

# 猪伪狂犬病病毒和猪圆环病毒 3 型双重 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法的建立

金 钺<sup>1</sup>, 陈曦艏<sup>1</sup>, 李洪炫<sup>1</sup>, 赵 宇<sup>1</sup>, 李新生<sup>1</sup>, 陈红英<sup>1</sup>, 王林青<sup>1,2\*</sup>

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

**摘 要:** 为了同时检测猪伪狂犬病病毒 (PRV) 野毒和猪圆环病毒 3 型 (PCV3), 基于 PRV *gE* 基因和 PCV3 *Rep* 基因保守序列各合成了 1 对引物, 在优化反应体系和扩增条件的基础上, 建立了检测 PRV 和 PCV3 的双重 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法。结果显示: PRV 和 PCV3 的  $T_m$  值分别为 87 和 81.5 °C, 能特异地检测 PRV 和 PCV3, 而对其他 5 种猪病原均未检测到荧光信号; PRV 和 PCV3 的最低检测值分别为 37.0 和 33.8 copies· $\mu\text{L}^{-1}$ ; 批内批间变异系数均小于 2%; 对 2017—2019 年期间来自河南地区的 78 份猪临床样品进行检测, PRV 和 PCV3 的阳性率分别为 19.23% (15/78) 和 41.03% (32/78), 二者混合感染的阳性率为 8.97% (7/78)。表明该方法具有高度的敏感性、特异性和稳定性, 可用于监测 PRV 野毒和 PCV3 及其流行病学调查。

**关键词:** 猪伪狂犬病病毒; 猪圆环病毒 3 型; 荧光定量 PCR

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2022)04-0590-05

## Double SYBR Green I fluorescence quantitative PCR for detecting porcine pseudorabies virus and porcine circovirus type 3

JIN Yue<sup>1</sup>, CHEN Ximeng<sup>1</sup>, LI Hongxuan<sup>1</sup>, ZHAO Yu<sup>1</sup>, LI Xinsheng<sup>1</sup>, CHEN Hongying<sup>1</sup>, WANG Linqing<sup>1,2</sup>

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002;

2. Zhengzhou Key Laboratory of Molecular Biology, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou 450044)

**Abstract:** In order to detect porcine pseudorabies virus (PRV) and porcine circovirus type 3 (PCV3) simultaneously, two pairs of specific primers were synthesized based on the conservative region of the *gE* gene of PRV and *Rep* gene of PCV3. A dual SYBR Green I fluorescent quantitative PCR method for the detection of PRV and PCV3 was developed based on the optimization of reaction system and amplification conditions. The results showed that: the  $T_m$  values of PRV and PCV3 were 87 and 81.5 °C, respectively, which could specifically detect PRV and PCV3, while no fluorescent signals were detected for the other five porcine pathogens; The lowest detection values of PRV and PCV3 were 37.0 and 33.8 copies· $\mu\text{L}^{-1}$ , respectively. The coefficients of variation in intra-batch and inter-batch assays were all less than 2.0%. The SYBR Green I -based duplex real-time RT-PCR assay was then used to detect 78 clinical samples of porcine collected from 2017 to 2019 in Henan Province, and the positive rates of PRV and PCV3 were 19.23% (15/78) and 41.03% (32/78), respectively, while the positive rate of co-infection for PCV3 and PRV was 8.97% (7/78). It showed that the method has high sensitivity, specificity and stability for monitoring PRV, PCV3 and their epidemiological investigation.

**Key words:** porcine pseudorabies virus; porcine circovirus type 3; real-time fluorescence quantitative PCR

伪狂犬病 (Pseudorabies, PR) 是由伪狂犬病病毒 (Pseudorabies virus, PRV) 引起多种家畜和野生动物的一种急性、致死性传染病<sup>[1]</sup>。PRV 能够感染各个年龄阶段猪, 引起仔猪神经症状和死亡, 7 日

收稿日期: 2021-12-12

基金项目: 中原千人计划项目 (204200510015), 河南省高校科技创新人才支持计划 (21HASTIT039) 和河南省自然科学基金 (222300420586) 共同资助。

