

密级:

论文编号:

中国农业科学院 学位论文

PCV2 感染与免疫血清 IgG、IgM 抗体变化特征研究及其 ELISA 检测方法的建立

Study on the Dynamic Changes of Specific IgG and IgM
Antibodies against PCV2 Infected and Immunized Swine Based
on the ELISA Assays

硕士研究生: 高雪

指导教师: 尹双辉副研究员

申请学位类别: 兽医硕士

专业领域名称: 兽医

培养单位: 兰州兽医研究所
研究生院

2019 年 5 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation

Study on the Dynamic Changes of Specific IgG and IgM Antibodies against PCV2 Infected and Immunized Swine Based on the ELISA Assays

M.S. Candidate: Gao Xue

Supervisor: Associate Prof. Yin Shuanghui

Degree: Master of Veterinary Medicine

Specialty: Veterinary

May 2019

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：高雪

时间：2019年6月3日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

研究生签名：高雪

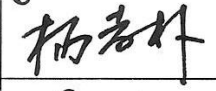
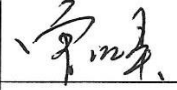
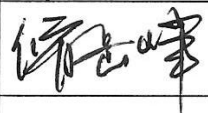
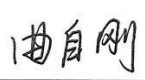
时间：2019年6月3日

导师签名：郭双辉

时间：2019年6月3日

中国农业科学院

硕士学位论文评阅人、答辩委员会签名表

论文题目		PCV2 感染与免疫猪的血清特异性 IgM、IgG 抗体变化特征研究					
论文作者		高雪	专业领域	兽医	研究方向	不区分研究方向	
指导教师		尹双辉		培养单位（研究所）		兰州兽医研究所	
姓名		职称	硕(博)	单 位	专 业	签 名	
评 阅 人	张彦明	教授	硕导 ☐ 博导 ☒	西北农林科技大学	预防兽医学		
	尚佑军	副研究员	硕导 ☒ 博导 ☐	中国农业科学院 兰州兽医研究所	预防兽医学		
答 辩 主 席	章金刚	教授	硕导 ☐ 博导 ☒	军事医学科学院 血液研究所	免疫学		
答 辩 委 员	姚火春	教授	硕导 ☐ 博导 ☒	南京农业大学	预防兽医学		
	杨孝朴	教授	硕导 ☒ 博导 ☐	甘肃农业大学	基础兽医学		
	曾巧英	教授	硕导 ☐ 博导 ☒	甘肃农业大学	预防兽医学		
	孙晓林	教授	硕导 ☒ 博导 ☐	甘肃农业大学	预防兽医学		
	关贵全	研究员	硕导 ☒ 博导 ☒	兰州兽医研究所	预防兽医学		
	储岳峰	研究员	硕导 ☐ 博导 ☒	兰州兽医研究所	预防兽医学		
				硕导 ☐ 博导 ☐			
会议记录（秘书）							
论文答辩时间地点			2019 年 5 月 19 日，国家重点实验室 5 楼会议室				

摘 要

猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus type 2, PCV2)感染会引起机体免疫功能紊乱、免疫抑制,多种病原继发感染和混合感染,给养猪业造成极大的损失。PCV2 持续性感染导致猪群的血清抗体阳性率居高不下,接种疫苗产生的抗体与自然感染产生的抗体无法有效区分,这是目前疫苗免疫防控面临的巨大挑战。鉴于此,本研究通过监测猪群中 IgG 和 IgM 抗体的动态变化规律,发现 PCV2 特异性 IgM 抗体的存在时间和存在状态在区分疫苗免疫和病毒感染方面发挥重要作用,基于此,分别建立了基于 SPG 的检测 PCV2 IgG 抗体的捕获 ELISA 和以抗猪 IgM 多抗为捕获抗原的检测 PCV2 IgM 抗体的捕获 ELISA 方法,综合两种抗体诊断方法的判定结果可为判断猪群感染状态和疫苗接种时机提供科学指导。研究内容可分为以下三个部分:

1. 分析 PCV2 感染和免疫后猪群产生的 IgG 和 IgM 抗体消长规律

利用 PCV2 商品化灭活疫苗和细胞分离毒株分别免疫和感染抗体阴性猪,接种后定期采集外周血并分离血清,进口试剂盒 INGEZIM IgG/IgM Kit 检测血清样品。通过监测抗体的消长变化,发现免疫和感染后 IgM 抗体首先产生,随后转变为 IgG 抗体,且持续存在;人工感染 PCV2 细胞毒产生的 IgM 存在时间为 20-30 d,自然感染(感染组的阳性对照)产生的 IgM 持续 55 d,而接种灭活疫苗的免疫组 IgM 的存在时间不超过 14 d。PCV2 IgM 抗体产生特点可以优化免疫程序,区分病毒感和疫苗免疫,首先免疫前应该避开 IgM 抗体阳性期;免疫后若 IgM 抗体变为阴性,在下次接种疫苗之前若检测结果为阳性,那么必定出现了新一轮的 PCV2 感染,此时不建议追加免疫。

2. 基于 SPG 建立检测 PCV2 IgG 的捕获 ELISA

通过比较 SPA、SPG 和 PPL 三种免疫球蛋白结合蛋白作为捕获抗原、HRP 标记的 PCV2 Cap 作为二抗的捕获法 ELISA,确定 SPG 为包被抗原,优化反应条件,绘制 ROC 曲线确定临界值(cut-off point, cut-off 值)为 0.61,此时对应的敏感性和特异性分别为 93.9%和 90.3%。187 例临床样本的检测结果显示,该方法与商业化的 INGEZIM Circovirus IgG Kit 的总符合率为 96.23%。

3. 建立捕获 ELISA 检测 PCV2 IgM 抗体

以兔抗猪 native IgM 高免血清做包被抗原,HRP 标记的 R2346 作为二抗,建立检测猪抗 PCV2 IgM 抗体的 ELISA 方法。优化该方法的最佳反应条件后,绘制 ROC 曲线判定 cut-off 值为 0.492,对应的敏感性和特异性分别为 96.7%和 97.2%;检测田间血清样品 IgM 与 INGEZIM IgM Kit 试剂盒符合率为 92.7%。

本研究分别建立检测 PCV2 IgG 和 IgM 抗体的捕获 ELISA,为优化疫苗免疫程序、PCV2 的早期快速诊断和区分病毒感和疫苗免疫提供了简单有效的途径,为进一步控制 PCV2 在猪场中的流行传播提供了可靠依据。

关键词: 猪圆环病毒 2 型, 免疫球蛋白 G, 免疫球蛋白 M, 酶联免疫吸附试验, 感染和免疫

Abstract

Infection with porcine circovirus type 2 (PCV2) causes immune dysfunction and immunosuppression in the body, resulting in secondary and mixed infections with other pathogens and occurrence of diseases, which give great losses to swine industry. PCV2 persistent infection caused a high positive rate of serum antibodies in pigs, and the antibodies produced by vaccination could not be effectively distinguished from those produced by natural infection. It has become the current biggest challenge of vaccine immunization prevention and control. In view of this, it was found that the existence time and state of PCV2 specific IgM antibodies play an important role in distinguishing vaccine immunity from viral infection by monitoring the dynamic changes of IgG and IgM antibodies in pigs. Based on this, the capture ELISA method for detecting PCV2 IgG antibody based on SPG and the capture ELISA method for detecting PCV2 IgM antibody with anti-pig IgM polyanitbody as capture antigen were established, respectively. The diagnosis results of the two antibody detection methods can provide scientific guidance for judging the status of swine infection and the timing of vaccination. The content of the study can be divided into the following three parts:

1. To analyze the regularity of IgG and IgM antibody growth and decline after PCV2 infection and immunization in pigs

We used PCV2 commercial inactivated vaccine and cell-isolated virus to immunize and infect antibody-negative pigs respectively, and collected peripheral blood and separated serum regularly after inoculation. The commercial INGEZIM IgG/IgM Kit was used to detect the serum samples. By monitoring the dynamic changes of the antibodies, it was found that the IgM antibody was first produced after immunization and infection, then transformed into IgG antibody and persisted for a long time. The duration of IgM produced by PCV2 cytotoxicity after artificial infection lasted for 20-30 d, and the duration of IgM produced by natural infection (positive control of the infection group) existed for 55 d, while the duration of IgM in the immune group inoculated with inactivated vaccine was less than 14 d. PCV2 IgM antibody production characteristics can optimize the immune process and distinguish between virus infection and vaccine immunity. The first immune should avoid IgM antibody positive phase. After 7-14 d, the IgM antibody becomes negative after immunization. If the test result is positive before the next vaccination, then a new round of PCV2 infection must occur, and additional immunization is not recommended at this time.

2. A capture method for detection of PCV2 IgG based on SPG ELISA was established

By comparing three immunoglobulin binding proteins SPA, SPG and PPL as capture antigens, and HRP labeled PCV2 Cap as the second antibody, it was determined that SPG was the optimal coated antigen. After the reaction conditions were optimized, the cut-off value of ROC curve was 0.61, when the sensitivity and specificity were 93.9% and 90.3%, respectively. The total coincidence rate between this method and commercial INGEZIM Circovirus IgG Kit was 96.23%.

3. A capture method for detection of PCV2 IgM antibody was established

By using anti-porcine native IgM polyanitbody as coating antigen and HRP-labeled R2346 as secondary antibody, a ELISA method was established for detection of IgM antibody against PCV2. After optimizing the optimal reaction conditions, the ROC curve was used to determine the cut-off value of 0.492, the corresponding sensitivity and specificity were 96.7% and 97.2%, respectively, and the coincidence rate between IgM and INGEZIM IgM Kit kit was 92.7%.

In this study, the capture ELISAs for detection of pcv2 IgG and IgM antibodies were established. It provide a simple and effective way to optimization of vaccine immunization procedures, early rapid diagnosis of PCV2 and distinction between viral infection and vaccine immunization., which lay the reliable basis for further control of the spread of PCV2 in pig farms.

Key words: Porcine circovirus type 2, IgG, IgM, ELISA, Infection and immunization

目 录

第一章 引 言	1
1.1 猪圆环病毒 2 型概述	1
1.2 猪圆环病毒病原学	1
1.2.1 PCV2 的发现及分类	1
1.2.2 基因组结构特点	2
1.2.3 形态结构与理化性质	3
1.3 猪圆环病毒 2 型分子流行病学	3
1.3.1 不同猪圆环病毒 2 型毒株的共感染	3
1.3.2 猪圆环病毒 2 型与多种病原的共感染	4
1.3.3 猪圆环病毒 2 型流行病学特性	5
1.4 猪圆环病毒 2 型致病机制及相关疾病	5
1.4.1 猪圆环病毒 2 型致病机制	5
1.4.2 猪圆环病毒 2 型相关疾病	6
1.5 猪圆环病毒 2 型诊断方法	7
1.5.1 病毒分离与鉴定	7
1.5.2 病原学诊断	7
1.5.3 血清抗体诊断	8
1.6 猪圆环病毒 2 型防控	9
1.7 本研究的的目的和意义	9
第二章 PCV2 感染和免疫后的猪群产生 IgG 和 IgM 抗体消长规律	10
2.1 材料与方法	10
2.1.1 材料	10
2.1.2 方法	10
2.2 实验结果	11
2.2.1 实验动物筛选结果	11
2.2.2 免疫和感染组抗体动态规律	12
2.3 讨论	13

第三章 基于免疫球蛋白结合蛋白建立检测 PCV2 IgG 的捕获 ELISA.....	15
3.1 材料与方法.....	15
3.1.1 材料	15
3.1.2 方法	15
3.2 实验结果.....	17
3.2.1 血清样品盘的建立	17
3.2.2 PCV2 Cap 蛋白的表达及鉴定	17
3.2.3 ELISA 反应条件的优化	18
3.2.4 cut-off 值的确立	20
3.2.5 敏感性和特异性分析	21
3.2.6 基于 SPG 的 ELISA 在血清诊断中的应用	22
3.3 分析与讨论.....	22
第四章 捕获 ELISA 检测 PCV2 IgM 抗体方法的建立	25
4.1 材料与方法.....	25
4.1.1 材料	25
4.1.2 方法	25
4.2 结果.....	28
4.2.1 兔抗猪 IgM 的制备	28
4.2.2 Cap 重组表位蛋白的表达和鉴定	28
4.2.3 Cap 重组表位蛋白免疫原性分析	29
4.2.4 样品盘的建立	30
4.2.5 ELISA 程序的优化.....	31
4.2.6 ROC 曲线确定 cut-off 值.....	33
4.2.7 敏感性和特异性试验	34
4.2.8 符合率试验.....	34
4.3 讨论	35
第五章 全文结论.....	37
参考文献	38

致 谢.....	51
作者简历	52

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
aa	Amino acid	氨基酸
APE	Acute pulmonary edema	急性肺水肿
bp	Base pair	碱基对
BVDV	Bovine viral diarrhea virus	牛病毒性腹泻病毒
CSFV	Classical swine fever virus	猪瘟病毒
cut-off 值	cut-off point	临界值
DC	Dendritic cells	树突状细胞
DMEM	Dulbecco, s modified eagle medium	一种细胞培养基
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
h	Hour	小时
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IFA	Indirect fluorescent antibody assay	间接免疫荧光试验
IFN	Interferon	干扰素
Ig	Immunoglobulin	免疫球蛋白
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IgM	Immunoglobulin M	免疫球蛋白 M
IL	Interleukin	白细胞介素
kDa	Kilodalton	千道尔顿
L	Liter	升
LAMP	Loop mediated isothermal amplification	环介导等温扩增 PCR
mg	Milligram	毫克
min	Minute	分钟
mL	Milliliter	毫升
NF-κB	Nuclear factor-κB	核因子 κB
nt	Nucleotides	核苷酸
OD	Optical density	光密度
ORF	Open reading frames	开放阅读框
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
PCV	Porcine circovirus type	猪圆环病毒
PCVAD	PCV-associated diseases	猪圆环病毒相关疾病

英文缩写	英文全称	中文名称
PEDV	Porcine epidemic diarrhea virus	猪流行性腹泻
PK-15	Pig kidney-15	猪肾细胞
PMWS	Postweaning multisystemic wasting syndrome	断奶仔猪多系统衰竭综合征
PPV	Porcine parvovirus	猪细小病毒
PRDC	Porcine respiratory disease complex	猪呼吸道综合征
PRFD	Porcine reproductive failure	猪繁殖障碍
PRRSV	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	猪繁殖与呼吸综合症病毒
PRV	Porcine pseudorabies virus	猪伪狂犬病病毒
qPCR	Quantitative PCR	定量 PCR
RFLP	Restriction fragment length polymorphism	限制性片段长度多态性
rpm	Rotation per minute	每分转速
s	Second	秒
SIV	Swine influenza virus	猪流感病毒
TLR	Toll-like receptors	Toll 样受体
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine	四甲基联苯胺
TNF	Tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
μg	Microgram	微克
μL	Microliter	微升

