

猪圆环病毒 2 型/3 型双重荧光定量 PCR 检测方法

王林青^{1,2}, 樊霖², 赵宇², 田润博², 崔建涛², 韩昊莹², 赵丽⁴, 陈红英^{2,3*}

(1. 郑州师范学院分子生物学郑州市重点实验室, 郑州 450044; 2. 河南农业大学动物医学院, 郑州 450002;

3. 郑州市猪重大疫病防控重点实验室, 郑州 450002; 4. 河南牧业经济学院动物医药学院, 郑州 450008)

摘要: 为了能够同时快速地检测和鉴别猪圆环病毒 2 型和 3 型 (PCV2 和 PCV3), 参考 GenBank 中已发表的 PCV2 和 PCV3 基因组序列, 针对其保守区分别设计了 2 对特异性引物, 经优化反应体系和条件, 建立了能快速检测和鉴别 PCV2/PCV3 双重荧光定量 PCR 方法。结果表明, PCV2 和 PCV3 的 R^2 分别为 0.999、0.999 3, E 值分别为 3.573 1、3.373 4。该方法能同时特异地检测 PCV2 和 PCV3, 而对其他 5 种猪病原均未检测到荧光信号; PCV2 和 PCV3 的最低检测值分别为 $41.1 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $27.0 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 批内和批间变异系数均小于 1%。临床样本检测结果显示, PCV2 和 PCV3 的阳性率分别为 62.12%(41/66)、48.48%(32/66), 二者混合感染的阳性率为 46.96%(31/66)。表明该方法具有敏感、特异和可靠等特点, 该方法为 PCV2 和 PCV3 单独或者混合感染的早期诊断、定量检测及其流行病学调查提供了可行的技术支持。

关键词: 猪圆环病毒; PCV2 和 PCV3; 双重荧光定量 PCR; 检测

中图分类号: S855.3; S828.7

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2021)04-0595-06

Duplex real-time fluorescence quantitative PCR method for detection of porcine circovirus Types 2 and 3

WANG Linqing^{1,2}, FAN Lin², ZHAO Yu², TIAN Runbo², CUI Jiantao², HAN Haoying², ZHAO Li⁴, CHEN Hongying^{2,3}

(1. Zhengzhou Key Laboratory of Molecular Biology, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou 450044;

2. College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002;

3. Zhengzhou Key Laboratory of Prevention and Control of Major Epidemics of Pigs, Zhengzhou 450002;

4. College of Veterinary Medicine, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450008)

Abstract: In order to quickly detect and differentiate porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine circovirus type 3 (PCV3), two pairs of specific primers were designed based on the conserved of PCV2 and PCV3 published in GenBank, a duplex real-time fluorescence quantitative PCR for simultaneous detection and differentiation of PCV2/PCV3 was established by optimizing the reaction system and conditions. The results showed that R^2 of PCV2 and PCV3 were 0.999 and 0.999 3, and the E values were 3.573 1 and 3.373 4, respectively. The assay could detect specifically PCV2 and PCV3, whereas no fluorescence was detected for other five porcine pathogens. The detection limits of PCV2 and PCV3 were $41.1 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ and $27 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, respectively. The intra- and inter-assay coefficients of the method were all less than 1%. The detection results for 66 clinical samples showed that the positive rates of PCV2 and PCV3 were 62.12% (41/66) and 48.48% (32/66), respectively, and their co-infection rate was 46.96% (31/66). The results reveal that the assay was sensitive, specific, reliable, and feasible for clinical samples, providing strong technical support for the early diagnosis and quantitative detection of PCV2 and PCV3.

Key words: porcine circovirus; PCV2 and PCV3; duplex fluorescent quantitative PCR; detection

猪圆环病毒 (*Porcine circovirus*, PCV) 是一种 圆环病毒科圆环病毒属, 为目前已知的最小的动物呈球形、无囊膜且单股闭合环状 DNA 病毒, 属于 病毒^[1]。在全球范围的猪群中, 迄今发现 PCV 有 3

收稿日期: 2020-09-01

基金项目: 河南省高校科技创新团队支持计划 (19IRTSTHN007), 河南省科技开放合作项目 (182106000048), 河南省高等学校青年骨干教师培养计划 (2018GGJS161) 和河南省科技攻关项目 (192102110184) 共同资助。

