

实时定量 PCR 探讨猪细小病毒自然感染猪体内病毒的分布情况

李厚伟¹, 魏战勇¹, 郭显坡^{1,2}, 陈红英², 李金磊¹, 韩志涛¹, 崔保安¹

(1 河南省动物性食品安全重点实验室, 河南 郑州 450002; 2 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

【摘要】 **【目的】**探讨猪自然感染猪细小病毒(Porcine Parvovirus, PPV)后病毒在体内的分布情况, 分析病毒对猪器官组织的嗜性, 揭示猪细小病毒的致病机制。 **【方法】**利用已建立的猪细小病毒 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测方法, 定量检测自然感染仔猪、妊娠母猪和同时混合感染有猪圆环病毒 2 型的仔猪器官组织中 PPV DNA 的相对含量, 分析猪细小病毒的组织嗜性及其与圆环病毒混合感染时的相互作用机制。 **【结果】**在多种器官组织中均可检测到 PPV, 在感染仔猪的肾脏、脾脏、颌下淋巴结中病毒含量较高, 为 $1.39 \times 10^5 \sim 1.81 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$; 在感染妊娠母猪的肾脏、脾脏、肺脏、子宫内膜中病毒含量为 $4.56 \times 10^5 \sim 5.82 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$; 混合感染 PPV 和猪圆环病毒 2 型(PCV2)仔猪肺脏中的 PPV DNA 相对含量显著增加, 从 $2.69 \times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$ 增加到 $5.04 \times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$ 。 **【结论】**PPV 对猪肾脏、脾脏、淋巴结、妊娠母猪子宫的嗜性最强, 对肝脏的嗜性较弱; PCV2 的混合感染可促进 PPV 在肺脏的复制增殖, 增强了 PPV 对感染器官组织的亲嗜能力。

【关键词】 猪细小病毒; 猪圆环病毒 2 型; 实时定量 PCR; 体内分布规律

【中图分类号】 S858.282.65⁺9.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)11-0001-06

Distribution of porcine parvovirus in the infected pigs by real-time quantitative PCR

LI Hou-wei¹, WEI Zhan-yong¹, GUO Xian-po^{1,2}, CHEN Hong-ying², LI Jin-lei¹,
HAN Zhi-tao¹, CUI Bao-an¹

(1 Key Laboratory for Animal-derived Food Safety of He'nan Province, Zhengzhou, He'nan 450002, China;

2 College of Animal Science and Veterinary Medicine, He'nan Agricultural University, Zhengzhou, He'nan 450002, China)

Abstract: **【Objective】**In order to survey the distribution of porcine parvovirus in pigs after infection, the research was conducted to investigate the tropism of the virus on pig organs and tissues, and reveal the pathogenic mechanism of PPV. **【Method】**SYBR Green I real-time quantitative PCR was used to detect the relative content of PPV DNA in infected porcine heart, lung, kidney, spleen, liver, lymphonodi subiliaci, endometrium and other organs. **【Result】**The results showed that the PPV DNA can be detected in heart, liver, spleen, kidney, lung, lymphonodi subiliaci of piglets, especially in kidney, spleen, lymphonodi subiliaci of piglets ($1.39 \times 10^5 - 1.81 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$). The relative content of PPV DNA in kidney, spleen, lung, endometrium of pregnancy sows is high up to $4.56 \times 10^5 - 5.82 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$. Comparing the naturally infected piglets with the porcine circovirus type 2 (PCV2) and the PPV mixed infection piglets, the relative content of PPV DNA in lung is increased obviously from $2.69 \times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$ to $5.04 \times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$. **【Conclusion】**The PPV in the kidney, spleen, lymphonodi subiliaci and endometrium of pregnancy sows has the strongest tropism,

* [收稿日期] 2010-04-10

[基金项目] 河南省杰出人才创新基金项目(0621002100)

[作者简介] 李厚伟(1981—), 男, 河南商丘人, 在读硕士, 主要从事动物分子免疫学研究。E-mail: lihouwei512027@126.com

[通信作者] 崔保安(1948—), 男, 河南濮阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学及分子免疫学研究。

E-mail: baoancui@henau.edu.cn

but lower for the liver tropism. The existence of PCV2 infection increases the proliferation and replication of the PPV, and enhances the PPV of the pro-infected tissue tropism.

