

doi: 10. 11751/ISSN. 1002 - 1280. 2020. 01. 01

北京市猪场猪圆环病毒 3 型感染状况调查及其 ORF2 基因遗传进化分析

李蕊¹, 王林^{1*}, 何伟勇^{2*}, 薛水玲¹, 赵景义¹, 傅彩霞¹, 石英男¹,
冯小宇¹, 程敏姮¹, 李栋梁¹, 梅力¹, 郑博君¹

(1. 北京市动物疫病预防控制中心, 北京 102629; 2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

[收稿日期] 2019 - 10 - 17 [文献标识码] A [文章编号] 1002 - 1280 (2020) 01 - 0001 - 08 [中图分类号] S852. 65

[摘要] 为了解猪圆环病毒 3 型(PCV3)在北京市不同区县猪场中的流行情况, 研究建立 PCR 检测方法, 对来自北京市 8 个区县 56 个养殖场的 1177 份临床样品进行检测, 并对获得的部分 ORF2 全基因序列进行遗传进化分析。结果显示, PCV3 总体阳性率为 1.0% (12/1177), 猪场阳性率为 8.9% (5/56)。对 PCV3 阳性样本进行 ORF2 基因测序及同源性比对, 共测得 12 株 PCV3 ORF2 全长基因序列, 其中包括 6 株不同的 ORF2 全长基因序列。结果显示, 该 6 株序列之间的核苷酸相似性为 97.7% ~ 99.5%, 推导氨基酸序列的相似性为 97.2% ~ 100%; 与参考毒株之间的核苷酸同源性为 96.0% ~ 99.5%, 推导氨基酸同源性为 92.1% ~ 100.0%; 进化树显示北京毒株属于 PCV3b 基因型。试验表明, PCV3 在北京多个猪场呈现一定的流行趋势, 流行毒株以 PCV3b 基因型为主。

[关键词] 猪圆环病毒 3 型; PCR 检测; ORF2 基因; 遗传进化分析

Investigation on the Infection Status of Porcine Circovirus Type 3 in Beijing and Phylogenetic Analysis of ORF2 Gene

LI Rui¹, WANG Lin^{1*}, HE Wei - yong^{2*}, XUE Shui - ling¹, ZHAO Jing - yi¹, FU Cai - xia¹,
SHI Ying - nan¹, FENG Xiao - yu¹, CHENG Min - heng¹, LI Dong - liang¹, MEI Li¹, ZHENG Bo - jun¹

(1. Beijing Center for Animal Disease Control and Prevention, Beijing 102629, China;

2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Corresponding authors: WANG Lin, E - mail: Lwang0631@163.com; HE Wei - yong, E - mail: hwy123@cau.edu.cn

Abstract: In order to understand the prevalence of porcine circovirus type 3 (PCV3) in pig farms of different districts and counties in Beijing, a PCR method was established to detect 1177 clinical samples from 56 farms of 8

基金项目: 北京市农业农村局农业科技项目(20190118)

作者简介: 李蕊, 兽医师, 兽医硕士, 从事动物疫病诊断技术研究。

通讯作者: 王林, E - mail: Lwang0631@163.com; 何伟勇, E - mail: hwy123@cau.edu.cn

districts and counties in Beijing, and the obtained ORF2 whole - genome sequence was analyzed. The results showed that the overall positive rate of PCV3 was 1.0% (12/1177), and that of pig farm was 8.9% (5/56). The ORF2 gene sequencing and homology comparison of PCV3 positive samples were carried out. A total of 12 PCV3 ORF2 full - length gene sequences were obtained, including 6 different ORF2 full - length gene sequences. The results showed that the nucleotide similarity was 97.7% ~ 99.5%, and the deduced amino acid sequence similarity was 97.2% ~ 100%. The nucleotide homology with reference strain was 96.0% ~ 99.5%, the deduced amino acid homology was 92.1% ~ 100.0%. The phylogenetic tree showed that Beijing virus belonged to PCV3b genotype. The assay showed that PCV3 had a certain epidemic trend in many pig farms in Beijing, and PCV3b genotype was the main epidemic strain.

