

DOI:CNKI:61-1390/S. 20110907. 1107. 029

网络出版时间:2011-09-07 11:07

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20110907.1107.029.html>

PCV-2、PPV 和 PRV 多重 PCR 检测 方法的建立及初步应用

陈光达,许信刚,童德文

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

【摘要】 【目的】建立可用于临床同时检测 PCV-2、PPV 和 PRV 3 种 DNA 病毒感染的多重 PCR 方法。【方法】根据 GenBank 中收录的 PCV-2、PPV 和 PRV 的基因组序列,选择 3 种病毒的特异性保守区设计 3 对引物,通过优化多重 PCR 的反应条件,建立了能够同时检测 3 种病毒混合感染的多重 PCR 方法,对该方法的特异性、敏感性、稳定性进行检测,并将其用于临床病料的检测。【结果】多重 PCR 方法中,当引物浓度均为 $1.0 \mu\text{mol/L}$,退火温度为 57.2°C 时,各目的片段均可较好地扩增。特异性试验结果表明,建立的多重 PCR 方法可从 PCV-2、PPV、PRV 病毒 DNA 中分别扩增出长度为 353,265 和 198 bp 的目的片段,从 3 种病毒 DNA 的混合物中也可扩增出上述目的片段,而其他对照组的扩增结果均呈阴性。敏感性试验结果表明,建立的多重 PCR 方法对 PCV-2、PPV 和 PRV 的最低检测量分别为 26.88,25.34 和 $24.9 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 。在不同时间对每份样品重复检测 3 次,结果一致,表明该方法具有良好的可重复性。临床应用结果表明,39 份疑似病料中,PCV-2、PPV 和 PRV 的阳性率分别为 53.84%,17.95%和 5.13%,PCV-2 与 PPV 混合感染的阳性率为 15.38%,PCV-2、PPV 和 PRV 混合感染的阳性率为 2.57%。【结论】建立的多重 PCR 方法敏感性高、特异性强、重复性好,可以有效检测 PCV-2、PPV 和 PRV 的混合感染。

【关键词】猪圆环病毒 2 型;猪细小病毒;猪伪狂犬病病毒;多重 PCR

【中图分类号】S858.280.1

【文献标识码】A

【文章编号】1671-9387(2011)11-0001-06

Establishment and initial application of multiplex PCR assay for detecting PCV-2, PPV and PRV infection

CHEN Guang-da, XU Xin-gang, TONG De-wen

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】A multiplex polymerase chain reaction assay was developed for the clinical detection of porcine circovirus type 2, porcine pseudorabies virus and porcine parvovirus infection of swine. 【Method】According to the highly conserved genome sequence of PCV-2, PPV and PRV, three pairs of primers targeting PCV-2 ORF2, PPV NS1 and PRV gB were synthesized. The multiplex PCR reaction condition was optimized and the multiplex PCR for simultaneous detecting PCV-2, PPV and PRV was established. The specificity, sensitivity and repeatability of the multiplex PCR were detected and the multiplex PCR method was applied to clinical sample detection. 【Result】All target fragments were well amplified, when the primers concentrations were $1.0 \mu\text{mol/L}$ and the annealing temperature was 57.2°C ; The specificity test showed that a fragment of 353, 265 and 198 bp was amplified from the genomic DNA of PCV-2,

* 【收稿日期】2011-04-07

【基金项目】陕西省科技攻关项目(2009K02-01);西北农林科技大学青年学术骨干项目(E111020901);教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-07-0701)

【作者简介】陈光达(1986—),男,内蒙古包头人,在读硕士,主要从事分子病原与免疫学研究。E-mail:CGD12@126.com

【通信作者】许信刚(1974—),男,陕西咸阳人,副教授,博士,主要从事分子病原与免疫学研究。E-mail:286567031@qq.com

童德文(1967—),男,安徽太湖人,教授,博士,博士生导师,主要从事动物病理学研究。E-mail:dwtong@nwsuaf.edu.cn

PPV and PRV respectively. Three fragments were amplified from the mixed DNA sample of PCV-2, PPV and PRV simultaneously, and no amplification was achieved from other negative control groups. The sensitivity test showed that the multiplex PCR of PCV-2, PPV and PRV DNA could be detected as 26.88, 25.34 and 24.9 pg/ μ L; The results of 3 replication test for each sample at different time were consistent indicating that multiplex PCR had good repeatability. The initial application test showed that the 39 clinical samples were subjected to multiplex PCR. Among these samples, PCV-2 positive percentage was 53.84%, PPV positive percentage 17.95% and PRV positive percentage 5.13%, co-infection of PCV-2 and PPV percentage 15.38%, co-infection of PCV-2, PPV and PRV percentage 2.57%. **【Conclusion】** These results indicated that multiplex PCR had specificity, sensitivity, and repetitive characteristics and multiplex PCR had potential values for detecting of PCV-2, PPV and PRV co-infection in pigs.

