘟病毒(CSFV)、猪呼吸道疾病综合

收稿日期:2021-09-26

基金项目:西藏农牧学院研究生创新计划(编号:YJS2020-17);国家长期性基础性数据监测专项[编号:ZX(21)5008]。

作者简介:朱家平(1994-),男,河南周口人,硕士研究生,主要从事高原动物传染病防控研究。E-mail:zhujp0206@yeah.net。

通信作者:索朗斯珠,博士,教授,主要从事高原动物传染病疫病防控研究,E-mail:xzslsz@163.com;何孔旺,博士,研究员,主要从事动物疫病防治,E-mail:kwh2003@263.net。

征(PRRSV)、伪狂犬病病毒(PRV)、猪细小病毒(PPV)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)等常见猪源病原均由江苏省农业科学院兽医研究所保存。47 份藏猪粪便样品于 2020 年 6 月采集于西藏林芝周边地区。

1.2 试验时间及地点

本试验于 2020 年 7—10 月在江苏省农业科学院兽医研究所、农业部兽用生物制品工程技术重点实验室完成。

1.3 主要试剂

Green Taq Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;DL-2000 DNA marker、pClone007 Simple Vector Kit、琼脂糖购自北京擎科生物科技有限公司(南京);DNA 提取试剂盒购自广州美基生物科技有限公司;胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒均购自美国 Omega 公司;引物合成和测序均由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

1.4 引物的设计与合成

用笔者所在实验室已有的引物序列检测 PCV-2 和 PCV-3,PCV-2 检测引物为 PCV-2-SF(5'-GGTTAGACGGATATTGTAGTCC-3')和 PCV-2-SR(5'-CGTTTCCGCAGAAGAAGACAC-3'),扩增长度为 630 bp;PCV-3 检测引物为 PCV-3-A2-U(5'-CAGCTGTGGGCCTCTAATGAAT-3')和 PCV-3-A2-L(5'-CCCCGTGGCTTGAAA TACAG-3'),扩增长度为 932 bp。

1.5 临床样品处理与病毒 DNA 提取

取适量粪便装入干净的 EP 管中,向管中加入 2 倍体积的 0.01 mol/L 无菌 PBS(pH 值 7.0),制成悬浮液,反复冻融 3 次;将冻融的样品于 4 ℃ 下 10 000 g 离心 5 min,取上清于 EP 管中,用 Magen 生物公司的组织 DNA 抽提试剂盒,按说明书中的步骤提取样品核酸作为模板。

1.6 单一 PCR 扩增

以提取的 DNA 为模板,用 PCV-2-SF、PCV-2-SR、和 PCV-3-A2-U、PCV-3-A2-L 引物进行 PCR 扩增。2 型最适 PCR 体系为 25 μ L:2 μ L 模板,1 μ L 的上游引物,1 μ L 的下游引物,2 \times mix 12.5 μ L,无菌水 8.5 μ L;最适反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,扩增 35 个循环;72 ℃ 延伸 7 min。3 型最适 PCR 体系为 25 μ L:1 μ L 模板,1 μ L 的上游引物,1 μ L 的下游引物,2 \times mix 12.5 μ L,无菌水 9.5 μ L;

最适反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,53.6 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 65 s,扩增 35 个循环;72 ℃ 延伸 7 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并观察扩增结果。

1.7 PCV-2 和 PCV-3 阳性质粒的制备

用引物 PCV-2-SF、PCV-2-SR、和 PCV-3-A2-U、PCV-3-A2-L 阳性样品进行 PCR 扩增,得到相应的特异性条带,将目的条带进行切胶回收,用 pClone007 Simple Vector Kit 进行 TA 克隆,将克隆送至北京擎科新业生物技术有限公司进行测序,并将含有目的片段的质粒作为阳性质粒。

1.8 双重 PCR 扩增条件筛选

在单重 PCR 的基础上,筛选双重 PCR 的最适退火温度、循环数、引物浓度,确定双重 PCR 的最适反应条件,并验证其特异性和敏感性。

1.9 双重 PCR 的敏感性试验

计算 PCV-2、PCV-3 的初始质粒浓度,并将其进行倍比稀释,用已建立好的最适单重 PCR 条件和双重 PCR 条件对不同浓度的阳性标准物进行检测,来确定双重 PCR 的敏感性。

