

回顾与展望

周继勇 教授，博士生导师，现任南京农业大学动物医学院院长。“万人计划”首批入选专家，长江学者特聘教授，国家杰出青年科学基金获得者，国家创新人才推进计划重点领域创新团队负责人。获国家技术发明二等奖 1 项、国家自然科学基金二等奖 1 项、国家新兽药注册证书 2 个、国家发明专利授权 14 个。发表 SCI 论文 50 多篇。



猪圆环病毒 2 型与猪圆环病毒相关性系统疾病的回顾及展望

顾金燕，邢刚，雷静，刘斐，周继勇

南京农业大学动物医学院，江苏 南京 210095

顾金燕，邢刚，雷静，等. 猪圆环病毒 2 型与猪圆环病毒相关性系统疾病的回顾及展望. 生物工程学报, 2015, 31(6): 880-891.

Gu JY, Xing G, Lei J, et al. Porcine circovirus type 2 and PCV2-systemic disease-a review. Chin J Biotech, 2015, 31(6): 880-891.

摘要: 猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 引起猪的免疫抑制，是猪圆环病毒相关性系统疾病 (PCV2-systemic disease, PCV2-SD) 的主要病原，给养猪业带来了巨大的经济损失。文中从 PCV2 的进化历程、编码蛋白、对免疫系统的影响及技术防控四方面入手，对 PCV2 及 PCV2-SD 进行了全面回顾与展望。

关键词: PCV2, PCV2-SD, 进化历程, 编码蛋白, 免疫

Received: March 23, 2015; **Accepted:** June 1, 2015

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 30230072, 31402198), Key Projects in the National Science & Technology Pillar Program during the Twelfth Five-year Plan Period (No. 2015BAD12B01).

Corresponding author: Jiyong Zhou. Tel/Fax: +86-25-84395605; E-mail: jyzhou@njau.edu.cn

国家自然科学基金项目 (Nos. 30230072, 31402198), “十二五”国家科技支撑计划 (No. 2015BAD12B01) 资助。

网络出版时间: 2015-06-12

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150612.1455.001.html>

Porcine circovirus type 2 and PCV2-systemic disease - a review

Jinyan Gu, Gang Xing, Jing Lei, Fei Liu, and Jiyong Zhou

College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: Porcine circovirus type 2 (PCV2) can cause immunosuppression on herds. PCV2, as an essential pathogen of PCV2-systemic disease (PCV2-SD), has caused considerable economic losses in pig industry worldwide. Here we review and address the evolution, viral protein and immunolesion of PCV2 and preventive techniques of PCV2-SD.

Keywords: PCV2, PCV2-SD, evolution, viral protein, immunolesion

猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 是目前已知的最小的哺乳动物病毒, 直径为 12–23 nm, 是猪圆环病毒相关性系统疾病 (PCV2-systemic disease, PCV2-SD) 的主要病原。PCV2 能损伤猪的免疫系统, 以淋巴结肿大、淋巴细胞减少等为特征, 导致严重的免疫抑制, 给世界养猪业带来巨大的损失。近几年疫苗的使用使 PCV2-SD 得到了一定的控制^[1]。

1 PCV2 的进化历程

1974 年, 德国学者 Tischer 首次描述了一种存在于猪肾细胞系 PK15 (ATCC-CCL33) 的类似小核糖核酸病毒的细胞污染物^[2]。8 年后, 他证明这种污染物是一种猪源的单链环状的 DNA 病毒, 并命名为猪圆环病毒 (Porcine circovirus, PCV)^[3]。将 PCV 接种猪后, 对猪不具有致病性。1996 年, 加拿大学者首次描述了一种新的、从 1991 年开始偶发的猪病, 该病主要侵犯 5–12 周龄的猪群且涉及猪病的多个器官的损伤, 称之为断奶后仔猪多系统衰竭综合征 (PMWS)^[4-5], 现在国际上多称为 PCV2 相关性系统疾病 (PCV2-SD)。随后, 该病在全世界相继被报道,

逐渐受到人们关注, 并从 PCV2-SD 患猪中分离到一种新的 PCV, 这种 PCV 能致病, 且抗原性和核苷酸序列与之前分离到的无致病性的 PCV 存在差异, 为了区分两者, 将不致病的 PCV 命名为 PCV1, 能致 PCV2-SD 的 PCV 命名为 PCV2。2009 年, 德国科学家利用原位杂交和 PCR 技术在一份保存于 1962 年的猪脾和肺脏组织中检测到了 PCV2^[6], 说明 PCV2 可能在猪群中存在已长达 50 年以上, 在这 50 多年间, PCV 逐渐从一种对猪群无害的病毒演变为能对猪群造成重大伤害的病毒。

PCV2 主要有两种基因型: PCV2a 和 PCV2b。两者基因组长分别为 1 767 和 1 768 个核苷酸^[7], 还有一种 PCV2c 仅在丹麦有过报道^[8]。起初 PCV2a 的大流行导致大规模的亚临床感染与零星的发病, 大约到 20 世纪 90 年代, PCV2b 逐渐成为优势毒株并导致了 PCV2-SD 的大爆发, 并且大多数在动物模型上成功诱导健康猪发病的基因亚型都为 PCV2b^[9]。2010 年, Guo 等测定了 2004 至 2008 年间分离自我国各地多株 PCV2 毒株的序列, 并按照现行基因分型原则进行分析, 首次提出了 PCV2d 亚型^[10]。

