

程泽, 李智, 王延辉, 等. 1 株猪圆环病毒 2 型的分离与鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (11): 86-93.

CHENG Z, LI Z, WANG Y H, et al. Isolation and identification of a porcine circovirus type 2 strain [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (11):86-93.

## 1 株猪圆环病毒 2 型的分离与鉴定

程泽<sup>1</sup>, 李智<sup>2</sup>, 王延辉<sup>3</sup>, 王文强<sup>1</sup>, 朱振邦<sup>1</sup>, 曲向阳<sup>2\*</sup>, 李向东<sup>1\*</sup>

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009;

2. 南京博维特健康管理有限公司, 江苏 南京 211899;

3. 普莱柯生物工程股份有限公司, 河南 洛阳 471003)

**摘要:** 为了解广东省某规模猪场引起母猪繁殖障碍及仔猪死亡的主要病原, 通过实验室检测病死仔猪肺脏及淋巴结样品中常见病原, 发现存在猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 的感染。对阳性样品进行全基因组扩增、测序后, 与国内外其他 PCV2 毒株进行同源性比对, 建立系统遗传进化树并进行分析; 通过猪肾细胞系进行病毒分离, 使用荧光定量 PCR 及间接免疫荧光法对分离病毒进行鉴定。结果显示: 分离的毒株 GD-2 为 PCV2a 基因型, 基因组全长为 1 768 bp。与其他毒株相比, GD-2 与 H24-1-2019、E15-2-2019、F18-2-2019 这 3 株 PCV2 毒株基因组同源性为 99.9%。毒株 GD-2 经 PK-15 细胞系连续传代, 第 7 代病毒滴度为  $10^{4.375}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL。本研究为广东地区 PCV2 的流行提供了新的数据信息。

**关键词:** 猪圆环病毒 2 型; 分离鉴定; 进化分析

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2024)11-0086-08

## Isolation and identification of a porcine circovirus type 2 strain

CHENG Ze<sup>1</sup>, LI Zhi<sup>2</sup>, WANG Yanhui<sup>3</sup>, WANG Wenqiang<sup>1</sup>, ZHU Zhenbang<sup>1</sup>, QU Xiangyang<sup>2\*</sup>, LI Xiangdong<sup>1\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Nanjing Dr. Vet Health Management Co., Ltd., Nanjing 211899, China;

3. Pulike Biological Engineering Co., Ltd., Luoyang 471003, China)

**Abstract:** In order to determine the main cause that led to reproductive disorder in sows and to death of piglets in a large-scaled pig herd in Guangdong Province, porcine circovirus type 2 (PCV2) was found by laboratory diagnosis using the lung and lymph node samples collected from dead piglets. The complete genome of PCV2 was amplified for sequencing. Furthermore, the sequence alignment and phylogenetic analysis were performed by comparing with PCV2 strains previously reported both in China and abroad. The positive PCV2 samples were inoculated into PK-15 cells for virus isolation, and the isolated virus was verified by qPCR and indirect immunofluorescence assay. The results showed that the GD-2 strain belonged to the PCV2a genotype and the complete genome sequence was 1 768 bp in length. Compared with other PCV2 strains, the nucleotide sequence homology of PCV2a in this study was 99.9% with those reported H24-1-2019, E15-2-2019 and F18-2-2019 strains. After a series of passages, the virus titer (TCID<sub>50</sub>) of the seventh passage was  $10^{4.375}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL. The present study provided new information for the epidemiological investigation of PCV2 in the Guangdong area.

**Keywords:** porcine circovirus type 2; isolation and identification; phylogenetic analysis

猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 属于圆环病毒科 (*Circoviridae*) 圆环病毒属 (*Circovirus*), 是一种无囊

膜的二十面体病毒, 拥有已知最小的自我复制病毒基因组<sup>[1]</sup>, 其感染主要导致机体免疫抑制, 造成机体免疫力降低。PCV2 是断奶仔猪多系统衰竭综合征 (PMWS) 的原发性病原, 与猪皮炎肾病综合征 (PDNS)、猪呼吸道疾病综合征 (PRDC)、增生性坏死性肺炎 (PNP)、先天性震颤 (CT) 等猪病相关, 给世界养猪业带来巨大的经济损失<sup>[2]</sup>。PCV2 常与多种病原混合感染, 加大了临床的防控难度<sup>[3]</sup>。

PCV2 基因组大小约为 1.76 kb, 其中 ORF1 基因主要编码 Rep 和 Rep' 蛋白, 是病毒的复制元件; ORF2 基因主要编码 Cap 蛋白, 而 Cap 蛋白是 PCV2

收稿日期: 2023-10-19; 修回日期: 2024-09-02

基金项目: 江苏省双创计划双创团队项目 (JSSCTD202224); 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 高等学校学科创新引智计划项目 (D18007)