1.10 双重 PCR 的特异性试验

用建立的方法对 PCV-2、PCV-3 和 PCV-2 与 PCV-3 混合物以及实验室保存的其他常见病原进行检测,验证此方法的特异性。

1.11 双重 PCR 重复性试验

在摸索双重 PCR 最适条件时,不同条件均做 3 组重复,降低试验结果出现偶然性,并用建立的方法对 3 份 PCV-2 阳性样品 DNA、3 份 PCV-2 阴性样品 DNA、3 份 PCV-3 阳性样品 DNA、3 份 PCV-3 阴性样品 DNA 等一些其他病原检测 1 次/周,重复检测 3 次,验证双重 PCR 的重复性。

1.12 临床检测与统计分析

收集 2020 年 6 月西藏林芝市周边地区藏猪粪便 47 份,用 Magen 生物公司的 DNA 抽提试剂盒按照说明书对其进行 DNA 提取,用单重 PCR 和建立的双重 PCR 的方法对样品中 PCV-2 和 PCV-3 进行检测,并用 Rstudio 1.2.5033 软件对检测结果进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 PCV-2 和 PCV-3 阳性质粒的制备

用 PCV-2 和 PCV-3 的引物对病料核酸进行 PCR 扩增,分别得到 630、932 bp 特异性条带,与预

期相符。切胶回收后进行 TA 克隆、质粒提取,再次 PCR 验证均可获得特异性条带,表明成功构建 PCV-2 和 PCV-3 阳性质粒(图 1)。

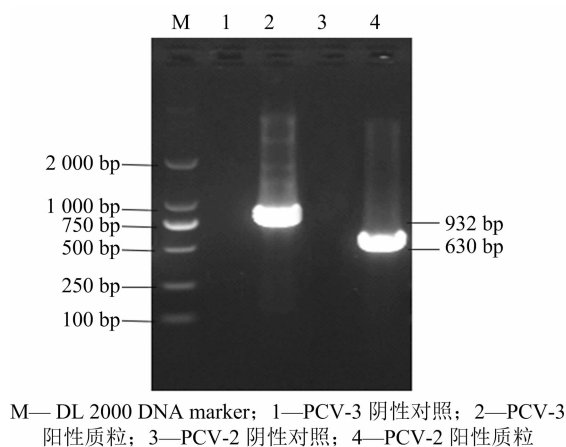


图1 PCV-2、PCV-3 阳性质粒 PCR 扩增结果

2.2 双重 PCR 扩增条件优化

2.2.1 双重 PCR 退火温度的优化 以 PCV-2 和 PCV-3 单重 PCR 检测方法为基础,选取合适的模板浓度,设置 4 个温度(53、54、55、56 ℃)作为退火温度进行双重 PCR 的扩增,用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察扩增,结果发现双重 PCR 在 54 ℃ 时 PCV-2 和 PCV3 的扩增效果最好,故确定最适退火温度为 54 ℃(图 2)。

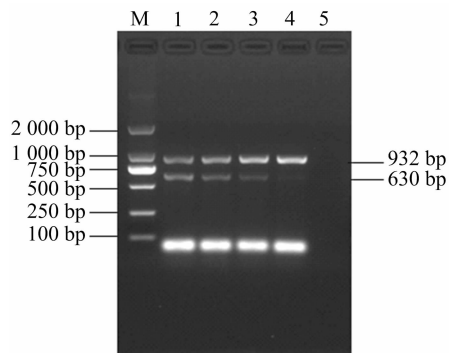


图2 PCV-2、PCV3 双重 PCR 退火温度的优化

2.2.2 双重 PCR 循环数的优化 以 54 ℃ 为双重 PCR 的退火温度,选取合适的模板浓度,设置 3 个不同循环(30、35、40)对双重 PCR 最适循环数进行验证,结果发现在循环数为 40 时条带亮度较为合适,因此选用 40 个循环为 PCR 的最适循环数(图 3)。

2.2.3 双重 PCR 引物浓度的优化 设置 0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 μL 等 5 个引物量(上下游引物浓度均为 1×10^4 pmol/μL)对 PCV-2/3 单重