Key words: porcine parvovirus; porcine circovirus type 2; real-time quantitative PCR; distribution *in vivo*

猪细小病毒(Porcine Parvovirus, PPV)是引起妊娠母猪繁殖障碍的主要病原体之一,初产妊娠母猪感染后,会经胎盘侵袭胚胎或胎儿,引起母猪流产、胚胎死亡、胎儿畸形及木乃伊化,致使母猪不孕或反复发情,同时还可引起仔猪的皮炎和腹泻^[1]。猪细小病毒在猪群中检出率甚高,在猪群中的血清抗体阳性率达 50%~80%,给养猪业造成了巨大的经济损失^[2]。猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus type 2, PCV2)是导致断奶仔猪多系统衰竭综合征(Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)的主要病原体之一。PPV 与 PCV2 常混合感染并广泛流行于国内外猪场,严重影响和制约着养猪业的发展^[3]。因此,PPV 的发病机理和致病机制以及 PPV 与 PCV2 混合感染后的相互作用机制,成为当前研究的热点之一。2005 年,Wilhelm 等^[4]建立了针对 PPV VP2 基因的实时定量 PCR 方法。2007 年,Zeeuw 等^[5]利用实时定量 PCR 研究妊娠母猪人工攻毒后 PPV 的组织嗜性,发现 PPV 在肺脏、肾脏、脾脏、淋巴结、子宫中的含量较高。目前,对猪细小病毒致病机制的研究,多集中在人工感染妊娠母猪后病毒在体内的分布规律上,而对自然感染猪细小病毒后猪体内各器官组织中 DNA 相对含量分布的研究尚未见报道;同时也未见 PPV 和 PCV2 混合感染对 PPV 在不同组织分布的影响的报道。为此,本试验利用李明凤等^[6]已成功建立的 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测方法,定量检测自然感染猪器官组织中 PPV DNA 的相对含量,以期为研究 PPV 的分子发病机理及致病机制提供理论参考和试验依据,并为预防控制 PPV、PPV 与 PCV2 混合感染提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 病料的采集

选择河南焦作某猪场 7 头 20 日龄发病仔猪及 3 头疑似 PPV 感染妊娠母猪,其中发病仔猪在临床症状上表现为精神萎靡、消瘦、皮肤苍白、腹股沟淋巴结肿大、皮肤出血点较多,剖检可见肺脏有散在出血斑点,肺尖叶、心叶发生肉变,肾脏乳头出血,腹股沟淋巴结、髂下淋巴结出血、水肿,脾脏边缘呈锯齿状,稍肿;妊娠母猪多次发生流产,屡配不孕并反复

发情,剖杀前无明显症状,解剖发现母猪子宫内膜有轻度炎症,出血,胎盘有部分钙化。无菌采集猪心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、髂下淋巴结、子宫内膜等器官组织作为检测对象,并经病毒分离、中和试验、PCR、ELISA 检测 PPV、PCV2、猪瘟病毒(CSFV)、猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒(PRRSV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、副猪嗜血杆菌(HPS)、刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)等发现,3 头仔猪仅有 PPV 感染,3 头妊娠母猪也仅有 PPV 感染,其余 4 头仔猪混合感染有 PPV 和 PCV2。选用经实验室诊断为无病原感染的 1 头同日龄健康仔猪及 1 头妊娠母猪作为对照,与自然感染猪同步剖杀,采集相同脏器作为阴性对照。

1.2 主要试剂与仪器

TaqTM 酶、SYBR Green PreMix 聚合酶、DNA Marker DL2000 等购自大连宝生物工程有限公司,Protein K 购自华美生物工程公司。PCR 仪购自德国 MJ RESEARCH, Rotor-Gene3000 型实时定量 PCR 扩增仪购自澳大利亚 Corbett Research 公司,紫外凝胶成像系统购自美国 ALPHA INNOTECH 公司。

1.3 引物的设计、样品模板的制备及 PCR 扩增

参照 GenBank 中已发表的猪细小病毒的 VP2 基因序列(登录号:NC001718),设计 1 对引物,PPV-F: 5'-CCAAAAATGCAAACCCCAATA-3', PPV-R: 5'-TCTGCGCGTGTGGAGTTAAG-3', 扩增片段长度 313 bp。参照 GenBank 中已发表的猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因序列(登录号:AF027217),设计 1 对引物 PCV2-F: 5'-CTG TTT CCG AAG CGA GTC CTG GC-3'; PCV2-R: 5'-GGT CTG CAA GAC GCG CCG GAT CG-3', 扩增片段长度 486 bp。其他病原体如 CSFV、PRRSV、PRV、TGEV 等的引物,由河南农业大学河南省动物性食品安全重点实验室提供。引物由 TaKaRa 公司合成。