第一作者: 程泽, 男, 硕士研究生; 李智, 男, 硕士研究生。\*共同第一作者

\*通信作者: 李向东, 教授, 主要从事动物疫病防控研究, E-mail: 007352@yzu.edu.cn; 曲向阳, 博士, 主要从事猪病防控工作, E-mail: qxy.12345@163.com。

唯一的结构蛋白，与病毒的免疫原性密切相关。根据全基因组和 Cap 基因的系统进化树分型可将 PCV2 分为 8 个基因型，包括 PCV2a、PCV2b、PCV2c、PCV2d、PCV2e、PCV2f、PCV2g 和 PCV2h<sup>[4]</sup>。我国 PCV2 流行毒株于 2000 年由 PCV2a 向 PCV2b 基因型开始发生转换<sup>[5]</sup>。自 2012 年以来，PCV2d 基因型流行率上升，我国也正在发生由 PCV2b 到 PCV2d 基因型的过渡<sup>[6]</sup>。由于 PCV2 基因型多且易发生突变，因此了解其流行情况对该病的防控起着重要作用。

本研究从广东某规模猪场采集病死仔猪的肺脏及淋巴结，对其进行实验室检测，随后对阳性样品进行 PCV2 全基因组扩增、测序及遗传进化分析，在 PK-15 细胞中分离病毒并对分离株进行鉴定及生物学特性研究。本研究丰富了对广东 PCV2 流行情况的了解，可为广东地区 PCV2 感染的防控提供一定的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源

广东省某规模猪场出现母猪流产，约 20% 的仔猪死亡。从该猪场采集 10 只病死仔猪的肺脏和淋巴结，编号为 1~10 号，其中 1、2、5、6 号为肺脏和淋巴结的混合样品，3、7、8、9、10 号为淋巴结样品，4 号为肺脏样品。

### 1.2 细胞与主要试剂、仪器

PK-15 细胞，由本实验室保存；DNA 病毒核酸提取试剂盒购自广州美基生物科技有限公司；2 × Taq Master Mix (Dye Plus)、DL2000 DNA Marker 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；Premix Taq<sup>TM</sup> 购自大连宝生物工程股份有限公司；0.25% EDTA-胰酶细胞消化液购自北京索莱宝科技有限公司；胎牛血清 (FBS)、DMEM 培养液购自苏州双湖生物科技有限公司；丙酮购自国药集团化学试剂有限公司；PCV2 Cap 蛋白单克隆抗体由普莱柯生物工程股份有限公司馈赠；Alexa Fluor 555 Phalloidin 标记羊抗鼠 IgG 购自 Cell Signaling Technology 公司；DAPI 染色液购自上海碧云天生物技术有限公司。主要仪器有 ABI MiniAmp Plus PCR 仪、ABI QuantStudio3 荧光定量 PCR 仪，均购自 Thermo 公司。

### 1.3 临床样品实验室检测

无菌剪切上述 10 只病死仔猪的临床样品，每份样品各 0.5 g 于离心管中，分别加入 1 mL PBS，使用组织破碎机破碎样品，6 500 r/min 离心 5 min 后吸取上清液，使用 DNA 病毒核酸提取试剂盒提取 10 份样

品中的病毒核酸，将剩余组织上清液放于 -80 °C 保存备用。随后使用荧光定量 PCR 方法对上述临床样品进行 PCV2 的检测。针对 PCV2 的特异性探针和引物参照参考文献 [5]。

### 1.4 PCV2 全基因组扩增

使用表 1 中的引物，采用普通 PCR 方法对阳性样品进行 PCV2 全基因组扩增，引物由上海生工生物有限公司合成，实验室制备的全基因组的质粒作为阳性对照。PCR 扩增体系 (50 μL)：2 × Taq Master Mix (Dye Plus) 25 μL，上、下游引物 (10 μmol/L) 各 2 μL，cDNA 模板 2 μL，ddH<sub>2</sub>O 19 μL。PCR 反应程序：95 °C 3 min；95 °C 15 s，55 °C 15 s，72 °C 2 min，35 个循环；72 °C 5 min，16 °C 保存。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析后送至金唯智生物科技有限公司进行序列测定，随后使用 SeqMan 软件将测序后的全基因片段拼接完整，用于后续的遗传进化分析。

表 1 PCV2 全基因组扩增引物

引物名称	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp
PCV2F	TATCCGCGGGCTGGCTGAACITTTTGAA	1 768
PCV2R	GTGCCCGGAAATTTCTGACAAACGTT	