第一章 引言

1.1 猪圆环病毒 2 型概述

猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus type 2, PCV2)是迄今发现最小的感染哺乳动物的 DNA 病毒,核酸的变异速度可达 1.2×10^{-3} 位点/年(Firth et al., 2009),导致流行特点不断出现新的变化,成为危害养猪业健康发展的重要病原之一。PCV2 感染与断奶仔猪多系统衰竭综合征(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)、猪皮炎与肾病综合征(porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS)、猪呼吸道综合征(porcine respiratory disease complex, PRDC)、繁殖障碍(porcine reproductive failure, PRFD)和急性肺水肿(acute pulmonary edema, APE)等疾病的发生密切相关(Gillespie et al., 2009; Harms et al., 2001),因此这些疾病称为猪圆环病毒相关疾病(PCV-associated diseases, PCVAD)。PCV2 主要感染 5-12 周龄的断奶仔猪,而其中又以 6-8 周龄的仔猪最为易感,发病动物主要表现为体重减轻、呼吸功能障碍、腹股沟浅淋巴结肿大、腹泻、淋巴细胞快速减少等临床症状(Vigre et al., 2005)。当前控制 PCV2 感染和流行的方法主要途径是通过接种灭活疫苗和基因工程疫苗,近几年国内外研究发现,PCV2d 基因亚型毒株大量出现并流行于疫苗免疫后的猪场(Opriessnig et al., 2013; Salgado et al., 2014; Seo et al., 2014; Zhan et al., 2016),给 PCV2 防控带来新的挑战,如何有效控制 PCV2 感染成为国内外猪病防控领域的一个研究重点。本文从 PCV2 病原学、分子流行病学、致病机制及其引起的相关疾病、诊断方法和疫苗防控等方面作一综述。

1.2 猪圆环病毒病原学

1.2.1 PCV2 的发现及分类

1974 年, Tischer 等发现, 在多株连续传代的猪肾细胞系(PK-15 细胞系和 ATCC-CCL33 细胞系)中发现了一种病毒样的“圆形小颗粒”, 当时认为是类似于微小核糖核酸病毒的细胞污染物, 并未确定其种类和来源(Tischer et al., 1974)。1982 年, 该研究小组通过超速离心方法进行提纯, 镜检观察及核酸鉴定后最终确定这种细胞污染物是一种新的小 DNA 病毒, 根据病毒粒子的形态特征将其命名为猪圆环病毒(porcine circovirus, PCV)(Tischer et al., 1982)。随后, 很多学者陆续对其进行进一步研究发现该病毒并没有致病性, 并命名为 PCV1(Allan et al., 1995; Tischer et al., 1986)。

1991 年, 在加拿大西部一猪场内患有 PMWS 的猪群中分离到一种 PCV 变异株, 该病毒在血清学特性、基因进化等方面均与 PK-15 细胞中分离的 PCV1 存在显著差异, 发现者将其命名为 PCV2。PCV2 能在 PK-15 细胞或猪源免疫细胞上生长增殖, 但在原代猪肾细胞上无法复制。研究发现, PCV2 在所感染的宿主细胞上均不能产生细胞病变效应(cytopathic effect, CPE) (Allan et al., 1998)。之后, 在更多的 PMWS 病例中陆续分离到 PCV2 毒株, 并证明 PCV2 是引起 PMWS 的主要病原之一(Ellis et al., 1998; Mankertz et al., 2000; Meehan et al., 1998)。

2016 年, 美国首先报道了一种新型猪圆环病毒 PCV3, 这一病毒感染与心脏和多系统炎症、猪皮炎肾病综合征与生殖功能衰竭有关(Palinski et al., 2017; Phan et al., 2016), 目前多个国家已经报告了 PCV3 在不同猪群中的流行情况及病原学特征, 不同于 PCV2 的是, PCV3 核苷酸序列变

异率很低,不同国家和地区检测到的 PCV3 基因序列与美国报道的毒株序列相似性均大于 95% (刘颖昞等, 2019)。在氨基酸水平上, PCV3 与 PCV1 和 PCV2 的序列同源性分别为 31%-48%(Ye et al., 2018), 表明 PCV3 与 PCV1 和 PCV2 在生物学特征方面存在诸多不同。目前认为, PCV3 同 PCV1、PCV2 同属于圆环病毒科(*Circoviridae*)、圆环病毒属(*Circovirus*), 单链负股环状 DNA 病毒, 是已知最小的动物 DNA 病毒之一, 无囊膜包被, 基因大小 2000 bp 左右。

1.2.2 基因组结构特点

通过不同地区和国家流行的 PCV2 分离株的核酸序列遗传进化分析, 将 PCV2 毒株分为 5 种基因型: PCV2a、PCV2b、PCV2c、PCV2d 和 PCV2e(Cheung, 2007; de Boisseson et al., 2004; Ma et al., 2007; Segales et al., 2008; Wang et al., 2009)。在另一项相关研究中, PCV2 基因型也被定义为有 8 个簇的两个亚组(1a-1c 和 2a-2e) (Olvera et al., 2007)。PCV2 基因组是一个单链封闭的环状 DNA, 含有 1766-1768 个核苷酸(nucleotides, nt), PCV2 的基因组大小被浓缩为病毒基因组复制和包装的最小复制单元(Finsterbusch and Mankertz, 2009), 基因组通过宿主合成的复制中间体的包埋病毒 DNA 和互补 DNA 编码蛋白质完成病毒复制和病毒粒子组装(Cheung, 2003)。根据核酸的组成特征, 预测 PCV2 基因组有 11 个重叠的开放阅读框(open reading frames, ORFs), ORF1、ORF5、ORF7 和 ORF10 位于病毒加链上顺时针方向转录, 而 ORF2、ORF3、ORF4、ORF6、ORF8、ORF9 和 ORF11 则在互补链上逆时针转录(Hamel et al., 1998)。这些 ORFs 具有互相补充的遗传特征, 可以充分利用有限的病毒遗传物质, 完成病毒的感染和复制, 可能是病毒进化过程中自然选择的结果。ORF1 和 ORF2 基因是两个主要的 ORFs 并且以相反的方向定向, 这种排列产生双译基因组, 并产生两个基因间区。较短的基因间区位于 ORF1 和 ORF2 基因的 30 个末端之间, 而较大的基因间区位于其 50 个末端之间, 包含病毒基因组复制的起源。PCV2 基因组的复制起始于推测的茎环结构的位置, 并通过滚动循环复制进行复制。基因组组织和复制策略的相似性表明 PCV2 与植物双链病毒和纳米病毒密切相关。

阅读框 ORF1 被称为复制酶(replicase, Rep)基因, 编码病毒的复制酶蛋白 Rep, 定位于病毒核酸的正链, 是 PCV2 最大的 ORF (945 bp, nt 51-995)。在 PCV2 的 Rep 基因启动子中鉴定出一个功能性病毒干扰素刺激应答元件样序列(5'-ctgaacgaaaaga-3', nt 1737-1751), 在病毒转录启动中起到重要作用(Gu et al., 2012)。

在逆时针链上, ORF2 基因片段大小约为 702 bp (nt 1735-1034), 由 234 个氨基酸(amino acid, aa)组成, 它编码病毒的主要免疫原性蛋白-衣壳蛋白(capsid protein, Cap), 分子量大小约为 27.8 kDa (Koonin and Ilyina, 1993; Nawagitgul et al., 2000a)。Cap 蛋白是构成病毒粒子的唯一的结构蛋白, 其在病毒的感染、复制和免疫方面发挥重要的作用。研究发现, 在重组杆状病毒的昆虫细胞中表达时能独立形成病毒衣壳样结构(Nawagitgulet al., 2000a), 这对研究 PCV2 的病毒粒子的组装构成具有重要意义。PCV2 的 ORF2 基因的遗传和变异与病毒的毒力和免疫原性有关, 是流行病学和系统发育研究的主要目标基因。分子和流行病学分析表明, 与 ORF1 和 ORF3 相比, ORF2 基因序列高度变异, PCV2 衣壳区的多态性与病毒的复制周期有关(Fenaux et al., 2004; Misinzo et al., 2006; O'Dea et al., 2008)。PCV2 通过 Cap 与包括硫酸肝素和硫酸软骨素 B 糖胺聚糖在内的病毒吸附受体相互作用, 完成感染宿主细胞的过程(Misinzo et al., 2006)。另外, Cap 蛋白也影响 PCV2 的

组装动力学或结构稳定性(O'Dea et al., 2008), 因此, PCV2 的变异依赖于 ORF2 基因的多态性, 因其适合携带 ORF2 内的某些等位基因。对 PCV2 毒力决定因子的研究表明, 在体外培养的 PK-15 细胞中, 替换 PCV2 Cap 蛋白中的某些氨基酸能够增强 PCV2 的复制能力, 通过体内的 120 次传代引起病毒毒力下降(Fenaux et al., 2004)。研究证实, PCV2 Cap 蛋白至少具有 8 个不同的抗原表位。它们分别是 aa 69-83、aa 117-131、aa 169-183 三个特异的抗原位点, 以及 aa 47-63、aa 165-200 内的 5 个不同的空间重叠抗原表位以及位于 C 末端的最后 4 个 aa (Lekcharoensuk et al., 2004; Mahe et al., 2000)。进一步研究发现, Cap 蛋白在 N 的前 41 个 aa 处含有高度保守的碱性 aa 序列(如精氨酸), 与鸡贫血病毒主要结构蛋白相似的端部(Meehan et al., 1998), 该区域在 Cap 蛋白中具有功能核定位信号, 是影响 PCV2 亚细胞分布的重要基序。此外, 氨基端定向突变试验表明, 在 ORF2 的核定位基序中, N 末端的 aa 残基 12-18 和 34-41 起着关键作用(Liu et al., 2001a; Liu et al., 2001b)。因此, 可以利用 Cap 蛋白抗原表位的分布特点, 研究 PCV2 诊断方法和基因工程疫苗。

PCV1 和 PCV2 的 Cap 蛋白的氨基酸组成差异不大, 但组成两种 PCV 的 Rep 蛋白氨基酸序列保守程度有显著差异。因此, Rep 蛋白的氨基酸变异程度可以作为指示 PCV1 和 PCV2 致病性差异的分子标记物。在 PCV2 感染早期, 可以在细胞核和细胞质中检测到 Cap 和 Rep 蛋白, 但 Cap 和 Rep 蛋白最终归宿可能是细胞核的不同区域(Gilpin et al., 2003; Timmusk et al., 2006)。

ORF3 基因称为凋亡诱导基因, 与 ORF1 基因完全重叠、方向相反(Liu et al., 2005)。ORF3 基因约 315 个 bp (nt 671-357), 编码 104 个 aa。自 2005 年在 PCV2 生产感染中首次被鉴定为非结构蛋白以来, 其结构和功能受到了国内外学者的关注。研究表明, PCV2 的 ORF3 编码的蛋白(也称为凋亡蛋白, 11.9 kDa)主要位于细胞核中, 在细胞质中占较小的比例(Liu et al., 2005)。ORF3 蛋白对培养细胞的病毒复制不是必需的, 但可以诱导病毒感染细胞如猪肾 PK-15 细胞、猪外周血单核细胞的凋亡(Lin et al., 2011a), 因此, ORF3 在研究 PCV2 的致病力方面具有重要意义。

1.2.3 形态结构与理化性质

PCV 病毒粒子表面呈二十面体对称结构, 无囊膜, 病毒粒子大约 14nm-26nm, 直径约为 17nm。PCV 病毒为单股、闭合环状 DNA 病毒, 是目前所知最小的动物病毒(殷震等, 1997)。PCV 病毒粒子不具备凝集红细胞的能力, 在 pH 3 和氯仿条件下病毒对灭活具有抵抗力, 对所有抗菌素均不表现敏感性, 病毒在 56℃和 70℃下的稳定性较好(Allen et al., 1994)。碘和酚类产品对病毒滴度没有影响, NaOH、NaClO 和酒精等能够降低病毒滴度(Martin et al., 2008)。

1.3 猪圆环病毒 2 型分子流行病学

1.3.1 不同猪圆环病毒 2 型毒株的共感染

根据 Cap 基因序列特征, PCV2 被分为五种基因型: PCV2a、PCV2b、PCV2c、PCV2d 和 PCV2e(Jantafong et al., 2011; Ren et al., 2016), 此外, PCV2b 基因型被分为三个簇: 1a-1c, PCV2a 基因型被细分为五个簇: 2a-2f (An et al., 2007; Jiang et al., 2017; Olvera et al., 2007; Ren et al., 2016), 近期对 1996 年至 1999 年中国 PCV2 感染的回顾性研究表明, PCV2f 基因与其他已知基因型具有较低的序列同源性(Bao et al., 2018)。自从 20 世纪 90 年代末发现 PCV2 以来, 该病毒一直在进化, 并且观察到两种主要的基因型转移。在 2004/2005 年, PCV2 的第一次基因型转移是从 PCV2a 到

PCV2b(Eddicks et al., 2017; Ramos et al., 2017)。自 2012 年以来, 猪群中广泛流行的 PCV2b 亚型逐渐被北美、中国、韩国和乌拉圭的 PCV2d 基因型取代(Eddickset al., 2017; Jianget al., 2017; Karuppannan and Opriessnig, 2017; Kwon et al., 2017; Li et al., 2016; Ramoset al., 2017)。此外, 国内猪群中, PCV2f 成为 PCV2a 群的主要基因型(Jianget al., 2017), 导致 PCV2 的防控遇到新的挑战。