Key words: porcine circovirus type 3; PCR detection; ORF2 gene; phylogenetic analysis

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)是呈二十面体对称、无囊膜的单股环状负链 DNA 病毒,是目前发现的可以自主复制的最小哺乳动物病毒^[1]。目前存在 PCV1、PCV2 和 PCV3 三种血清型^[2]。PCV3 基因组长为 2.0 kb,其基因组共有 3 个开放阅读框(Open reading frame, ORF),分别编码与圆环病毒同源的 REP 蛋白、Cap 蛋白和一个特有的 ORF3 蛋白^[3]。Cap 蛋白是 PCV 的主要结构蛋白,可以在动物体内诱导产生特异性免疫反应。2015 年 6 月,美国堪萨斯州立大学、爱荷华州立大学和史密斯菲尔德的研究人员发现一种新型的圆环病毒,命名为 PCV3^[4]。随后,Stadejek 等^[5]对波兰境内 14 个商品化猪场猪群血清作 PCV3 检测,首次证实欧洲存在 PCV3 感染。Kwon 等^[6]对韩国猪场的猪唾液样品进行了 PCV3 检测,首次发现 PCV3 感染与流行在韩国猪群也存在。2017 年宋长绪课题组对我国华南地区部分猪场进行 PCV3 的检测,并报道了我国首例 PCV3^[7]。何启盖课题组从 11 个省份地区均检出 PCV3,并表明可以从不同的组织中检测到 PCV3^[8]。

为了解 PCV3 在北京地区不同猪场中的流行情况,本研究拟通过建立 PCR 方法,对 2017 - 2018 年间北京地区不同猪场采集的样品进行 PCV3 检测,并对扩增的 ORF2 全基因序列进行遗传进化树分析,为北京地区防控 PCV3 提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 T Guide S32 磁珠法病毒 DNA/RNA

提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; DNA Marker、2 × Trans Taq - T PCR Super Mix、GelStain(EB 替代染料)、50 倍 TAE 电泳缓冲液(100 mL)、PBS pH 7.2 basic(1 ×)、Gel Extraction Kit、PMD18 - T 载体购自北京全式金生物技术有限公司; Trans10 感受态细胞购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 临床样品及毒株 采集 2017 年 8 月 - 2018 年 7 月期间北京市 8 个区县 56 个养殖场的临床样品,包括血清、扁桃体、淋巴结等,共采集 1177 份。PCV2 和 PCV3 阳性质粒由河北农业大学惠赠。PRV、PRRSV、CSFV 核酸均由疫苗中提取,保存于北京市动物疫病预防控制中心实验室。

1.3 样品采集 对北京市种场、规模场、散户进行随机血液抽样,流产、死胎以每窝取一只为原则进行无菌剖检,分别采集扁桃体、淋巴结、肾、肺、脾组织。冷藏运输, - 20 °C 冷冻备用。

1.4 PCV3 PCR 检测方法的建立

1.4.1 检测引物设计 PCV3 引物设计基于 GenBank 中已公布的 PCV3 全长基因序列,选取保守区域设计 PCV3 检测引物(表 1)。

表 1 PCV3 检测引物

Tab 1 Primers used for PCV3 detection

引物名称	引物序列(5' - 3')	PCR 产物长度/bp
PCV3 - F	TTTCCGCATAAGGGTCGTC	326
PCV3 - R	AAGCGCTATGTCAGAAGAAACT	

1.4.2 PCR 扩增 以提取的样品 DNA 为模板进行 PCR 检测, 25 μL 反应体系如下: Mix 反应液 12.5 μL , 上游引物和下游引物各 0.25 μL , ddH₂O 9 μL , DNA 模板 3 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 35 个扩增循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.4.3 电泳检测 配制 1% 琼脂糖凝胶, 取 10 μL PCR 产物进行电泳, 凝胶成像仪观察结果, 并取阳性 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证。

1.4.4 灵敏度实验 将合成的质粒进行 10 倍的倍比稀释, 由 1 ng/ μL 稀释到 1×10^{-5} ng/ μL 6 个梯度, 以不同稀释度为模板, 对扩增产物进行琼脂糖电泳, 以能检出清晰特异性条带的最大稀释倍数为本方法的检测极限。