作者简介: 金 钺, 实验师。E-mail: jin13526508306@163.com

\* 通信作者: 王林青, 博士, 副教授。E-mail: wanglinqing@zznu.edu.cn

龄以内新生仔猪死亡率高达 100%，母猪繁殖障碍，以及育肥猪呼吸系统疾病。对于 PR 的防制，主要开展疫苗接种以有效控制疾病。然而自 2011 年底以来，中国多个省份规模化猪场的猪群中暴发了 PR 疫情<sup>[2-3]</sup>，严重限制着我国养猪业的健康发展。

2015 年，Palinski 等<sup>[4]</sup>和 Phan 等<sup>[5]</sup>几乎同时从患病母猪和流产胎儿体内鉴定出猪圆环病毒 3 型 (Porcine circovirus 3, PCV3)，是一种无囊膜的单股闭合环状 DNA 病毒。PCV3 的基因组由 2 000 个核苷酸组成，包括 2 个主要的开放阅读框 ORF1 和 ORF2。前期研究发现，PCV3 感染与母猪繁殖障碍、猪皮炎肾病综合征、心脏和多系统炎症有关<sup>[4-5]</sup>。随后，Shen 等<sup>[6]</sup>在患发热、肺炎的猪样品中检出 PCV3；Qi 等<sup>[7]</sup>对采自 2015—2017 年中国 7 省患有呼吸道疾病的 94 份猪肺组织样品进行 PCV3 检测，PCV3 阳性率 26.6% (25/94)；Saporiti 等<sup>[8]</sup>对采自 1997—2018 年患有呼吸道疾病的 129 份病猪血清样品进行 PCV3 检测，PCV3 阳性率 6.2% (8/129)。这些调查结果提示，PCV3 感染可能与呼吸道疾病相关。目前 PCV3 在亚洲、欧洲及南美洲多个国家和地区相继流行<sup>[4-11]</sup>。

实时荧光 PCR (Quantitative real-time PCR, qPCR) 是目前测定样品中核酸拷贝数最敏感、最准确的检测技术。qPCR 包括荧光探针 PCR 和荧光染料 PCR，Taqman 探针合成价格高，只适合特定目标<sup>[12]</sup>，而荧光染料如 SYBR Green I，适用性广、灵敏、方便且便宜。目前，Liu 等已建立检测 PRV 的 Taqman 探针 qPCR 方法<sup>[13]</sup>，Xu 等已建立 PCV3 的 SYBR Green I qPCR 检测方法<sup>[14]</sup>，但是迄今尚无同时快速检测 PRV 和 PCV3 的双重 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法。*gE* 基因是 PRV 的主要毒力基因之一，也是世界动物卫生组织所规定 PRV 基因缺失疫苗的缺失基因<sup>[15]</sup>，因而建立靶向 *gE* 基因序列的 PCR 技术，能够监测 PRV 野毒感染。因此，本试验靶向 PRV *gE* 和 PCV3 *Rep* 基因，设计 2 对特异引物，建立一种在同一反应管中同时检测 PRV 与 PCV3 的快速、简便的双重 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法，以期用于 PRV 野毒和 PCV3 单独或者混合感染的临床检测及其流行病学调查。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒、菌株及临床样品

PCV3 阳性病料是由本实验室按照 Xu 等<sup>[14]</sup>介绍的方法进行 PCR 扩增、测序而获得。PRV、PCV2、猪细小病毒 (PPV)、猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、猪蓝耳病病毒 (PRRSV) 以及猪瘟病毒 (CSFV)

均由郑州市猪重大疫病防控重点实验室保存。DH5 $\alpha$  感受态细胞购自北京康为世纪有限公司。

临床样品共 78 份，采集于 2017—2019 年期间河南省郑州、许昌和新乡等地市患有呼吸道疾病和繁殖障碍病猪场送检的发病猪，包括脑、肝脏、脾脏、肺、肾和淋巴结。取适量组织进行研磨，反复冻融 3 次，12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。取上清液，于 -80℃ 保存备用。

### 1.2 主要试剂

pMD18-T (宝生物工程有限公司)；2 $\times$ Taq MasterMix (北京康为世纪有限公司)；DNA、RNA 抽提试剂盒 (生工生物工程股份有限公司)；SanPrep ChamQ SYBR qPCR Master Mix、反转录试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒等购自诺唯赞生物科技有限公司。