据报道, 在同一头病毒感染猪体内能够检测到不同 PCV2 基因型, 这说明 PCV2 不同基因型可以在体内实现随机的基因内重组(Huang et al., 2012; Khaiseb et al., 2011; Wang et al., 2019; Zhai et al., 2011)。通过应用优化的差异聚合酶链反应分析从患病猪中分离出 118 个 PCV2 阳性 DNA 样品发现, 病猪体内不同 PCV2 基因型的共存水平达到 32.2% (38/118)。38 份共感染样本的测序结果显示, 共存的基因型为 PCV2a-PCV2b(12/38)、PCV2a-PCV2d(15/38)和 PCV2e-PCV2d(11/38)(Zhai et al., 2011)。不同 PCV2 基因型毒株的共感染可能会引起有感染猪中发生更严重的临床症状, 更危险的是, 不同基因型的共感染会导致田间毒株之间发生更高频率的重组事件(Harding et al., 2010; Hesse et al., 2008; Huang et al., 2013; Zhai et al., 2011), 造成现有疫苗的免疫效果不足, 甚至免疫失败的发生。因此, 将更多的研究重点聚焦于分析 PCV2 毒株的重组趋、特征及对病毒毒力和免疫原性的影响, 为开发高效的疫苗提供科学的指导。

1.3.2 猪圆环病毒 2 型与多种病原的共感染

大量流行病学研究证实, PCV2 与多种常见病原体存在共感染现象, 如猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)、猪细小病毒(porcine parvovirus, PPV)、猪伪狂犬病病毒(porcine pseudorabies virus, PRV)、牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)、猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)和猪流感病毒(swine influenza virus, SIV)等共同感染(Cao et al., 2005; Deng et al., 2012; Jiang et al., 2010; Jung et al., 2006; Liu et al., 2013; Opriessnig and Halbur, 2012; Xu et al., 2012; Yue et al., 2009; Zheng et al., 2013), 同时也可能与新出现的病原体混合感染(Li et al., 2013b; Zhai et al., 2010; Zhai et al., 2013; Zhang et al., 2011)。PCV2 增加了 PRRSV、CSFV、SwIV、PRV 或 PEDV 感染的临床征象, 同时继发性感染(如 PPV 感染)和较差的生理生长状况也可以为 PCV2 感染提供一个较好的体内环境。

PCV3 与心脏和多系统炎症、PRDC、PDNS 和生殖障碍有关(Phan et al., 2016; Palinski et al., 2017)(Klaumann et al., 2018; Zhang et al., 2018), 其中大多数与 PCV2 引起的 PCVAD 相似。此外发现 PCV3 阳性的临床样本大多与 PCV2 共感染, 猪场和屠宰场的共感染率分别为 27.6%-39.39%和 19.14% (Kim et al., 2017; Li et al., 2018; Wen et al., 2018; Zhanget al., 2018; Zhao et al., 2018; Zheng et al., 2017), 表明 PCV2 和 PCV3 混合感染在猪群中普遍存在。

PRRSV 和 PCV2 共感染在临床上是常见的, 并可引起多种多微生物病综合征(Kwon et al., 2017; Niederwerder et al., 2016; Sun et al., 2015)。在断奶猪肺组织中, PRRSV 和 PCV2 的混合感染率分别为 42%和 85.4%(Drolet et al., 2003)。国内一团队从中国贵州省养猪场采集的 103 份临床标本中, PRRSV 和 PCV2 的共感染率为 52.4%, 此外还发现了 PRRSV 和 PCV2 自然共感染的野猪(Burgara-Estrella et al., 2012)。

在猪和野猪中观察到不同组合的 PCV2 和 PPV 同时感染(Saekhow et al., 2016; Sharma and Saikumar, 2010; Sliz et al., 2015; Sunet al., 2015)。同时在母猪中感染 PCV2 和 PPV 会导致生木乃伊胎和死胎, 以及血清呈阳性的仔猪, 表明在母猪中缺乏抗 PCV2 和 PPV 感染的抗体(Dias et al., 2013)。此外, 实验性接种 PCV2 和 PPV 复制了类似于 PMWS 现场病例的病变(Allan et al., 1999; Ha et al., 2008; Kennedy et al., 2000; Kim et al., 2003a)。

1.3.3 猪圆环病毒 2 型流行病学特性

几乎所有猪对 PCV2 均易感, 其中以妊娠母猪和新生仔猪最为敏感。感染 PCV2 的猪群主要集中在生长初期(Rodriguez-Arrioja et al., 2002; Mckeown et al., 2005; Segales et al., 2005; McIntosh et al., 2006), 15 日龄以内低龄仔猪病死率高达 50% 以上。PCV2 可以存在于粪便和口鼻液中(Segales et al., 2005), 猪与猪之间的直接接触被认为是 PCV2 的主要传播途径。病毒可以通过水平传播和垂直传播两种方式扩散, 病毒存在于猪群眼分泌物、尿液、粪便等排泄物中导致用具、饮水和接触环境污染, 是潜在传染源。PCV2 主要传播途径是通过呼吸道和消化道进行猪群的水平传播, 而间接传播在 PCV2 跨区流行中作用明显(Park et al., 2009; Shibata et al., 2003); 在妊娠母猪感染病毒后, PCV2 会存在于乳汁中进行传播(Ha et al., 2009), 也有试验证明, PCV2 可通过胎盘屏障进行垂直传播(Park et al., 2005)。

1.4 猪圆环病毒 2 型致病机制及相关疾病

1.4.1 猪圆环病毒 2 型致病机制

PCV2 可以在上皮细胞、单核细胞、内皮细胞和纤维细胞中复制(Meng, 2013; Misinzo et al., 2009; Steiner et al., 2008), 此外还可以驻留在树突状细胞(dendritic cells, DCs)中, 而病毒很少发生复制或降解的现象(Vincent et al., 2003)。PCV2 首先感染淋巴组织, 引起淋巴细胞耗竭和免疫抑制(Meng, 2013), 导致有关组织器官炎症反应, 抗体抗感染能力下降, 极易发生继发感染和混合感染。

在 PCV2 感染过程中, 病毒被宿主感染细胞的病原体识别受体识别, 从而触发信号级联, 启动细胞内天然抗病毒免疫反应, 抑制病毒的增殖和扩散(Altfeld and Gale, 2015)。此外, 不同基因型的 PCV2 可能同时存在于同一仔猪体内, 并发生复制和体内重组, 可能导致这些仔猪出现更为严重的临床症状(Khaisebet al., 2011; Zhalet al., 2011)。DCs 在激活先天免疫反应和适应性免疫反应中起着至关重要的作用, 这使它们成为病毒感染的关键目标(Lin et al., 2012; Vincent et al., 2003)。大多数 DCs (80%-90%)与 PCV2 相互作用, 然而令人意外的是, 病毒滞留在细胞内, 极少发生复制或降解, 表明树突状细胞可能仅作为病毒储存和转运的中间载体(Vincent et al., 2003), 但并不是病毒复制和繁殖的场所。PCV2 通过抑制干扰素 α (interferon α , IFN- α)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)的产生限制髓样树突状细胞的成熟, 削弱它们识别病毒抗原的能力(Kreikemeier et al., 2015)。PCV2 DNA 还抑制肌动蛋白聚合和内吞作用(Balmelli et al., 2011)。包膜病毒单链 DNA 在 IFN- γ 存在时刺激 pDCs, 而病毒双链 DNA 抑制 pDCs 中 IFN- α 的产生(Baumann et al., 2013)。

PCV2 感染影响胸腺成熟 T 细胞的选择(Klausmann et al., 2015), 导致对病毒衣壳蛋白的免疫反应失调(Klausmann et al., 2015; Lee et al., 2015; Stevenson et al., 2007), PCV2 感染的免疫细胞移位到胸腺的皮质髓质交界处(Klausmann et al., 2015)。PCV2 感染还通过干扰 CD4 共受体和 T 细胞受体表达, 导致体内胸腺细胞选择和 T 细胞重编程失调(Klausmann et al., 2015)。T 淋巴细胞对 PCV2 的反应主要针对非结构蛋白 ORF1 和 ORF3 的表位(Stevenson et al., 2007)。Lin 等人发现在 PCV2 感染过程中, 96 个被选择的上调免疫基因中有 61 个主要参与 DC 和 B、T 淋巴细胞的活化(Lee et al., 2015)。近年来, ORF4 通过调节 CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞来调节宿主免疫系统, 与野生型 PCV2 感染小鼠相比, ORF4 缺陷 PCV2 感染小鼠的 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞的相对比例显著降低(Yang et al., 2013)。

在单核巨噬细胞系统中, PCV2 感染上调了前炎性细胞因子相关基因的表达, 并通过 Toll 样受体(toll-like receptors, TLR) TLR1 和 TLR9 通路持续诱导高水平的细胞因子分泌(Li et al., 2013a)。白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2)可诱导外周血淋巴细胞增殖和 PCV2 复制(Linet et al., 2012), 并且发生 PCVAD 猪的 IL-10 和促炎性细胞因子表达水平上调(Kekarainen et al., 2010; Meng, 2013)。此外, ORF3 蛋白促进猪上皮细胞分泌 IL-6(Choi et al., 2015)。患病猪体内 IL-2 增加 IFN- γ 略微降低(Sipos et al., 2004), 在外周血单核细胞中 IFN- γ 和 IL-2 表达水平也有减少的现象(Kekarainen et al., 2010), 这些结果说明 IFN- γ 和 IL-2 的表达水平在病毒感染的不同阶段变化特征存在显著差异(Yang et al., 2015)。另外, 在 PCV2 感染过程中, CD74 分子通过激活 NF- κ B 信号通路显著增强炎症反应(Zhang et al., 2013), 促进机体抗病毒天然免疫反应的强度。

1.4.2 猪圆环病毒 2 型相关疾病

1.4.2.1 断奶仔猪多系统衰竭综合征(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)

PMWS 是 PCVAD 最常见的形式, 最早发现于 1991 年加拿大猪场内, 之后此病在全球范围内迅速蔓延, 严重影响养猪业的生产。临床上将 PMWS 分为两个阶段: 早期 PMWS 和晚期 PMWS。早期 PMWS 主要发生在 4-8 周龄的猪身上, 这种形式是典型的 PMWS, 临床上以消瘦、体重增加、淋巴结肿大和呼吸困难为特征(Chae, 2004)。晚期 PMWS 主要发生在 8-12 周龄的猪中, 主要表现为腹泻, 并常与沙门氏菌病混合感染, 晚期 PMWS 感染猪病死率高达 80%(Ha et al., 2005)。病理解剖变化为腹股沟和支气管淋巴结肿大、肝硬化、肺脏出血萎缩伴有间质性肺炎、脾脏肿大出血、肾脏肿大苍白, 表现为广泛的淋巴细胞缺失和浸润(Kennedy et al., 2003)。

1.4.2.2 猪皮炎与肾病综合征(porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS)

PDNS 感染的猪临床表现为厌食和抑郁、很少或没有发热(Drolet et al., 1999), 表现为匍匐或不愿意走动, 或显示僵硬的步态。最明显的征象是皮肤出现不规则的红到紫的斑疹和丘疹, 主要发生在后肢和会阴区域, 但有时更广泛分布。随着时间的推移, 发生病变的斑疹或丘疹部位会逐渐被黑色的硬壳覆盖。皮肤病变逐渐消退, 有时留下疤痕(Segales et al., 1998)。PDNS 影响育幼猪、保育猪和成年猪(Drolet et al., 1999), 该综合症的患病率通常低于 1%(Segales et al., 1998), 尽管偶尔也有较高的发生率(Gresham et al., 2000)。3 个月以上的猪的病死率可能达到 100%, 而受感染的较年轻的猪的病死率大约为 50%, 严重、急性感染的猪在出现临床症状后几天内死亡, 存活下来的猪往往会在症状开始后的 7 到 10 天内恢复并增加体重(Segales et al., 1998)。

1.4.2.3 猪呼吸道综合征(porcine respiratory disease complex, PRDC)

PRDC 是 PCVAD 中一种独特的临床表现,其特点是生长缓慢、饲料效率降低、嗜睡、厌食、发烧、咳嗽和呼吸困难,一般发生在生长和育成的猪,尤其是 16-22 周龄左右(Chae, 2005;Kim et al., 2003b)。组织学上,PCV2 相关的 PRDC 的特征是广泛的肉芽肿性炎症、多核巨细胞和浸润的组织细胞和巨噬细胞内嗜碱性病毒包涵体数目不等。而在韩国的一项研究中,PCV2 相关的 PRDC 最显著和一致的病变是支气管间质性肺炎,伴有支气管周或支气管周纤维化,没有非呼吸组织特征性病变的证据(Kim et al., 2003b)。

1.4.2.4 猪繁殖障碍(porcine reproductive failure, PRFD)

PRFD 引起的肉眼可见的病变包括胎儿木乃伊或水肿胎儿、胎儿肝脏肿大充血、胎儿心肌肥厚伴有多灶性心肌变色和胎儿腹水、胸腔积液和心包积液,显微镜下可见非化脓性胎儿坏死性心肌炎或纤维化心肌炎和胎儿慢性、被动肝充血以及胎儿轻度肺炎。然而,在田间条件下 PCV2 相关的繁殖疾病是罕见的(Pensaert et al., 2004),这可能是由于在成年猪中的 PCV2 血清学阳性率较高,因此大多数种猪群没有遭受临床疾病的折磨,受影响的牧群通常母猪数量较高的新种群或 PCV2 血清阴性猪群(Opriessnig et al., 2007;Togashi et al., 2011;West et al., 1999)。

1.4.2.5 急性肺水肿(acute pulmonary edema, APE)

APE 主要影响健康年轻的育幼猪,病死率可达 20%。临床症状包括呼吸窘迫的迅速发作,随后几乎立即死亡,通常猪被发现死亡之前没有任何疾病迹象。在 7 周龄的仔猪中临床体征明显,对 APE 猪的检查显示胸腔内有清晰的液体积聚,肺内弥漫湿重,小叶间隔有中到重度扩张,肺镜检查可见小叶内隔弥漫性扩张,这是由于水肿所致;巨噬细胞和淋巴细胞也有弥漫性间质浸润,存在弥漫性淋巴样耗竭,血管壁伴有纤维蛋白样坏死(AG et al., 2011)。

1.5 猪圆环病毒 2 型诊断方法

PCV2 感染引起的 PCVAD 常表现为亚临床症状,并伴有其他类型病原体的混合或继发感染。当前 PCV2 的诊断主要基于流行病学、病理解剖和临床症状的综合结果,此外还需通过实验室病原学和血清学方法进行确诊。

1.5.1 病毒分离与鉴定

将感染猪的组织器官如淋巴结、肝脏、脾脏、肺脏等取出分离研磨成组织匀浆,离心取上清接种至 PK-15 细胞系中培养传代,通过比较传代病毒的核苷酸序列和在组织器官中检测到的原病毒的核苷酸序列确认分离株的身份。该过程耗时耗力,不符合临床上大批量诊断的要求。