1.4.5 特异性实验 利用 PCV3 PCR 检测方法, 同时扩增 PCV2、PCV3、PRV、PRRSV、CSFV 等 DNA 模板, 若只有 PCV3 扩增出 326 bp 的条带, 其他病毒均未扩增出条带, 并将扩增出的 PCV3 目的片段的 PCR 产物进行测序鉴定, 测序结果若为目的片段, 可表明该 PCV3 引物具有高度特异性。

1.5 PCV3 ORF2 基因序列的测定

1.5.1 巢式 PCR 引物设计 根据 PCV3 ORF2 片段设计测序巢式 PCR 引物, 为保证测序结果准确性, 扩增产物均长于 ORF2 全长。引物信息见(表 2)。

1.5.2 PCR 扩增 以 PCV3 检测阳性样本的 DNA 为模板, PCV3 - ORF2 - F、PCV3 - ORF2 - R 作为上下游引物, 进行 PCR 扩增, 50 μL 反应体系如下: Mix 反应液 25 μL , 上游引物和下游引物各 1 μL , ddH₂O 19 μL , DNA 模板 4 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 35 个扩增循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 70 s), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

再以 PCR 产物为模板, PCV3 - ORF2 - n1F、PCV3 - ORF2 - n1R 作为上下游引物, 进行 PCR 扩增, 50 μL 反应体系如下: Mix 反应液 25 μL , 上游引物和下游引物各 1 μL , ddH₂O 22 μL , DNA 模板

表 2 PCV3 ORF2 片段扩增引物

Tab 2 Primers used for PCV3 ORF2 amplification and sequencing

引物名称	引物序列(5' - 3')	PCR 产物长度/bp
PCV3-ORF2-F	TTGCACCTGTGTACAATTATTGCC	1075
PCV3-ORF2-R	ATCTTCAGGACACTCGTAGCACCAC	
PCV3-ORF2-n1F	CCACATGCGAGGGCGTTTAC	830
PCV3-ORF2-n1R	GATACCACTTTTTCTCCCTACAG	

1 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 35 个扩增循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 70 s), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.6 序列分析 对 PCV3 ORF2 片段进行扩增, 进行 TA 克隆、DNA 测序后, 通过序列分析软件 MEGA 6.0、MegAlign 对 PCV3 的 ORF2 基因核苷酸序列进行分析。选取 GenBank 中收录的序列作为参考, 分析 ORF2 基因的遗传演化关系。

从 NCBI GenBank 中选取 52 株不同国家、不同省份的 PCV3 ORF2 全长基因序列(表 3)作为参考, 进行 ORF2 基因的分子特征及遗传演化分析。

2 结果与分析

2.1 PCV3 PCR 检测方法的建立

2.1.1 PCV3 PCR 扩增 使用设计引物, 以质粒作为阳性对照, 对临床样本进行扩增, 电泳后可以扩增出 326 bp 目的片段(图 1)。

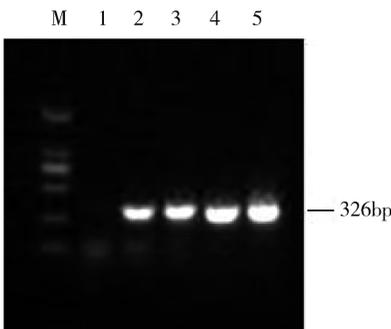
2.1.2 PCV3 检测方法的灵敏度实验 PCR 扩增及电泳结果显示, 当质粒稀释到 1×10^{-3} ng/ μL 能检测出目的条带, 1×10^{-4} ng/ μL 检测不到目的条带(图 2), 本方法的灵敏度为 1×10^{-3} ng/ μL 。

2.1.3 PCV3 检测方法的特异性实验 PCR 扩增及电泳检测结果显示, 只有 PCV3 扩增出 326 bp 的条带, 其他病毒及阴性对照均未扩增出条带(图 3)。随机取 PCR 阳性产物测序, 经 NCBI BLAST 比对, 结果显示 PCR 产物为 PCV3 片段, 表明 PCV3 检测方法使用的引物具有高度特异性。