### 1.3 引物的设计与合成

从 GenBank 中下载 PRV *gE* 基因序列 MH507059.1 和 MH521042.1，利用 DNASTAR (version 5.0) 软件 MegAlign 程序进行同源性分析。基于 *gE* 基因保守序列，应用 Primer6.0 引物设计软件，设计 1 对特异引物 (表 1)，该引物扩增 PRV *gE* 基因片段长度为 92 bp，而 PCV3 特异引物则参考 Xu 等<sup>[14]</sup>设计的引物，引物扩增基因片段长度为 138 bp。引物由奥科鼎盛 (武汉) 生物科技有限公司合成。

表 1 本试验所用的 PRV 和 PCV3 引物

Table 1 Primers for the detection of PRV and PCV3 in this study		
名称	序列 (5'-3')	长度/bp
PCV3-F	GCTACGTGTCCTGAAGATAAG	138
PCV3-R	GCCTCCACACTCCACAATAG	
PRV-F	TCGCGCGAGAACTTTACC	92
PRV-R	TAGATGCAGGGCTCGTACA	

### 1.4 PRV 和 PCV3 标准品的制备

用 SanPrep 柱式 DNA 提取试剂盒，分别提取 PRV 和 PCV3 的 DNA，作为 PCR 模板，利用 PRV 和 PCV3 特异引物 PRV-F/R 和 PCV3-F/R，按以下条件进行 PCR 扩增 35 个循环：95℃ 5 min；95℃ 15 s，60℃ 15 s，72℃ 20 s。将纯化的 PCR 产物引入到 pMD18-T 载体中，形成重组质粒 pMD18-PRV 和 pMD18-PCV3，作为 PRV 和 PCV3 的标准品。经测序确认后，用 Nano-100 显微分光光度计检测标准品的浓度，并折算为 copies· $\mu$ L<sup>-1</sup>。

### 1.5 标准曲线的建立

为了寻求最佳反应条件和体系，分别对退火温度 (55~65℃)、引物量，PRV 与 PCV3 的引物浓度比 (0:10、1:9、1:4、3:7、2:3、1:1、3:2、

7:3、4:1、9:1和10:0)以及延伸时间进行荧光定量PCR,以明确qPCR的最高荧光值、最低样本阈值循环数(Cq值)。10倍系列( $10^{-1} \sim 10^{-10}$ )稀释标准品,选取9个稀释度( $10^{-2} \sim 10^{-10}$ )标准品为模板,且每个稀释度标准品做3个重复,进行qPCR扩增。以标准品拷贝数对数值作为X轴,循环阈值(Cq值)为Y轴,建立标准曲线。

### 1.6 特异性和敏感性试验

利用优化的双重qPCR,对PRV、PCV3、PCV2、PPV、PEDV、PRRSV以及CSFV的核酸进行检测,以确定双重qPCR的特异性。对8个稀释度 $10^{-10} \sim 10^{-3}$ 的PRV和PCV3标准品及其混合标准品分别进行双重qPCR,同时以去离子水为阴性对照,测定PRV和PCV3的最低检测线。

### 1.7 重复性检测

对 $10^{-3}$ 、 $10^{-5}$ 和 $10^{-7}$ 不同稀释度样品进行3次重复扩增,且在相同扩增条件下每个稀释度样品进行3个平行试验,计算批内变异系数;另外隔天对不同批次样品进行双重qPCR,进行3次重复检测,计算批间变异系数,以评价批内批间检测可重复性。

### 1.8 临床样品检测

对河南省郑州、许昌、新乡等地市猪场患有呼吸道疾病和繁殖障碍病猪的78份临床样品提取DNA,采用已建立的荧光定量PCR方法和常规PCR进行检测,比较这两种检测方法的检出率,评估其可靠性。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准品模板的制备结果

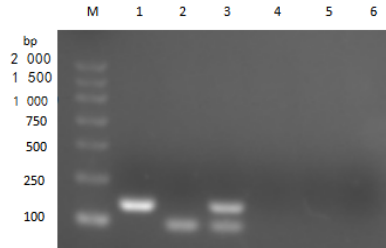
以PRV和PCV3的DNA为模板,利用PRV-F/R和PCV3-F/R作引物,进行PCR扩增。结果显示,扩增出约92 bp的PRV *gE*基因和138 bp的PCV3 *Rep*(图1),克隆至pMD18-T载体中,获得标准品(pMD18-PRV和pMD18-PCV3)。经测序表明PCR产物是特异的,扩增的PRV *gE*和PCV3 *Rep*基因片段长度分别为138 bp和92 bp,与MH507059.1、KX898030相应序列同源性100%。PRV和PCV3标准品浓度分别为113和105 ng· $\mu\text{L}^{-1}$ ;折算为拷贝数时,分别为 $3.70 \times 10^{10}$ 和 $3.38 \times 10^{10}$  copies· $\mu\text{L}^{-1}$ 。