1.5.2 病原学诊断

检测组织病变中 PCV2 特异性 DNA 和蛋白被认为是 PCV2 诊断的标志之一。限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分析和原位杂交(Ogawa et al., 2009)检测组织病变中 PCV2 DNA 是 PCV2 的早期检测方法(McNeilly et al., 1999;Nawagitgul et al., 2000b),RFLP 分析结合其他手段有助于 PCV2 基因组变异的早期检测。

目前,利用 PCR 技术从多种样本,如血清、血液、组织、精液、口腔和鼻腔分泌物以及环境样本中检测 PCV2 核酸的方法陆续被报道(Caprioli et al., 2006;Shibata et al., 2003;Sinha et al.,

2011), 为病毒的快速诊断提供了更多的选择。定量 PCR(quantitative PCR, qPCR)和环介导等温扩增 PCR(loop mediated isothermal amplification, LAMP)方法通过靶向这些毒株中存在差异的 DNA 序列, 已成功地区分了 PCV1 和 PCV2、PCV2a、PCV2b、现有的嵌合 PCV2a/b 疫苗株以及新突变的 PCV2b 株(Chang et al., 2010;Liu et al., 2011;Opriessnig et al., 2014;Shen et al., 2012;Wang et al., 2011;Zhou et al., 2011)。与早期的 RFLP 分析相似, PCR 检测在病毒进化过程中对基因序列的改变反映在敏感性或特异性的变化上, 例如检测了一种 PCV1-2a 重组病毒, 通过 qPCR 检测 ct 值异常则怀疑它是由加拿大的一种嵌合 PCV1-2a 商业疫苗引起的(Gagnon et al., 2008;Gagnon et al., 2010)。目前开发了多种多重 PCR 检测方法, 甚至可以同时检测多达 9 个病毒的 RNA 和 DNA 包括 PCV2(Ogawa et al., 2009;Wernike et al., 2013); 也有研究基于荧光检测 PCV2 和 PRRSV 的 DNA 微阵列或 DNA 芯片(Jiang et al., 2011;Nicholson et al., 2011), 虽然 DNA 芯片技术在筛选多种感染因子方面具有巨大的潜力, 但在将其应用于常规兽医诊断之前, 还必须实现显著的成本和敏感性改进。

鉴于 PCV2 在世界各地猪群中的高感染率, 仅用 PCR 方法对临床病例进行检测或基因分型, 对 PCVAD 的诊断作用有限。然而以检测核酸为目标技术可能是发现病毒变异的最佳和最有效的方式。鉴于 PCV2 的快速进化, 核酸检测在监测 PCV2 进化中的作用和重要性不能低估。

1.5.3 血清抗体诊断

目前, 许多用于检测 PCV2 抗原和特异性抗体的酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒已在诊断实验室中得到应用。PCV2 血清抗体检测的 ELISA 分为间接 ELISA、竞争 ELISA 和阻断 ELISA 三类产品, 在这些试剂盒问世之前, 免疫荧光法和免疫过氧化物酶单层法被广泛应用于检测 PCV2 特异性抗体和鉴定感染性 PCV2 病毒(Opriessnig et al., 2007)。已经开发出 PCV2 特异性抗体的血清学检测的平台系统, 包括基于微珠的检测, 例如 Luminex, 它允许同时检测针对其他病原体的抗体(Lin et al., 2011b)。由于 PCV2 感染被认为是普遍存在于猪群的, 而且大多数猪在出生后都接种 PCV2 疫苗, 所以很多国家的养殖猪群体内都存在抗 PCV2 的血清抗体, 导致区分疫苗免疫抗体和野毒感染抗体变得尤为困难。

根据对 PCV2 核酸序列的遗传分析研究发现, PCV2b 到 PCV2d 的两种基因型在世界范围内广泛存在, 因此, 开发能够区分两种基因型的检测方法显得尤为重要。基于 ELISA 技术对 PCV2 感染基因型的鉴别具有较高的实用价值, 目前利用序列信息研究分子流行病学的方法不能直接反应新兴基因型的免疫学特征, 因此开发血清学检测方法来研究感染 PCV2 或接种疫苗的猪血清中和谱的变化是至关重要的。目前检测血清抗体常用的 ELISA 方法有阻断(竞争)ELISA、捕获 ELISA、间接 ELISA、双抗原夹心 ELISA 等。

1.5.3.1 间接 ELISA

主要操作步骤是包被抗原, 加入待检血清, 再加入酶标二抗, 最后显色读数。这是最基本的 ELISA 方法, 反应物颜色深浅与待检抗体量成正比。

1.5.3.2 捕获 ELISA

先把能特异性结合待测抗体的抗原固定于固相载体表面, 加入待测样品, 通过固定在载体表面的针对该抗体的抗原固定于载体表面, 加入特异性酶标抗原, 再加入酶促反应底物, 发生显色

反应，显色的深浅与待测抗体的量成正比。

1.5.3.3 阻断（竞争）ELISA

受检抗体和酶标抗体竞争与固相抗原结合，因此结合于固相的酶标抗体量与受检抗体的量呈反比。具体步骤为将特异抗原与固相载体连接，形成固相抗原；待测孔中加受检标本和一定量酶标抗体的混合溶液，使之与固相抗原反应，也可以分步加入；加底物显色读数。待测孔颜色越淡，表示标本中抗体含量越多。

1.5.3.4 双抗原夹心 ELISA

将特异性抗原与固相载体连接，形成固相抗原；加受检标本，使之与固相抗原接触反应一段时间，让标本中的抗体与固相载体上的抗原结合，形成固相抗体复合物；加酶标抗原，使固相免疫复合物上的抗体与酶标抗原结合，加底物显色读数。颜色越深表明待检样品中抗体含量越高。

1.6 猪圆环病毒 2 型防控

为了加强 PCV2 相关疾病的防控工作，除了改善医疗基础设施和完善管理制度外，抗 PCV2 疫苗是减少 PCVAD 的有效方法。目前，常用的 PCV2 商业化疫苗约有 7 种，包括 Circovac® (Merial, France)、Ingelvac® CircoFLEX、FLEXcombo® (Boehringer Ingelheim, USA)、Circumvent® PCV G2、Circumvent® PCV-M G2 (Merck, USA)、Fostera™ PCV 和 Fostera™ PCV MH(Zoetis Inc, USA)，它们都是灭活疫苗或病毒样颗粒(virus-like particles, VLP)疫苗。亚单位疫苗在商业化生产中占有主导地位，大多数商业化的 PCV2 亚单位疫苗都表达来自昆虫杆状病毒表达系统的 Cap 蛋白，但制备过程耗时较长，可产生较高的外源蛋白产量。相比之下，原核表达系统更便宜、更容易扩增，可以产生大量的外源蛋白，但也存在目标蛋白水溶性低、空间折叠不正确等缺点，影响了应用效果(Chen et al., 2018)。

1.7 本研究的目的和意义

PCV2 在当前已经成为严重阻碍养猪业健康发展的主要病原之一，由于猪感染 PCV2 主要破坏机体免疫器官及其功能，导致机体抗感染能力下降，极易诱发多种病原微生物的继发感染，给养殖户造成经济损失。另外，血清学调查证实，PCV2 持续性感染导致猪群的血清抗体阳性率居高不下，接种疫苗产生的抗体与自然感染产生的抗体无法有效区分，这是目前疫苗免疫防控面临的最大挑战。鉴于此，本研究通过监测猪群中 IgG 和 IgM 抗体的动态变化规律，发现 PCV2 特异性 IgM 抗体的存在时间和存在状态在区分疫苗免疫和病毒感染方面发挥重要作用，基于此，分别建立了基于 SPG 的检测 PCV2 IgG 抗体的捕获 ELISA 和以抗猪 IgM 多抗为捕获抗原的检测 PCV2 IgM 抗体的捕获 ELISA 方法，综合两种抗体诊断方法的判定结果为判断猪群感染状态和疫苗接种时机提供科学指导。

第二章 PCV2 感染和免疫后的猪群产生 IgG 和 IgM 抗体消长规律

PCV2 感染可以引起机体免疫抑制,导致一系列疾病。接种 PCV2 疫苗可以大幅度降低 PCV2 发病率,保证猪群健康,但也带来新的问题。由于猪群中 PCV2 持续性带毒的个体或者隐性感染动物占极大比例,导致猪群血清抗体的阳性率很高,区分或者鉴别疫苗免疫产生的抗体和野毒感染抗体,对于选择合理的疫苗接种时机、最大程度发挥疫苗的免疫效果具有重要意义。通常,疫苗免疫的前提是猪群不能处于 PCV2 感染期,否则容易诱发疾病的发生。本研究通过血清抗体 ELISA 检测方法分析疫苗免疫猪和病毒感染实验猪群体内 IgG 和 IgM 抗体产生和动态变化规律,确定猪群的病毒感染状态,为接种 PCV2 疫苗的时机提供理论指导,从而发挥疫苗的最佳免疫效果,有效的防控 PCV2 的发生。

2.1 材料与方法

2.1.1 材料

2.1.1.1 PCV2 疫苗

购自圆毕净上海海利生物技术有限公司,20mL/瓶,产品批号为 20161131。

2.1.1.2 PCV2 细胞毒

PCV2 细胞毒由中国农业科学院兰州兽医研究所猪禽消化道感染与黏膜免疫研究创新团队分离保存。

2.1.1.3 实验动物

体重为 25-35kg 的 7 周龄断奶仔猪,均购自甘肃省康乐县养殖场。

2.1.1.4 主要试剂

西班牙 INGEZIM Circovirus IgG/IgM Kit 试剂盒(货号 1.1.PCV.K.2)购自甘肃科美特生物有限公司,其他试剂系国产分析纯。

2.1.1.5 主要仪器

移液器和离心机(台式)均为 Eppendorf 公司产品,酶标仪购自美谷分子仪器(上海)有限公司。

2.1.2 方法

2.1.2.1 实验动物筛选

实验动物分为免疫组和感染组两组。各选取 18 只健康断奶仔猪隔离饲养,颈动脉采血,离心分离上层血清后,首先通过研究所的布病抗体检测证实无布病感染,然后用商品化的 INGEZIM Circovirus IgG/IgM Kit 试剂盒检测 PCV2 抗体。具体操作步骤如下:

- 1、所有试剂(酶结合物除外)使用前恢复至室温;
- 2、对应的板中每孔加入 100 μ L IgM 阳性对照或 IgG 阳性对照、阴性对照,其余每孔加 100 μ L 稀释样品。待检血清样品需用稀释液 1:100 稀释,对照不用稀释。封板 37°C 孵育 60 min;

- 3、每孔加 300 μL 洗涤液, 轻摇微孔板, 迅速翻转微孔板甩出洗涤液, 按此步骤洗涤 4 次;
- 4、每孔加入 100 μL 抗原, 封板, 37°C 孵育 30 min;
- 5、按步骤描述洗涤 4 次;
- 6、每孔加入 100 μL 稀释好的酶标记物 (用稀释液 1:100 稀释, 现用现配), 封板 37°C 孵育 30 min;
- 7、按洗涤步骤洗涤 4 次;
- 8、每孔加入 100 μL 底物溶液, 室温放置 5 min 后, 每孔再加入 100 μL 终止液;
- 9、加终止液 5 min 内, 450nm 读取 OD 值。

选取 IgG 和 IgM 双阴性的仔猪作为本研究实验动物, 感染组还分别设置两只自然感染 PCV2 仔猪即 IgM、IgG 抗体阳性作为阳性对照和抗体双阴性作为阴性对照。

2.1.2.2 细胞毒感染与疫苗免疫

疫苗免疫组: 肌肉注射, 2 mL/只, 每周采集一次血清, 35 日后对 IgG 和 IgM 抗体双阴性猪用相同剂量的疫苗追加免疫; 感染组: 取 PCV2 细胞毒株, 通过肌肉注射 (2 mL/只) 和鼻腔 (2 mL/只) 接种进行感染, 每隔 5 天进行颈动脉采血。追加免疫实际上增加了实验动物数量, 因为再次免疫和感染的猪血清抗体均表现为 IgG 和 IgM 抗体阴性。

2.1.2.3 血清采集与处理

将采集的血液样本 12000 rpm 离心, 分离血清, 分装保存至 -20°C, 留出一管进行抗体检测。

2.1.2.4 血清抗体检测

按照实验动物筛选中的操作步骤, 用商品化的 INGEZIM Circovirus IgG/IgM Kit 试剂盒检测抗体消长水平。使用该试剂盒需注意以下几点: 避免混同使用其他试剂盒的试剂; 使用前所有试剂恢复至室温 (20°C-25°C); 避免使用过期的试剂和混合不同批次的试剂; 每次使用试剂盒都要对阳性对照和阴性对照进行系统的检测。试验结果有效性的前提是 IgG 和 IgM 阳性对照 OD 值 > 0.7, 阴性对照 OD 值 < 0.3。结果判定: 样品 $\text{OD}_{450} > \text{cut-off}$ 值为阳性, 反之为阴性, 而 IgM cut-off 值 = IgM 阳性对照 $\text{OD}_{450} \times 0.4$, IgG cut-off 值 = IgG 阳性对照 $\text{OD}_{450} \times 0.3$ 。

2.1.2.5 抗体动态结果分析

将检测的抗体结果用 Excel 表格进行统计分析。

2.2 实验结果

2.2.1 实验动物筛选结果

布病检测结果均为阴性。免疫组筛选出 9 只 IgG 和 IgM 抗体双阴性猪, 标号为 1702、1704、1708、1709、1710、1713、1714、1717 和 1720, 进行疫苗接种, 免疫后 35 天对抗体双阴性的 1704、1708 和 1713 追加免疫; 感染组共筛选出 8 只, 其中 1902 和 1903 作为自然感染的阳性对照组 (IgM 抗体阳性), 而 1904 和 1906 作为阴性对照组 (IgG 和 IgM 抗体双阴性), 剩余 4 只编号为 1907、1909、1911 和 1912 作为感染组进行人为 PCV2 细胞毒感染。

2.2.2 免疫和感染组抗体动态规律

免疫和感染后, IgM 抗体首先产生, 持续时间较短; 而后 IgG 抗体占主导地位, 且持续时间较长, 这与抗体产生的一般规律相符; 与免疫组相比, 感染组 (自然感染和细胞毒感染) 产生的 IgM 持续时间较长, 细胞毒感染产生的 IgM 存在时间为 20 d-30 d, 自然感染 (感染组的阳性对照) 产生的 IgM 持续 55 d, 而免疫组产生的 IgM 存在时间不超过 14 d。通过监测 IgM 抗体规律, 可以优化疫苗接种程序, 免疫后 IgM 首先产生, 再次加强免疫时应避开 IgM 阳性期; 一般来说免疫后 IgM 由阳性变为阴性, 如果不追加免疫, IgM 应一直为阴性, 如果此时 IgM 变为阳性, 一定是病毒感染所致, 由此可以区分 PCV2 感染和免疫。

表 1.1 疫苗免疫实验猪血清中 PCV2 IgG 抗体消长

Table 1.1 The growth and decline of IgG antibodies detected from PCV2 vaccine immunization group

Dpi	7	14	21	28	35	42	49	56	63
1702	-	-	-	+	+	+	+	+	+
1704	-	-	-	-	-				
1708	-	-	-	-	-				
1709	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1710	+	+	+	+	-	+	+	+	+
1713	-	-	-	-	-				
1714	-	+	+	+	+	+	+	+	+
1717	+	+	+	+	-	-	+	+	+
1720	-	-	-	-	-	-	+	+	+
1704'	-	+	+	+	+	+	+	+	+
1708'	-	+	+	+	+	+	+	+	-
1713'	-	-	+	+	+	+	+	+	+

注: 1704'、1708' 和 1713' 为追加免疫, 故免疫 35 天之后的抗体没有相应值

1704'、1708' and 1713' were in the enhanced immune group, so there was no corresponding value for antibodies after 35 days of immunization.