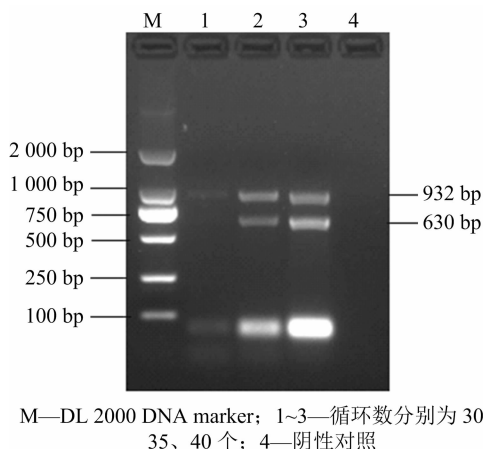


图3 PCV-2、PCV3 双重 PCR 循环数的优化

PCR 的最适引物量进行摸索。结果发现,PCV-2 和 PCV-3 均在引物量为 0.5、1.0、1.5 μL 时条带已足够亮(图 4、图 5)。以 0.5、1.0、1.5 μL 为双重 PCR 的引物量,以棋盘滴定法找到双重 PCR 中 PCV-2 与 PCV-3 初始最适引物体积比例为 2.0、0.5 μL(图 6)。并按照该引物体积比例设置 3 组引物量(1.2 μL : 0.3 μL; 1.6 μL : 0.4 μL; 2.0 μL : 0.5 μL)确定双重 PCR 中 PCV-2 与 PCV-3 的最终最适引物体积比例为 1.6 μL : 0.4 μL(图 7)。

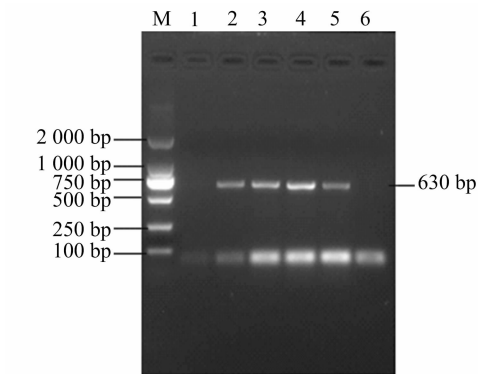


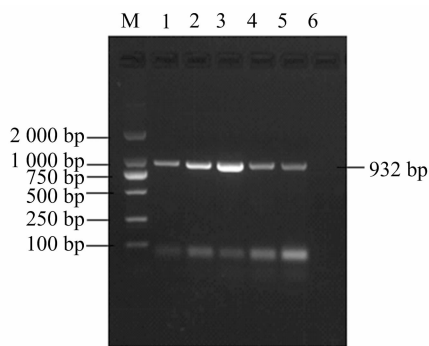
图4 PCV-2 单重 PCR 引物浓度的优化

2.3 双重 PCR 敏感性试验结果

将 70.7 ng/μL PCV-2、62.5 ng/μL PCV-3 的阳性质粒均稀释成 10^{10} 拷贝数/μL,按比例混合稀释为 10^9 拷贝数/μL,之后进行倍比稀释来进行 PCR 的敏感性试验。经敏感度测定发现,优化后的双重 PCR 敏感度和其单一 PCR 的敏感度相同,均为 10^1 拷贝数/μL,说明建立的双重 PCR 检测方法具有很高的敏感度(图 8、图 9、图 10)。

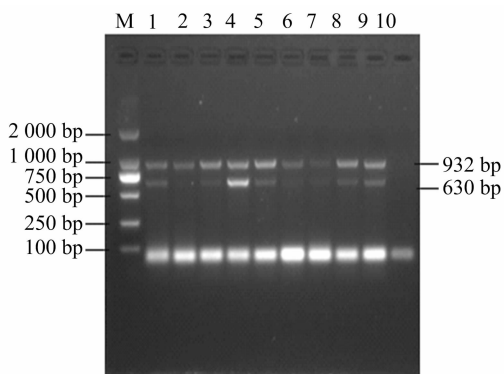
2.4 双重 PCR 特异性试验

以优化后的双重 PCR 对 PCV-2、PCV-3、



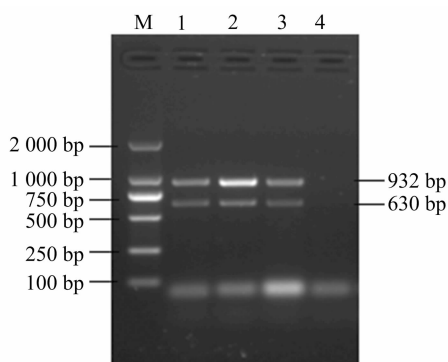
M—DL 2000 DNA marker; 1~5—引物量分别为 0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 μL ; 6—阴性对照