### 1.5 PCV2 遗传进化分析

经 SeqMan 软件对测序结果进行拼接，获得 PCV2 基因组全长为 1 768 bp，将测序获得的全长基因组毒株命名为 GD-2 (以下均称 GD-2)。从 NCBI 数据库中选取国内外 24 株 PCV2 参考序列 (表 2)，使用 MegAlign 软件将毒株 GD-2 和这些参考毒株的全长基因组和 ORF2 基因序列进行核苷酸序列同源性比对，同时使用 MEGA-X 软件 Maximum-Likelihood 法基于全基因组序列和 ORF2 序列建立系统遗传进化树，比较分析 GD-2 与 24 株参考毒株的遗传进化关系。

### 1.6 病毒的分离培养

取 2 号样品组织上清液，通过 0.22 μm 的无菌滤膜过滤除菌。组织上清液分别以 1 : 10、1 : 20、1 : 60、1 : 180 的比例同步接种到 PK-15 细胞悬液中，于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养，24 h 后待细胞长至单层，换成含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养 24 h，经带毒传代 7 次后，对分离毒株进行实验室检测及生物学特性研究。

表 2 参考毒株信息

毒株名称	GenBank 登录号	来源	基因型
pmws PCV	AF027217	加拿大	PCV2a
LG	HM038034	中国	PV2a (LG 疫苗株)
E15-2-2019	MT876210.1	中国	PCV2a
F18-2-2019	MT876212.1	中国	PCV2a
H24-1-2019	MT876214.1	中国	PCV2a
No. 26	AB072302	日本	PCV2a
Pingtung-1	AY146991.1	中国台湾	PCV2a
HR	AF381176.1	中国	PCV2a
A4099	JF317566	韩国	PCV2b
DBN-SX07-2	HM641752	中国	PCV2b (DBN-SX07-2 疫苗株)
QZ0401	AY691169	中国	PCV2b
Fh19	AY322003.1	法国	PCV2b
AUT5	AY424405.1	澳大利亚	PCV2b
HL1	HQ202970.1	中国台湾	PCV2b
SH	AY686763	中国	PCV2b (SH 疫苗株)
DK1980PMWSfree	EU148503.1	丹麦	PCV2c
DK1990PMWSfree	EU148505.1	丹麦	PCV2c
GS04	EF524517	中国	PCV2d
NL_ Control_ 4	AY484410	荷兰	PCV2d
KSU-MN-2017-PCV2-8	MK504388	美国	PCV2d
TJ	AY181946.1	中国	PCV2d
YN/KM/2018	MH593263.1	中国	PCV2d
YN/QuJing-2018	MK405699.1	中国	PCV2d
CQWZ12	KF742551	中国	PCV2d

### 1.7 分离株荧光定量 PCR 检测

收集第 7 代 GD-2 分离株细胞上清液，同时收集第 7 代带毒细胞，使用 DNA 病毒核酸提取试剂盒提取细胞上清液和细胞中的病毒 DNA，随后进行荧光定量 PCR 检测。

### 1.8 间接免疫荧光法测定 PCV2 滴度

使用 0.125% 胰酶消化带毒细胞，并使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液将带毒细胞作 10 倍浓度梯度稀释，稀释度为  $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-8}$ ，每个稀释度重复 8 孔，各稀释度同步接种于 PK-15 细胞悬液中，同时设立 8 个阴性对照孔，于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养 72 h。

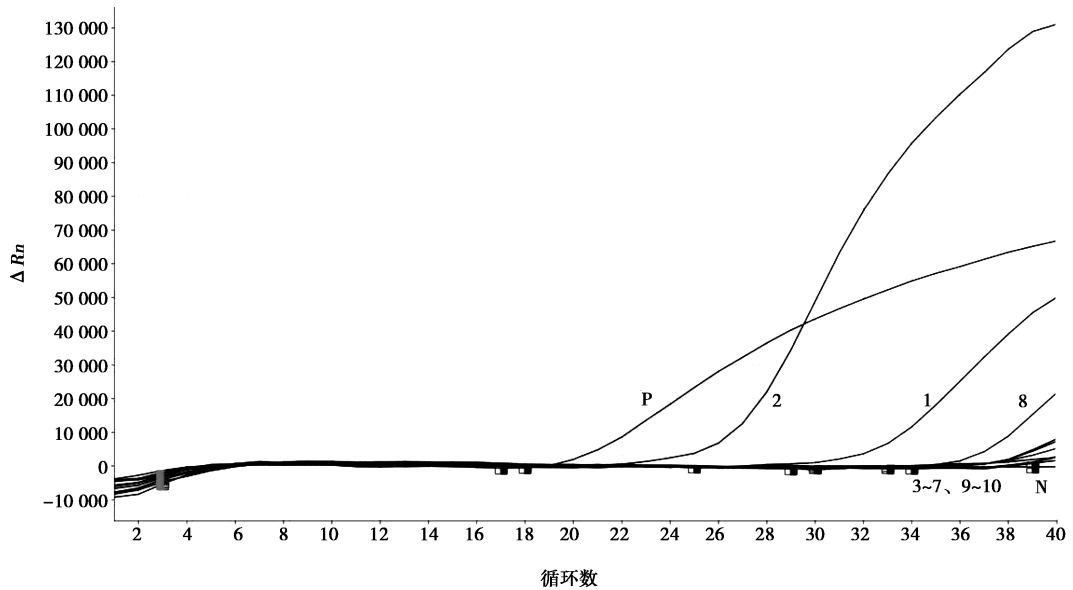
72 h 后将培养板从 37 °C 培养箱中取出，弃掉板内液体，PBS 洗涤 3 次后加入预冷的 80% 丙酮，4 °C 固定 30 min。PBS 洗涤 3 次后加入用 PBS 1 : 400 稀释的 PCV2 Cap 蛋白单克隆抗体，置于 37 °C 孵育