参考文献[7],采用蛋白酶 K 法提取病料组织中的病毒 DNA 作为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μ L: DNA 模板 1 μ L, Premix Ex Taq DNA 聚合酶 12.5 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, 加灭菌超纯水至 25 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5

min;94 ℃变性 1 min,60 ℃退火 50 s,72 ℃延伸 2 min,33 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。反应结束后,取 5 μL PCR 产物进行 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定,具体操作步骤参照文献[8-9]进行。

1.4 标准 DNA 模板的制备

以河南省动物性食品安全重点实验室构建的含 PPV VP2 基因的重组质粒和含 PCV2 ORF2 基因的重组质粒^[6,9]作为荧光定量 PCR 标准品,分装,置-20 ℃保存备用。

1.5 实时定量 PCR 标准曲线的建立及其特异性、敏感性、重复性试验

采用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒进行实时定量 PCR 试验,具体方法和步骤参照文献[6]进行。

1.6 自然感染猪临床病料样品的检测

应用上述建立的 PPV 荧光定量 PCR 方法,检测 PPV 感染仔猪和妊娠母猪的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、子宫内膜等器官组织,并设阴性对照。每个荧光定量 PCR 反应做 2 个重复。

1.7 数据分析

在实时定量 PCR 中,Ct 值是反映模板中目标基因含量的一个重要指标,通过样品和标准曲线 Ct

值的比较,可以准确计算出 DNA 含量。利用 Rotor-Gene3000 型实时定量 PCR 仪分析软件,计算感染组织器官中的 PPV 含量。

2 结果与分析

2.1 PPV 在仔猪体内的分布

对无菌采集的自然感染 PPV 的 3 头仔猪的肾脏、心脏、肺脏、脾脏、肝脏、髂下淋巴结分别提取 DNA,并进行实时定量 PCR 检测,同时设对照组(PPV 的 DNA 含量为 0),并根据所建立的标准曲线,计算 PPV 在不同组织中的 DNA 含量,结果见图 1。由图 1 可以看出,3 头仔猪体内不同器官组织中 PPV 的含量相差较大,其中肾脏、脾脏和髂下淋巴结中的含量较高,分别达 $5.85 \times 10^5 \sim 1.81 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$, $2.04 \times 10^5 \sim 2.86 \times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$ 和 $1.39 \times 10^5 \sim 1.34 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$,而心脏、肺脏和肝脏中 PPV 的 DNA 含量较低,如心脏中只有 $8.9 \times 10^3 \sim 1.76 \times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$ 。对照组仔猪器官组织检测结果均为阴性。上述结果表明,PPV 对仔猪的肾脏、髂下淋巴结和脾脏的嗜性较高,对肾脏的嗜性尤高。