### 2.2 双重qPCR的优化与扩增结果

对单重qPCR,结果显示PRV和PCV3的峰值分别对应PRV和PCV3的T<sub>m</sub>值。所扩增PRV的T<sub>m</sub>值为87°C,PCV3的T<sub>m</sub>值为81.5°C(图2)。

通过对双重qPCR中PCV3与PRV的引物比进行摸索,结果显示,当PRV与PCV3的引物浓度比

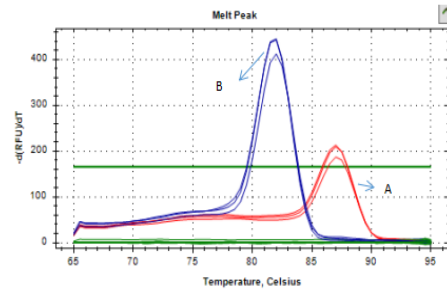
为1:4时,PRV与PCV3的溶解峰高低相近,最终确定了PRV和PCV3的双重qPCR反应体系为:PRV上、下游引物各0.2  $\mu\text{L}$ ,PCV3引物各0.8  $\mu\text{L}$ ,ChamQ SYBR qPCR Master Mix酶10  $\mu\text{L}$ ,PRV与PCV3标准阳性质粒各1  $\mu\text{L}$ ,补充ddH<sub>2</sub>O至20  $\mu\text{L}$ ;扩增条件为:95°C 5 min;95°C 15 s,62°C 15 s,72°C 20 s,共35个循环;最终72°C延伸10 min。所扩增的PRV和PCV3的T<sub>m</sub>值分别为87°C和81.5°C(图3)。



M. DL2000 Marker; 1. PCV3 PCR产物; 2. PRV PCR产物; 3. PRV和PCV3双重PCR产物; 4—6. 阴性对照。

图1 PRV和PCV3的PCR扩增结果

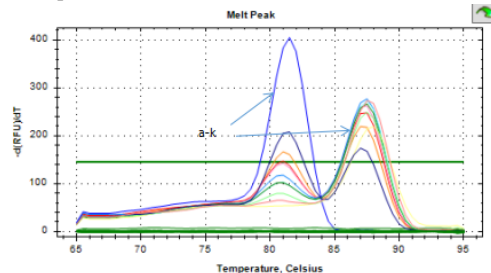
Figure 1 PCR amplification results of PCV3 and PRV



A: 红色的溶解峰代表PRV的溶解峰; B: 蓝色的溶解峰代表PCV3的溶解峰。

图2 PRV和PCV3单重qPCR的溶解峰分析

Figure 2 Melting curve analysis for the SYBR Green I-based qPCR of PRV and PCV3



a-k:不同颜色的溶解峰代表PRV和PCV3引物不同浓度比的溶解曲线,其中黄色的溶解峰代表摸索的最佳引物比时PCV3与PRV的溶解峰。

图3 双重荧光定量PCR的溶解峰分析

Figure 3 Melting curve analysis for the duplex SYBR Green I-based qPCR

### 2.3 荧光定量PCR标准曲线的建立

分别以8个稀释度( $3.70 \times 10^7 \sim 3.70 \times 10^0$  copies· $\mu\text{L}^{-1}$ )的PRV标准品和( $3.38 \times 10^7 \sim 3.38 \times 10^0$  copies· $\mu\text{L}^{-1}$ )的PCV3标准品为模板,按照优化的双

重 SYBR Green I 荧光定量 PCR 反应条件, 进行荧光定量 PCR 扩增。以标准品拷贝数对数值为 X 轴,  $C_q$  为 Y 轴, 作出 PRV 和 PCV3 标准曲线 (图 4 和图 5)。PRV 直线方程为:  $y = -3.389 3x + 40.74$ ,  $R^2$  为 0.998 3; PCV3 直线方程为:  $y = -3.435x + 41.681$ ,  $R^2$  为 0.994 4, 具有良好的线性相关。