30 min; PBS 洗涤 3 次后加入用 PBS 1 : 1 000 稀释的 Alexa Fluor 555 Phalloidin 标记羊抗鼠 IgG 荧光二抗，置于 37 °C 孵育 30 min; PBS 洗涤 3 次后加入用 PBS 1 : 2 000 稀释的 DAPI 染色液，室温染色 8 min 后用 PBS 洗涤 3 次，最后在荧光显微镜下观察各稀释度下出现特异性红色荧光的孔数，按照 Karber 法计算 TCID<sub>50</sub>。

## 2 结果与分析

### 2.1 临床样品实验室检测

使用荧光定量 PCR 方法对 10 份临床样品进行 PCV2 实验室检测。荧光定量 PCR 结果显示 1、2、8 号样品为 PCV2 阳性 (图 1)。其中，2 号样品的 Ct 值最低，为 19.076。因此，选取 2 号阳性样品进行接下来的研究。

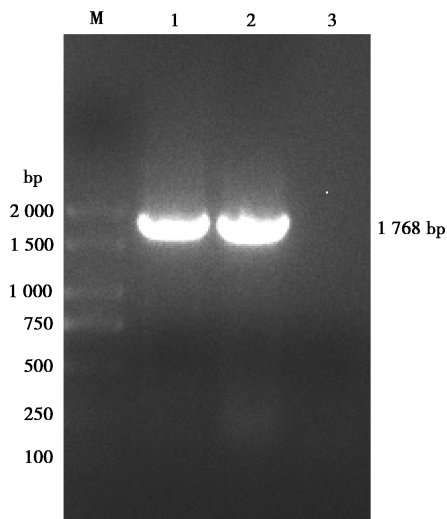


P. 阳性对照; 1~10. 1~10号样品; N. 阴性对照。

图1 临床样品荧光定量PCR检测

## 2.2 PCV2全基因组扩增

使用全基因组测序引物对2号样品中的PCV2基因组进行扩增,得到大小为1 768 bp的特异性条带(图2)。对特异性条带回收纯化后进行测序分析,测序结果经SeqMan软件拼接得到1株PCV2全基因序列,长度为1 768 bp。本研究获得的PCV2全基因序列已登录GenBank数据库,登录号为OR552397。



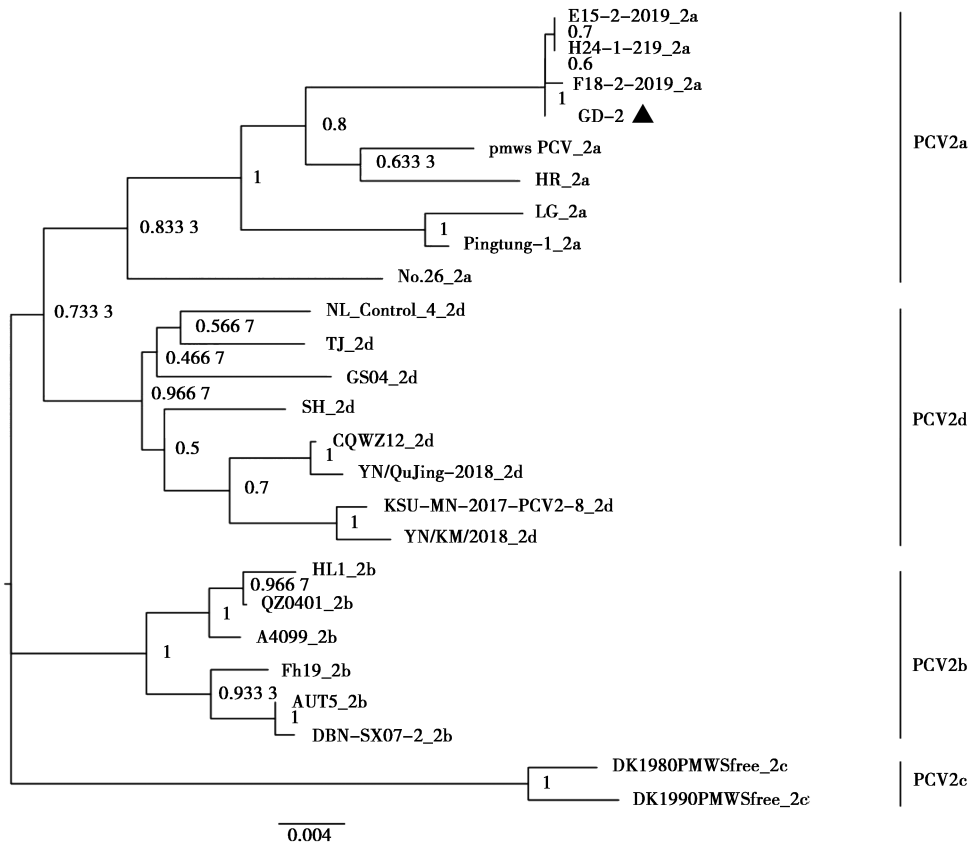
M. DNA分子量标准(DL2000); 1. 阳性对照; 2. 2号样品; 3. 阴性对照。