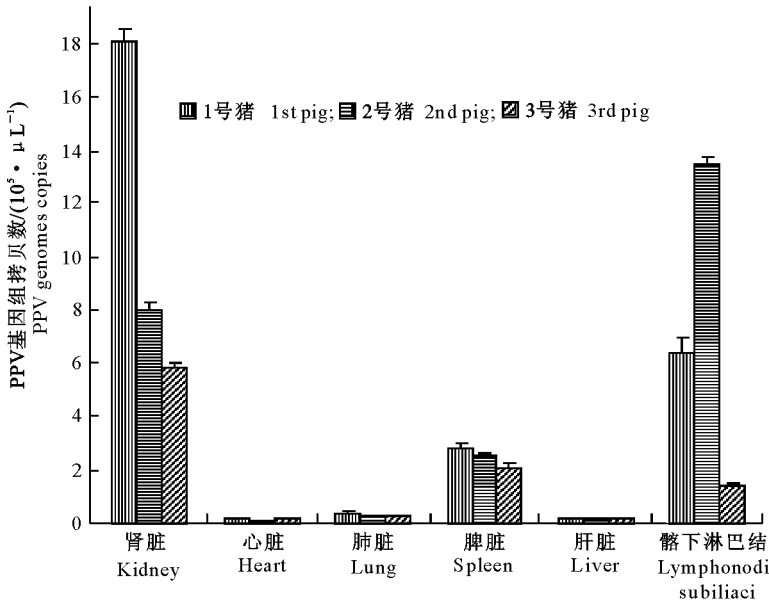


图 1 PPV 在仔猪主要器官组织中的含量

Fig.1 Viral load of the field PPV in organs

2.2 PPV 在妊娠母猪体内的分布

对无菌采集自然感染 PPV 的 3 头妊娠母猪的肾脏、心脏、肺脏、脾脏、肝脏、子宫内膜分别提取 DNA,并进行实时定量 PCR 检测,同时设对照组(PPV 的 DNA 含量为 0),并根据所建立的标准曲

线,计算 PPV 在不同组织中的 DNA 含量,结果见图 2。由图 2 可知,在被检器官组织中均能检测到 PPV,而不同器官组织中含量差异较大,其中子宫内膜、肾脏、脾脏、肺脏中的 PPV 含量相对较高,分别达到 $2.72 \times 10^6 \sim 4.46 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$, $3.67 \times 10^6 \sim$

$5.82 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$, $5.97 \times 10^5 \sim 1.18 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ 和 $4.56 \times 10^5 \sim 6.06 \times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$ 。对照组妊娠猪器官组织检测结果均为阴性。上述结果表明,在妊娠母猪体内,PPV 对子宫内膜、肾脏、脾脏、肺脏等器官组织的嗜性较强。

2.3 PPV 在混合感染 PCV2 仔猪体内的分布

对无菌采集混合感染 PPV 和 PCV2 的 4 头仔猪的肾脏、心脏、肺脏、脾脏、肝脏、髂下淋巴结分别提取 DNA,并进行实时定量 PCR 检测,同时设对照组(PPV 的 DNA 含量为 0),并根据所建立的标准

曲线,计算 PPV 在不同组织中的 DNA 含量,结果见图 3。由图 3 可知,在混合感染 PPV 和 PCV2 的仔猪器官组织中,以肾脏、髂下淋巴结、脾脏和肺脏中的 PPV 含量较高,分别为 $8.08 \times 10^5 \sim 1.24 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$, $8.34 \times 10^5 \sim 1.05 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$, $3.72 \times 10^5 \sim 7.92 \times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$ 和 $3.56 \times 10^5 \sim 5.04 \times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$ 。对照组仔猪器官组织检测结果均为阴性。上述结果表明,PPV 和 PCV2 混合感染时,PPV 呈多脏器分布;与单独感染 PPV 的仔猪相比,PPV 在肺脏中的含量显著增加。