2011年, Jantafong 等将在泰国分离到的一株新 PCV2 毒株命名为 PCV2e^[11], 近两年, PCV2d 和 PCV2e 在世界其他地区也偶见报道^[12-13]。但是 Cortey 等并不同意这种新的亚型命名方式, 他们认为应该坚持将 PCV2 分为 a、b、c 三个亚型^[14]。我们实验室对在 2009–2013 年间从中国东部地区分离到的 20 株 PCV2 进行分析, 发现两株 PCV2 虽然具有 PCV2b 标签序列, 但在进化分析中却组成一个独立分支, 可能是一个新的基因型, 并命名为 PCV2new^[15]。除此之外, 我国还分离到一些基因缺失毒株、基因插入毒株、重组毒株、类 PCV 毒株等圆环病毒的突变体^[16]。总之, 不管用哪种分类方式, 以上研究都表明当前 PCV2 的变异速度加快, 且临床上存在多种 PCV2 亚型共感染, PCV2 与其他多种病毒 (如猪瘟病毒、蓝耳病毒、细小病毒、伪狂犬病毒等) 共感染的现象, 感染情况普遍且复杂。另有研究发现, PCV2 现已不仅在猪群中流行, 在人类、牛、啮齿动物、苍蝇、蚊子、贝类等动物种群以及水、人用疫苗、空气中也分别检测或分离到了 PCV2^[17-21], 为 PCV2-SD 的防控带来新的挑战。

2 PCV2 编码蛋白

PCV2 基因组很小, Hamel 等通过软件分析认为其基因组结构存在 11 个潜在的开放阅读框 (Open reading frame, ORF)。PCV2 充分利用了其在宿主细胞内形成的复制中间体及阅读框间相互重叠的方式传达了大量的遗传信息^[22], 其中 ORF1、5、7 和 10 位于病毒正链 DNA 上并顺时针转录, 而 ORF2、3、4、6、8、9、11 则位于病毒负链 DNA 上并逆时针转录^[23], 到目前为止, ORF1、2、3、4 的编码产物已经被分别

证明, 其他阅读框所编码产物是否存在尚不清楚。

2.1 ORF1 编码蛋白

ORF1 基因, 亦称 *rep* 基因, 是 PCV2 基因组中最大的 ORF (945 bp, nt 51-995), 在其基因启动子区存在一个干扰素刺激反应元件 (ISRE, nt 1 737-1 751), 研究证明该 ISRE 在病毒的转录起始方面起着很重要的作用^[24]。*rep* 基因编码两个复制必需蛋白 Rep 和 Rep', 前者编码自 *rep* 基因的全长转录本, 而后者则由 *rep* 基因剪接转录本翻译而得, 虽然两者的 N 端是一致的, 但是由于 Rep' 剪接造成的移码, 两者 C 端的氨基酸差异很大^[25]。

之前大量实验数据证明, Rep 及 Rep' 蛋白主要定位于细胞核^[26-27], 这可能与 Rep 及 Rep' 蛋白 N 端存在的核定位信号相关。Rep 及 Rep' 蛋白的共同 N 端存在 3 个核定位信号区 (NLS1、2、3), 其中 NLS1 和 NLS2 是 Rep 及 Rep' 蛋白核定位所必需的, NLS3 在蛋白核转运过程中起促进作用。但是我们实验室证实 Rep 蛋白仅在病毒感染早期定位于核质, 随着时间推移慢慢向细胞核周围移动并进入细胞质^[28]。Finsterbush 等通过细菌双杂交系统发现了 syncoilin 蛋白和转录调节蛋白 c-myc 与 Rep 蛋白互作, 随后有人用酵母双杂交系统又鉴定出了宿主细胞中能与 Rep 蛋白互作的锌指蛋白 265 (ZNF265)、胸腺嘧啶糖苷酶 (TDG) 和血管生成因子 VG5Q。有趣的是 Rep' 只能与 VG5Q 及 TDG 发生反应, 这可能是因为 Rep 蛋白与 ZNF265 作用的位点位于两者差异很大的 C 端^[29]。

2.2 ORF2 编码蛋白

位于负链的 ORF2 基因编码一个大小为 27.8 kDa 的衣壳蛋白 Cap, Cap 蛋白是 PCV2 的

结构蛋白。随着 Cap 单体蛋白晶体结构的解析,人们终于解开了其组装方式的神秘面纱,在这个模型中,60 个 Cap 蛋白亚基即可形成了一个对称的二十面体,独立构成完整的 PCV2 衣壳。

分子流行病学显示 *cap* 基因比其他 ORF 基因更容易发生变异,而且 *cap* 基因的多态性与 PCV2 的毒力和复制能力相关。研究发现, Cap 蛋白 110 位的脯氨酸变成丙氨酸 (P110A)、191 位的精氨酸变成丝氨酸 (R191S) 后, PCV2 在体外的生长能力增强但在体内的毒力衰减^[30]。有学者在比较 PCV2a 和 PCV2b 差异序列时发现, Cap 蛋白的 190-191-206-210 四个保守氨基酸残基与病毒蛋白的分布模式相关, PCV2b 的这 4 个氨基酸残基 AGIE 比 PCV2a 的 SRKD 更有利于 Cap 和 Rep 蛋白在细胞核中的定位,从而促进了病毒的复制^[31]。我们实验室分离到的长度为 1 766 bp 的 PCV2 毒株与 1 767 bp 毒株相比,其 *cap* 基因中 1 059 处碱基缺失,导致体外复制能力增强^[32]。为了解 PCV2 新的潜在核苷酸缺失可行性,本实验室选择 Cap 蛋白抗原表位外不影响 ORF2 内其他编码框翻译的 1 376、1 377、1 378 和 1 379 位点的碱基进行单核苷酸缺失感染性克隆构建,结果显示,1 376 位点不是 PCV2 形成病毒粒子所必需的,但是它的缺失能增强病毒复制能力,促进 IL-6 的表达^[33],再次说明 Cap 蛋白与 PCV2 的复制能力相关。