表 1.2 疫苗免疫实验猪血清中 PCV2 IgM 抗体消长

Table 1.2 The growth and decline of IgM antibodies detected from PCV2 vaccine immunization group

Dpi	7	14	21	28	35	42	49	56	63
1702	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1704	-	-	-	-	-				
1708	-	-	-	-	-				
1709	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1710	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1713	-	-	-	-	-				
1714	+	+	-	-	-	-	-	-	-
1717	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1720	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1704'	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1708'	-	+	+	-	-	-	-	-	-
1713'	-	-	+	-	-	-	-	-	-

注: 1704'、1708' 和 1713' 为追加免疫, 故免疫 35 天之后的抗体没有相应值

1704'、1708' and 1713' were in the enhanced immune group, so there was no corresponding value for antibodies after 35 days of immunization.

表 1.3 PCV2 感染实验猪血清中 PCV2 IgG 抗体消长

Table 1.3 The growth and decline of IgG antibodies detected from PCV2-infected group

Dpi	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
1902	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1903	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1904	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
1906	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1907	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
1909	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
1911	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
1912	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

表 1.4 PCV2 感染实验猪血清中 PCV2 IgM 抗体消长

Table 1.4 The growth and decline of IgM antibodies detected from PCV2-infected group

Dpi	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
1902	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1903	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1904	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1906	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1907	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
1909	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1911	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
1912	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

2.3 讨论

本试验探究了 PCV2 感染和疫苗免疫后机体产生的 IgG 和 IgM 抗体的消长规律, PCV2 疫苗免疫或者病毒感染后, IgM 抗体首先产生, 持续时间相对短暂, 而后 IgG 抗体稍晚产生, 存在时间较长, 符合抗体产生的一般规律; 感染组(自然感染和细胞毒感染)产生的 IgM 持续时间较长, 细胞毒感染产生的 IgM 存在时间为 20-30 d, 自然感染(感染组的阳性对照)产生的 IgM 超过 55 d, 而接种灭活疫苗的免疫组 IgM 的存在时间不超过 14 d。

有研究表明, 猪感染 PCV2 后, 即使表现为亚临床症状, 血清抗体在感染 10-28 d 后发生转变(Allan et al., 1999; Meerts et al., 2005), 而患有 PMWS 的猪血清抗体转变时间会延后(Okuda et al., 2003)。Meerts 发现猪在感染 10 d 产生高滴度 IgM 抗体(Meerts et al., 2006), 但也有研究报道, IgM 抗体产生早于抗猪 PCV2 IgG 抗体, 在 14-21 d 发生转变, 而 IgG 抗体更能持续存在 69 d, 且认为 IgM 抗体阳性标志着 PCV2 病毒血症产生(Fort et al., 2007)。在研究 ELISAs 和病毒中和试验相互关系中发现, PCV2 感染后猪群产生的中和抗体为 IgG 而不是 IgM (Fort et al., 2007), 中和抗体 IgG 水平与能否降低病毒感染有关(Fort et al., 2007, 2009a), 相关报道也证实, 患有 PMWS 猪体内存在较低或不存在抗 PCV2 感染的中和抗体(Meerts et al., 2006)。

本研究发现,通过监测 IgM 抗体产生特点,可为优化 PCV2 疫苗接种程序提供技术支持。由表 1.1、1.2、1.3 和 1.4 可知,疫苗免疫或者病毒感染后 IgM 抗体的存在时间相对稳定,会在一段时间内持续存在,继而迅速下降变为阴性,通过免疫球蛋白类别转换产生 IgG,而后血清中 IgG 抗体占据主导地位。因此,建议 PCV2 疫苗免疫接种时应该考虑避开 IgM 抗体阳性期,此时机体内的病毒复制可能正处于活跃期,接种疫苗容易诱发疾病的发生,或者达不到免疫效果,甚至发生免疫失败;IgM 抗体在免疫后 7-14 d 表现为阳性,然后抗体水平迅速下降变为阴性,在下次接种疫苗之前如果检测到 IgM 抗体结果为阳性,那么必定出现了新一轮的 PCV2 感染,建议加强免疫时要避开此时期。

值得注意的是,在本研究中 PCV2 自然感染即筛选时 IgM 为阳性的猪和 PCV2 抗体为双阴性的猪都饲养在相同的猪舍中,PCV2 可能会通过直接传播和间接传播的方式感染阴性猪。由表 1.3 和 1.4 可知,实验动物中确定了同群感染的现象。1904 和 1906 作为阴性对照存在,未感染 PCV2 细胞毒,但是感染后 15d 1904 的 IgM 抗体变为阳性,并持续了 40 d 左右,IgG 抗体在感染后 20 d 也变为阳性,这明显符合感染病毒后抗体产生的规律,由此可推测 1904 组在试验过程中出现了 PCV2 自然感染的问题。类似的情况也发生在 1911 组,1911 作为实验组人工感染过 PCV2 细胞毒,但是感染后 5-30 d 时,IgG 和 IgM 抗体一直表现为阴性,可能原因是人为感染 PCV2 失败,未引起机体的免疫应答反应。但在感染后 35 d 时,IgM 抗体变为阳性,IgG 抗体在感染后 40 d 也变为阳性,导致这种现象的原因可能是 PCV2 自然感染所致。表 1.3 和 1.4 结果表明,人工感染 PCV2 室验动物机体产生的 IgM 抗体比自然感染 PCV2 产生的 IgM 持续时间相对短暂,1907、1909 和 1912 作为实验组 IgM 存在周期为 20-30 d,而自然感染的阳性对照组 1902 和 1903 实验猪体内产生的 IgM 一直持续存在,1904 组的 IgM 也持续了 40 d,推测可能原因是 PCV2 的细胞毒毒力弱于自然感染的 PCV2 野毒或者分离毒株的毒力发生改变所致。

此外,有文章报道通过 INGEZIM IgG/IgM 试剂盒检测 IgM/IgG 抗体,结合免疫时间可以综合判断疫苗免疫效果(牛德料, 2018),与本文研究目的有异曲同工之处,但是本文主要通过 IgM 的存在时间和状态可以区分病毒感染与疫苗免疫产生的抗体,对优化疫苗免疫程序提供技术参考。

本研究通过阐明 PCV2 疫苗免疫和病毒感染的 IgG 和 IgM 抗体消长规律,发现人工感染 PCV2 细胞毒产生的 IgM 存在时间为 20-30 d,自然感染(感染组的阳性对照)产生的 IgM 持续 55 d,而接种灭活疫苗的免疫组 IgM 的存在时间不超过 14 d,建议 PCV2 疫苗首免或加强免疫时应该考虑避开 IgM 抗体阳性期;IgM 抗体如果在免疫后变为阴性,在下次接种疫苗之前如检测到结果为阳性,那么必定出现了新一轮的 PCV2 感染。通过监测 PCV2 IgM 抗体产生特点可以为优化 PCV2 免疫程序、区分病毒感染和免疫提供理论依据和技术支持。

第三章 基于免疫球蛋白结合蛋白建立检测 PCV2 IgG 的捕获 ELISA

葡萄球菌蛋白 A(*Staphylococcal protein A*, SPA)、链球菌蛋白 G(*Streptococcal protein G*, SPG)和大消化链球菌蛋白 L(*Peptostreptococcus magnus protein L*, PPL)是一类定义明确的细菌免疫球蛋白结合蛋白(Immunoglobulin-binding proteins, IBPs), 通过以非免疫方式与 IgG 的特定片段相互作用, 广泛应用于 IgG 抗体的纯化和检测(Firth et al., 2009; Harmset et al., 2001)。本研究中将 IBPs 为包被抗原以结合血清中总 IgG, 辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)标记的 PCV2 Cap 作为二抗来结合 PCV2 特异性 IgG 抗体。结果表明, OD₄₅₀ 和 P/N 值均显示 SPG 比 SPA 和 PPL 更能有效地捕获猪血清中的 IgG; ROC 曲线确定该方法的 cut-off 值为 0.61, 对应的敏感度和特异性分别为 93.9%和 90.3%。对 187 份临床标本的检测结果表明, 该方法与商品化的 INGEZIM Circovirus IgG/IgM Kit (N-ELISA)总符合率为 96.26%。鉴于猪场中大规模检测所需的 N-ELISA 成本较高, 建立的基于 SPG 高特异性、高灵敏度的抗体捕获 ELISA 检测试剂盒具有较好的应用前景。

3.1 材料与方法

3.1.1 材料

3.1.1.1 重组质粒、细胞和毒株

重组 PCV2 Cap 质粒、PCV2 细胞毒株和 PK-15 细胞均为中国农业科学院兰州兽医研究所猪禽消化道感染与黏膜免疫研究创新团队构建并保存。

3.1.1.2 血清样品

所有血清样品均为中国农业科学院兰州兽医研究所猪禽消化道感染与黏膜免疫研究创新团队保存。

3.1.1.3 主要试剂

SPA 购自北京博奥龙免疫技术有限公司, SPG 和 PPL 购自兰州乾煜宏达商贸有限公司, INGEZIM Circovirus IgG/IgM Kit 试剂盒购自甘肃科美特生物有限公司, 细胞培养液 DMEM、Carbonate-Bicarbonate Buffer、Phosphate-Citrate Buffer with Sodium Perborate 和 anti-pig IgG (HRP) 抗体系 SIGMA 产品, Triton x100、4%多聚甲醛、羊抗猪 FITC 抗体和 DNase/RNase-Free Deionized water 系 Solarbio 产品, Ni-NTA Agarose 系 QIAGEN 产品, 脱脂奶粉系 BD 产品, ECL 发光底物系 Thermo Fisher 产品, 蛋白 HRP 标记服务系北京博奥龙免疫技术有限公司支持, 其他试剂系国产分析纯。

3.1.1.4 主要仪器设备

ELISA 酶标板系 Costar 产品, 移液器和离心机(台式)均为 Eppendorf 公司产品, 酶标仪购自美谷分子仪器(上海)有限公司, 电泳仪和凝胶成像系统均为 Bio-Rad 产品。

3.1.2 方法

3.1.2.1 标准对照血清筛选

在 24 孔板中接种 PK-15 细胞, 于 37°C 5% CO₂ 培养箱中培养 1 d, 汇合度约为 70%-90%时感染 PCV2 传代细胞毒, 18-24 h 后换成含 2%胎牛血清的细胞维持液, 继续于培养箱中培养 24 h, 按照间接免疫荧光(Indirect immunofluorescence and, IFA)的步骤进行操作。具体程序为: 用 4%多聚甲醛室温固定细胞 15 min, PBS 洗涤 3 次后, 加入 5% Triton x100 (PBS)浸润细胞 15-20min, PBS 洗涤, 将待测血清 1:50 稀释, 作为一抗加至细胞中, 4°C过夜或者 37°C孵育 2 h, TBS-T 洗涤后, 加入 1:300 稀释的 anti-pig FITC 二抗, 37°C 孵育 1 h 后, 倒置荧光显微镜下观察荧光强度。

3.1.2.2 PCV2 Cap 蛋白的表达和鉴定

将实验室构建和保存的重组 PCV2 Cap 质粒在 *E.coil* 中进行诱导和表达(Yin et al., 2010)。将表达后的大肠杆菌进行超声波破碎, 7000 rpm 离心, 分别收集上清和沉淀, 跑 SDS-PAGE 电泳后进行考马斯亮蓝染色, 检测 PCV2 Cap 的表达水平。用 Ni⁺亲和层析柱纯化 His 标记的 Cap 蛋白, western blot 鉴定。具体步骤为: 将纯化蛋白的 Cap 蛋白 (1mg/mL) 转移到硝酸纤维素膜上, 室温下用 5%脱脂乳孵育 1 h 后, 分别与 PCV2 抗体(猪阳性血清, 1:100)和二抗(抗猪 HRP, 1:5000)孵育; 最后, 利用 ECL 发光底物对膜进行暗室曝光。将纯化的 Cap 进行 HRP 标记服务。

3.1.2.3 筛选最佳包被抗原以及包被抗原和待检血清最佳浓度的确定

采用棋盘滴定法, 将三种包被抗原 SPA、SPG 和 PPL (浓度 15 ng/μL) 分别按照 1:400、1:800 和 1:1600 三个梯度稀释于 0.05M 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)中, 100 μL/孔包被在 96 孔板中, 4°C过夜孵育; 洗涤后, 将标准血清用 TBS-T(pH 7.4, 0.05% Tween-20)稀释至 1:40、1:80 和 1:160 分别加至对应孔中, 然后按照常规 ELISA 方法进行剩余部分的操作。

3.1.2.4 最佳血清反应时间的确立

包被抗原和血清的最佳浓度确定之后, 将血清样品在 37°C分别孵育 0.5 h、1 h 和 2 h, 比较阴阳性标准血清的 OD₄₅₀ 和 P/N 值, 确定血清与包被抗原结合的最适反应时间。

3.1.2.5 反应体系最佳 pH 的确立

包被抗原及血清浓度、反应时间确定之后, 通过设置一系列血清稀释液的 pH 值: pH 4.5、pH 5.5、pH 6.5、pH 7.5、pH 8.5、pH 9.5 和 pH 10.5, 观察包被抗原在不同 pH 值下结合血清中 IgG 抗体的能力, 根据 OD₄₅₀ 值确定反应体系的最佳 pH。