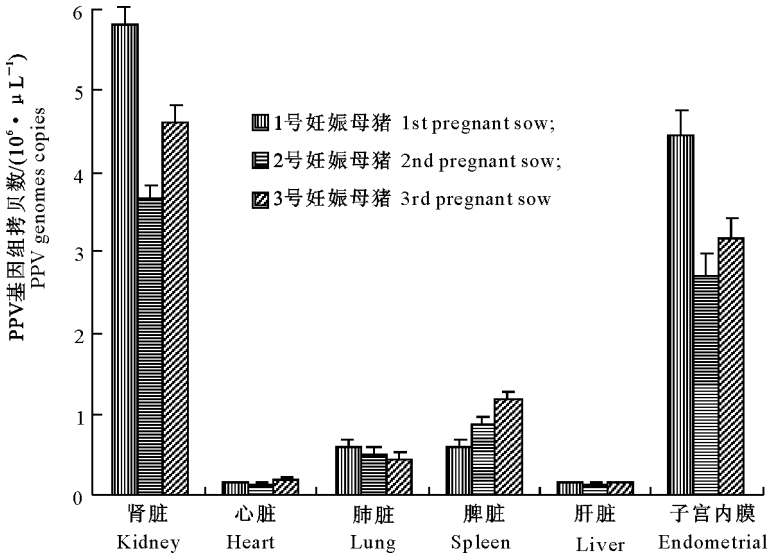


图 2 PPV 在妊娠母猪主要器官组织中的含量

Fig. 2 Viral load of the field PPV in organs of pregnant swine

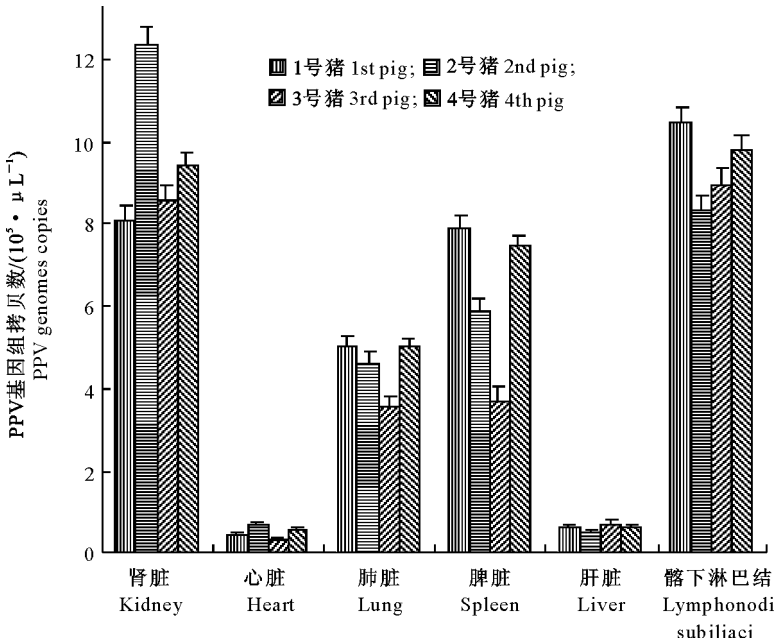


图 3 PPV 在混合感染 PCV2 仔猪主要器官组织中的含量

Fig. 3 Viral load of the field PPV in organs after PCV2 and PPV mixed infection

3 结论与讨论

PPV 是引起母猪流产和新生仔猪死亡的主要病原体之一,同时也能引起某些皮肤病和腹泻,严重影响着猪群的健康和正常生产,给世界养猪业造成了巨大的经济损失。PPV 的临床感染大部分为隐性感染,因此对其致病机理的研究尤为重要,但是目前尚无利用定量检测自然感染猪组织器官中 PPV 含量的分布而研究其致病机理的报道。有研究证实,病猪的临床症状与其体内的病毒核酸载量呈正相关,病毒载量越大,病情越严重^[10-11]。因此,准确定量感染猪体内各器官组织中 PPV 的核酸载量,成为研究 PPV 致病机制的主要手段。目前,已经建立了许多检测猪细小病毒的先进方法,如分子信标实时 PCR、免疫荧光染色、SYBR Green I 荧光定量 PCR、*Taq Man* 荧光定量 PCR 等^[12-15],其中 SYBR Green I 实时定量 PCR 对靶基因能够进行准确定量,检测敏感性高,重复性好,具备快速、敏感、特异、高通量、低成本等优点,适用于感染动物组织病毒载量的定量检测^[16]。为了在低成本前提下实现对 PPV DNA 的准确定量,本试验利用 SYBR Green I 实时定量 PCR 方法对无菌采集的样品进行检测,结果表明,所有被检器官组织中都含有 PPV,但是病毒 DNA 在各器官组织中的分布并不相同。

对感染 PPV 的 3 头仔猪不同器官组织中 PPV 含量的分析发现,PPV 在仔猪的肾脏、脾脏和淋巴结中含量较高,而在肝脏、心脏、肺脏中的含量相对较低,其中肝脏的 DNA 含量最低,这与 Miao 等^[17]报道的结果一致。其原因可能与 PPV 对仔猪肾脏、脾脏和淋巴结的嗜性较强,尤其对免疫器官的嗜性较强有关。Krakowka 等^[18]证实,PPV 与猪的消瘦综合征有关;Bolt 等^[19]证实,PPV 与猪的非化脓性心肌炎有关,且能引起仔猪的皮炎与腹泻等疾病,这是因为 PPV 破坏了免疫器官,导致机体抵抗力下降,更易于其他病原侵入体内。本试验也证实了这一结论。

本试验所检测的 3 头妊娠母猪的肾脏和子宫内 膜中 PPV 含量相对较高,其次是脾脏和肺脏,心脏、肝脏中 PPV 含量最低,由此可推测 PPV 对妊娠母猪的子宫内 膜、肾脏、肺脏、脾脏的嗜性较强,而对肝脏和心脏的嗜性较弱。子宫内 膜是 PPV 的主要靶器官之一,这可能是由于妊娠母猪的子宫内 膜在孕激素和动情素的共同作用下上皮细胞分裂加速,加之妊娠期的细胞免疫抑制,使免疫微环境发生改变,