图5 PCV-3 单重 PCR 引物浓度的优化



M—DL 2000 DNA marker; 1—1 μL : 0.5 μL ; 2—1 μL : 1.0 μL ; 3—1 μL : 1.5 μL ; 4—2 μL : 0.5 μL ; 5—2 μL : 1.0 μL ; 6—2 μL : 0.5 μL ; 7—1.5 μL : 0.5 μL ; 8—1.5 μL : 0.5 μL ; 9—1.5 μL : 0.5 μL ; 10—阴性对照

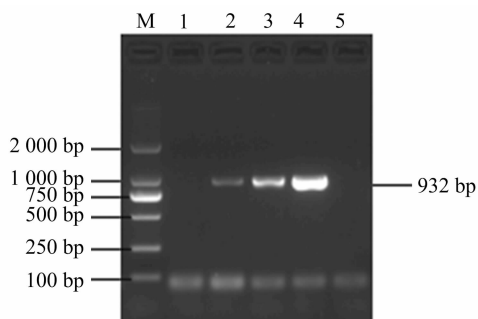
图6 PCV-2、PCV-3 双重 PCR 引物浓度的优化



M—DL 2000 DNA marker; 1—1.2 μL : 0.3 μL ; 2—1.6 μL : 0.4 μL ; 3—2.0 μL : 0.5 μL ; 4—阴性对照

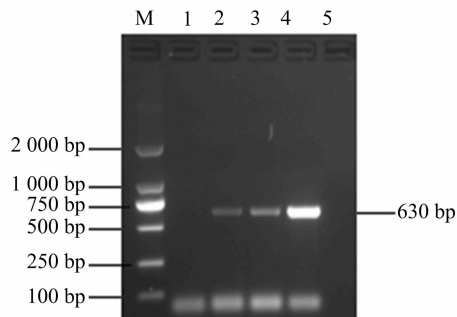
图7 PCV-2、PCV-3 双重 PCR 引物浓度的优化

PCV-2 + PCV-3 以及 PCV-1、CSFV、PPV、PRV、PRRSV、PEDV 进行检测。结果显示,本试验建立的方法对 PCV-2、PCV-3、PCV-2 + PCV-3 均能扩增出目的条带,对其余病原均无特异性目的条带,虽 PRV 出现较弱非特异性条带,但与目的条带距离较大,并不影响对 PCV-2 与 PCV-3 的判定结果。表明建立的双重 PCR 的方法具有较好的特异性(图 11)。



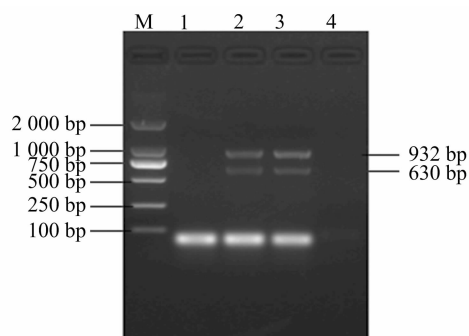
M—DL 2000 DNA marker; 1— 10^0 拷贝数/ μL ; 2— 10^1 拷贝数/ μL ; 3— 10^2 拷贝数/ μL ; 4— 10^3 拷贝数/ μL ; 5—阴性对照

图8 PCV-3 单重 PCR 灵敏度测定



M—DL 2000 DNA marker; 1— 10^0 拷贝数/ μL ; 2— 10^1 拷贝数/ μL ; 3— 10^2 拷贝数/ μL ; 4— 10^3 拷贝数/ μL ; 5—阴性对照

图9 PCV-3 单重 PCR 灵敏度测定



M—DL 2000 DNA marker; 1— 10^0 拷贝数/ μL ; 2— 10^1 拷贝数/ μL ; 3— 10^2 拷贝数/ μL ; 4—阴性对照