3.1.2.6 cut-off 值的确立

根据已建立的 ELISA 程序, 选择 64 份标准血清进行测定, 每份设置两个平行对照孔。将血清的 OD₄₅₀ 值输入到 SPSS Statistics 17.0 中绘制特性曲线 ROC。从与 ROC 曲线敏感性和特异性相关的一系列数值中选择最大 Youden 指数(敏感性与特异性之和减去 1)作为该方法的临界值。而高于临界值的 ELISA 结果被认为是阳性, 反之阴性。

3.1.2.7 特异性、敏感性试验

通过检测 4 份标准阳性血清, 评价该方法的敏感性, 即每份血清样品用 PBS-T 作倍比稀释, 从 1:50 稀释至 1:3200, 然后用建立的 ELISA 方法进行检测; 为确定该方法的特异性, 对 CSFV、PEDV 和 FMDV 的阳性样品进行检测, 同时设置 PCV2 标准阴性和阳性血清对照组, 测定血清交叉反应。

3.1.2.8 符合率试验

通过对 187 份 PCV2 疫苗免疫组和病毒感染组采集的血清样品进行检测, 比较该方法与商品化 N-ELISA 方法的定性结果, 分析两者之间的符合率, 以确定所建立的 ELISA 方法的可靠性。

3.2 实验结果

3.2.1 血清样品盘的建立

通过 IFA 的方法筛选出 31 份 PCV2 阴性血清和 33 份阳性血清，作为样品盘以建立该 ELISA 方法并确定 cut-off 值及其敏感性。

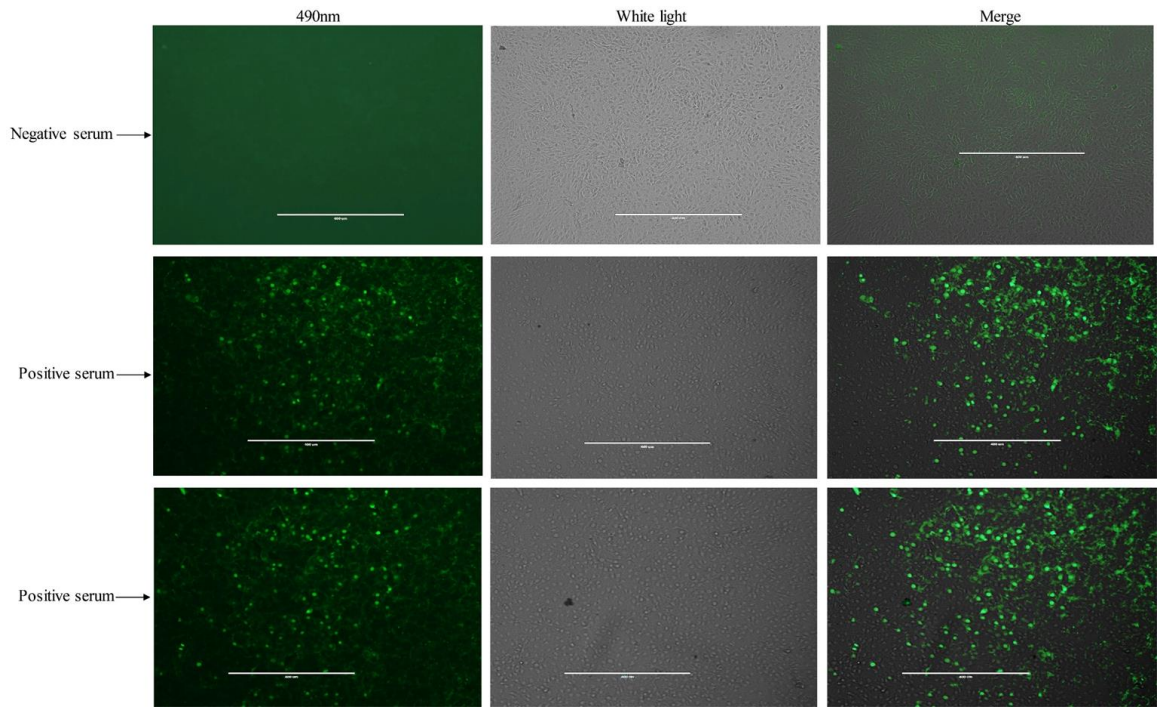


图 2.1 部分标准血清的 IFA 结果

Fig 2.1 Partial reference serum immunofluorescence results

3.2.2 PCV2 Cap 蛋白的表达及鉴定

通过 SDA-PAGE 证实 PCV2 Cap 重组蛋白在大肠杆菌中成功表达，镍离子柱纯化效果较好(图 2.2)。Western blot 显示抗体能够识别纯化的 Cap 蛋白，说明具有反应原性（图 2.2）。

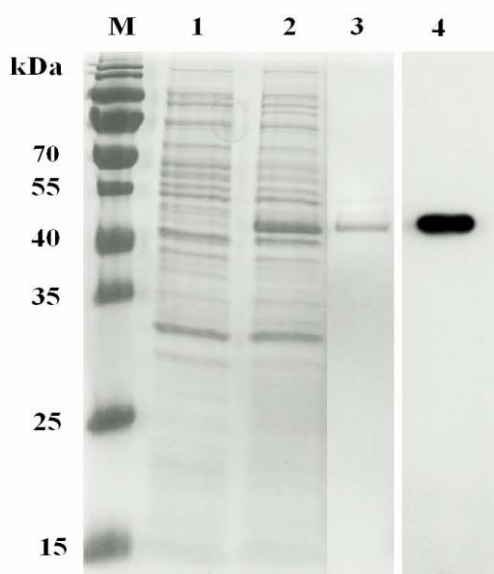


图 2.2 PCV2 Cap 蛋白的 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析

Fig 2.2 SDS-PAGE and Western Blot analysis of PCV2 Cap

M: 分子蛋白 Marker (10-170 kDa); 1 和 2: IPTG 未诱导和诱导后的重组 PCV2 Cap; 3: 纯化的 PCV2 Cap; 4: 纯化 Cap 的 Western Blot。

M: Protein molecular weight Marker(10-170 kDa); Line1 and Line2: Uninduced and IPTG-induced recombinant PCV2 Cap; Line3: Purified PCV2 Cap; Lane 4: Western Blot of purified proteins.

3.2.3 ELISA 反应条件的优化

棋盘滴定法结果表明, 无论 OD_{450} 还是 P/N 值均显示 SPG 为最佳捕获抗原 (图 2.3)。SPG 最佳包被浓度为每孔 1.875 ng(1:800), 血清的最佳稀释度为 1:80 (图 2.3 和图 2.4)。将血清放置于 37°C 分别与 SPG 作用 0.5 h、1 h 和 2 h, 结果显示, 随着培养时间的延长, 阴性血清和阳性血清的 OD_{450} 值相应增加 (表 2.1)。Akerstrom 等人曾报道 SPG 与 IgG 在 30-45 min 的结合率可达 50%, 然后逐渐减慢, 即使 16.5 h 后, 它仍在缓慢上升(Akerstrom and Bjorck, 1986)。结合 P/N 值, 血清最佳反应时间设置为 1 h (图 2.5a)。此外, 缓冲溶液的 pH 值对 SPG 结合血清中的 IgG 没有显著影响 (图 2.5b)。然而, 这一结论与以前的报告不一致(Akerstrom and Bjorck, 1986), 可能是因为它们的反应相不同, 这表明 SPG 能够很好地适应反应环境的酸碱度。因此, 本研究中的反应体系的 pH 设定为 5.0, 酸性环境可以避免其他免疫球蛋白的影响, 如血清中 IgM, 并减少非特异性反应。

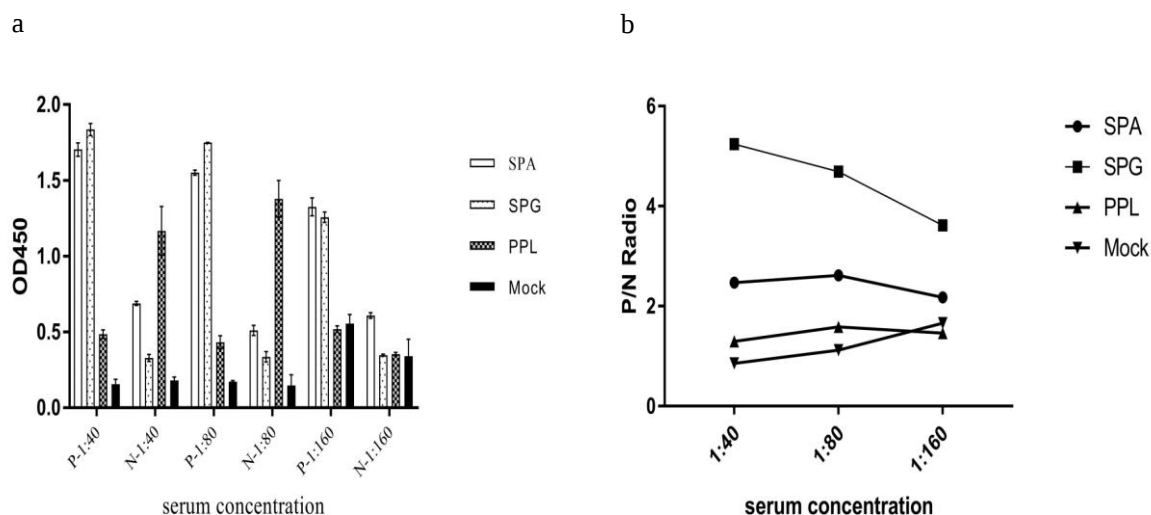


图 2.3 IBPs 在不同的血清稀释度下结合 IgG 抗体的差异

Fig 2.3 The binding IgG ability of different IBPs

结果显示, SPG 为最佳包被抗原, 血清最佳稀释度为 1:80。a: 每孔包被 1.875 ng 抗原, 血清稀释度在 1:40、1:80 和 1:160 时不同 IBPs OD₄₅₀ 的差异。 b: 每孔包被 1.875 ng 抗原, 血清稀释度在 1:40、1:80 和 1:160 时不同 IBPs P/N 的差异。

The results showed that SPG was the best coated antigen and the optimal serum dilution was 1:80. a: Comparison of different IBPs under the optimum condition (1.875 ng each well) for affinity to IgG with positive serum and negative serum at a dilution of 1:40, 1:80 and 1:160. b: Comparison of P/N values for affinity to IgG under the optimum condition of different IBPs (1.875 ng each well) with serum concentration at 1:40, 1:80 and 1:160.

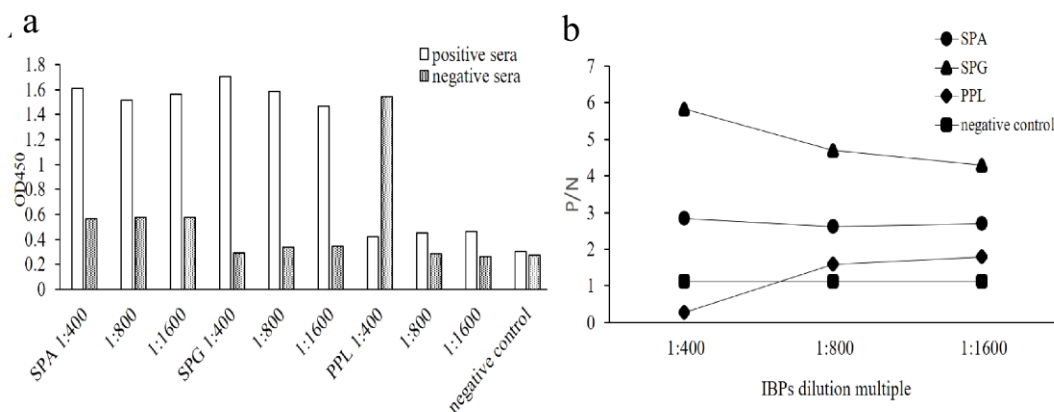


图 2.4 在最佳血清稀释度 1:80 条件下, 不同浓度的 IBPs 结合 IgG 能力的差异。

Fig 2.4 Under the optimal serum dilution of 1:80, the IgG binding ability of different concentrations of IBPs

结果显示, SPG 为最佳包被抗原, 最佳稀释度为 1:800。A、B 分别为 IBPs (浓度为 15 ng/ul) 在不同稀释度结合阴阳性血清中 IgG 抗体的 OD₄₅₀ 值和 P/N 值。

The results showed that SPG was the best coating antigen and optimal dilution was 1:800 (concentration 15 ng/ul). a and b were the OD₄₅₀ value and P/N value of IgG antibody in negative positive serum bound by IBPs at different dilutions, respectively.

表 2.1 反应时间对 SPG 结合血清中 IgG 的影响

Table 2.1 Effect of temperature on IgG capture by SPG

sample ID	37 °C 2 h	37 °C 1 h	37 °C 0.5 h
1	1.661	1.5616	0.744
2	1.2046	1.0271	0.6197
3	1.3942	1.0234	0.4865
4	1.6193	1.299	0.5823
5	0.6917	0.3582	0.1911
6	0.5666	0.3182	0.2029
7	0.6083	0.224	0.1209
8	0.4677	0.2131	0.2073

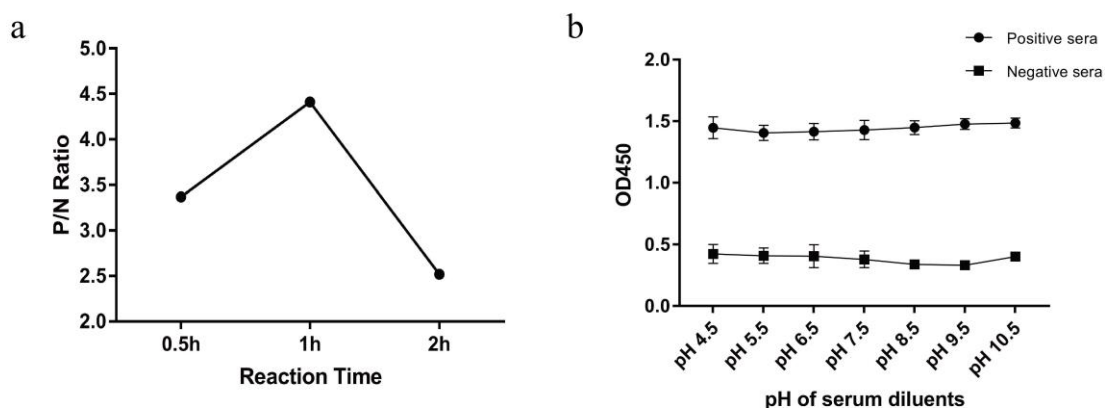


图 2.5 反应条件的优化

Fig 2.5 Optimization of reaction conditions

a: SPG 在不同时间内结合血清的 P/N 值, 结合 OD₄₅₀ 值, 确定血清孵育时间为 1 h; b: 不同 pH 对 SPG 结合 IgG 的影响, 血清稀释液 buffer 的 pH 对反应影响不明显。

a: The P/N of serum in different reaction time. The incubation time of serum was determined to be 1 h; b: The effect of pH on the binding ability of SPG. The pH of serum buffer had no significant effect on the reaction.