Key words: PCV-2; PPV; PRV; multiplex PCR

猪圆环病毒 2 型(PCV-2)为圆环病毒科圆环病毒属成员,该病毒与断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)、猪皮炎与肾病综合征(PDNS)、仔猪先天性震颤等密切相关^[1]。猪细小病毒(PPV)是猪繁殖障碍的重要病原,随着规模化和集约化养猪业的不断发展,PPV 感染不断蔓延扩大,造成了严重的经济损失^[2]。Ellis 等^[3]研究发现,PCV-2 和 PPV 共同接种仔猪后出现了明显的 PMWS 症状。猪伪狂犬病病毒(PRV)感染多种家畜、野生动物后可引发急性传染病,感染母猪后主要引起繁殖障碍,危害极其严重。PCV-2、PPV 和 PRV 被认为是引起母猪繁殖障碍疾病的重要病原体^[4-6]。目前,对于病毒性疫病的诊断一般采用病原分离鉴定和血清学方法,但这些方法存在操作复杂、费时费力、敏感性较差等缺点,特别是当猪群混合感染多种病原时,应用常规方法难以进行早期快速检测和鉴别诊断。多重 PCR 技术是在同一 PCR 反应体系中加入多对引物,从而实现对多个目的基因同时进行扩增的方法,具有快速、灵敏、特异性好、可 1 次检测多个病原基因的优势,更适用于多种病原体混合感染的诊断,在病原分子检测领域显示出了其强大的生命力^[7]。目前,有关 PCV-2、PPV、PRV 多重 PCR 检测方法的研究报道并不多。为此,本试验依据 PCV-2、PPV 和 PRV 的保守区基因序列,参考国内外相关文献设计并合成了 3 对特异性引物,建立了可以同时检测 PCV-2、PPV 和 PRV 3 种 DNA 病毒混合感染的多重 PCR 检测方法,并对临床猪繁殖障碍疫病疑似病料进行了初步检测,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和细胞株 PCV-2 Shaanxi 株、PPV

Shaanxi 株和 PRRSV Shaanxi 株,由西北农林科技大学兽医病理学实验室分离鉴定并保存;猪瘟疫化弱毒活疫苗(细胞源),购自中牧实业股份有限公司;日本乙型脑炎病毒(JEV)减毒活疫苗(SA14-14-2 株),由成都生物制品研究所生产;猪伪狂犬病毒弱毒疫苗(Bartha-K16 株),购自齐鲁动物保健品有限公司。试验所用的 PK-15 细胞由西北农林科技大学动物医学院兽医病理学实验室保存。

1.1.2 待检病料 39 份疑似感染 PCV-2、PPV 和 PRV 病死猪的肝脏、脾脏、肺脏和淋巴结等组织(每头猪的各种组织混合后作为 1 份病料),2010-06—2011-01 采自陕西省不同地区的养猪场。

1.1.3 主要试剂 Taq DNA 聚合酶、dNTP 及 PCR 试剂均购自 Promega 公司;其他试剂均为国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 中收录的 PCV-2、PPV 和 PRV 全基因序列,并参考文献[8-9],利用 Primer 5.0 引物分析软件,设计 3 对引物,分别用于扩增 PCV-2 ORF2 基因、PPV NS1 基因和 PRV gB 基因的保守区。引物由南京金斯瑞生物工程有限公司合成,其序列、位置及扩增片段长度见表 1。