表 3 下载自 GenBank 的 PCV3 ORF2 参考序列信息

Tab 3 The reference sequences of PCV3 ORF2 downloaded from GenBank

来源地	GenBank 登录号				
泰国	MG310152.1				
美国	KX966193.1	KX898030.1	KX778720.1		
巴西	MF079254.1	MF079253.1			
俄罗斯	MG679917.1	MG679916.1			
韩国	KY996338.1	KY996337.1	KY996339.1		
意大利	MF162299.1	MF162298.1			
中国 河北	MF139082.1	MF769805.1	MF460442.1	MF318449.1	MF318448.1
中国 河南	MF769809.1	KY354045.1			
中国 江苏	MF769807.1	MF769806.1			
中国 广西	MG250184.1	MG250179.1	MG250178.1		
中国 北京	MF318453.1				
中国 福建	KY924474.1	KY924473.1	KY924475.1	KY354044.1	
中国 湖北	KY354070.1	KY354069.1			
中国 广东	KY418606.2	MF069115.1	MF405275.1		
中国 江西	MF589134.1	MF589132.1	MF589107.1	MF589106.1	
中国 辽宁	KY354047.1	KY354046.1			
中国 湖南	MF589126.1	MF589125.1			
中国 重庆	KY075992.1	KY075991.1			
中国 海南	MF496982.1				
中国 上海	KY865243.1	KY865242.1			
中国 安徽	MF084994.1				
中国 山东	KY778777.1	KY778776.1			
中国 长春	KY421348.1				

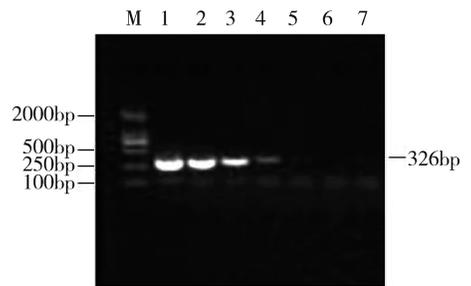


M: DNA Marker; 1: 阴性对照; 2: 阳性对照; 3-5: 部分临床样本

M: DNA Marker; 1: negative control; 2: positive control;
3-5: clinical samples

图 1 PCV3 临床样本 PCR 检测

Fig 1 Detection of PCV3 in clinical samples by PCR



M: DNA Marker; 1-6: 不同稀释浓度质粒

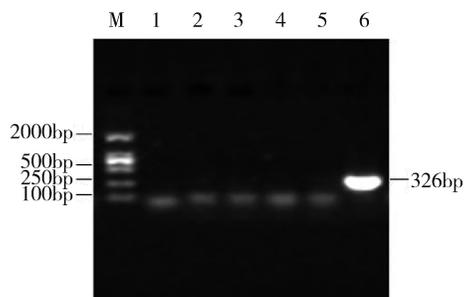
(1 ng/μL ~ 1 × 10⁻⁵ ng/μL); 7: 阴性对照

M: DNA Marker; 1-6: plasmid of different concentrations

(1 ng/μL ~ 1 × 10⁻⁵ ng/μL); 7: negative control

图 2 PCV3 检测方法灵敏度实验

Fig 2 The sensitivity of the PCV3 PCR detection



M: DNA Marker; 1-4: 依次为 PCV2、PRV、PRRSV、CSFV;
5: 阴性对照; 6: PCV3 质粒

M: DNA Marker; 1-4: PCV2、PRV、PRRSV、CSFV;
5: negative control; 6: PCV3 plasmid

图 3 PCV3 检测方法特异性实验

Fig 3 The specific test of the PCV3 PCR detection

2.2 临床样品 PCV3 的 PCR 检测 本研究共检测了 2017 年 8 月 - 2018 年 7 月期间采集自北京市 8 个区县的 1177 份临床样品。采集样品包括: 死胎 47 只、流产 5 只、病死猪 6 只、血清 1019 份、扁桃体 100 份。养殖场包括: 种场 27 个、规模场 6 个、散户 19 个、屠宰场 4 个, 共计 56 个场户。表 4 结果显示, PCV3 检测场阳性率为 8.9% (5/56), 样品阳性率为 1.0% (12/1177)。