图2 PCV2全基因扩增分析

## 2.3 PCV2全基因组序列同源性比对及遗传进化分析

使用MegAlign软件将GD-2与24个国内外参考毒株进行全基因组核苷酸同源性分析。结果显示,GD-2与我国不同地区(包括台湾)的15个PCV2参考毒株之间的全基因组序列同源性为94.5%~99.9%,其中该毒株与E15-2-2019、H24-1-2019、F18-2-2019的同源性高达99.9%。GD-2与国外9个PCV2参考毒株之间的核苷酸同源性为93.3%~97.0%,其中该毒株与加拿大首次报道的分离株pmws PCV同源性最高为97.0%。GD-2与PCV2a基因型全基因组核苷酸同源性为96.0%~99.9%,与PCV2b基因型全基因组核苷酸同源性为95.2%~96.4%,与PCV2c基因型全基因组核苷酸同源性为93.3%~93.6%,与PCV2d基因型全基因组核苷酸同源性为94.5%~95.4%。上述结果说明该毒株与PCV2a基因型核苷酸同源性最高。

使用MEGA-X软件对该毒株与24株PCV2参考毒株全基因序列构建遗传进化树(图3),该毒株与F18-2-2019、H24-1-2019、E15-2-2019这3株毒株在同一遗传进化分支上,与F18-2-2019毒株遗传关系最接近,以上结果说明,该毒株属于PCV2a基因型。



▲为本研究毒株。下同。

图 3 GD-2 与 PCV2 参考毒株全基因组序列系统遗传进化分析

### 2.4 ORF2 核苷酸序列遗传进化分析

ORF2 基因主要编码 Cap 蛋白，是 PCV2 唯一的结构蛋白，根据 Cap 蛋白基因，可将 PCV2 分为不同的基因型。因此，使用 MegAlign 软件对 GD-2 与 24 株 PCV2 参考毒株序列的 ORF2 核苷酸序列进行同源性比对。结果显示，该毒株与国内外参考毒株 ORF2 的核苷酸同源性为 85.9%~100%，其中 GD-2 与 E15-2-2019、H24-1-2019 这 2 株毒株同源性为 100%。

使用 MEGA-X 软件对 GD-2 与国内外 24 株 PCV2 参考毒株的 ORF2 核苷酸序列构建遗传进化树，结果显示 GD-2 与 E15-2-2119、F18-2-21019、H24-1-2019 在同一遗传进化分支上，遗传关系最为接近，同属于 PCV2a 基因型（图 4）。由 ORF2 遗传进化结果显示，该毒株属于 PCV2a 基因型。

### 2.5 分离株荧光定量 PCR 检测

本研究分别用 1:10、1:20、1:60、1:180 的病毒稀释比例进行连续带毒传代，收集第 7 代病毒的细胞上清液和感染的细胞，使用荧光定量 PCR 方法

检测各稀释比例下病毒的增殖情况。结果显示，1:20 病毒稀释比例下的细胞上清液和细胞中 PCV2 核酸的 Ct 值分别为 26.400 和 21.402，1:60 病毒稀释比例下细胞上清液和细胞中 Ct 值分别为 25.545 和 21.659，而以 1:10 和 1:180 比例稀释传代的病毒在第 7 代中没有检测到 Ct 值（图 5）。结果说明分离株 GD-2 可以在 1:20、1:60 病毒稀释比例的细胞中增殖传代。