1.2.2 病毒 DNA 的提取 取病毒细胞培养物(或疫苗稀释液)1 mL,12 000 r/min 离心 15 min,取上清液 437.5 μ L,加入 12.5 μ L 蛋白酶 K (20 μ g/mL)和 100 g/L SDS 50 μ L,37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min。加入等体积混合液(V(酚):V(氯仿):V(异戊醇)=25:24:1)抽提 2 次后,取上清液,加入 1/10 体积的 NaAC (2 mol/L)和 2 倍体积的无水乙醇,于-20 $^{\circ}$ C 过夜沉淀,12 000 r/min 离心 10 min,用体积分数 75%乙醇洗涤 2 次,待乙醇挥发后,用适量灭菌双蒸水溶解 DNA 并于-20 $^{\circ}$ C 保存。

表 1 本试验中多重 PCR 的引物序列

Table 1 Special primer pairs sequences for multiplex PCR in this research

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	扩增片段长度/bp Product length	位置/bp Location	登录号 GenBank accession No.
PCV-2-P1	AAGGGCTGGGTTATGGTATG	353	1 275~1 628	NC_005148
PCV-2-P2	CGCTGGAGAAGGAAAAATGG			
PPV-P3	AGTTAGAATAGATGCGAGGAA	265	1 761~2 026	NC_001718
PPV-P4	AGAGTCTGTTGGTGTATTATTGG			
PRV-P5	GGGGTTGGACAGGAAGGACACCA	198	17 205~17 403	NC_006151
PRV-P6	AACCAGCTGCACGCGCTCAA			

1.2.3 单项 PCR 检测方法的建立 分别以 PCV-2、PPV 和 PRV 的 DNA 为模板,用相应的引物分别进行 PCR 扩增。PCR 反应在 25 μL 体系中进行:10×PCR buffer 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL,上、下游引物(20 pmol/μL)各 0.5 μL,DNA 2 μL,Taq DNA 聚合酶(1 U) 0.2 μL,灭菌双蒸水 15.3 μL。PCR 反应条件为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。为了探明不同退火温度对 PCR 反应的影响,将退火温度设定为 52.4,54.4,56 和 57.2 ℃ 4 个梯度,以确定单项 PCR 反应的最佳退火温度。

1.2.4 多重 PCR 扩增条件的优化 测定提取的 PCV-2、PPV 和 PRV 的 DNA 质量浓度(PCV-2 为 84.1 ng/μL,PPV 为 79.2 ng/μL,PRV 为 77.8 ng/μL)后,均稀释为 50 ng/μL,等量混匀作为模板。多重 PCR 反应在 30 μL 体系中进行:10×PCR buffer 3 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2.4 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2.4 μL,PCV-2、PPV 和 PRV 的上下游引物(20 pmol/μL)各 0.8 μL,PCV-2、PPV 和 PRV 基因组 DNA 各 2 μL,Taq DNA 聚合酶(1 U) 0.4 μL,灭菌双蒸水 11 μL。对多重 PCR 中的退火温度(52.4,54.4,56,57.2 和 58 ℃)、各引物对终浓度组合(组合中 PCV-2、PPV 和 PRV 的引物对终浓度分别为 0.5,0.5,0.5;0.5,1.0,0.5;0.5,1.0,1.0;1.0,0.5,0.5;1.0,1.0,1.0 μmol/L)等反应条件进行优化,筛选出多重 PCR 扩增的最佳反应条件。

1.2.5 多重 PCR 的特异性试验 采用优化后的扩增条件及程序,在多重 PCR 体系中分别加入 PCV-2、PPV、PRV、PCV-2+PPV+PRV、PK-15 细胞和 *E. coli* 的 DNA 模板及 CSFV、PRRSV、JEV 的 RNA 反转录产物模板,同时设灭菌双蒸水作为阴性对照,进行多重 PCR 反应。

1.2.6 多重 PCR 的敏感性试验 对提取的 3 种病毒 DNA 的质量浓度分别进行 5¹~5⁷ 倍比稀释,将稀释倍数相同的 DNA 等体积混合后作为 PCR 反应模板,采用优化后的多重 PCR 扩增条件进行反应,以检测多重 PCR 的敏感性。

1.2.7 多重 PCR 的稳定性试验 用建立的多重 PCR 方法,分别取 PCV-2、PPV、PRV、PCV-2+PPV+PRV DNA 样品和 CSFV、PRRSV、JEV 的 RNA 反转录样品及正常细胞对照样品各 2 份,重复检测 3 次,验证多重 PCR 试验的稳定性。