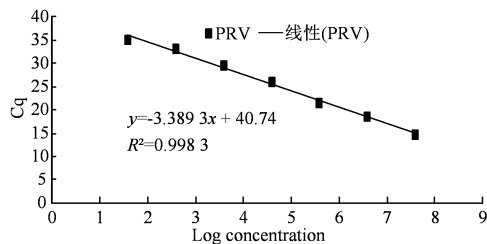


图 4 双重 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测 PRV 的标准曲线  
Figure 4 The standard curve of SYBR Green I -based qPCR for detecting PRV

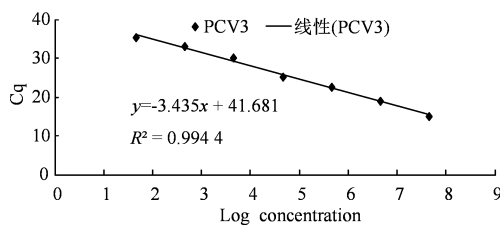
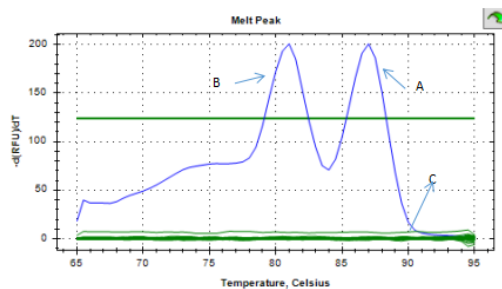


图 5 双重 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测 PCV3 标准曲线  
Figure 5 The standard curve of SYBR Green I -based qPCR for detecting PCV3



A: PRV 溶解峰; B: PCV3 溶解峰; C: 其他病原体与阴性对照。

图 6 双重 SYBR Green I qPCR 特异性试验结果

Figure 6 The specificity results of the duplex SYBR Green I -based qPCR assay

## 2.4 敏感性、特异性试验结果

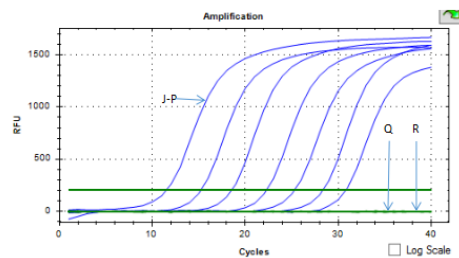
结果 (图 6) 表明该方法具有良好特异性, PCV2、PPV、PEDV、PRRSV 和 CSFV 核酸以及 H<sub>2</sub>O 均无特异性吸收峰值, 而 PRV 和 PCV3 核酸荧光信号明显。

图 7 结果显示 PRV 的检测限为 37.0 copies· $\mu$ L<sup>-1</sup>, PCV3 的检测限为 33.8 copies· $\mu$ L<sup>-1</sup>, PRV 和 PCV3 均在 10<sup>-9</sup> 稀释度仍出现扩增曲线<sup>[16]</sup>。

## 2.5 重复性试验结果

选取 PRV 的 3 个稀释度 3.70×10<sup>3</sup>、3.70×10<sup>5</sup> 和 3.70×10<sup>7</sup> copies· $\mu$ L<sup>-1</sup> 及 PCV3 的 3.38×10<sup>3</sup>、3.38×10<sup>5</sup>

和 3.38×10<sup>7</sup> copies· $\mu$ L<sup>-1</sup> 标准品进行检测。结果显示表明该方法重复性高、稳定性良好, 批内变异系数在 0.32%~1.28% 之间, 批间变异系数在 0.79%~1.68% 之间。



J-Q 分别对应稀释度为 10<sup>-3</sup>~10<sup>-10</sup> 的混合标准质粒的 PRV 与 PCV3 扩增结果; R 为阴性对照。

图 7 双重 SYBR Green I qPCR 的敏感性试验结果  
Figure 7 The sensitivity results of the duplex SYBR Green I -based qPCR assay

## 2.6 临床样品的检测结果

对 2017—2019 年采集的 78 份猪样品进行检测。结果显示, PRV 阳性 15 份, 阳性率 19.23%; PCV3 阳性 32 份, 阳性率 41.03%; 混合感染 7 份, 阳性率 8.97%。采用常规 PCR 检测时, PRV 和 PCV3 阳性率分别是 14.10% (11/78) 和 32.05% (25/78), PRV 和 PCV3 混合感染率为 6.41% (5/78)。表明建立的双重 SYBR Green I qPCR 检测方法更为灵敏。