作为主要的免疫原性蛋白, Cap 蛋白的抗原表位逐渐被解析,2000 年, Mahé 等利用 PEPSCAN 技术鉴定出了 Cap 蛋白的 4 个线性表位,分别为 aa65-87、aa117-131、aa157-183 和 aa193-207^[34];2004 年, Lekcharoensuk 等利用

PCV1 和 PCV2 嵌合病毒鉴定出了由 aa47-63、aa165-200 和 C 末端的最后 4 个氨基酸共同构成的至少 3 个构象表位^[35]。2009 年,我们利用单抗及合成肽精细地定位了 Cap 蛋白的 aa156-162、aa175-192、aa195-202 和 aa231-233 四个线性表位,其中 aa231-233 既是线性表位又能形成构象表位,并确认其是潜在的 PCV2 感染的血清学标志^[32]。2011 年, Guo 等在 Cap 蛋白的核定位信号区鉴定出了一个新的抗原表位 aa26-36,对 Cap 蛋白的核定位和功能研究有重要意义^[36]。2013 年, Ge 等利用噬菌体展示技术又发现了 aa86-93 和 aa102-107 两个抗原表位。aa86-93 是 Cap 蛋白中 PCV2a 和 PCV2b 两个基因型间差异最明显的氨基酸序列,可能是区别 PCV2 两种基因型的靶标片段及特异性表位。aa102-107 与 PCV2 细胞受体硫酸乙酰肝素潜在的结合位点末端序列 aa98-103 部分重叠,而 PCV2 是通过 Cap 蛋白与受体硫酸乙酰肝素和硫酸软骨素 B 的糖胺聚糖结合而完成入胞过程的^[37],所以针对此表位的单抗可能可以影响 PCV2 的吸附及入胞^[38]。

在 PCV 感染的早期, Cap 蛋白定位于核仁,而后进入核质,说明 Cap 蛋白可在细胞不同区域之间穿梭,这与只定位于核质的 Rep 蛋白不同^[26]。在 PCV2 与宿主细胞相互作用的研究过程中,研究人员迄今发现了 11 个能与 Cap 蛋白互作的宿主细胞蛋白,包括补体因子 C1qB、细胞粘附分子 P-selectin、makorin 环指蛋白 1 (MKRN1)、受体蛋白补充组件的球状头部 C1q (gC1qR)、核小体组装蛋白 1 (NAP1)、前列腺凋亡反应蛋白 4 (Par-4)、核仁磷酸蛋白 1 (NPM1)、热休克蛋白 40 (Hsp40)、细胞骨架蛋白

α -tubulin、热休克蛋白 70 (Hsp70)^[29,39-40]和我们实验室最近发现的胞质动力蛋白 IC1 亚基^[41]。另有研究表明, Cap 蛋白在体外能与 Rep 蛋白互作, 甚至 Cap 蛋白之间也能发生互作^[42], 我们实验室最近研究发现 Rep 蛋白和 ORF3 蛋白具有干扰 Cap 蛋白诱导小鼠产生保护性免疫反应的能力^[43]。

2.3 ORF3 编码蛋白

ORF3 叠加于 ORF1 中, 但转录方向相反。PCV1 和 PCV2 的 ORF3 序列大小不一样, 在 PCV1 中为 621 bp, 在 PCV2 中只有 315 bp。2005 年, Liu 等首次通过实验证明 ORF3 编码蛋白是 PCV2 复制非必需的, 但是它能通过活化 caspase-8 和 caspase-3 通路来诱导细胞凋亡^[44]。随后的研究表明, ORF3 蛋白能与 pPirh2 特异性结合并导致 p53 聚集从而诱发细胞凋亡^[45-46]。动物试验表明 ORF3 与 PCV2 的致病性相关^[47-48], 且 ORF3 能提高病毒在体内外的散播^[49]。但是, 我们实验室构建的 ORF3 缺失 PCV2 感染性克隆未能在细胞上拯救出病毒, ORF3 是否在 PCV2 的复制中发挥作用有待进一步实验^[50]。最近, Choi 等研究发现在 PCV2 感染的早期阶段, ORF3 蛋白能促进蛋白酶体降解 RGS16 并促使猪上皮细胞分泌 IL-6、IL-8 等细胞因子, 这提示 ORF3 蛋白可能与 PCV2 引起的慢性炎症反应有关^[51]。

2.4 ORF4 编码蛋白

ORF4 基因完全叠加在 ORF3 基因中, 且转录方向与 ORF3 一致, 我们实验室分别从蛋白和转录本水平验证了 PCV2 ORF4 基因的转录和表达, 其转录本为 180 bp, 并证明 ORF4 不是 PCV2 在体内复制所必需的, ORF4 缺失 PCV2

能够诱发感染细胞更高水平的 caspase-3、8、9 活性, 提示 ORF4 蛋白与凋亡抑制相关, 是 PCV2 致病性的负调控基因^[52]。随后, Gao 等用 RACE 技术确定了 ORF4 的全长 mRNA 为 355 bp^[53], 并验证了 ORF4 编码蛋白不是 PCV2 复制所必需的, 但却在感染的早期阶段抑制病毒的复制, ORF4 编码蛋白通过抑制 ORF3 的转录来抑制细胞凋亡作用^[54]。

3 PCV2 对免疫系统的影响

PCV2 是 PCV2-SD 的主要诱因, PCV2-SD 患猪的最主要特征是淋巴结损耗。研究表明, 淋巴结损耗会影响 B 细胞、T 细胞和 NK 细胞^[55-57], 且 PCV2-SD 患猪的外周血中性粒细胞和淋巴细胞的相对比例与健康猪是相反的, 说明 PCV2 的感染会对宿主免疫系统产生巨大的影响^[58]。