1.2.8 临床样品的检测 称取混合病料样品约 100 mg,加液氮充分研磨后转入组织匀浆器中,加入 10 mmol/L PBS(pH 7.2)1 mL 充分匀浆,于-80 ℃反复冻融 3 次裂解细胞后,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液提取病毒 DNA,按建立的多重 PCR 方法进行反应。

2 结果与分析

2.1 PCV-2、PPV 和 PRV 的单项 PCR 扩增结果及退火温度的选择

PCV-2、PPV 和 PRV 的单项 PCR 扩增及退火温度筛选的结果见图 1。

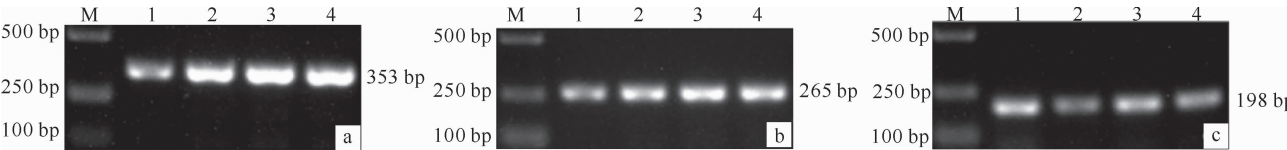


图 1 PCV-2、PPV 和 PRV 的单项 PCR 扩增及退火温度的筛选结果

a. PCV-2;b. PPV;c. PRV;M. DL2000 DNA 分子质量标准;1~4. 退火温度分别为 52.4,54.4,56 和 57.2 ℃

Fig. 1 Optimization for annealing temperature of single PCR and results of single PCR for detecting PCV-2,PPV and PRV
a. PCV-2;b. PPV;c. PRV;M. DL2000 DNA Marker;1~4. Annealing temperature was 52.4,54.4,56 and 57.2 ℃, respectively

由图 1 可见,以 PCV-2、PPV 和 PRV 的 DNA 为模板,经单项 PCR 扩增,分别得到了长度为 353, 265 和 198 bp 的条带,均与预期结果相符。采用不同的退火温度进行 PCR 反应,结果(图 1)显示,在 56 ℃时 3 个目的片段均能较好地扩增,所以单项 PCR 反应的退火温度定为 56 ℃。

2.2 PCV-2、PPV 和 PRV 多重 PCR 退火温度的优化

选取不同的退火温度(52.4~58 ℃)进行多重

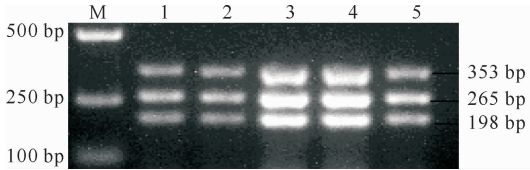


图 2 PCV-2、PPV 和 PRV 多重 PCR 退火温度的确定

M. DL2000 DNA 分子质量标准;1~5. 退火温度分别为 52.4、54.4、56、57.2 和 58 ℃

Fig.2 Determination of optimal annealing temperature in multiplex PCR for detecting PCV-2,PPV and PRV

M. DL2000 DNA Marker;1-5. Annealing temperature was 52.4,54.4,56,57.2 and 58 ℃, respectively

2.4 优化多重 PCR 的特异性检测结果

PCV-2、PPV 和 PRV 优化多重 PCR 的特异性检测结果见图 4。图 4 表明,以 PCV-2、PPV 和 PRV DNA 及其混合物为模板,均可扩增出特异的目的片段,而以 CSFV、JEV、PRRSV RNA 反转录产物及 *E. coli*、PK-15 细胞 DNA 为模板的均未扩增出目的条带,ddH₂O 阴性对照也未扩增出目的条带,表明建立的多重 PCR 方法的特异性较好。

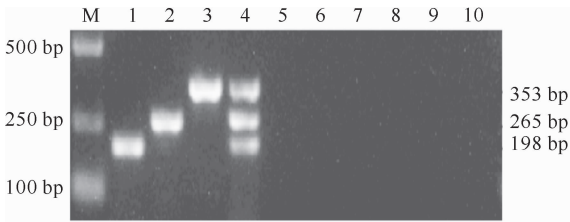


图 4 PCV-2、PPV 和 PRV 优化多重 PCR 的特异性检测

M. DL2000 DNA 分子质量标准;1~4. PRV、PPV、PCV-2 DNA 及其混合物;5~7. CSFV、JEV、PRRSV RNA 反转录产物;8~9. *E. coli*、PK-15 细胞 DNA;10. 阴性对照 ddH₂O