## 3 讨论与结论

自 2011 年底以来, 中国很多地区规模化猪场爆发了新一轮 PR 疫情, 给养猪业造成巨大经济损失。随后, 中国政府于 2012 年提出 PR 的根除计划, 虽然 2013 年后 PRV gE 血清抗体阳性率逐渐降低, 但是现在还没有完全根除 PR。PCV3 是近年来新发现的一种猪圆环病毒, 已在世界范围内逐渐流行<sup>[4-11]</sup>。前期研究发现, PCV3 可能与呼吸道疾病、繁殖障碍有关<sup>[4-9]</sup>。PRV 和 PCV3 感染均可导致呼吸道疾病和母猪繁殖障碍, 且前期研究报道我国猪群中已存在 PRV 与 PCV3 的混合感染<sup>[17-18]</sup>。Zhang 等<sup>[19]</sup>报道 PCV2 感染加重 PRV 引起仔猪的肺和脑损伤。与 PCV2 相似, PCV3 可能会导致更严重 PRV 感染引起的临床症状和 PRV 病变。因此, 建立一种可以快速鉴别和诊断这两种病原体的方法是十分有必要的。

gE 基因作为 PRV 毒力基因之一, 在该基因缺失后病毒依然能够复制<sup>[20]</sup>。目前我国规模化猪场广泛使用 gE 基因缺失 PRV 疫苗, 可通过 gE-ELISA 方法检测 PRV gE 蛋白抗体来有效监测猪群中 PRV 野毒感染情况, 但是 gE-ELISA 方法费用高, 耗时长, 因而 PRV 的检测引物靶向 gE 基因。PCV3 Rep

与病毒复制相关,且比较保守<sup>[21]</sup>,故PCV3的检测引物应选择 *Rep* 基因<sup>[14]</sup>。因此,本试验靶向 PRV *gE* 和 PCV3 *Rep* 基因保守区,设计合成 PRV 和 PCV3 的荧光定量 PCR 检测引物,通过反应体系和扩增条件的摸索,最终建立了双重 qPCR 检测方法。当 PRV 与 PCV3 的引物浓度比为 1:4 时,PRV 和 PCV3 在同一反应管中均可以产生特异的溶解峰值(PRV 和 PCV3 的  $T_m$  值分别为 87°C 和 81.5°C),而其他病原体均不出现溶解峰。PRV 的最小检测下线为 37.0 copies· $\mu\text{L}^{-1}$ , 略微低于 Liu 等所建立的方法<sup>[13]</sup>; PCV3 的最小检测值为 33.8 copies· $\mu\text{L}^{-1}$ , 与 Han 等<sup>[22]</sup> 所建立的 PCV3 qPCR 方法相当。此外,批内批间变异系数均小于 2%。因此,本研究所建立的双重 qPCR 检测方法具有特异、敏感和重复性好的优点,可及时、准确剔除 PRV 阳性的野毒感染动物,为根除、净化 PR 提供技术保障,为 PRV 和 PCV3 的检测和防控起着很重要的作用。

本研究对 2017—2019 年河南省郑州、许昌和新乡等地市患有呼吸道疾病和繁殖障碍病猪场送检的 78 份临床病料样品,采用建立的双重 qPCR 进行 PRV 和 PCV3 的检测,PRV 阳性率 19.23%(15/78),表明 2017—2019 年河南部分地区猪场仍存在 PRV 野毒感染,PR 防控形势依然严峻。PCV3 阳性率 41.03%(32/78),PRV 和 PCV3 混合感染率为 8.97%(7/78),表明中国猪场仍存在 PRV 和 PCV3 感染。PRV 和 PCV3 的混合感染率(8.97%)略高于 Zhao 等<sup>[17]</sup>报道的 PRV 和 PCV3 混合感染率(3.6%),这可能是由于本试验所采集的临床样本均来自患有呼吸症状和繁殖失败的病猪。鉴于 PRV 感染造成的巨大经济损失、中国政府提出的 PR 根除方案以及 PCV3 的潜在危害,迫切需要加强对 PRV 和 PCV3 的临床诊断和监测。

本试验建立的双重荧光 PCR 检测方法具有特异、敏感、快速和准确等优点,检测时间 2~3 h,适合 PRV 和 PCV3 的早期诊断及流行病学调查,具有较强的应用价值。本研究建立的双重荧光 PCR 方法有望广泛应用于疫病病原学方面研究。