因此更利于 PPV 的复制。Wilhelm 等^[4]利用荧光定量 PCR,研究妊娠母猪人工攻毒后 PPV 在猪体器官组织中的分布规律,证实 PPV 对脾脏等免疫器官的嗜性较强;2007 年,Zeeuw 等^[5]采用与 Wilhelm 相同的方法,研究妊娠母猪人工攻毒后 PPV 的组织嗜性,证实 PPV 在肺脏、肾脏、脾脏、淋巴结、子宫中的含量较高。本试验利用自然感染猪体为研究对象的结果与此结果一致,进一步证实了 PPV 对妊娠母猪的肾脏、子宫内 膜、脾脏等具有较强的组织嗜性。

PPV 和 PCV2 都是小的单链 DNA 病毒,其编码蛋白的能力很弱,复制要高度依赖于宿主细胞的功能^[20-21]。实验室和临床上均已证实,PPV 和 PCV2 有共同感染的情况^[22-23]。本试验检测 PPV 和 PCV2 混合感染仔猪的器官组织时发现,PPV 在肾脏、淋巴结、脾脏、肺脏中的含量较高,这一结果与仅感染 PPV 仔猪器官组织中 PPV 含量的分布基本一致,但含量增加显著,证实 PPV 与 PCV2 对仔猪主要器官组织具有协同损害和致病作用,这与 Opriessnig 等^[24]的报道基本一致。另外,本试验比较了 PPV 单独感染与 PPV 和 PCV2 混合感染后 PPV 在肺脏的分布,发现 PPV 和 PCV2 混合感染仔猪肺脏中的 PPV 含量显著高于单独感染,这可能是由于协同感染导致肺脏损伤严重,创造了有利于 PPV 增殖的条件,致使 PPV 含量增加。

本试验利用实时定量 PCR 证实,PPV 对仔猪及妊娠母猪的肾脏、脾脏、子宫内 膜和髂下淋巴结的嗜性较强,对肝脏的嗜性较弱;PPV 对 PPV 和 PCV2 混合感染仔猪的肾脏、髂下淋巴结、脾脏、肺脏的嗜性较强,尤其是在肺脏中,PPV 的含量显著增加,表明 PCV2 的存在可促进 PPV 的复制增殖,二者协同作用对感染发病仔猪造成了不可逆转的损害,加速了病猪的死亡。本研究可为规模化猪场 PPV 感染的分子流行病学调查、PPV 分子发病机理研究及疫苗免疫机制研究,提供试验依据和技术手段。

〔参考文献〕

- [1] 殷 震,刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京:科学出版社, 1997:1148-1182.
- [2] Yin Z, Liu J H. Animal virology [M]. 2nd edition. Beijing: Science Press Publishing Company, 1997:1148-1182. (in Chinese)
- [2] Harding M J, Molitor T W. A monoclonal antibody which recognizes cell surface antigen and inhibits porcine parvovirus replication [J]. Arch Virol, 1992, 123: 323-333.
- [3] 温永俊, 吴国军, 蔡雪辉, 等. 猪圆环病毒和猪繁殖与呼吸综合征病毒混合感染对仔猪致病性的评估 [J]. 中国预防兽医学