Fig.4 Specificity test of multiplex PCR for detecting PCV-2,PPV and PRV

M. DL2000 DNA Marker;1-4. DNA of PRV,PPV,PCV-2, PRV+PPV+PCV-2;5-7. cDNA of CSFV,JEV,PRRSV; 8-9. DNA of *E. coli*,PK-15 cell line;10. Negative control ddH₂O

PCR 反应,琼脂糖凝胶电泳结果(图 2)表明,多重 PCR 在 57.2 ℃扩增效果较好,故确定最佳退火温度为 57.2 ℃。

2.3 PCV-2、PPV 和 PRV 的多重 PCR 引物浓度的优化

取不同浓度的引物组合进行多重 PCR 反应,结果表明,3 种引物浓度均为 1.0 μmol/L 时的多重 PCR 扩增效果最好(图 3)。

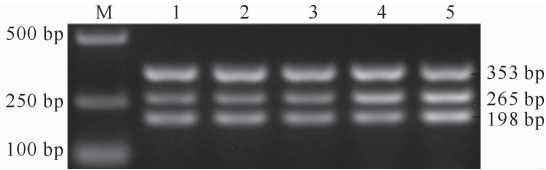


图 3 PCV-2、PPV 和 PRV 多重 PCR 引物浓度的确定

M. DL2000 DNA 分子质量标准;1~5. PCV-2、PPV、PRV 引物对终浓度分别为 0.5、0.5、0.5;0.5、1.0, 0.5、0.5、1.0、1.0;1.0、0.5、0.5;1.0、1.0、1.0 μmol/L

Fig.3 Determination of optimal primer concentration used in multiplex PCR for detecting PCV-2,PPV and PRV

M. DL2000 DNA Marker;1-5. Primers concentration for PCV-2, PPV and PRV were 0.5,0.5,0.5;0.5,1.0,0.5; 0.5,1.0,1.0;1.0,0.5,0.5;1.0,1.0,1.0 μmol/L, respectively

2.5 优化多重 PCR 的敏感性检测结果

采用优化后的多重 PCR 扩增条件来扩增倍比稀释的 PCV-2、PPV 和 PRV DNA,结果显示,多重 PCR 对 PCV-2、PPV、PRV DNA 的最低检测量分别为 26.88、25.34 和 24.9 pg/μL(图 5)。本试验单项 PCR 的最低检测量分别为 5.38、5.10 和 4.98 pg/μL,由此可知,多重 PCR 的检测灵敏度仅是单项 PCR 的 1/5 左右。

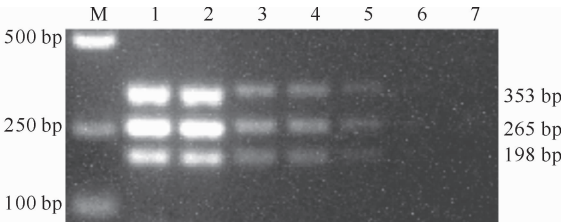


图 5 PCV-2、PPV 和 PRV 优化多重 PCR 的敏感性检测

M. DL2000 DNA 分子质量标准;1~7. 依次为 5¹~5⁷ 倍比稀释病毒 DNA 的扩增产物

Fig.5 Sensitivity test of the multiplex PCR for detecting PCV-2,PPV and PRV

M. DL2000 DNA Marker;1-7. Different dilutions of template from 5¹ to 5⁷

2.6 优化多重 PCR 的稳定性试验结果

用建立的多重 PCR 方法在不同时间对每份样品重复检测 3 次,结果表明,3 次的检测结果一致,说明该方法具有良好的可重复性。

2.7 优化多重 PCR 的临床应用

用建立的多重 PCR 方法对 39 份临床病料进行检测,结果见图 6 和表 2。由表 2 可知,在 39 份病料

中,单纯感染 PCV-2 的有 21 份,单纯感染 PPV 的有 7 份,单纯感染 PRV 的有 2 份,混合感染 PCV-2 与 PPV 的有 6 份,同时感染 3 种病毒的仅有 1 份,还有 2 份病料的检测结果为阴性。PCV-2、PPV、PRV 的阳性率分别为 53.84%,17.95%和 5.13%。PCV-2 与 PPV 混合感染的阳性率为 15.38%,PCV-2、PPV、PRV 混合感染的阳性率为 2.57%。