表 4 样品来源及 PCV3 检测结果

Tab 4 Origin of the samples and the PCV3 detection results

区县编号	采样场数	阳性场数	场阳性率	样品数	阳性样品数	样品阳性率
1	29	4	13.8%	677	11	1.6%
2	3	0	0.0%	105	0	0.0%
3	1	0	0.0%	4	0	0.0%
4	4	0	0.0%	133	0	0.0%
5	2	0	0.0%	9	0	0.0%
6	3	1	33.3%	11	1	9.1%
7	6	0	0.0%	92	0	0.0%
8	4	0	0.0%	46	0	0.0%
屠宰场	4	0	0.0%	100	0	0.0%
合计	56	5	8.9%	1177	12	1.0%

2.2.1 不同组织中 PCV3 检出情况 根据采集临床样品种类的不同, 进行了统计分析 (表 5), 养殖场户总数为 58 个场 (户)。结果显示, PCV3 只在血清中检测出, 组织样品中均未检测到 PCV3。

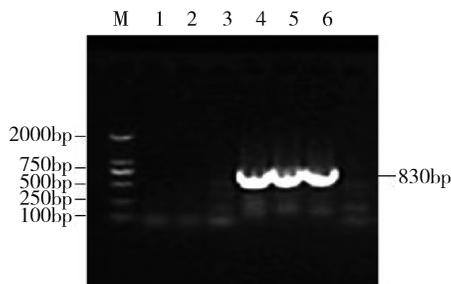
表 5 不同样品 PCV3 阳性率

Tab 5 PCV3 positive rate of different sample types

样品种类	场数	阳性场数	场阳性率	采集样品数	阳性样品数	样品阳性率
死胎	6	0	0.0%	47	0	0.0%
流产	2	0	0.0%	5	0	0.0%
病死猪	1	0	0.0%	6	0	0.0%
血清	45	5	11.1%	1019	12	1.2%
扁桃体	4	0	0.0%	100	0	0.0%
合计	58	5	8.6%	1177	12	1.0%

不同样品种类的统计中, 包含重复统计的场户, 故场数比实际多

2.3 PCV3 ORF2 基因的巢式 PCR 扩增及变异分析 利用 PCR 方法扩增 PCV3 ORF2 全长基因, 使用 ORF2 引物 (PCV3 - ORF2 - F、PCV3 - ORF2 - R) 未能扩增出 1075 bp 大小目的条带, 使用巢式 PCR 方法进行 PCR 检测, 产物经琼脂糖凝胶电泳扩增出清晰 830 bp 条带 (图 4)。



M: DNA Marker; 1: 阴性对照; 4-6: 阳性样本的 ORF2 全长扩增

M: DNA Marker; 1: negative control; 4-6: the amplification products of the positive samples