### 2.6 间接免疫荧光法测定 PCV2 滴度

为了进一步验证毒株 GD-2 能在细胞中增殖，使用间接免疫荧光方法检测 1:20 稀释比例的第 7 代带毒传代的 PK-15 细胞。结果显示，带毒传代的 PK-15 细胞可观察到特异性红色荧光，未感染的 PK-15 细胞没有观察到特异性荧光，证明毒株 GD-2 可以在 PK-15 细胞中增殖（图 6）。随后通过间接免疫荧光试验测定分离株 TCID<sub>50</sub>，按照 Karber 法计算得到分离株 GD-2 的第 7 代病毒的 TCID<sub>50</sub> 为 10<sup>4.375</sup> TCID<sub>50</sub>/0.1 mL。

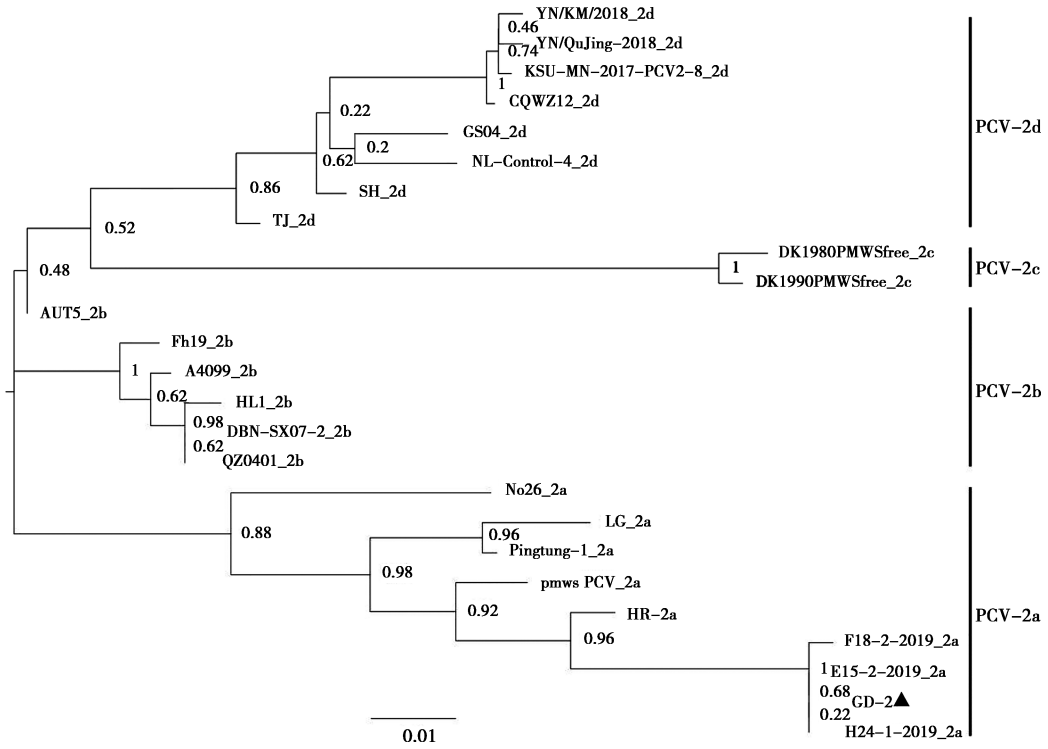
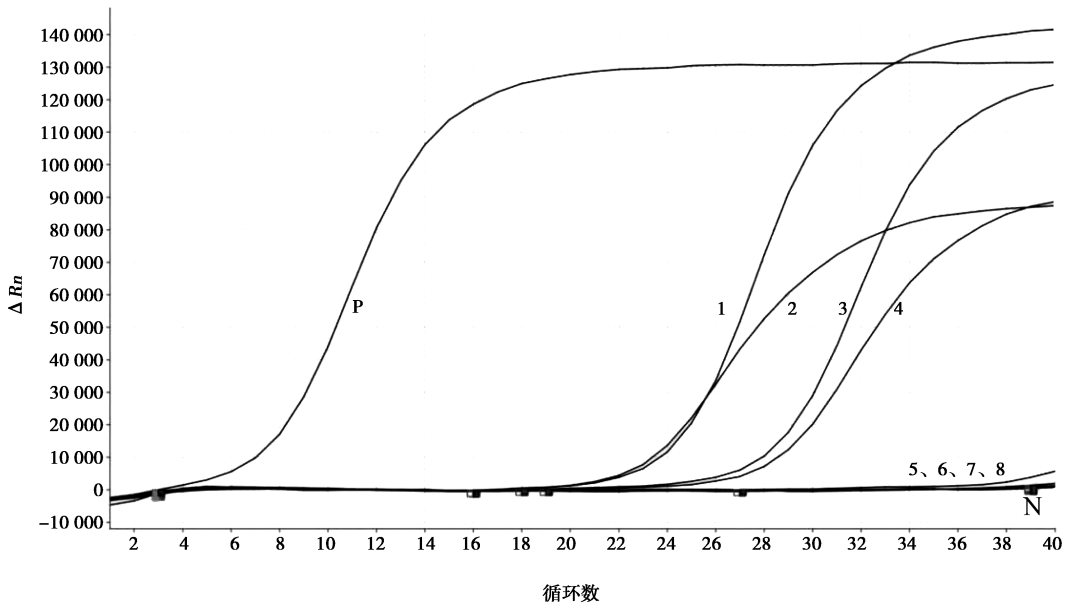