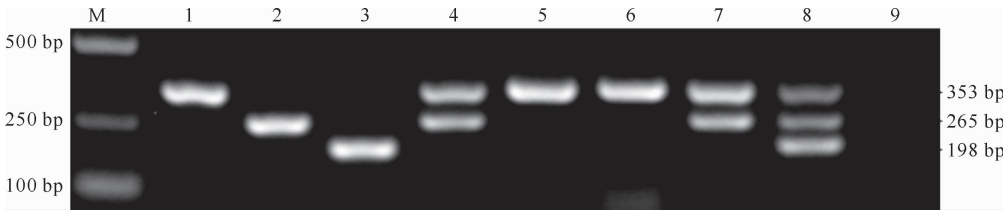


图 6 优化多重 PCR 对患有繁殖障碍性疾病病猪组织临床样品中 PCV-2、PPV 和 PRV 的检测结果
M. DL2000 DNA 分子质量标准;1~8. 临床样品;9. 阴性对照

Fig. 6 Detecting result of the clinical samples by multiplex PCR assay for PCV-2,PPV and PRV
M. DL2000 DNA Marker;1-8. 8 clinical samples;9. Negative control

表 2 39 份患有繁殖障碍性疾病病猪组织病料的 多重 PCR 检测结果
Table 2 Results of 39 clinical samples detected by multiplex PCR assay

项目 Item	阳性样品数 No. of positive sample	所占比例/% Rate
单纯感染 PCV-2 PCV-2 infection	21	53.84(21/39)
单纯感染 PPV PPV infection	7	17.95(7/39)
单纯感染 PRV PRV infection	2	5.13(2/39)
混合感染 PCV-2+PPV Co-infection with PCV-2 and PPV	6	15.38(6/39)
混合感染 PCV-2+PPV+PRV Co-infection with PCV-2,PPV and PRV	1	2.57(1/39)
未检出感染 No infection	2	5.13(2/39)

3 讨 论

PCV-2、PPV、PRV 均可感染母猪使之发生繁殖障碍,但感染后症状难以区分且存在混合感染的可能。目前用于检测这 3 种病毒的主要方法有病原分离鉴定、间接免疫荧光试验、酶联免疫吸附试验等^[10]。随着分子生物学的不断发展,PCR 检测方法以其灵敏性高、特异性强等特点,而被广泛应用于疾病的病原检测领域,检测 PCV-2、PRV、PPV 的常规 PCR 方法已经开始应用于临床实践^[11-12]。但由于 PCV-2、PRV、PPV 混合感染情况较为严重,因此研究快速而灵敏地鉴别多种病毒的检测手段显得尤为重要。多重 PCR 方法不仅保留了常规 PCR 快速、灵敏、特异的特点,更具有 1 次检测多个病原基因的优势,对临床混合感染的鉴别诊断尤为有效。

本研究基于 PCV-2、PPV、PRV 的保守性基因合成了 3 对特异性引物,从 3 种混合病毒中提取了混合病毒的 DNA,运用多重 PCR 技术成功扩增出了长度分别为 353 bp(PCV-2),265 bp(PPV)和 198

bp(PRV)的特异性片段。在建立多重 PCR 检测方法时,各引物间的比例、退火温度等因素对试验结果的影响较大^[13]。因此有必要对多重 PCR 的反应条件进行优化。试验结果表明,3 种引物浓度均为 1.0 μmol/L、退火温度为 57.2 ℃ 时,多重 PCR 的扩增效果较好。特异性试验结果表明,优化的多重 PCR 方法对其他猪常见的病毒检测结果均为阴性,显示出了良好的特异性。敏感性试验结果表明,优化的多重 PCR 方法对 PCV-2、PPV、PRV DNA 的最低检测量分别达到 26.88,25.34 和 24.9 pg/μL,虽然该方法的灵敏度低于单项 PCR,但已超过了病毒分离鉴定和 ELISA 检测方法的灵敏度,完全可以满足临床检测的需要。