3.2.4 cut-off 值的确立

为建立 PCV2 IgG 定性检测方法, 采用 SPSS Statistics 17.0 软件对 33 份阳性血清样品和 31 份阴性血清样品结果进行分析, 以确定 cut-off 值。结果表明, 最大 Youden 指数和 cut-off 值分别为 0.842 和 0.61, 曲线下面积分别为 0.954, 对应的敏感度和特异度为 93.9% 和 90.3% (图 2.6)。

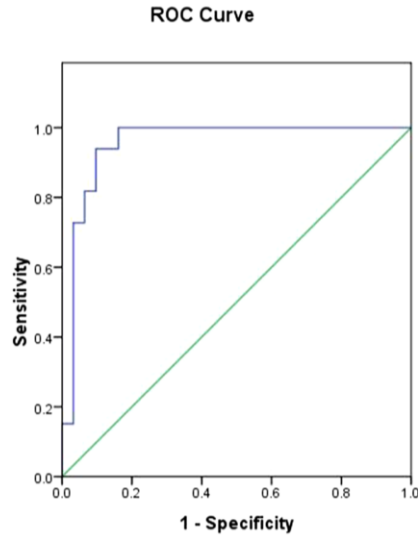


图 2.6 ROC 曲线确定临界值

Fig 2.6 The ROC curve analysis of the C-ELISA based on SPG

曲线下面积为 0.954，对应的 cut-off 值为 0.61。

The area under the ROC curve is 0.954, when the optimal cut-off value was 0.61.

3. 2. 5 敏感性和特异性分析

检测 4 份阳性标准血清，从 1:50 倍比稀释至 1:3200。当稀释倍数为 1:1600 时，血清由阳性变为阴性（图 2.7），表明该方法具有较好的敏感性。同时，该方法对 CSFV、PEDV 和 FMDV 阳性血清均无交叉反应（表 2.2）。

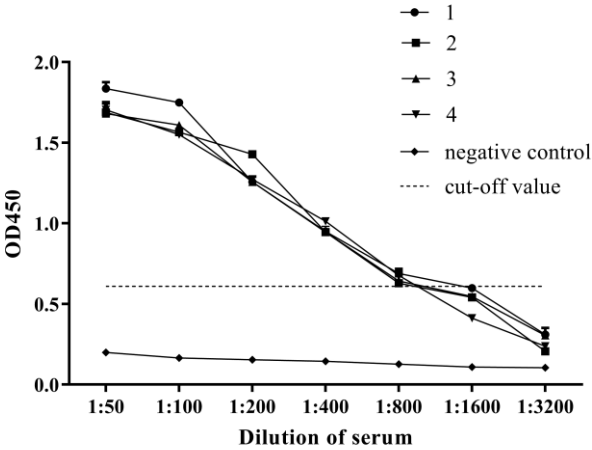


图 2.7 敏感性试验

Fig 2.7 Determination of the sensitivity of SPG-ELISA.

4 份阳性标准血清和阴性对照血清用倍比稀释法分别从 1:50 稀释至 1:3200，结果显示，在稀释度为 1:1600 时，阳性血清变为阴性，表明该方法具有较好的敏感性。

Four positive standard serums and negative control serums were diluted from 1:50 to 1:3200 by multiple dilution method, respectively. The results showed that the positive serums became negative when the dilution was 1:1600, indicating that this method had a good sensitivity.

表 2.2 特异性试验

Table 2.2 Determination of the specificity

Sample	CSFV	PEDV	FMDV	PCV2 +	PCV2 -
OD ₄₅₀	0.3311	0.5093	0.474	1.2852	0.3183
Result	-	-	-	+	-

3.2.6 基于 SPG 的 ELISA 在血清诊断中的应用

将免疫组的 187 份血清进行检测，并与商品化 N-ELISA 法比较。两种检测方法均显示 130 份血清为阳性，50 份血清为阴性。C-ELISA 与商品化检测试剂盒的符合率为 96.26%。其中，有 136 份血清 SPG-ELISA 判定结果为阳性(72.73%)，131 例 N-ELISA 方法鉴定为阳性(70.05%)，该方法的阳性检出率高于 N-ELISA。两者之间的交叉分类试验结果见表 2.3。

表 2.3 血清符合率试验

Table 2.3 Cross-classified test results for the detection of PCV2 IgG antibodies in swine sera

SPG-ELISA	N-ELISA		Total
	Positive	Negative	
Positive	130	6	136
Negative	1	50	51
Total	131	56	187

注：SPG-ELISA 和商品化 INGEZIM IgG 检测试剂盒分别对 187 份血清进行检测，符合率为 96.23%。

SPG-ELISA and commercialized INGEZIM IgG detection kits were used to detect 187 samples of serum respectively, and the coincidence rate was 96.23%.

3.3 分析与讨论

IBPs 在细菌表面表达，介导宿主对细菌感染的免疫防御反应，并通过非免疫方式与 IgG 的特定片段相互作用，在细菌感染的发病机制中起重要作用(Bouvet, 1994;Kronvall and Jonsson, 1999)。IBPs 的典型代表包括 SPA、SPG 和 PPL，它们含有多个连续的胞外免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)结合域，氨基酸序列同源性较高。SPA 和 SPG 主要与 IgG 的 Fc 区结合(Akerstrom and Bjorck, 1989;Bjorck and Kronvall, 1984)，而 PPL 结合 IgL 的 κ 同种型子群，因此具有更宽的免疫球蛋白结合范围(De Chateau et al., 1993)。IBPs 具有独特的结构和结合特性，在抗体的纯化、检测和吸收等方面发挥着重要的作用。SPA 和 SPG 被广泛用作酶标记的次级抗体，用于检测包括人类在内的各种动物病原体特异性抗体(Bhullar et al., 2011;Chen and Fang, 2013;Kang et al., 2006)。

SPA 可以与各种聚合物载体（例如琼脂糖）结合，用于免疫沉淀以精制来自生物溶液的抗体。SPA 通常用于检测方法，如聚集、ELISA 和 Western 印迹，它还广泛用于药物应用中来结合免疫

复合物和血清免疫球蛋白(Rashidieh et al., 2015)。与免疫球蛋白结合的蛋白质在大量的间接初级结合试验中被用作报告蛋白,特别是在兽医诊断中,因为它们适用于许多物种(Nielsen et al., 2004; Nilsson et al., 1987)。Lawman 等使用放射性标记的 SPA 来跟踪牛抗体,特别是针对牛布氏杆菌的 IgG2 亚类(Lawman et al., 1986; Lawman et al., 1984)。此外,酶结合的 SPA 已经用于在水牛、北极熊、牛和人中追踪抗布鲁氏菌抗体; SPA 也被用于针对布鲁氏菌的人抗体的凝集试验(Lawman et al., 1986)。

SPG 也是一种常见的 IBPs,最初在 C 链球菌和 G 链球菌中检测到(Bjorck and Kronvall, 1984)。与 SPA 类似, SPG 能够在不同 pH(4.0-8.0)范围内与多种哺乳动物 IgG 的 Fc 片段结合。此外, SPG 比蛋白 A 具有更广泛的反应性,由于 SPG 与人 IgG 四个亚类的结合特性(Kmiecik and Kolinski, 2008),它更适合于 IgG 的纯化和分离。SPG 是一种 65 kDa(G 型)或 58 kDa(C 型)细胞表面蛋白,可通过与 Fc 区结合来纯化 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 抗体(Kmiecik and Kolinski, 2008)。虽然 SPA 和 SPG 的三级结构非常相似,但它们的氨基酸组成差异很大,从而导致了不同的结合特性。SPG 可用于纯化与 SPA 不能结合的哺乳动物单克隆和多克隆 IgGs, SPG 与大多数哺乳动物 IgGs 具有更强的亲和力,特别是对 IgG 的某些亚类,包括人 IgG3、小鼠 IgG1 和大鼠 IgG2a(Aybay, 2003)。然而,与 SPA 不同, SPG 不与人 IgM、IgD 或 IgA 结合(Graille et al., 2000)。

PPL 自 1985 年被发现以来一直受到特别关注,主要是因为它是一种 Ig 轻链结合蛋白,因此特别适合于单链可变片段、Fab 和 F(ab)₂ 生物分子的纯化(Housden et al., 2003)。PPL 与大量具有 $\kappa 1$ 、 $\kappa 3$ 和 $\kappa 4$ 轻链的 Ig 结合结合(但不与 $\kappa 2$ 和 λ 亚基),从而识别 50% 的人的 Ig 和 75% 以上的小鼠的 Ig(Stura et al., 2002)。SPA 是纯化兔抗体和小鼠 IgG 某些亚类的很好工具,而其他亚类则不被识别,对大鼠 IgG 的亲和力也很低。PPL 对许多缺乏 A 蛋白的 Ig 具有亲和力,因此常用于 SPA 不起作用的蛋白。一般情况下,一种方法并不比另一种更好,它们都具有特定和重叠的功能, Ig 的类型决定了什么蛋白质是最好的使用。

PCV2 导致流产、死产,增加断奶前病死率,并引起严重的免疫抑制,对全世界养猪业经济具有严重威胁。PCV2 的诊断主要集中在细胞浸润、淋巴衰竭、相关的 PCV2 抗原和 PCV2 基因组的标记组织病理损害的检测,用免疫组化和原位杂交方法可以对 PCV2 在可疑组织中的含量和分布进行检测(符貽武等, 2019)。目前, ELISA 试剂盒广泛应用于 PCV2 特异性抗原和抗体检测,在临床诊断中应用前景广阔。

ELISA 判定结果的依据主要取决于 cut-off 值,合适的 cut-off 值有助于减少假阳性或者假阴性出现概率,确保试验具有较高的敏感性和特异性,尤其对于人医方面的诊断具有举足轻重的影响,例如丙型肝炎、幽门螺旋杆菌和副结核的血清抗体诊断。判定 cut-off 值的方法包括标准差比率、测定标本对阴性比值、以阴性对照均值 $\pm 2s$ 或 $3s$ 、百分位数法、双质控、ROC 曲线等,不同方法设置的临界值可能有所差异,但是都要考虑样品的假阳性率和假阴性率。ROC 曲线是显示整个图之间的敏感性和 1-特异性之间的一系列临界点之间的折衷图,其曲线下面积是诊断试验内在效度的有效度量。ROC 曲线能够考虑每一个可能的 cut-off 值,更客观地评价诊断试验的诊断价值和确定最佳临界值,其中 Youden 指数是敏感性和特异性之和减 1,是评价筛查试验真实性的方法,指数越大说明筛查试验的效果越好,真实性越大。ROC 曲线广泛应用于一下几方面:找出最优临界点,使疾病或非疾病患者分类最少;评估一项测试正确挑选患病和非疾病受试者的判别能力;比较两项或两项以上评估同一疾病的试验的效果比较两个或两个以上的观察者测量相同

的测试。

在此，我们利用三种有效的 IBPs 结合猪血清中的 IgG 建立了 SPG-ELISA 方法。结果表明，无论 OD₄₅₀ 或 P/N 值 SPG 为最佳包被抗原。ROC 曲线确定该方法最大 Youden 指数和 cut-off 值分别为 0.842 和 0.61，曲线下面积分别为 0.954，对应的敏感度和特异度为 93.9% 和 90.3%。田间检测结果表明，该方法的阳性检出率(72.73%)高于商品 N-ELISA 法(70.05%)。作为一种包被抗原，SPG 具有许多其他包被抗原（如单克隆抗体）所不具备的独特优点。SPG 能在较宽的 pH 范围内与 IgG 保持亲和力(Qi et al., 2012)。本研究将 ELISA 应用于酸性反应体系中，可有效抑制血清中 IgM 等其他免疫蛋白的活性，从而提高反应的特异性。同时，由于 SPG 结合 IgG 的能力是非特异性的，该方法的包被抗原可以捕获血清中的所有 IgG 抗体。理论上，通过改变不同病原体的抗原作为二抗，可以检测不同疾病产生的 IgG 抗体。用一种方法检测多种抗原也是未来诊断方法的发展趋势。

第四章 捕获 ELISA 检测 PCV2 IgM 抗体方法的建立

IgM 机体对病原体或疫苗产生适应性免疫反应后最早产生的抗体，几天内达到高峰后开始下降，随后 IgG 抗体占主导地位，因此 IgM 在动物疾病早期诊断方面起着关键的作用。血清学检测在评估这些适应性免疫反应中起着核心作用，这种检测方法不仅对评估疫苗的免疫原性至关重要，而且对接触病原体和与其他病毒的交叉反应也具有指导意义(Atre et al., 2019)。本试验利用自己制备的兔抗猪 IgM 多抗作为包被抗原，以捕获血清中所有的 IgM 抗体，然后孵育 HRP 标记的 R2346 重组表位蛋白作为二抗，以检测 PCV2 特异性 IgM 抗体。ROC 曲线确定 cut-off 值为 0.479，该方法具有较高的特异性和敏感性，是诊断 PCV2 早期感染和评价疫苗免疫效果有价值的工具。