PCV2 很容易侵犯宿主先天免疫系统的单核/巨噬细胞系统和树突状细胞, 但是 PCV2 在巨噬细胞中复制非常缓慢, 在树突状细胞中基本不复制, PCV2 与这些细胞共存, 不被降解, 不被递呈, 也不引起细胞凋亡, 极有可能 PCV2 仅是利用这些细胞作为自己在宿主体内散播的载体, 这可能与 PCV2 的免疫逃避机制相关^[27,59]。PCV2 感染巨噬细胞后虽然不会引起细胞凋亡, 但是会降低其杀微生物的能力。除此之外, 感染 PCV2 的肺泡巨噬细胞会产生高水平 TNF- α 和 IL-8, 同时上调中性粒细胞趋化因子 II、粒细胞集落刺激因子和单核细胞趋化蛋白 1 的水平^[60]。

研究表明, PCV2 感染能提高宿主淋巴组织和外周血单核细胞中 IL-10 的表达水平^[61],

IL-10 能够抑制活化的 T 细胞产生细胞因子, 抑制 NK 细胞活性, 干扰 NK 细胞和巨噬细胞产生细胞因子。据报道病毒的持续感染或慢性感染会导致 IL-10 的高水平表达, IL-10 表达水平的提高导致 IL-12 等细胞因子分泌减少从而诱导免疫抑制, 阻碍病毒清除^[62]。PCV2 感染中 IL-10 高水平的表达提示 IL-10 诱导的免疫抑制在 PCV2 的致病和持续性感染中扮演重要角色^[63]。Crisci 等发现在 PCV2-SD 患猪的脾脏中, IL-10 表达上调都位于 T 细胞富集区, 而很少位于 B 细胞或巨噬细胞富集区, 这有利于 IL-10 对 T 细胞的调节, 诱导下游免疫抑制^[64]。有趣的是, 在感染 PCV2 的细胞中并没有检测到高水平的 IL-10, 而在感染细胞周围的细胞中 IL-10 的表达水平非常高, 这可能是旁分泌作用导致的^[63]。除了 IL-10 以外, PCV2 还能诱导 IL-1 β 和 IL-8 的产生, 但是对 IL-2、IL-4 和 IFN- γ 的表达具有抑制作用, 说明 PCV2 的感染影响了患猪的免疫功能^[61,65]。

在 PCV2 感染猪体实验中, 中和抗体一般在接种后 4 周产生^[66], 中和抗体的水平与 PCV2 的复制相关。Meerts 等发现, 在中和抗体和 IFN- γ 水平很高的猪体中, PCV2 的病毒载量很低; 而在中和抗体和 IFN- γ 水平很低的猪体中, PCV2 的病毒载量很高, 提示中和抗体在清除宿主病毒中起着很重要的作用^[67]。在 PCV2-SD 患猪体内往往不能产生特异性中和抗体或抗体水平很低, 这可能导致病毒在体内大量积聚^[68], 总之, 体液免疫受损, 特别是中和抗体反应的失能可能是导致 PCV2-SD 的重要原因。

淋巴细胞的活化是 PCV2 在体内增殖所必需的, 免疫刺激能促进 PCV2 的增殖, 这些现

象说明 PCV2 能利用天然免疫系统促进自身的增殖, 但同时它又破坏宿主免疫系统, 影响关键天然免疫细胞的功能, 造成免疫抑制。PCV2 究竟如何导致 PCV2-SD 的发生? 哪些因子在这个过程中起着作用? 淋巴系统的损伤又是如何造成的? 解决这些问题并不容易, 仍然需要科学家们进一步探索。

4 技术防控

4.1 诊断与检测技术

PCV2 单独感染时常呈现亚临床感染状态, 混合感染时又与其他共感染病原导致的临床症状及器官病变十分相似, 仅依靠临床和病理学诊断很难准确检测该病。国内外学者对 PCV2 的诊断与检测技术投入了大量的研究, 并取得了很大的进步, 这些技术大致可以分为病原学检测技术和血清学检测技术。

PCV2 病原学检测技术主要有 PCR 技术、原位杂交技术和核酸探针技术。PCR 技术具有快速、简便、特异性强的优点, 是实验室最常用的检测 PCV2 病原的方法。随着分子生物学的发展, 常规 PCR 和基于此的多重 PCR、竞争 PCR、荧光定量 PCR 等检测 PCV2 的 PCR 检测技术被不断建立。1999 年, Laroche 等应用建立多重 PCR 方法检测了加拿大地区 1994–1998 年间的 42 份病料, 此法成功鉴别了每份样品中 PCV 的型^[69]。2000 年, Liu 等建立了检测感染仔猪样品中 PCV 基因的竞争 PCR 方法, 此法不仅能够区分 PCV1 和 PCV2, 还能确定病毒的拷贝数量^[70]。Mcintosh 等建立了绿色荧光实时 PCR 方法来检测 PCV2, 运用该方法成功地从血清、粪便、肠系膜淋巴结、心肌层、肝脏、肾

脏中检测出 PCV2^[71]。除此之外, 基于 PCR 技术的环介导等温扩增技术(LAMP)操作简便, 非常适合基层操作, 我们实验室 Qiu 等建立的 LAMP 方法能准确鉴别 PCV2a 和 PCV2b, 具有很好的特异性、灵敏性和稳定性^[72]。2007 年, Pérez-Martín 等建立了检测病料中 PCV2 的原位杂交方法^[73], 同年, 国内姚鑫等利用原位杂交技术分析 PCV2 在人工感染仔猪主要组织中的分布, 此法具有良好的敏感型与特异性, 可用于 PCV2 的实验室诊断和感染靶细胞的定位^[74]。核酸探针技术是一种快速、可靠、敏感度高的检测 PCV2 的方法, 姜永厚等结合 PCR 方法和 DNA-DNA 杂交技术建立的 PCV2 检测与分型寡核苷酸芯片可以准确鉴别 PCV 病毒基因型, 其灵敏度是凝胶电泳的 5 倍^[75]。肖驰等根据 PRRSV、CSFV、PCV2 的序列制成相应探针并构建的 DNA 芯片具有特异性高、灵敏度高和可重复利用的优点, 能够同时检测 PRRSV、CSFV 和 PCV-2 感染^[76]。