作者简介: 王林青, 博士, 副教授。E-mail: wanglinqing@zznu.edu.cn

* 通信作者: 陈红英, 博士, 教授。E-mail: chhy927@163.com

个血清型：猪圆环病毒 1 型、2 型和 3 型 (PCV1、PCV2 和 PCV3)。PCV1 于 1974 年首次被发现存在于猪肾细胞 PK-15 中，但不产生细胞病变^[2]，且对猪无致病性^[3]。而 PCV2 于 1997 年首次被报道，能够引起猪发生包括仔猪断奶后多系统衰竭综合征 (PMWS)、猪皮炎与肾病综合征 (PDNS) 和繁殖障碍等猪圆环病毒相关疾病 (PCVAD)^[4-6]，给世界养猪业造成了巨大的经济损失。

2016 年，美国 Palinski 等^[7]和 Phan 等^[8]分别从患有 PDNS、繁殖障碍的母猪和关节肿胀和消瘦等疾病的母猪或仔猪检测到 PCV3。PCV3 基因组为 2 000 个碱基，与 PCV2 相似，含有 2 个主要的开放阅读框 (*ORF1* 和 *ORF2*)，分别编码 rep 和 cap 蛋白。PCV2 和 PCV3 临床表现相似且难以区分，并且常以单独或混合感染的方式感染猪^[9]，使我国乃至世界养猪业面临巨大的挑战。因此，建立一种能同时检测和鉴别 PCV2 和 PCV3 的方法，为提供有价值的流行病学信息以及启动适当的预防和控制策略至关重要。

荧光定量 PCR 作为一种新技术，因其与普通 PCR 相比，具有更加快速、敏感、特异性强和自动化程度高等特点而不断发展，并广泛地应用于生命科学研究的各个领域。因此，本试验根据 GenBank 中已发表的 PCV2 和 PCV3 基因组核苷酸序列，分别设计了 2 对特异性引物，在同一个 PCR 反应管中进行两种病原的荧光定量检测，旨在为同时检测和鉴别两种病原提供一种新方法。

1 材料与方法

1.1 病毒、菌株及临床样品

PCV3 阳性病料由郑州市猪重大疫病防控重点实验室对疑似 PCV3 感染的病料样品进行 PCR 扩增

和测序而获得，作为 PCV3 的阳性对照。pMD18-PCV2 阳性全基因组质粒、猪伪狂犬病毒 (PRV)、猪蓝耳病病毒 (PRRSV)、猪瘟病毒 (CSFV)、猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 以及猪细小病毒 (PPV) 均由郑州市猪重大疫病防控重点实验室保存。DH5 α 感受态细胞购自北京康为世纪有限公司。

66 份临床样品 (包括血清、淋巴结和脾脏等) 为 2017—2019 年，采自河南省郑州、原阳和许昌等 7 个地市猪场。临床样品中一部分来源于河南各地健康猪群组织，另一部分为患有腹泻、流产死胎及圆环病毒感染相关疾病的病死猪组织。取适量组织进行研磨，于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次， $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 6 min。取上清液， $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 主要试剂

pMD18-T 载体购自宝生物工程 (大连) 有限公司； $2\times\text{Taq MasterMix}$ (中国北京) 购自北京康为世纪有限公司；DNA 凝胶回收试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 和 RNA 小量抽提试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司；ChamQ TM Universal SYBR qPCR Master Mix、Trizol 和反转录试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.3 引物的设计与合成

利用 DNASTAR (version5.0) 软件 MegAlign 程序对 GenBank 中已发表的 PCV2 全基因组序列 (KT719404.1、DI434116.1 和 MH169117.1) 进行同源性分析，应用 Primer6.0 引物设计软件，基于 PCV2 基因组上 393~665 bp 高度保守区域，设计 1 对特异性引物 PCV2-F/R (表 1)，针对 PCV3 基因组上 168~305 bp 保守区域并参考 Xu 等设计的引物^[10]，两对引物均由奥科鼎盛 (武汉) 生物科技有限公司合成。

表 1 PCV2 和 PCV3 检测引物

Table 1 Primers for the detection of PCV2 and PCV3

引物名称	序列 (5'→3')	扩增长度/bp	引物位置/nt
PCV2-F	GTTATGGTATGGCGGGAGG	251	393~665 bp
PCV2-R	GCGGTGGACATGATGAGA		
PCV3-F	GCTACGTGTCCTGAAGATAAG	138	168~305 bp
PCV3-R	GCCTCCACACTCCACAATAG		

1.4 标准品模板的制备

根据 SanPrep 柱式 DNA 提取试剂盒说明书，提取 PCV3、PRV 和 PPV 的 DNA，根据 Trizol 说明书提取 PEDV、PRRSV 和 CSFV 总 RNA，按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA，并于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备