- 报,2007,29(5):336-337.
- Wen Y J, Wu G J, Cai X H, et al. Pathogenicity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 coinfection in piglets [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2007, 29(5): 336-337. (in Chinese)
- [4] Wilhelm S, Zeeuw E J, Selblitz H J, et al. Tissue distribution of two field isolates and two vaccine strains of porcine parvovirus in foetal organs after experimental infection of pregnant sows as determined by Real-time PCR [J]. Vet Med, 2005, B52: 323-326.
- [5] Zeeuw E J, Leinecker N, Herwig V, et al. Study of virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts [J]. Journal of General Virology, 2007, 88: 420-427.
- [6] 李明凤, 魏战勇, 崔保安, 等. 猪细小病毒 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 浙江农业学报, 2009, 21(3): 220-224.
- Li M F, Wei Z Y, Cui B A, et al. Development of a SYBR-Green I real-time PCR assay for detection of porcine parvovirus [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2009, 21(3): 220-224. (in Chinese)
- [7] 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 463-471.
- Joseph S, Russell D W. Molecular cloning laboratory manual [M]. 3rd ed. Huang P T, translation. Beijing: Science Press Publishing Company, 2002: 463-471. (in Chinese)
- [8] 魏战勇, 王学斌, 黄克和, 等. 猪细小病毒 NJ-1 株 VP2 基因克隆与分析 [J]. 河南农业大学学报, 2007, 41(1): 56-60.
- Wei Z Y, Wang X B, Huang K H, et al. Molecular cloning and antigenicity analysis of the VP2 gene of PPV [J]. Journal of Henan Agricultural University, 2007, 41(1): 56-60. (in Chinese)
- [9] 贾艳艳, 李明凤, 魏战勇, 等. 猪圆环病毒 2 型 SYBR-Green 1 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2009, 37(3): 82-86.
- Jia Y Y, Li M F, Wei Z Y, et al. Development of a SYBR-Green 1 real-time fluorescent quantitative PCR method for detection of type 2 porcine circovirus [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2009, 37(3): 82-86. (in Chinese)
- [10] Yu S, Opriessnig T, Kitikoon P, et al. Porcine circovirus type 2 early infected pigs [J]. Vet Imm Immunopath, 2007, 115: 261-272.
- [11] Alex O, Marina S, Maria C, et al. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by real-time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs [J]. Journal of Virological Methods, 2004, 117: 75-80.
- [12] McKillen J, Hjertner B, Millar A, et al. Molecular beacon real-time PCR detection of swine viruses [J]. Journal of Virological Methods, 2007, 140: 155-165.
- [13] Kang S E, Nam Y S, Hong K W. Rapid detection of enterobacter sakazakii using TaqMan real-time PCR assay [J]. Microbiol Biotechnol, 2007, 17(3): 516-519.
- [14] Susan W, Kevin E B. Development of an improved method of detection of infectious parvovirus B19 [J]. Journal of Clinical Virology, 2006, 35: 407-413.
- [15] Chen H Y, Li X K, Cui B A, et al. A TaqMan-based real-time polymerase chain reaction for the detection of porcine parvovirus [J]. Journal of Virological Methods, 2009, 156: 84-88.
- [16] 危艳武, 刘长明, 袁 婧, 等. 实时定量 PCR 对猪圆环病毒 2 型感染猪体内病毒分布规律的研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(12): 924-928.
- Wei Y W, Liu C M, Yuan J, et al. Detection of porcine circovirus type 2 distributions in the infected pigs by real-time quantitative PCR [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2008, 30(12): 924-928. (in Chinese)
- [17] Miao L F, Zhang C F, Chen C M, et al. Real-time PCR to detect and analyze virulent PPV loads in artificially challenged sows and their fetuses [J]. Vet Microbiol, 2009, 43(6): 1-5.
- [18] Krakowka S, Ellis J A, Meehan B. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus [J]. Vet Pathol, 2000, 37(3): 254-263.
- [19] Bolt D M, Hani H, Muller E. Non-suppurative myocarditis in piglets associated with porcine parvovirus infection [J]. J Comp Pathol, 1997, 117(2): 55-57.
- [20] Cui L, Yao C B, Lu Y H, et al. Epidemiology investigation of co-infection with porcine circovirus type 2 (PCV2), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine parvovirus (PPV) [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University, 2006, 24: 330-334.
- [21] Giammarioli M, Pellegrini C, Casciari C, et al. Development of a novel hot-start multiplex PCR for simultaneous detection of classical swine fever virus, African swine fever virus, porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine parvovirus [J]. Veterinary Research Communications, 2008, 32: 255-262.
- [22] John M, Bernt H, Andrena M, et al. Molecular beacon real-time PCR detection of swine viruses [J]. J Virol Meth, 2007, 140: 155-165.
- [23] Jiang Y H, Shang H W, 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: 172-175.
- [24] Opriessnig T, Fenaux M, Yu S, et al. Effect of porcine parvovirus vaccination on the development of PMWS in segregated early weaned pigs coinfecting with type 2 porcine circovirus and porcine parvovirus [J]. Vet Microbiol, 2004, 98(3/4): 209-220.