血清学检测技术主要有间接免疫荧光 (Indirect immunofluorescence assay, IFA)、免疫过氧化物酶单层细胞试验 (Immunoperoxidase monolayer assay, IPMA)、酶联免疫吸附试验 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 和胶体金诊断方法等。1998 年, Allan 等建立了 IFA 方法用于 PCV2 感染猪的检测^[77]。1998 年, Ellis 等建立了用于检测 PCV2 感染猪的 IPMA 方法^[78]。2007 年, 刘长明等建立了用于检测 PCV2 血清抗体的 IPMA^[79]。ELISA 检测方法具有快速、简单、敏感性高、特异性强又易于标准的优点, 为最常用的血清学检测技术, 用于检测抗体的 ELISA 有间接 ELISA、竞争 ELISA 和阻断 ELISA 3 种。2000 年, Walker 等用细胞

培养 PCV2 作为抗原, 以 PCV2 单抗作为竞争抗体成功建立了检测 PCV2 抗体的竞争 ELISA 方法, 结果显示此法比 IFA 更敏感, 具备大规模检测 PCV2 抗体的条件^[80]。2002 年, Nawagitgul 等建立了分别基于 PCV2 病毒粒子和 Cap 蛋白为抗原的间接 ELISA 方法检测 PCV2 抗体, 结果显示两者的敏感性、特异性和准确性相似^[81]。我们实验室 Shang 等用大肠杆菌表达的核定位信号缺失 Cap 蛋白作为包被抗原建立了间接 ELISA 方法检测 PCV2 抗体, 研制出了我国第一个获得国家批准生产的商品化 PCV2 ELISA 抗体检测试剂盒^[82]。除了以上这些传统的 PCV2 检测技术, 最近 Hu 等应用表面等离子共振技术检测液体样本中的 PCV2 含量的方法^[83]。Yang 等进行了将 PCV2 特异性的单域抗体融合于碱性磷酸酶作为新型的检测试剂的探索^[84]。

4.2 免疫预防

控制病毒性疾病最好的方法是使用安全有效的疫苗。自 2004 年第一个 PCV2 疫苗在法国和德国生产使用以来, 商品化的圆环病毒疫苗已在世界各地猪场广泛使用。亚单位疫苗、PCV1-2 嵌合灭活苗和 PCV2 灭活苗等在欧洲、北美、韩国等地区都取得了很好的防疫效果。近年来, 中国政府和养殖企业对 PCV2-SD 逐渐关注, 我国浙江大学、华中农业大学、南京农业大学、哈尔滨兽医研究所等单位已成功开发出 5 种全病毒灭活疫苗, 这些疫苗为控制我国的 PCV2-SD 作出了重要贡献。与此同时, 基于大肠杆菌、杆状病毒、伪狂犬病毒及腺病毒等载体的 PCV2 疫苗研究都取得了重要进展。Yin 等在大肠杆菌表达系统获得了 Cap 蛋白组装的病毒样颗粒^[85-86]; Fan 等在昆虫细胞中获得了

Cap 蛋白组装的病毒样颗粒,动物实验证明其能在小鼠体内诱导产生较好的免疫反应^[87-88]。最新研究显示将 poIFN- γ 与 *cap* 基因在杆状病毒载体串联表达也能诱导小鼠体产生良好的免疫保护作用^[89]。最近,武汉中博股份有限公司利用杆状病毒载体研发的 PCV2 灭活疫苗取得了国家新兽药证书。除此以外,以伪狂犬病毒、腺病毒为载体的 PCV2 疫苗试验也在不同的实验室进行^[90-94],这些研究为 PCV2 基因工程疫苗的发展奠定了基础。

总之,虽然使用疫苗使 PCV2-SD 得到了一定程度的遏制,但由于 PCV2 许多基本特性和致病机理不清,加上临床上 PCV2 变异速度的加快、共感染问题愈加严重,未来 PCV2-SD 的防控面临着极大的挑战,因此,PCV2 感染的研究与 PCV2-SD 新型控制技术的开发任重道远。