图10 PCV-2、PCV-3 双重 PCR 灵敏度测定

2.5 双重 PCR 重复性试验

在摸索双重 PCR 最适条件时,3 组重复均大致相同,且利用建立的双重 PCR 方法分别对 PCV-2 阳性样品 DNA、PCV-2 阴性样品 DNA、PCV-3 阳性样品 DNA、PCV-3 阴性样品 DNA 以及其他病原进行检测,3 次重复结果一致,说明建立的 PCV-2、PCV3 双重 PCR 方法具有很好的重复性。

2.6 临床检测与统计分析

以单重 PCR 和建立的双重 PCR 分别对采集的 47 份临床样品进行 PCR 扩增,发现双重 PCR 与单重 PCR 结果一致。利用 RStudio 对结果进行分析并

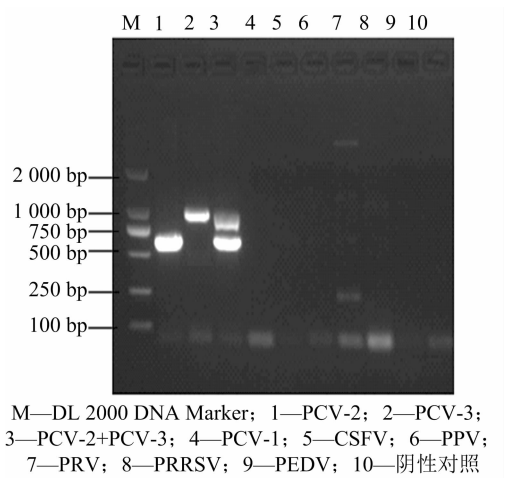


图11 PCV-2、PCV-3 双重 PCR 特异性检测结果

做可视化处理, PCV-2、PCV-3 的阳性率分别为 38.30% (18/47)、12.77% (6/47), 混合感染率为 10.64% (5/47), 单患 PCV-2 率为 27.7% (13/47), 单患 PCV-3 率为 2.1% (1/47), PCV-2 和 PCV3 双阴性率为 59.6% (28/47) (图 12)。

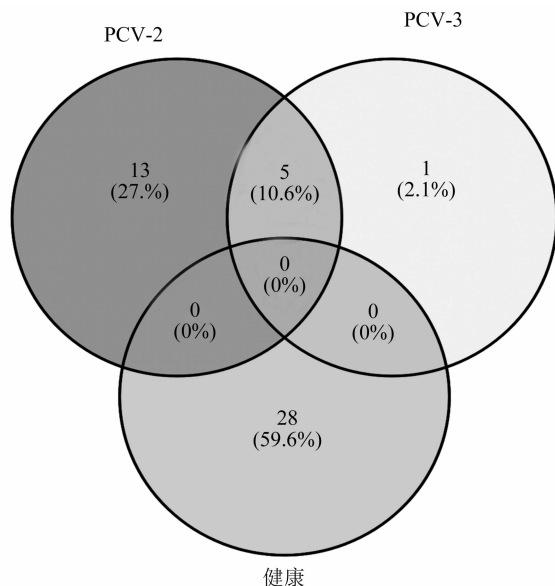


图12 临床样品 PCV-2、PCV-3 检测结果

3 讨论与结论

自 PCV-2 和 PCV-3 报道以来,国内外均有猪群感染的情况,且感染率居高不下,存在混合感染现象^[11]。PCV-2 和 PCV-3 在临床上均表现为繁殖障碍、猪呼吸道疾病综合征 (PRDC)、猪皮炎肾病综合征 (PNDS)、能够引起猪断奶后多系统衰竭综合征 (PMWS)、仔猪先天性震颤、增生性坏死性肺炎 (PNP) 等^[3-4],在临床上无法明确区分 PCV-2 和 PCV-3。另有报道在无临床症状的猪和犬中检

测到 PCV-3^[13-14],且 PCV-3 能跨种间传播,在牛、蜚、鼠中亦能检测到^[15],但 PCV-2 和 PCV-3 无交叉免疫保护,PCV-2 的疫苗无法防止 PCV-3 的感染^[16],猪圆环病毒不仅给世界养猪业带来严重损失,也可为其他动物的健康带来严重威胁,增加防控难度。因此,建立敏感性高、特异性强、重复性好的诊断方法对 PCV-2 和 PCV-3 临床检测与防控具有重要意义。