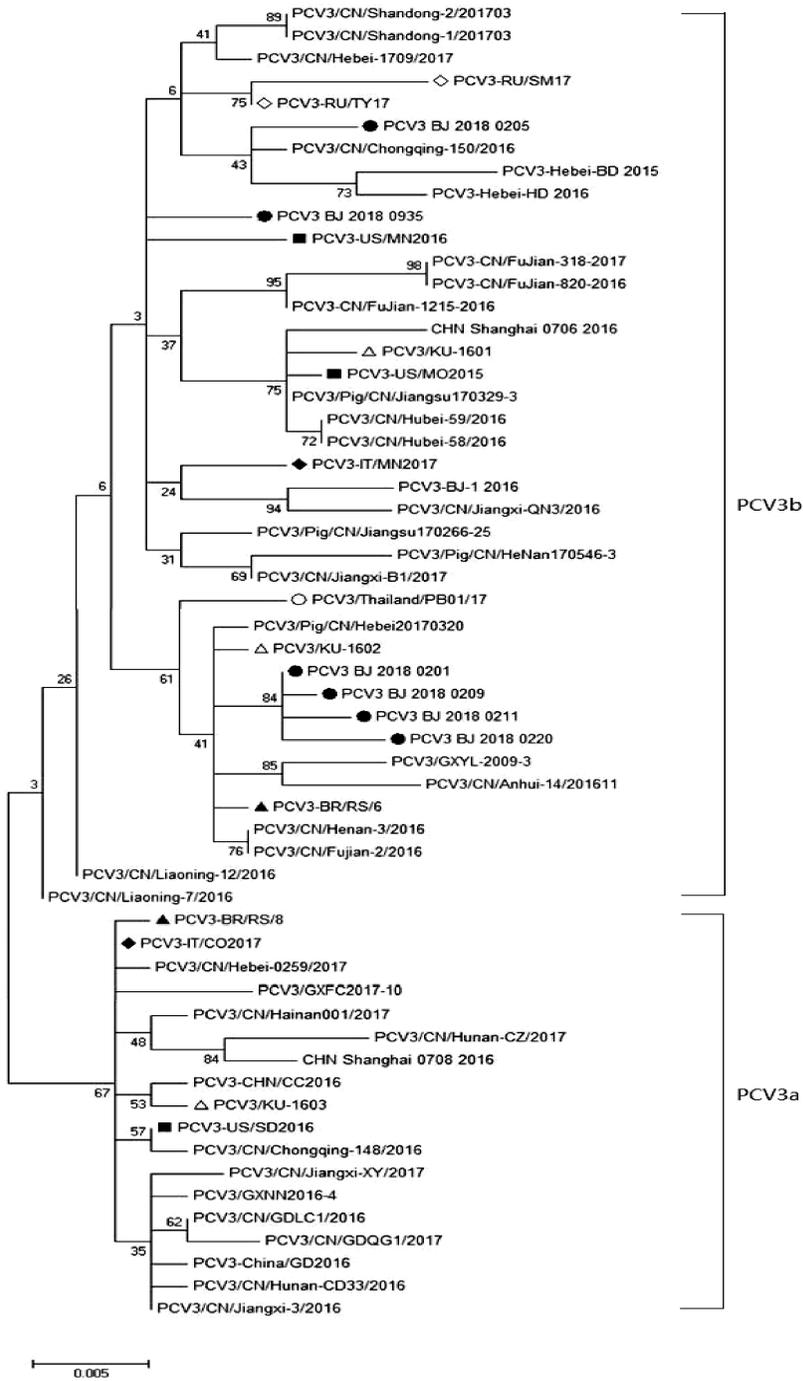
图 4 PCV3 ORF2 全长基因的巢式 PCR 扩增

Fig 4 Amplification of PCV3 ORF2 genes by nested PCR

2.4 PCV3 ORF2 序列分析 本实验共测得 12 株 PCV3 ORF2 全长基因序列, 长度为 645 nt, 编码 214 个氨基酸。使用 MegAlign 软件中 Clustal W 方法分析同源性, 结果显示该 12 株序列之间的核苷酸相似性为 97.7% ~ 100.0%, 12 株中有 7 株序列一致。6 株不同序列之间核苷酸相似性为 97.7% ~ 99.5%; 推导氨基酸序列的相似性为 97.2% ~ 100%。与从 GenBank 下载的序列相比, 同源性为 96.0% ~ 99.5%, 推导氨基酸同源性为 92.1% ~ 100.0%。

运用 MEGA 6.0 软件将本实验获得的 6 株不同的 PCV3 ORF2 基因与从 GenBank 下载的 52 条

序列,使用 Maximum Likelihood 方法,Bootstrap 计算 1000 次,绘制进化树(图 5)。



● 为本实验测得的序列; ■ 为美国测得的序列; ◆ 为意大利测得的序列; ▲ 为巴西测得的序列;
 △ 为韩国测得的序列; ○ 为泰国测得的序列; ◇ 为俄罗斯测得的序列

● Indicate the sequences obtained in this study; ■ Indicate the sequences obtained in USA; ◆ Indicate the sequences obtained in Italy;
 ▲ Indicate the sequences obtained in Brazil; △ Indicate the sequences obtained in South Korea;
 ○ Indicate the sequences obtained in Thailand; ◇ Indicate the sequences obtained in Russia