用。利用 PCV2 和 PCV3 特异引物 PCV2-F/R 和 PCV3-F/R，以 pMD18-PCV2 全基因组质粒以及提取的 PCV3 DNA 为模板，分别进行 PCR 扩增。反应条件为： $95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 5\ \text{min}$ ； $95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 20\ \text{s}$ ， $60\text{ }^{\circ}\text{C}\ 20\ \text{s}$ ， $72\text{ }^{\circ}\text{C}\ 30\ \text{s}$ ，共 35 个循环；最终 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

反应结束后, 扩增产物经 3.0%琼脂糖凝胶电泳检测。将胶回收试剂盒回收纯化的 PCR 产物, 克隆至 pMD18-T 载体中, 构建重组质粒 (pMD18-PCV2 和 pMD18-PCV3) 并测序。测序正确的质粒 pMD18-PCV2 和 pMD18-PCV3 作为 PCV2 和 PCV3 的标准品, 经紫外分光光度计检测其浓度, 并根据公式: 质粒浓度 ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $\times 6.022 \times 10^{23}$ /质粒长度 $\times 660 \times 10^9$, 换算为拷贝数/ μL 。

1.5 双重荧光定量 PCR 反应条件优化及标准曲线的建立

为了寻求最合适的双重荧光定量 PCR 反应体系和反应条件, 对退火温度 ($55 \sim 65^\circ\text{C}$)、引物量以及延伸时间进行摸索。将标准品分别用去离子水作 10 倍系列稀释, 选取 6 个稀释度 ($10^{-3} \sim 10^{-8}$) 为模板, 每个梯度标准品设立 3 个重复, 用 CFX96™ 型荧光定量 PCR 仪进行荧光定量扩增。用荧光定量 PCR 仪的分析软件对荧光定量扩增结果进行分析, 并建立标准曲线。

1.6 特异性和敏感性试验

采用优化的双重荧光定量 PCR 反应体系和反应条件, 以 PCV2、PCV3、PPV、PRV、CSFV、PEDV 和 PRRSV 的核酸为模板, 同时以去离子水为阴性对照, 进行荧光定量 PCR 检测。选取标准品的 8 个稀释度 ($10^{-10} \sim 10^{-3}$) 为模板, 同时以去离子水为阴性对照, 进行荧光定量 PCR (每个稀释度作 3 个平行试验), 确定 PCV2 和 PCV3 的最低检测线, 同时进行常规 PCR 检测, 比较其敏感性。

1.7 重复性试验

将 1.5 中所用样品保存至 4°C , 每隔 2 周, 同等条件下取 3 个稀释度 (如 10^{-3} 、 10^{-5} 和 10^{-8}) 标准品为模板进行批内试验, 每个稀释度做 3 个平行试验; 另对不同批次样品按前述方法稀释后定期进行荧光定量 PCR 检测, 重复进行 3 次检测, 分别计算其变异系数。

1.8 临床样品检测

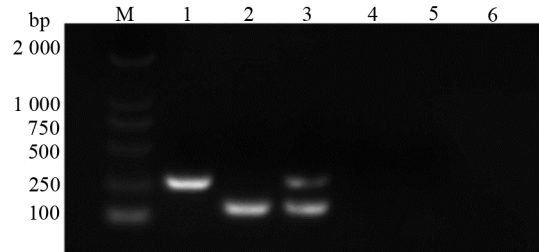
对 2017—2019 年河南省郑州、原阳和许昌等地猪场的 66 份临床样品采用已建立的 PCV2 和 PCV3 双重 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法和常规 PCR 方法进行检测, 比较这两种检测方法的检出率, 评价其临床实用性。

2 结果与分析

2.1 标准品模板的制备结果

利用 PCV2 和 PCV3 的特异引物, 以 pMD18-PCV2 全基因组质粒和 PCV3 的 DNA 为模板进行扩

增和电泳, 分别扩增出约 251 bp 和 138 bp 的特异性条带 (图 1), 与预期扩增片段长度相一致。将回收纯化的 PCR 产物克隆至载体 pMD18-T 中, 构建重组质粒 (pMD18-PCV2 和 pMD18-PCV3), 作为标准品模板。经测序鉴定, 结果显示所克隆的 PCV2 和 PCV3 基因序列分别为 251 bp 和 138 bp, 分别与参考序列 KT719404 和 KX898030 相应的区域同源性为 100%, 表明 PCR 扩增的产物是特异的。