## 参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1985.
- [2] AN T Q, PENG J M, TIAN Z J, et al. Pseudorabies virus variant in Bartha-K61-vaccinated pigs, China, 2012 [J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(11): 1749-1755.
- [3] TAN L, YAO J, YANG Y D, et al. Current status and challenge of pseudorabies virus infection in China [J]. Virol Sin, 2021, 36(4): 588-607.
- [4] PALINSKI R, PIŃEYRO P, SHANG P C, 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): e01879-e01816.
- [5] PHAN T G, GIANNITTI F, ROSSOW S, et al. Erratum to: detection of a novel circovirus PCV in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation[J]. Virol J, 2017, 14(1): 87.
- [6] SHEN H, LIU X, ZHANG P, et al. Genome characterization of a *Porcine circovirus* type 3 in South China[J]. Transbound Emerg Dis, 2018, 65(1): 264-266.
- [7] QI S S, SU M J, GUO D H, et al. Molecular detection and phylogenetic analysis of *Porcine circovirus* type 3 in 21 Provinces of China during 2015-2017[J]. Transbound Emerg Dis, 2019, 66(2): 1004-1015.
- [8] SAPORITI V, CRUZ T F, CORREA-FIZ F, et al. Similar frequency of *Porcine circovirus* 3 (PCV-3) detection in serum samples of pigs affected by digestive or respiratory disorders and age-matched clinically healthy pigs[J]. Transbound Emerg Dis, 2020, 67(1): 199-205.
- [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] KWON T, YOO S J, PARK C K, et al. Prevalence of novel *Porcine circovirus* 3 in Korean pig populations[J]. Vet Microbiol, 2017, 207: 178-180.
- [11] SAPORITI V, FRANZO G, SIBILA M, et al. *Porcine circovirus* 3 (PCV-3) as a causal agent of disease in swine and a proposal of PCV-3 associated disease case definition[J]. Transbound Emerg Dis, 2021, 68(6): 2936-2948.
- [12] VARGA A, JAMES D. Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of Plum pox virus strains C, EA, and W: Effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation[J]. J Virol Methods, 2006, 132(1/2): 146-153.
- [13] LIU Z C, ZHANG C H, SHEN H Y, et al. Duplex fluorescence melting curve analysis as a new tool for rapid detection and differentiation of genotype I, II and Bartha-K61 vaccine strains of pseudorabies virus [J]. BMC Vet Res, 2018, 14(1): 372.
- [14] 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.
- [15] 顾阳,高晓云,程琨,等. 鉴别猪伪狂犬病病毒强毒与疫苗毒双重 PCR 检测方法的建立[J]. 华北农学报, 2014, 29(2): 94-97.
- [16] 赵宇. PRV 的分离、基因缺失株的构建及其免疫效力的探究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2020.
- [17] ZHAO D, WANG X B, GAO Q Q, et al. Retrospective survey and phylogenetic analysis of *Porcine circovirus* type 3 in Jiangsu Province, China, 2008 to 2017[J]. Arch Virol, 2018, 163(9): 2531-2538.
- [18] CHEN G H, MAI K J, ZHOU L, et al. Detection and genome sequencing of *Porcine circovirus* 3 in neonatal pigs with congenital tremors in South China[J]. Transbound Emerg Dis, 2017, 64(6): 1650-1654.
- [19] ZHANG X, SHU X H, BAI H Y, et al. Effect of *Porcine circovirus* type 2 on the severity of lung and brain damage in piglets infected with porcine pseudorabies virus[J]. Vet Microbiol, 2019, 237: 108394.
- [20] MORENO A, CHIAPPONI C, SOZZI E, et al. Detection of a gE-deleted Pseudorabies virus strain in an Italian red fox [J]. Vet Microbiol, 2020, 244: 108666.
- [21] 代振江,王伟丞,曾智勇,等. 猪圆环病毒基因组结构与功能研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(3): 151-154.
- [22] HAN H Y, ZHENG H H, ZHAO Y, et al. Development of a SYBR green I-based duplex real-time fluorescence quantitative PCR assay for the simultaneous detection of porcine epidemic diarrhea virus and *Porcine circovirus* 3[J]. Mol Cell Probes, 2019, 44: 44-50.