图 5 依据 PCV3 ORF2 基因核苷酸序列绘制的进化树

Fig 5 Phylogenetic tree based on the complete sequences of PCV3 ORF2

从进化树分析可看出主要分为两大亚群: PCV3a 和 PCV3b。本实验所得 6 条序列及 GenBank 中收录的北京毒株 PCV3 - BJ - 1 - 2016 (MF318453.1)、俄罗斯毒株 PCV3 - RU/SM17 (MG679917.1) 和 PCV3 - RU/TY17 (MG679916.1)、韩国毒株 PCV3/KU - 1601 (KY996337.1) 和 PCV3/KU - 1602 (KY996338.1)、美国毒株 PCV3 - US/MN2016 (KX898030.1) 和 PCV3 - US/MO2015 (KX778720.1)、意大利毒株 PCV3 - IT/MN2017 (MF162299.1)、巴西毒株 PCV3 - BR/RS/6 (MF079253.1) 处于一个大分支上属于 PCV3b 基因型。

其中 PCV3_BJ_2018_0201、PCV3_BJ_2018_0209、PCV3_BJ_2018_0211、PCV3_BJ_2018_0220 这四条序列在一个小分支上,说明它们亲缘性非常接近;PCV3_BJ_2018_0935、PCV3_BJ_2018_0205 处于一个大分支上,说明它们亲缘性较近;另外 PCV3_BJ_2018_0205 与 PCV3/CN/Chongqing - 150/2016、PCV3 - Hebei - BD2015、PCV3 - Hebei - BD2016 处于一个小分支上,说明其亲缘性更为接近。

3 讨论与结论

PCV3 是近年来发现的新型病毒,各研究学者的流行病学调查研究证明,PCV3 已在世界及我国广泛蔓延。本研究通过建立 PCV3 的 PCR 检测方法对北京地区 2017 - 2018 年采集的样本进行检测,并对获得的 ORF2 序列进行遗传进化树分析,了解北京地区的 PCV3 的流行情况,建立了 PCV3 的 PCR 检测方法,具有较强的特异性,灵敏度性可达到 $1 \times 10^{-3} \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。张志建立了猪圆环病毒 3 型半巢式 PCR 方法,该方法敏感性可达到 $5 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{mL}$,阳性检出率可达到 27.5%,与常规 PCR 检出率 6.25% 相比有着更强敏感性^[9]。本检测方法的灵敏度与上述半巢式 PCR 方法相近,说明本研究建立的 PCV3 的 PCR 检测方法灵敏度可以满足检测需要。本研究检测结果显示,北京市部分猪场存在 PCV3 感染,所检测样品中 PCV3 总体阳性率 1.0%,场阳性率为 8.9%。何泌承对 2014 年 2 月 - 2017 年 11 月全国 25 个省、自治区和直辖市 152 个猪场 505 份样品进行检测,其中北京市猪场

阳性率为 11.1% (1/9),样品阳性率为 1.6% (1/61)^[10]。本研究检测阳性率情况与其基本相符,可能由于其采集样品为病死猪组织,且样品数量较少,阳性率与本检测数据相比稍高。本研究只在血清中检测到 PCV3,且只在散户血清中检测到。何启盖课题组在 11 个省份地区采集的脑、肺、淋巴结、扁桃体、精液、血清中均检测到 PCV3,检出率最高的是大脑 73.5%,而血清检出率仅为 28.7%,其他组织样本均比血清检出率高,说明 PCV3 具有组织泛嗜性,可感染多种组织^[8]。可能由于本研究组织病料采集于种场及规模场,采集范围较小,未能在组织中检测到 PCV3。冯选榕(2017 年)首次在广西某市屠宰健康猪群内检出 PCV3^[11],本研究未在北京市屠宰场内检测出 PCV3,可能与屠宰场样品数量和样品采集方法有关。本研究只在北京两个区县检测出 PCV3 阳性,未出现大范围感染的情况,但由于感染区域方位相差较远,怀疑由不同传染源传入北京,若不加强 PCV3 的防控工作,随着散户猪群的流动极易扩大我市感染面积。