M.DNA Marker 2000; 1.PCV2; 2.PCV3; 3.PCV2/3 双重 PCR 产物; 4-6.阴性对照。

图 1 PCV2/3 单一及双重 PCR 扩增结果

Figure 1 PCV2/3 single and double PCR amplification results

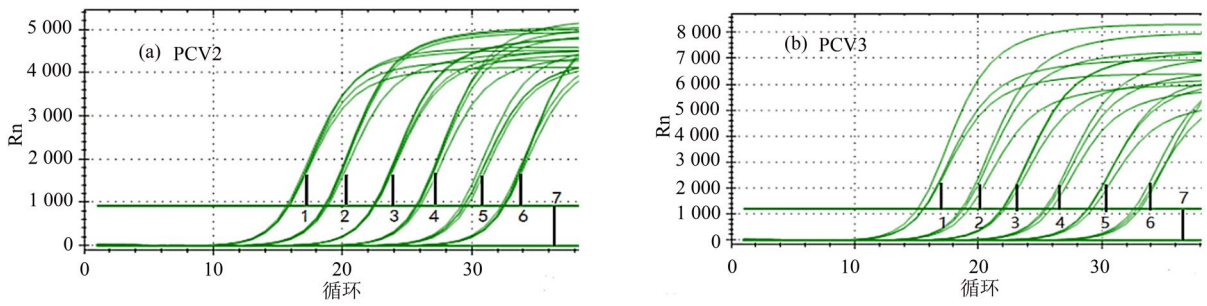
2.2 双重荧光定量 PCR 的优化与标准曲线的绘制结果

经优化双重 SYBR Green I 荧光 PCR 的反应条件和反应体系, 确定 PCV2 和 PCV3 双重 SYBR Green I 实时荧光 PCR 反应体系为: SYBR Green I Premix Ex Taq 酶 $10 \mu\text{L}$, 上、下游引物各 $0.5 \mu\text{L}$, 标准阳性质粒 $1 \mu\text{L}$, 补充 ddH₂O 至 $20 \mu\text{L}$; 扩增条件为: $95^\circ\text{C} 5 \text{ min}$; $95^\circ\text{C} 15 \text{ s}$, $60^\circ\text{C} 15 \text{ s}$, $72^\circ\text{C} 20 \text{ s}$, 共 35 个循环; 最终 72°C 延伸 10 min 。

按照双重荧光定量 PCR 反应体系和扩增条件, 分别以 PCV2 和 PCV3 标准品的 6 个稀释度 ($10^{-8} \sim 10^{-3}$) 作模板进行荧光定量 PCR 扩增, PCV2 获得扩增曲线, 见图 2 (a), PCV3 获得扩增曲线, 见图 2 (b)。根据 PCV2, PCV3 扩增曲线, 以标准品拷贝数对数值为横坐标, Ct 为纵坐标分别绘制 PCV2 和 PCV3 标准曲线 (图 3), PCV2 直线方程为 $y = -3.5731x + 42.456$, $R^2 = 0.999$, 截距为 42.456; PCV3 直线方程为 $y = -3.3734x + 40.513$, $R^2 = 0.9993$, 截距为 40.513。二者相关系数均为 0.999, 具有良好的线性相关。

2.3 特异性试验和敏感性试验结果

采用建立的 PCV2, PCV3 双重 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR, 对 PRV、PRRSV、PPV、CSFV 和 PEDV 核酸进行检测。结果显示, 均无特异性吸收峰值和扩增曲线, 而 PCV2 和 PCV3 有扩增曲线 (图 4), 表明该方法具有良好特异性。



1-6.6个稀释度扩增结果; 7.阴性对照。

图2 PCV2/PCV3 荧光定量 PCR 扩增结果

Figure 2 PCV2/PCV3 real-time PCR amplification results

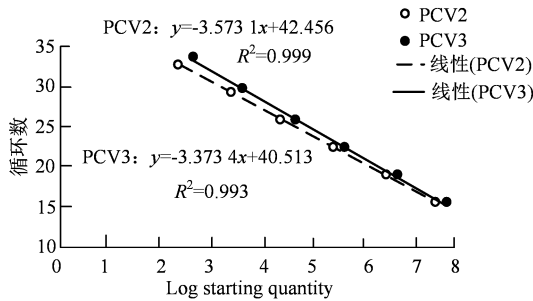
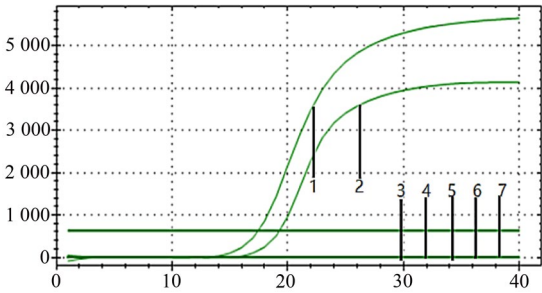