REFERENCES

- [1] Beach NM, Meng XJ. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res*, 2012, 164(1/2): 33–42.
- [2] Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol Orig A*, 1974, 226(2): 153–167.
- [3] Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, 1982, 295(5844): 64–66.
- [4] Harding JCS, Clark EG. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod*, 1997, 5: 201–203.
- [5] Harding JCS, Clark EG, Strokappe JH, et al. Postweaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation. *Swine Health Prod*, 1998, 6: 249–254.
- [6] Jacobsen B, Krueger L, Seeliger F, et al. Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Vet Microbiol*, 2009, 138(1/2): 27–33.
- [7] Cheung AK, Lager KM, Kohutyuk OI, et al. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch Virol*, 2007, 152(5): 1035–1044.
- [8] Segales J, Olvera A, Grau-Roma L, et al. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec*, 2008, 162(26): 867–868.
- [9] Tomás A, Fernandes LT, Valero O, et al. A meta-analysis on experimental infections with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet Microbiol*, 2008, 132(3/4): 260–273.
- [10] Guo LJ, Lu YH, Wei YW, et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virol J*, 2010, 7: 273.
- [11] Jantafong T, Boonsoongnern A, Poolperm P, et al. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 in piglets from PMWS-affected and -negative farms in Thailand. *Virol J*, 2011, 8: 88.
- [12] Toplak I, Lazić S, Lupulović D, et al. Study of the genetic variability of porcine circovirus type 2 detected in serbia and slovenia. *Acta Vet Hung*, 2012, 60(3): 409–420.
- [13] Zhai SL, Chen SN, Wei ZZ, et al. Co-existence of multiple strains of porcine circovirus type 2 in the same pig from China. *Virol J*, 2011, 8: 517.
- [14] Cortey M, Olvera A, Grau-Roma L, et al. Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature. *Vet Microbiol*, 2011, 149(3/4): 522–523.
- [15] Qiu XH, Lv P, Xing G, et al. Molecular epidemiology of PCV2 in eastern china from 2009 to 2013//Livestock Epidemiology Branch of China Animal Husbandry and Veterinary Institute. Beijing: Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine, 2013 (in Chinese). 邱小伙, 吕朋, 邢刚, 等. 中国东部 PCV2 分子流行病学调查 2009–2013//动物生态养殖、疫病防控、食品安全与人类健康——中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会第八届全国会员代表大会暨第十五次学术研讨会论文集. 北京: 中国畜牧兽医学会.
- [16] Zhai SL, Chen SN, Xu ZH, et al. Porcine circovirus type 2 in China: an update on and insights to its prevalence and control. *Virol J*, 2014, 11: 88.
- [17] Zhai SL, Chen RA, Chen SN, et al. First molecular

- detection of porcine circovirus type 2 in bovids in China. *Virus Genes*, 2014, 49(3): 507–511.
- [18] Yang XH, Hou LD, Ye J, et al. Detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) in mosquitoes from pig farms by PCR. *Pakistan Vet J*, 2012, 32(1): 134–135.
- [19] Blunt R, McOrist S, McKillen J, et al. House fly vector for porcine circovirus 2b on commercial pig farms. *Vet Microbiol*, 2011, 149(3/4): 452–455.
- [20] Nayar GPS, Hamel AL, Lin LH, et al. Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses. *Can Vet J*, 1999, 40(4): 277–278.
- [21] Lőrincz M, Cságola A, Biksi I, et al. Detection of porcine circovirus in rodents-short communication. *Acta Vet Hung*, 2010, 58(2): 265–268.
- [22] Cheung AK. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology*, 2003, 313(2): 452–459.
- [23] Hamel AL, Lin LL, Nayar GPS. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol*, 1998, 72(6): 5262–5267.
- [24] Gu JY, Zhang Y, Lian X, et al. Functional analysis of the interferon-stimulated response element of porcine circovirus type 2 and its role during viral replication *in vitro* and *in vivo*. *Viol J*, 2012, 9: 152.
- [25] Finsterbusch T, Mankertz A. Porcine circoviruses-Small but powerful. *Virus Res*, 2009, 143(2): 177–183.
- [26] Finsterbusch T, Steinfeldt T, Caliskan R, et al. Analysis of the subcellular localization of the proteins Rep, Rep' and Cap of porcine circovirus type 1. *Virology*, 2005, 343(1): 36–46.
- [27] Gilpin DF, McCullough K, Meehan BM, et al. *In vitro* studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. *Vet Immunol Immunopathol*, 2003, 94(3/4): 149–161.
- [28] Zhang X, Ma GP, Li YF, et al. Characterization of monoclonal antibody against replication-associated protein of porcine circovirus. *DNA Cell Biol*, 2009, 28(1): 23–29.
- [29] Finsterbusch T, Steinfeldt T, Doberstein K, et al. Interaction of the replication proteins and the capsid protein of porcine circovirus type 1 and 2 with host proteins. *Virology*, 2009, 386(1): 122–131.
- [30] Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, et al. Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication *in vitro* and attenuated the virus *in vivo*. *J Virol*, 2004, 78(24): 13440–13446.
- [31] Cheung AK, Greenlee JJ. Identification of an amino acid domain encoded by the capsid gene of porcine circovirus type 2 that modulates intracellular viral protein distribution during replication. *Virus Res*, 2011, 155(1): 358–362.
- [32] Shang SB, Jin YL, Jiang XT, et al. Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus type 2. *Mol Immunol*, 2009, 46(3): 327–334.
- [33] Jin YL, Xing G, Tian PF, et al. Construction of single nucleotide-deleted porcine circovirus type 2 and its bioactivity. *Sci Sin Vitae*, 2014, 44(4): 422–428 (in Chinese).
金玉兰, 邢刚, 田鹏飞, 等. 猪圆环病毒2型 Cap 基因单核苷酸缺失突变体的构建与生物学特性. *中国科学: 生命科学*, 2014, 44(4): 422–428.
- [34] Mahé D, Blanchard P, Truong C, et al. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt 7): 1815–1824.
- [35] Lekcharoensuk P, Morozov I, Paul PS, et al. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J Virol*, 2004, 78(15): 8135–8145.
- [36] Guo L, Lu Y, Huang L, et al. Identification of a new antigen epitope in the nuclear localization signal region of porcine circovirus type 2 capsid protein. *Intervirology*, 2011, 54(3): 156–163.
- [37] Misinzo G, Delputte PL, Meerts P, et al. Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. *J Virol*, 2006, 80(7): 3487–3494.
- [38] Ge M, Yan A, Luo W, et al. Epitope screening of the PCV2 Cap protein by use of a random peptide-displayed library and polyclonal antibody. *Virus Res*, 2013, 177(1): 103–107.
- [39] Liu J, Bai J, Zhang LL, et al. Hsp70 positively