本研究由于 PCV3 阳性全部自血清中检测出,在进行 ORF2 扩增时,由于病毒含量较少,未能扩出目的条带。而巢式 PCR 具有特异性强和敏感性高的特点,适合病毒含量较少的组织样品或细胞的检测,因此本研究设计的 ORF2 巢式 PCR 引物扩增出了目的条带,并且扩增产物均长于 ORF2 的全长,保证了下一步测序的准确性,为临床上 PCV3 Cap 蛋白的研究提供了更为灵敏的扩增方法。本研究获得了 12 条 PCV3 ORF2 基因全长序列,其中有 7 条序列相似性为 100%,该 7 条相同序列的样品均采自同一区县,同一乡镇,考虑可能是同一传染源。尽管 6 株不同 ORF2 核苷酸序列存在一定的变异,但有不同毒株的核苷酸之间产生了同义突变,造成多条序列推导出的氨基酸序列相似性为 100%,说明 PCV3 在进化过程中变异程度不大。PCV3 ORF2 基因遗传进化分析表明,PCV3 毒株主要存在 2 个亚型,即 PCV3a 和 PCV3b,与 Ku^[8] 和 Fux^[12] 等的分型一致。本研究获得的毒株均为 PCV3b 基因型。

另外,湛洋等在疑似 PDNS 综合征病料中检测到 PCV2、PCV3,并对 PCV2 和 PCV3 的 Cap 进行了研究,发现 PCV2 和 PCV3 的 Cap 蛋白结构及抗原性存在明显差异,因此推测 PCV2 和 PCV3 间无交叉免疫保护特性^[13]。因此加快对 PCV3 疫苗研究的步伐,对控制 PCV3 的流行是非常必要的。

参考文献:

- [1] Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, *et al.* A very small porcine virus with circular single-stranded DNA [J]. *Nature*, 1982, 295(5844): 64-66.
- [2] Hattermann K, Roedner C, Schmitt C, *et al.* Infection studies on humancell lines with porcine circovirus type 1 and porcine circovirus type 2 [J]. *Xenotransplantation*, 2004, 11(3): 284-294.
- [3] Li L, Kapoor A, Slikas B, *et al.* Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces [J]. *J Virol*, 2010, 84(4):1674-1682.
- [4] Palinski R, Pineyro P, 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): 1879-1916.
- [5] Stadejek T, Wozniak 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.
- [6] Kwon T, Yoo S J, Park CK, *et al.* Prevalence of novel porcine circovirus 3 in Korean pig populations[J]. *Vet Microbiol*, 2017, 207(8): 178-180.
- [7] Shen H, Liu X, Zhang P, *et al.* Genome characterization of a porcine circovirus type 3 in South China[J]. *Transboundary & Emerging Diseases*, 2018, 65(1):264-266.
- [8] Ku X, Chen F, Li P, *et al.* Identification and characterization of porcine circovirus type 3 in China [J]. *Transboundary & Emerging Diseases*, 2017, 64(3): 703-708.
- [9] 张志,赫占武,杨旭兵,等. 猪圆环病毒 3 型半巢式 PCR 方法的建立和应用[J]. *中国动物检疫*,2018, 35(1): 81-84.
Zhang Z, He Z W, Yang X B, *et al.* Establishment and application of porcine circovirus type 3 semi-nested PCR method [J]. *Chinese Animal Quarantine*, 2018, 35(1): 81-84.
- [10] 何泌承. PCV3 分子流行病学监测及其衣壳蛋白多克隆抗体的制备[D]. 北京. 中国农业大学硕士学位论文,2018.
He B C. Epidemiology monitoring of PCV3 and preparation of polyclonal antibody against capsid protein [D]. Master's Thesis of China Agricultural University, Beijing, 2018.
- [11] 冯选榕. 广西某市屠宰猪淋巴结 PCV2 和 PCV3 的病原检测及遗传进化分析[D]. 广西大学专业学位硕士学位论文,2017.
Feng X R. Pathogen detection and genetic evolution analysis of lymph node PCV2 and PCV3 in slaughter pigs in a city of Guangxi [D]. Guangxi University of Guangxi Professional Degree Master's Thesis, 2017.
- [12] Fux R, Sockler C, Link E K, *et al.* Full genome characterization of porcine circovirus type 3 isolates reveals the existence of two distinct groups of virus strains [J]. *Virology Journal*, 2018, 15(1): 15-25.
- [13] 湛洋,王东亮,王乃东,等. 猪圆环病毒 3 型检测及其 Cap 结构序列和抗原性预测分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(6): 1076-1084.
Zhan Y, Wang D L, Wang N D, *et al.* Detection of porcine circovirus type 3 and its Cap structure sequence and antigenicity prediction analysis [J]. *Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2017, 48(6): 1076-1084.

(编辑:李文平)