图3 双重 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测 PCV2/3 的标准曲线

Figure 3 Standard curve of PCV2/3 detection by dual SYBR Green I real-time PCR



1.PCV2 标准品模板; 2.PCV3 标准品模板; 3-7.PRRSV、PRV、CSFV、PPV、PEDV。

图4 荧光定量 PCR 特异性试验结果

Figure 4 Fluorescence quantitative PCR specific test results

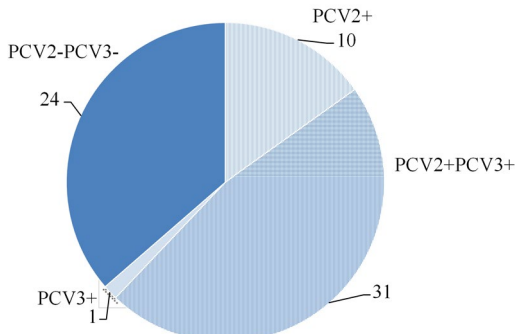


图5 临床样本双重 PCR 检测结果

Figure 5 PCR results of clinical samples

选取 8 个稀释度 ($10^{-10} \sim 10^{-3}$) 的标准品作为模板, 进行双重 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR。

结果显示, PCV2 和 PCV3 的检测下限分别为 $41.1 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 和 $27 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 而常规 PCR 检测时, PCV2 和 PCV3 的检测下限分别为 $4.11 \times 10^2 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 和 $2.7 \times 10^2 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 说明所建立的荧光定量 PCR 检测方法灵敏度优于普通 PCR 检测方法。

2.4 重复性检测

选取 3 个稀释度 (10^{-3} 、 10^{-5} 和 10^{-8}) 的标准品作为模板, 进行荧光定量 PCR 检测。检测结果显示, 不同浓度标准品模板的批内变异系数为 $0.320\% \sim 0.727\%$; 而批间的变异系数为 $0.725\% \sim 0.886\%$, 且批内和批间的变异系数均小于 1% 。表明本研究建立的双重荧光定量 PCR 检测方法具有重复性高且稳定性良好的特性。

2.5 临床样品 PCV2 和 PCV3 的检测

采用建立的 PCV2/PCV3 双重荧光定量 PCR, 对 2017—2019 年采集的 66 份临床样品进行检测。结果显示, PCV2 阳性 41 份, 阳性率 $62.12\% (41/66)$; PCV3 阳性 32 份, 阳性率 $48.48\% (32/66)$; 混合感染 31 份, 阳性率 $46.96\% (31/66)$ 。普通 PCR 方法检测为阳性的病料, 荧光定量 PCR 检测均为阳性, 且荧光定量 PCR 检出的阳性率高于普通 PCR 阳性率, 表明本研究建立的双重荧光定量 PCR 检测方法更为灵敏。

3 讨论与结论

自 2016 年 Palinski 等^[7]报道美国猪场中检测到 PCV3 以来, 中国、波兰和意大利等国家也相继报道 PCV3 的存在^[9-12], 这些研究结果证明, PCV3 已在世界范围内广泛传播, 对养猪业造成巨大的威胁。由于 PCV3 与 PCV2 临床表现相似, 且对 PCV2 和 PCV3 混合感染的检测与鉴定仍存在困难^[9], 因此, 建立一种敏感且特异地同时检测和区分 PCV2 和 PCV3 的方法十分必要。目前, 季程远等^[13]、贺会利等^[14]以及徐朋丽等^[15]分别建立了能够同时检测 PCV2 和 PCV3 的双重 PCR 检测方法, 该方法具有

快速、准确和方便等方面的优势,但普通的 PCR 方法在感染早期病毒含量较少时,往往不能做出准确的检测,而荧光定量 PCR 具备普通 PCR 的特点,并且能够更加灵敏地对健康的或有疑似症状的猪进行早期的诊断,以便提前采取预防或治疗等有效措施,并且方法省去了电泳环节,避免了核酸染料对环境的污染以及操作人健康的危害,因此,本研究针对 PCV2 基因组上 393~665 bp 保守区域和 PCV3 基因组上 168~305 bp 保守区域,建立了 PCV2/PCV3 双重 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法。