PCR 为实验室检测的常用技术,肖琦等分别建立了 PCV-2 和 PCV-3 PCR 检测技术,但单重 PCR 技术 1 次只能检测 1 种病原^[10,17]。多重 PCR 方法于 1988 年提出^[18],该方法在疾病混合感染方面具有快速、省时、省力的优势,既具有单项 PCR 的敏感性和特异性,又可节省试剂,1 次检测多个病原体或多个基因型,具有很高的实用性。季程远等建立的双重 PCR 方法中 PCV-2 和 PCV-3 检测敏感度分别为 1×10^3 、 1×10^3 拷贝数/ μL ^[19], 6.1×10^2 、 8.0×10^2 拷贝数/ μL ^[20]。本研究通过对 PCR 不同条件的优化和反复试验,最终建立了简单快速、灵敏稳定、准确可靠的 PCV-2 和 PCV-3 双重 PCR 方法,其灵敏度和单重 PCR 相同均为 1×10^1 拷贝数/ μL ,且高于已报道的 PCV-2、PCV-3 双重方法的敏感度。

目前,我国 PCV-2 和 PCV-3 在很多省份均有报道。PCV-2 感染率为 23.53% ~ 81.40%^[19-27] (青海省为 23.53%、云南省为 36.05%、江苏省为 38.00%、吉林省为 38.50%、京津冀为 56.70%、广西壮族自治区为 65.10%、新疆维吾尔自治区为 70.71%、四川省为 74.48%、河南省为 81.40%); PCV-3 感染率为 11.10% ~ 38.3%^[10,19-22,26-28] (广西壮族自治区为 11.10%、四川省为 11.19%、江苏省为 12.67%、云南省为 17.44%、青海省为 18.38%、新疆维吾尔自治区为 20.00%,河南省为 30.23%,京津冀为 38.30%),混合感染率为 6.64% ~ 30.23%^[19-22,26-27] (广西壮族自治区为 7.90%,京津冀为 17.50%,青海省为 7.35%,河南省为 30.23%,四川省为 6.64%,云南省为 15.12%)。本研究建立的双重 PCR 方法对临床健康的藏猪粪便进行猪圆环病毒检测,结果 PCV-2 感染率为 38.3% (18/47),PCV-3 感染率为 12.8% (6/47),混合感染率为 10.6% (5/47)。从目前我国 PCV-2 和 PCV-3 的感染类型来看,PCV-2、PCV-3 阳性率大致为 53%、20%,混合感染率为

14. 12% 左右,可见 PCV - 2、PCV - 3 在我国已普遍流行,且 PCV - 3 多与 PCV - 2 以混合感染的形式存在。从 PCV - 2 和 PCV - 3 感染地区来看,中国北部地区 PCV - 2 和 PCV - 3 阳性率较高,这可能与南北方气候差异有关。本试验以西藏林芝周边临床健康猪为检测对象,对其粪便进行检测。整体来看,西藏林芝地区 PCV - 2 和 PCV - 3 感染率相对较低,这可能与藏猪的散养模式、耐受能力和高原气候有关,且 PCV - 3 多与 PCV - 2 混合感染,但也存在 PCV - 3 单独感染的现象,存在隐性感染的可能,因此西藏养殖户应加强对猪圆环病毒的防控意识。

参考文献:

- [1] Mankertz A, Çaliskan R, Hattermann K, et al. Molecular biology of Porcine *Circovirus*: Analyses of gene expression and viral replication [J]. *Veterinary Microbiology*, 2004, 98(2): 81 - 88.
- [2] Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. Characterization of papovavirus - and picornavirus - like particles in permanent pig kidney cell lines [J]. *Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*, 1974, 226(2): 153 - 167.
- [3] Ellis J, Hassard L, Clark E, et al. Isolation of *Circovirus* from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. *The Canadian Veterinary Journal*, 1998, 39(1): 44 - 51.
- [4] 谷思颖, 屈勇刚, 魏其, 等. 猪圆环病毒 3 型新疆株 Cap 蛋白的原核表达及纯化 [J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(8): 2660 - 2665.
- [5] Zhang H H, Hu W Q, Li J Y, et al. Novel *Circovirus* species identified in farmed pigs designated as Porcine *Circovirus* 4, Hunan Province, China [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67(3): 1057 - 1061.
- [6] 郭佳慧, 肖琦, 汪伟, 等. 两株猪圆环病毒 2 型的分离鉴定和小鼠致病性试验 [J]. *畜牧与兽医*, 2019, 51(11): 102 - 108.
- [7] 郭影成, 付守鹏, 高学勇, 等. 吉林省猪圆环病毒 3 型的分子流行病学调查及遗传演化分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2019, 46(5): 1483 - 1490.
- [8] 郎洪武, 张广川, 吴发权, 等. 断奶猪多系统衰弱综合征血清抗体检测 [J]. *中国兽医科技*, 2000, 30(3): 3 - 5.
- [9] Ku X, Chen F, Li P, et al. Identification and genetic characterization of porcine *Circovirus* type 3 in China [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(3): 703 - 708.
- [10] 肖琦, 茅爱华, 汪伟, 等. 猪圆环病毒 3 型 PCR 检测方法的建立及其应用 [J]. *中国动物传染病学报*, 2018, 26(2): 9 - 14.
- [11] 王小敏, 曹东阳, 徐祥兰, 等. 2010—2015 年华东地区猪圆环病毒 2 型的分子流行病学分析 [J]. *微生物学报*, 2020, 60(4): 703 - 714.