图4 GD-2与PCV2参考毒株基于ORF2序列的系统遗传进化分析



P. 阳性对照；1、3. 1：60 稀释的细胞、上清液；2、4. 1：20 稀释的细胞、上清液；5、7. 1：10 稀释的细胞、上清液；6、8. 1：180 稀释的细胞、上清液；N. 阴性对照。

图5 分离株第7代荧光定量PCR检测

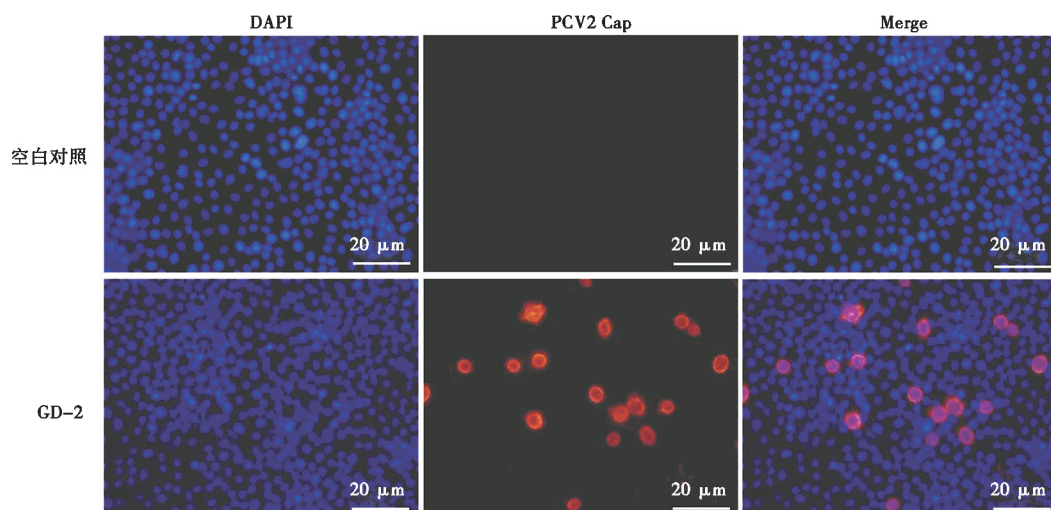


图6 间接免疫荧光检测

### 3 讨论

PCV2能够引起免疫抑制，感染后会造淋巴细胞凋亡，降低机体的免疫反应，进而容易造成其他病毒和细菌的混合感染<sup>[7]</sup>，造成更大的经济损失。PCV2可在PK-15细胞中增殖，但不会出现细胞病变，这给病毒的检测带来困难，主要原因可能是PCV2的复制依赖细胞聚合酶，这种酶主要在细胞增殖周期的S期合成，缩短了病毒的繁殖期<sup>[8]</sup>。刘长明等<sup>[9]</sup>用3种不同方法对PCV2进行增殖，结果表明同步接毒法的病毒含量明显高于单次接毒法。高睿等<sup>[10]</sup>使用3种不同增殖工艺对PCV2进行增殖，结果发现带毒传代生产效果显著。本研究首先使用单次接毒法进行分离，经实验室检测发现未分离成功，可能是因为PCV2的复制在指数生长期的PK-15细胞中增殖效果更好，于是采用在PK-15细胞悬液中同步加入病毒液，随后进行带毒传代的方法进行分离病毒，盲传7代后，使用荧光定量PCR检测第7代分离株细胞上清液和细胞中的Ct值，并进一步通过间接免疫荧光试验鉴定分离株在细胞中的增殖特性。结果显示获得1株稳定感染增殖的PCV2毒株，病毒滴度为 $10^{4.375}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL。

本试验使用4个不同病毒稀释比例进行分离培养，其中1:20、1:60的病毒稀释比例细胞中的Ct值分别为21.402和21.659，1:10、1:180病毒稀释比例未检测到Ct值，可能是由于1:10病毒稀释比例中病毒含量较高，里面一些非特异性物质对细胞造成损害，1:180病毒稀释比例中病毒含量太少，在细胞生长发育过程中复制较差。因此，最适合PCV2在PK-15细胞中增殖的病毒稀释比例为1:20和1:60。张瑞永等<sup>[11]</sup>使用含1%胎牛血清的培养基