结果表明,该方法能特异地检测 PCV2 和 PCV3,对 PRV、PRRSV、PPV、CSFV 和 PEDV 等 5 种其他猪病原的检测结果均为阴性,说明该方法具有良好的特异性;PCV2 和 PCV3 检测下限分别为 $41.1 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 和 $27 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,其中 PCV2 的检测下线明显低于季程远等^[13]和徐朋丽等^[15]所建立的常规 PCR 检测方法,而 PCV3 的检测下线明显低于季程远等^[13]所建立的常规 PCR 检测方法,并与徐朋丽等^[15]所建立的常规 PCR 检测方法,李卓昕等^[16]所建立的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法以及张志等^[17]所建立的 Taqman 实时荧光定量 PCR 检测方法相当,表明该方法具有良好的敏感性;运用所建立的 PCV2/PCV3 双重 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法对 2017—2019 年采自河南地区的 66 份临床样品进行检测,评价该方法的临床实用性,结果显示,PCV2 阳性率为 62.12% (41/66),PCV3 的阳性率为 48.48% (32/66),PCV2 和 PCV3 的混合感染率为 46.96% (31/66),并且荧光定量 PCR 方法的阳性率高于普通 PCR 方法的阳性率,表明荧光定量 PCR 更适合少量病毒的检测且 PCV2 和 PCV3 的混合感染情况在河南省已经普遍存在。

本研究成功地建立了一种能同时检测和鉴别 PCV2 和 PCV3 的双重 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法。该方法对临床样品的检测具有敏感、特异和可靠等特点,适合于 PCV2 和 PCV3 单独或混合感染的早期诊断、定量检测及流行病学调查,以便采取及时地防控和治疗,为我国控制 PCV2 和 PCV3 感染提供有效的技术支持。

参考文献:

- [1] TISCHER I, GELDERBLUM H, VETTERMANN W, et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA [J]. *Nature*, 1982, 295(5844): 64-66.
- [2] TISCHER I, RASCH R, TOCHTERMANN G. Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney celllines [J]. *Zentralbl Bakteriolog Orig A*, 1974, 226(2): 153-167.
- [3] RAMAMOORTHY S, MENG X J. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox [J]. *Anim Health Res Rev*, 2009, 10(1):1-20.
- [4] BAEKBO P, KRISTENSEN C S, LARSEN L E. Porcine circovirus diseases:A review of PMWS[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2012, 59(S1): 60-67.
- [5] GE X, WANG F, GUO X, et al. Porcine circovirus type 2 and its associated diseases in China [J]. *Virus Res*, 2012, 164(1/2): 100-106.
- [6] CHAE C. A review of porcine Circovirus 2-associated syndromes and diseases[J]. *Vet J*, 2005, 169(3): 326-336.
- [7] PALINSKI R, P PIÑEYRO, SHANG P, et al. A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure[J]. *J Virol*, 2016, 91(1): 1879-1891.
- [8] PHAN T G, GIANNITTI F, ROSSOW S, et al. Erratum to: detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation[J]. *Virol J*, 2017, 14(1): 87.
- [9] KU X, CHEN F, LI P, et al. Identification and genetic characterization of porcine Circovirus type 3 in China[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64(3): 703-708.
- [10] XU P L, ZHANG Y, ZHAO Y, et al. Detection and phylogenetic analysis of porcine Circovirus type 3 in central China[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65(5): 1163-1169.
- [11] STADEJEK T, WOŹNIAK A, MILEK D, et al. First detection of porcine Circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64(5): 1350-1353.
- [12] FACCINI S, BARBIERI I, GILIOI A, et al. Detection and genetic characterization of Porcine Circovirus type 3 in Italy[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64(6): 1661-1664.
- [13] 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.
- [14] 贺会利, 李军, 潘艳, 等. 猪圆环病毒 2 型和 3 型双重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *畜牧与兽医*, 2018, 50(11): 74-77.
- [15] 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.
- [16] 李卓昕, 温树波, 孙文超, 等. 猪圆环病毒 3 型 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法的建立及应用[J]. *中国病原生物学杂志*, 2018, 13(9): 934-938.
- [17] 张志, 郝占武, 张美晶, 等. 猪圆环病毒 3 型实时荧光定量 PCR 方法的建立和应用[J]. *中国兽医科学*, 2018, 48(6): 686-691.