- regulates porcine circovirus type 2 replication *in vitro*. *Virology*, 2013, 447(1/2): 52–62.
- [40] Zhang X, Zhou JY, Wu YP, et al. Differential proteome analysis of host cells infected with porcine circovirus type 2. *J Proteome Res*, 2009, 8(11): 5111–5119.
- [41] Cao JJ, Lin C, Wang HJ, et al. Circovirus transport proceeds via direct interaction of the cytoplasmic dynein IC1 subunit with the viral capsid protein. *J Virol*, 2015, 89(5): 2777–2791.
- [42] Timmusk S, Fossum C, Berg M. Porcine circovirus type 2 replicase binds the capsid protein and an intermediate filament-like protein. *J Gen Virol*, 2006, 87(11): 3215–3223.
- [43] Shen HG, Zhou JY, Zhang X, et al. Interference of porcine circovirus type 2 ORF2 immunogenicity by ORF1 and ORF3 mixed DNA immunizations in mice. *Virology*, 2009, 393(1): 104–111.
- [44] Liu J, Chen I, Kwang J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J Virol*, 2005, 79(13): 8262–8274.
- [45] Karuppanan AK, Liu S, Jia Q, et al. Porcine circovirus type 2 ORF3 protein competes with P53 in binding to Pirh2 and mediates the deregulation of P53 homeostasis. *Virology*, 2010, 398(1): 1–11.
- [46] Liu J, Zhu Y, Chen I, et al. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 interacts with porcine ubiquitin E3 ligase Pirh2 and facilitates p53 expression in viral infection. *J Virol*, 2007, 81(17): 9560–9567.
- [47] Karuppanan AK, Jong MH, Lee SH, et al. Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. *Virology*, 2009, 383(2): 338–347.
- [48] Liu J, Chen I, Du QY, et al. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis *in vivo*. *J Virol*, 2006, 80(10): 5065–5073.
- [49] Karuppanan AK, Kwang J. ORF3 of porcine circovirus 2 enhances the *in vitro* and *in vivo* spread of the virus. *Virology*, 2011, 410(1): 248–256.
- [50] He JL, Dai D, Zhou N, et al. Analysis of putative ORF3 gene within porcine circovirus type 2. *Hybridoma*, 2012, 31(3): 180–187.
- [51] Choi CY, Rho SB, Kim HS, et al. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 (PCV2) promotes secretion of IL-6 and IL-8 in porcine epithelial cells by facilitating proteasomal degradation of regulator of G protein signaling 16 (RGS16) through physical interaction. *J Gen Virol*, 2015, 96(Pt 5): 1098–1108.
- [52] He JL, Cao JJ, Zhou N, et al. Identification and functional analysis of the novel ORF4 protein encoded by porcine circovirus type 2. *J Virol*, 2013, 87(3): 1420–1429.
- [53] Gao ZZ, Dong QF, Jiang YH, et al. Identification and characterization of two novel transcription units of porcine circovirus 2. *Virus Genes*, 2013, 47(2): 268–275.
- [54] Gao ZZ, Dong QF, Jiang YH, et al. ORF4-protein deficient PCV2 mutants enhance virus-induced apoptosis and show differential expression of mRNAs *in vitro*. *Virus Res*, 2014, 183: 56–62.
- [55] Shibahara T, Sato K, Ishikawa Y, et al. Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. *J Vet Med Sci*, 2000, 62(11): 1125–1131.
- [56] Quintana J, Segalés J, Rosell C, et al. Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Rec*, 2001, 149(12): 357–361.
- [57] Nielsen J, Vincent IE, Bøtner A, et al. Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol*, 2003, 92(3/4): 97–111.
- [58] Darwich L, Segalés J, Domingo M, et al. Changes in CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺ CD8⁺, and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9(2): 236–242.
- [59] Steiner E, Balmelli C, Herrmann B, et al. Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. *Virology*, 2008, 378(2): 311–322.
- [60] Chang HW, Jeng CR, Lin TL, et al. Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by *in vitro* inoculation. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006,