培养PK-15细胞进行病毒分离，传代后发现细胞出现脱落拉网的现象。因此，在试验过程中发现当使用含1%胎牛血清的DMEM培养液培养时，带毒细胞会出现贴壁差、漂浮、生长停滞的现象；当使用含10%胎牛血清的DMEM培养液进行带毒传代时，带毒细胞生长发育良好。

对2号阳性病料进行全基因组扩增及序列测定，并与国内外24株参考毒株序列进行同源性比对，结果表明GD-2与24株参考毒株的全基因组核苷酸序列同源性在93.9%~99.9%之间，表明广东该猪场流行的PCV2与国内外不同地区PCV2的基因序列差别不大。基于全基因组及ORF2序列构建遗传进化树进行遗传进化分析，结构基本一致。GD-2与E15-2-2019、F18-2-2019、H24-1-2019这3株PCV2a基因型毒株在同一分支上，表明GD-2与这3株毒株的遗传关系最为接近，并且GD-2与这3株毒株的全基因组核苷酸同源性为99.9%，与E15-2-2019、H24-1-2019毒株的ORF2核苷酸序列同源性为100%。E15-2-2019、F18-2-2019、H24-1-2019毒株均在2019年由河南农业科学院分离，进一步说明该毒株有可能在国内流行，给猪场造成不同程度的经济损失，因此对于该毒株基因型的流行应当引起重视。

徐廷川等<sup>[12]</sup>对2007—2011年广东地区49株PCV2全基因组进行分析发现，该地区PCV2基因型已经发生了从PCV2b到PCV2d基因型的转换。梁鹏帅<sup>[13]</sup>报道2010—2012年广东及周边地区PCV2的主要流行毒株为PCV2b基因型，PCV2a基因型仅有少量存在。羊露露等<sup>[14]</sup>对2020—2021年广东地区4株PCV2全基因组分析发现，4株均为PCV2d基因型，说明PCV2d基因型为该地区主要流行毒株。本研究鉴定了广东某规模猪场存在PCV2感染，并对其进行

病毒分离及全基因组测序分析,得到1株基因型为PCV2a的毒株,说明PCV2可能在该猪场流行,并且该毒株与国内外其他PCV2毒株遗传关系较近。目前广东地区PCV2基因型的流行以PCV2b和PCV2d基因型为主,PCV2a基因型流行很少。本研究为进一步了解广东地区PCV2的流行情况提供了参考。

## 参考文献:

- [1] NATH B K, DAS S, ROBY J A, et al. Structural perspectives of beak and feather disease virus and porcine circovirus proteins [J]. *Viral Immunol*, 2021, 34 (1): 49-59.
- [2] CHAE C. An emerging porcine circovirus type 2b mutant (mPCV2b) originally known as PCV2d [J]. *Vet J*, 2015, 203 (1): 6-9.
- [3] CHEN N, HUANG Y, YE M, et al. Co-infection status of classical swine fever virus (CSFV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circoviruses (PCV2 and PCV3) in eight regions of China from 2016 to 2018 [J]. *Infect Genet Evol*, 2019, 68: 127-135.
- [4] SOLA C, FRANZO G, SEGALES J. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology [J]. *PLoS One*, 2018, 13 (12): e0208585.
- [5] GUO L J, LU Y H, WEI Y W, et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China [J]. *Virology*, 2010, 7: 273.
- [6] KWON T, LEE D U, YOO S J, et al. Genotypic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) and genotype shift to PCV2d in Korean pig population [J]. *Virus Res*, 2017, 228: 24-29.
- [7] HARMS P A. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Vet Pathol*, 2001, 38: 528-539.
- [8] 陈玉文. 不同接毒方法对猪圆环病毒2型增殖的影响 [J]. *福建畜牧兽医*, 2017, 39 (4): 21-22.
- [9] 刘长明, 张超范, 危艳武, 等. 猪圆环病毒2型细胞培养适应毒株的培育和鉴定 [J]. *中国预防兽医学报*, 2006 (3): 248-252.
- [10] 高睿, 李林河, 焦铁军. 猪圆环病毒2型培养工艺比较研究 [J]. *动物医学进展*, 2021, 42 (4): 44-47.
- [11] 张瑞永, 管宇, 吴信明, 等. 低血清培养PK-15细胞及其增殖猪圆环病毒2型的研究 [J]. *动物医学进展*, 2016, 37 (9): 16-20.
- [12] 徐廷川, 张亮权, 王衡, 等. 2007—2011年广东省猪圆环病毒2型分离株的遗传变异分析 [J]. *中国兽医科学*, 2012, 42 (3): 233-237.
- [13] 梁鹏帅. 广东省规模化猪场猪圆环病毒感染情况及分子特征研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2012.
- [14] 羊露露, 李安琪, 袁生, 等. 广东省4株PCV2型分离株全基因组进化分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49 (3): 1015-1023.