- [12] 李倩文, 杨榛, 杨雅楠, 等. 冬夏两季环境温度对藏猪生理特征及相关基因表达的影响 [J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(3): 873 - 881.
- [13] Zheng S, Wu X, Zhang L, et al. The occurrence of porcine *Circovirus* 3 without clinical infection signs in Shandong Province [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(5): 1337 - 1341.
- [14] Zhang J X, Liu Z G, Zou Y W, et al. First molecular detection of porcine *Circovirus* type 3 in dogs in China [J]. *Virus Genes*, 2018, 54(1): 140 - 144.
- [15] Ou - Yang T, Niu G Y, Liu X H, et al. Recent progress on porcine *Circovirus* type 3 [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019, 73: 227 - 233.
- [16] Woźniak A, Milek D, Bańska P, et al. Does porcine *Circovirus* type 3 (PCV₃) interfere with porcine *Circovirus* type 2 (PCV₂) vaccine efficacy? [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(4): 1454 - 1461.
- [17] 董亚青, 郭广富, 朱爱萍, 等. 猪圆环病毒 2 型 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2016(22): 126 - 128.
- [18] Chamberlain J S, Gibbs R A, Ranier J E, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification [J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(23): 11141 - 11156.
- [19] 季程远, 王蔚怡, 黄欣, 等. 猪圆环病毒 2 型和 3 型双重 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. *中国预防兽医学报*, 2018, 40(10): 913 - 916.
- [20] 温海京, 石玉佩, 胡胜云, 等. 猪圆环病毒 2 型与 3 型双重 PCR 检测方法的建立 [J]. *北京农学院学报*, 2020, 35(3): 101 - 105.
- [21] 杨永宁, 任宜家, 申禄昌. 猪圆环病毒 2 型和 3 型双重 PCR 鉴别检测方法的建立及应用 [J]. *畜牧与兽医*, 2018, 50(12): 91 - 95.
- [22] 钟顺平, 刘应华, 杨贵伟, 等. 云南省勐腊县猪场 PCV2 和 PCV3 的感染状况 [J]. *贵州农业科学*, 2020, 48(5): 89 - 91.
- [23] 曹启明. 江苏部分地区猪圆环病毒 2 型分子流行病学调查及其致病性研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2017.
- [24] 苗丽娟, 刘东旭, 尹柏双. 2016—2018 年吉林省猪圆环病毒 2 型流行病学调查及序列分析 [J]. *中国兽医杂志*, 2020, 56(3): 33 - 36, 40.
- [25] 张家瑞, 阿丽亚·买买提依明, 屈勇刚, 等. 新疆部分地区猪圆环病毒 2 型抗体检测与分析 [J]. *中国猪业*, 2020, 15(4): 43 - 46.
- [26] 张毅, 陈斌, 邵靛, 等. 2017 年四川省猪群 5 种病毒性传染病流行病学调查 [J]. *畜牧与兽医*, 2018, 50(9): 82 - 86.
- [27] 徐朋丽, 赵宇, 张宇, 等. 猪圆环病毒 2 型和 3 型双重 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国兽医学报*, 2019, 39(1): 25 - 30.
- [28] 任敏, 屈勇刚, 魏其, 等. 新疆首次检测到猪圆环病毒 3 型及其全基因组进化分析 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2019(21): 76 - 80, 86.