- 110(3/4): 207–219.
- [61] Darwich L, Balasch M, Plana-Durán J, et al. Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *J Gen Virol*, 2003, 84(12): 3453–3457.
- [62] Brooks DG, Trifilo MJ, Edelmann KH, et al. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence *in vivo*. *Nat Med*, 2006, 12(11): 1301–1309.
- [63] Doster AR, Subramaniam S, Yhee JY, et al. Distribution and characterization of IL-10-secreting cells in lymphoid tissues of PCV2-infected pigs. *J Vet Sci*, 2010, 11(3): 177–183.
- [64] Crisci E, Balester M, Domínguez J, et al. Increased numbers of myeloid and lymphoid IL-10 producing cells in spleen of pigs with naturally occurring postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Immunol Immunopathol*, 2010, 136(3/4): 305–310.
- [65] Darwich L, Pié S, Rovira A, et al. Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Gen Virol*, 2003, 84(8): 2117–2125.
- [66] Pogranichnyy RM, Yoon KJ, Harms PA, et al. Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunol*, 2000, 13(2): 143–153.
- [67] Meerts P, Van Gucht S, Cox E, et al. Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. *Viral Immunol*, 2005, 18(2): 333–341.
- [68] Meerts P, Misinzo G, Lefebvre D, et al. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Vet Res*, 2006, 2: 6.
- [69] Laroche R, Antaya M, Morin M, et al. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J Virol Methods*, 1999, 80(1): 69–75.
- [70] Liu Q, Wang L, Willson P, et al. Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(9): 3474–3477.
- [71] McIntosh KA, Tumber A, Harding JC, et al. Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in serum, buffy coat, feces, and multiple tissues. *Vet Microbiol*, 2009, 133(1/2): 23–33.
- [72] Qiu X, Li T, Zhang G, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method to rapidly detect porcine circovirus genotypes 2a and 2b. *Virology*, 2012, 9: 318.
- [73] Pérez-Martín E, Rovira A, Calsamiglia M, et al. A new method to identify cell types that support porcine circovirus type 2 replication in formalin-fixed, paraffin-embedded swine tissues. *J Virol Methods*, 2007, 146(1/2): 86–95.
- [74] Yao X, Yang HC, Guo X, et al. Development and Application of an *in situ* hybridization for detection of porcine type 2. *Acta Vet Zootechn Sin*, 2007, 38(2): 169–174 (in Chinese).
姚鑫, 杨汉春, 郭鑫, 等. 猪圆环病毒 2 型原位杂交检测技术的建立与应用. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(2): 169–174.
- [75] Jiang YH, Shang HW, Chen WJ, et al. Oligonucleotide microarray constructed for detecting and identifying subtype of PCV2. *Chin J Vet Sci*, 2008, 28(10): 1174–1180 (in Chinese).
姜永厚, 商晗武, 陈伟杰, 等. 猪圆环病毒检测与分型寡核苷酸芯片的建立及应用. *中国兽医学报*, 2008, 28(10): 1174–1180.
- [76] Xiao C, Cao SJ, Wen XT, et al. Development of PRRS-CSF-PCV2 diagnostic DNA microarray. *Acta Vet Zootechn Sin*, 2006, 37(8): 799–803 (in Chinese).
肖驰, 曹三杰, 文心田, 等. PRRS-CSF-PCV2 诊断 DNA 芯片构建研究. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(8): 799–803.
- [77] Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, et al. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest*, 1998, 10(1): 3–10.
- [78] Ellis J, Hassard L, Clark E, et al. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J*, 1998, 39(1): 44–51.
- [79] Liu CM, Zhang CF, Wei YW, et al. Development and application of an immunoperoxidase monolayer assay based kit for detection of porcine circovirus type 2. *Chin J Prev Vet Med*, 2007, 29(8): 621–624, 633 (in Chinese).

- 刘长明, 张超范, 危艳武, 等. 猪圆环病毒 2 型免疫过氧化物酶单层细胞试验抗体检测试剂盒的研制及应用. 中国预防兽医学报, 2007, 29(8): 621–624, 633.
- [80] Walker IW, Konoby CA, Jewhurst VA, et al. Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest*, 2000, 12(5): 400–405.
- [81] Nawagitgul P, Harms PA, Morozov I, et al. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9(1): 33–40.
- [82] Shang SB, Li YF, Guo JQ, et al. Development and validation of a recombinant capsid protein-based ELISA for detection of antibody to porcine circovirus type 2. *Res Vet Sci*, 2008, 84(1): 150–157.
- [83] Hu JD, Wang TT, Wang S, et al. Development of a surface plasmon resonance biosensing approach for the rapid detection of porcine circovirus type 2 in sample solutions. *PLoS ONE*, 2014, 9(10): e111292.
- [84] Yang SL, Shang YJ, Yin SH, et al. A phage-displayed single domain antibody fused to alkaline phosphatase for detection of porcine circovirus type 2. *J Virol Methods*, 2015, 213: 84–92.
- [85] Wu PC, Lin WL, Wu CM, et al. Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) capsid particle assembly and its application to virus-like particle vaccine development. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 95(6): 1501–1507.
- [86] Yin SH, Sun SQ, Yang SL, et al. Self-assembly of virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein expressed from *Escherichia coli*. *Viol J*, 2010, 7(1): 166.
- [87] Ye Y, Cheng XL, Zhang J, et al. Induction of robust immunity response in mice by dual-expression-system-based recombinant baculovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2. *Viol J*, 2013, 10(1): 316.
- [88] Fan HY, Pan YF, Fang LR, et al. Construction and immunogenicity of recombinant pseudotype baculovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus type 2 in mice. *J Virol Methods*, 2008, 50(1/2): 21–26.
- [89] Wang YP, Liu D, Guo LJ, et al. Enhanced protective immune response to PCV2 subunit vaccine by co-administration of recombinant porcine IFN- γ in mice. *Vaccine*, 2013, 31(5): 833–838.
- [90] Chao AJ, Fu PF, Guo XQ, et al. Immune efficacy in mice by recombinant pseudorabies virus PGO expressing ORF2 gene of porcine circovirus type 2. *Acta Microbiol Sin*, 2014, 54(2): 211–217 (in Chinese).
- 钞安军, 付朋飞, 郭晓庆, 等. 表达猪圆环病毒 II 型 ORF2 基因的重组猪伪狂犬病毒的免疫原性. *微生物学报*, 2014, 54(2): 211–217.
- [91] Ju CM, Fan HY, Tan YD, et al. Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1-ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol*, 2005, 109(3/4): 179–190.
- [92] Song YF, Jin ML, Zhang SL, et al. Generation and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing cap protein of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol*, 2007, 119(2/4): 97–104.
- [93] Ju CM, Chen HC, Fan HY, et al. Recombination and expression of ORF1 and ORF2 gene of porcine circovirus type 2 and gene of pseudorabies virus. *Chin J Biotech*, 2005, 21(3): 370–374 (in Chinese).
- 琚春梅, 陈焕春, 樊惠英, 等. 猪 2 型圆环病毒 ORF1 与 ORF2 基因和伪狂犬病毒基因的重组与表达的研究. *生物工程学报*, 2005, 21(3): 370–374.
- [94] Chi JN, Wu CY, Chien MS, et al. The preparation of porcine circovirus type 2 (PCV2) virus-like particles using a recombinant pseudorabies virus and its application to vaccine development. *J Biotechnol*, 2014, 181: 12–19.

(本文责编 郝丽芳)