本研究运用优化的多重 PCR 方法,检测了 39 份患有繁殖障碍性疾病病猪的组织(肺脏、脾脏、淋巴结等)病料,结果表明,PCV-2 的感染阳性率为 53.84%,PPV 的感染阳性率为 17.95%,PRV 的感染阳性率为 5.13%。PCV-2 与 PPV 混合感染的阳性率为 15.38%,3 种病毒混合感染的阳性率为

2.57%。将部分阳性样品的 PCR 产物送往南京金斯瑞生物工程有限公司进行测序,测序结果证实,扩增的片段为 PCV-2 ORF2 基因、PPV NS1 基因和 PRV gB 基因。由上述结果可以看出,PCV-2 感染较为严重,在 PCV-2 高感染的背景下还存在着 PPV 和 PRV 的感染,表明 PCV-2 将是未来猪病监测及防治的重点。

总之,本研究建立的多重 PCR 方法能够用于 PCV-2、PPV、PRV 的单纯感染和混合感染检测,且较传统的病毒检测方法更为灵敏、简便、高效。虽然该方法在临床应用中检测到了一定的阳性样品,但目前该方法还不能用于区分疫苗免疫和强毒感染,故检测结果只能在一定程度上反映实际感染情况。因此,在临床应用中还要配合其他方法和途径进行综合判断。另外,引起猪繁殖障碍性疾病的病原还有其他病毒及细菌,建立更广泛的多重 PCR 体系将是未来工作的重点。

[参考文献]

- [1] Allan G, McNeilly F, Cassidy J, et al. Pathogenesis of porcine circovirus: Experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material [J]. *Veterinary Microbiology*, 1995, 44(1): 49-64.
- [2] Mengeling W L, Lager K M, Vorwald A C. The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance [J]. *Animal Reproduction Science*, 2000, 60-61(2): 199-210.
- [3] Ellis J, Clark E, Haines D, et al. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field [J]. *Veterinary Microbiology*, 2004, 98(2): 159-163.
- [4] Ellis J, Bratanich A, Clark G, et al. Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2000, 12(1): 21-27.
- [5] Bogdan J, West K, Clark E, et al. Association of porcine circovirus 2 with reproductive failure in pigs: A retrospective study, 1995-1998 [J]. *The Canadian Veterinary Journal*, 2001, 42

(7): 548.

- [6] Zhang S, Jafer O, Yuan J, et al. Association analysis between pseudorabies antibody and five single-nucleotide polymorphisms in pigs [J]. *Animal*, 2009, 3(10): 1363-1367.
- [7] Elnifro E, Ashshi A, Cooper R, et al. Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000, 13(4): 559.
- [8] Yue F, Cui S, Zhang C, et al. A multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, porcine pseudorabies virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens [J]. *Virus Genes*, 2009, 38(3): 392-397.
- [9] Jiang Y, Shang H, Xu H, et al. Simultaneous detection of porcine circovirus type 2, classical swine fever virus, porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs by multiplex polymerase chain reaction [J]. *The Veterinary Journal*, 2010, 183(2): 172-175.
- [10] 傅 昱,郝晓芳,卢曾军,等. 兰州地方分离 PCV 毒株 ORF2 阅读框的测序分析与原核表达鉴定 [J]. *湖南农业科学*, 2010(7): 23-27.
Fu Y, Hao X F, Lu Z J, et al. Sequence analysis and prokaryotic expression identification of ORF2 gene in porcine circovirus isolated from Lanzhou [J]. *Hunan Agriculture Science*, 2010(7): 23-27. (in Chinese)
- [11] 贾 赞,芦银华,张素芳,等. 猪圆环病毒 2 型、猪繁殖与呼吸综合征病毒及猪细小病毒混合感染的流行病学调查 [J]. *中国病毒学*, 2004, 19(5): 467-470.
Jia Y, Lu Y H, Zhang S F, et al. Investigation on epidemiology of co-infection of porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory disease syndrome virus and porcine parvovirus [J]. *Virologica Sinica*, 2004, 19(5): 467-470. (in Chinese)
- [12] Junghyun K, Chanhee C. A comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and *in situ* hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfecting pigs [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2004, 16: 45-50.
- [13] Henegariu O, Heerema N, Dlouhy S, et al. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol [J]. *Biotechniques*, 1997, 23(3): 504-511.