4.1 材料与方法

4.1.1 材料

4.1.1.1 质粒和菌株

PCV2 Cap 抗原表位串联连接至 PET32a 载体，由苏州金唯智生物科技有限公司进行基因合成；BL21(DE3)感受态细胞购自全式金生物有限公司。

4.1.1.2 实验动物

2-3 月龄家兔和 BALB/c 小鼠，均购自兰州兽医研究所动物实验中心。

4.1.1.3 血清

所有血清均为本实验室保存。

4.1.1.4 主要试剂

206 佐剂由中国农业科学院兰州兽医研究所猪禽消化道感染与黏膜免疫研究创新团队保存，Native pig IgM 系 Abd 产品，Goat anti pig IgM HRP 抗体系 Bio-Rad 产品，INGEZIM Circovirus IgG/IgM Kit 试剂盒购自甘肃科美特生物有限公司，弗氏佐剂、Carbonate-Bicarbonate Buffer、Phosphate-Citrate Buffer with Sodium Perborate、Rabbit anti-pig IgG (HRP)抗体、anti-mouse(HRP)抗体系 SIGMA 产品，Ni-NTA Agarose 系 QIAGEN 产品，脱脂奶粉系 BD 产品，ECL 发光底物系 Thermo Fisher 产品，anti-mouse TCR β 、anti-mouse CD8a 和 anti-mouse CD4 抗体系 BioLegend 公司产品，Mouse IFN- γ ELISA kit、Mouse IL-4 ELISA kit 购自北京绿源伯德生物科技有限公司；HRP 标记 His Tag 抗体，北京博奥龙免疫技术有限公司产品，蛋白 HRP 标记服务和兔源抗猪 IgM 多抗纯化系北京博奥龙免疫技术有限公司支持，其他试剂系国产分析纯。

4.1.1.5 设备仪器

ELISA 酶标板系 Costar 产品，移液器和离心机（台式）均为 Eppendorf 公司产品，酶标仪购自美谷分子仪器（上海）有限公司，电泳仪和凝胶成像系统均为 Bio-Rad 产品。

4.1.2 方法

4.1.2.1 包被抗原的制备

以 Native pig IgM 为免疫原与弗氏佐剂乳化，按照 200 μ g/只的剂量免疫家兔，采用背部皮下

多点注射和腿部肌肉注射的方式，每隔两周加强免疫；每次免疫前耳缘静脉采血，分离血清，检测抗体水平；最后一次加强免疫后采血分离血清，并纯化 IgG 抗体。免疫程序见表 3.1。

表 3.1 pig native IgM 免疫家兔的免疫程序

Table 3.1 The immune program of pig native IgM

编号	抗原	注射剂量	免疫次数	免疫方式
A	Pig native IgM 200μg	0.2 mL	4	皮下多点注射+肌肉注射
B	Pig native IgM 200μg	0.2 mL	4	皮下多点注射+肌肉注射
C	PBS	0.2 mL	4	皮下多点注射+肌肉注射

4. 1. 2. 2 PCV2 Cap 重组表位蛋白的表达和鉴定

根据文献分析整理 PCV2 Cap B 细胞表位序列，得到六个抗原表位，分别命名为 R1、R2、R3、R4、R5 和 R6；将六个表位进行串联，中间用 Linker(GGGGS)连接，通过 DNASTar 软件对串联表位进行疏水性、表面蛋白可能性、蛋白骨架区的柔韧性以及抗原指数综合分析，得到六组表位组合，分别命名为 R1234、R1235、R1236、R2345、R2346 和 R3456（表 3.2），密码子优化后进行基因合成，克隆至 pET32a 原核表达载体。将合成的质粒在 BL21 大肠杆菌感受态中进行 IPTG 诱导表达，随后跑 SDS-PAGE 鉴定目的蛋白是否表达；将诱导后的菌液进行超声破碎，经 7000 rpm 离心后分别收集上清和沉淀，用 SDS-PAGE 分析蛋白表达在上清还是包涵体中；目的蛋白因带有 His 标签，对其进行 Ni²⁺柱子纯化，将纯化后的六组 Cap 重组表位蛋白进行 Western blot 分析。

表 3.2 PCV2 Cap B 细胞抗原表位

Table 3.2 PCV2 Cap B cell epitope

名称	Cap 氨基酸定位	氨基酸顺序(5' - 3')
R1234	25-43/69-83/117-131/169-183	RRPWL VHPRHRYR WRRKNGGGGSVDMLRFNLDDFVPPGGGGGS GVGSSAII LDDNFVIGGGGSSTIDYFQPNNKRNQL
R1235	25-43/69-83/117-131/193-207	RRPWL VHPRHRYR WRRKNGGGGSVDMLRFNLDDFVPPGGGGGS GVGSSAII LDDNFVIGGGGSVDHVGLGTAFENSKY
R1236	25-43/69-83/117-131/175-195	RRPWL VHPRHRYR WRRKNGGGGSVDMLRFNLDDFVPPGGGGGS GVGSSAII LDDNFVIGGGGSQPNNKRNQLWMRLQTSRNV DH
R2345	69-83/117-131/169-183/193-207	VDMLRFNLDDFVPPGGGGSGVGSSAII LDDNFVIGGGGS STIDYFQPNNKRNQLGGGGSV DHDVGLGTAFENSKY
R2346	69-83/117-131/169-183/175-195	VDMLRFNLDDFVPPGGGGSGVGSSAII LDDNFVIGGGGS STIDYFQPNNKRNQLGGGGSQPNNKRNQLWMRLQTSRNV DH
R3456	117-131/169-183/193-207/175-195	GVGSSAII LDDNFVIGGGGSSTIDYFQPNNKRNQLGGGGGS VDHVGLGTAFENSKYGGGGSQPNNKRNQLWMRLQTSRNV DH

注：下划线序列为 Linker

Note: Underscore sequence is Linker

4. 1. 2. 3 Cap 重组表位蛋白免疫原性分析

将纯化的六组表位串联体重组蛋白和实验室保存的原核表达重组 Cap 蛋白按照 1:1 的比例与 206 佐剂乳化后分别采用肌肉注射的方式免疫 BALB/c 小鼠，剂量为 50 μg/只，同时设置 PBS 阴性对照组，每间隔 7 d 眼眶采血分离血清。按照常规间接 ELISA 方法检测血清中 PCV2 特异性抗体水平；免疫后 35 d 分离小鼠脾脏淋巴细胞，用 PBS（含 2% 犊牛血清）重悬至细胞密度约为

10⁶个/mL, 分别复染 anti-mouse TCR β 、anti-mouse CD8a 和 anti-mouse CD4 抗体, 同时设置单染对照组和不染对照组, 通过流式细胞术检测脾脏淋巴细胞中的 CD4⁺和 CD8⁺细胞的百分比; 按照细胞因子 ELISA 试剂盒说明书, 分别对免疫后 35 d 小鼠外周血分离血清中 IFN- γ 和 IL-4 的含量进行检测, OD 值为标准品和标本的 OD 值减去空白孔值。以标准品浓度作横坐标、OD 值为纵坐标, 绘制标准曲线, 将样品 OD 值代入公式后计算结果即为待检标本中细胞因子的浓度。

4.1.2.4 标准血清的筛选

取 30 μ L 纯化后的 Cap (1 mg/mL) 样品, 加入 4 x loading buffer, 煮沸 10min 后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 上样量为 10 μ L/孔; 将蛋白条带转移至 NC 膜上后, 在 5%脱脂奶粉(TBS-T)中室温封闭 1 h; 用 TBST 洗涤 NC 膜, 然后以 1:50 的比例用脱脂奶粉稀释待检血清, 与膜在室温下摇床上孵育 6 h; 洗涤后, 加入 anti pig HRP 二抗(1:5000), 室温下摇床孵育 1 h; 再次洗涤后, 加入 ECL 发光液进行显色, 暗室曝光。

4.1.2.5 包被抗原和待检血清最佳浓度的确定

采用棋盘滴定法确定包被抗原和待检血清的最佳稀释度。包被不同稀释度的抗猪 Native IgM (4.4 mg/mL) 按照 1:1000、1:2000 和 1:4000 的稀释度作为捕获抗体, 在 4°C 下孵育过夜; 次日, 用脱脂奶粉(PBS)封闭平板, 洗涤后, 在脱脂奶粉中按照 1:10、1:50、1:100 和 1:200 梯度稀释标准血清, 加入相应的孔 (100 μ L/孔) 并在 37°C 下孵育 1h; 之后按照常规 ELISA 方法进行操作, 比较 OD₄₅₀ 值确定两者的最佳浓度。

4.1.2.6 血清最佳孵育时间的确立

包被抗原和血清的最佳浓度确定之后, 将血清样品在 37°C 分别孵育 0.5 h、1 h、3 h 和 24 h, 比较阴阳性标准血清的 OD₄₅₀ 值, 确定血清与包被抗原结合的最适反应时间。

4.1.2.7 二抗最佳稀释度及反应时间的优化

包被抗原及血清浓度、反应时间确定之后, 将 HRP-R2346 用 5%脱脂奶粉作 1:10、1:50、1:100、1:500、1:1000 和 1:2000 的稀释, 进行 ELISA 试验, 确定二抗最佳浓度; 二抗浓度确定后, 将酶标板放置 37°C 与二抗分别反应 0.5 h、1 h、3 h 和 24 h, 通过 OD₄₅₀ 值确定二抗反应时间。

4.1.2.8 cut-off 值的确立

根据已建立的 ELISA 程序, 选择 50 份标准血清进行测定, 每份设置两个平行对照孔。将血清的 OD₄₅₀ 值输入到 SPSS Statistics 17.0 中绘制特性曲线 ROC。从与 ROC 曲线敏感性和特异性相关的一系列数值中选择最大 Youden 指数作为该方法的临界值。而高于临界值的 ELISA 结果被认为是阳性, 反之阴性。

4.1.2.9 敏感性和特异性试验

通过检测 3 份标准阳性血清, 评价该方法的敏感性, 即每份血清样品用 5%脱脂奶粉作倍比稀释, 从 1:50 稀释至 1:1600, 然后用建立的 ELISA 方法进行检测; 为确定该方法的特异性, 对 CSFV、PEDV 和 FMDV 的阳性样品进行检测, 同时设置 PCV2 标准阴性和阳性血清对照组, 测定血清交叉反应。

4.1.2.10 田间样品的检测及符合率试验

通过对 187 份 PCV2 感染组和疫苗免疫组采集的血清样品进行检测, 比较该方法与商品化 N-ELISA 方法的定性结果, 分析两者之间的符合率, 以确定所建立的 ELISA 方法的可靠性。

4.2 结果

4.2.1 兔抗猪 IgM 的制备

用间接 ELISA 检测抗体水平, 结果显示, 抗体效价较高, 如下图所示。

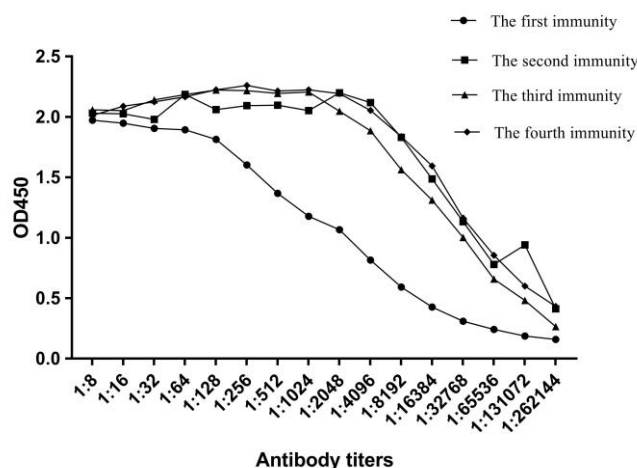


图 3.1 间接 ELISA 检测抗体滴度

Fig 3.1 Curve of antibodies alteration by indirect ELISA test

当抗体稀释至 1: 50000, OD₄₅₀ 值仍大于 1.0。

When the antibody was diluted to 1:50000, the OD₄₅₀ value was still greater than 1.0.

4.2.2 Cap 重组表位蛋白的表达和鉴定

通过 SDA-PAGE 证实六组重组表位蛋白在大肠杆菌中成功表达, 镍离子柱纯化效果较好 (图 3.2)。Western Blot 结果证实构建的带有 His 标签的表位串联体和 Cap 蛋白与 HRP-His-Tag 抗体孵育均显示条带 (箭头所指) (图 3.3)。

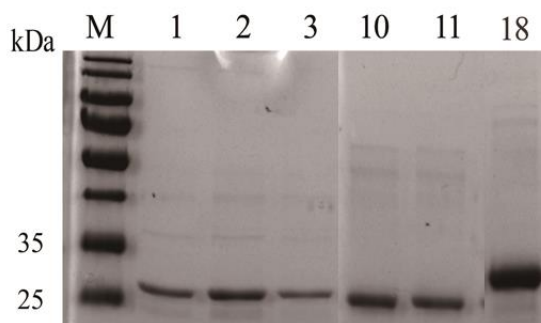


图 3.2 PCV2 Cap 重组表位蛋白纯化结果

Fig 3.2 Purification result of recombinant epitope proteins of PCV2 Cap

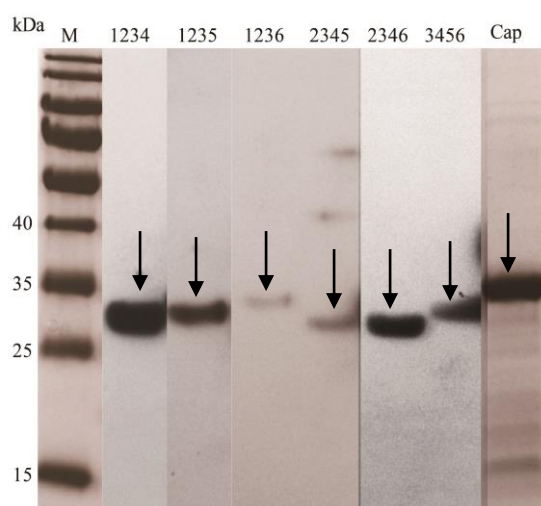


图 3.3 PCV2 Cap 及其重组表位蛋白的 Western Blot 结果

Fig 3.3 Western Blot analysis of PCV2 Cap and recombinant epitope proteins

4. 2. 3 Cap 重组表位蛋白免疫原性分析

间接 ELISA 检测 PCV2 特异性抗体，以实验组与阴性对照组（PBS 组） OD_{450} 比值大于或等于 2.0 的最高稀释倍数的倒数为该血清的抗体滴度。由图可知，R2346 组抗体水平随免疫时间增加而上升，抗体滴度在免疫后 28 d 达到 500（图 3.4），且在免疫后 35 d 持续，显著高于其他实验组和对照组；通过流式细胞术检测 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 比例，结果显示，R1234、R2345、R2346、R3456 和 Cap 组的 $CD4^+$ 细胞比例高于 PBS 组 ($P < 0.05$)（图 3.5a），R1235 和 R2346 组的 $CD8^+$ 淋巴细胞比例与 PBS 组相比有差异，其中 R2346 组差异显著 ($P < 0.01$)（图 3.5b）；通过对免疫后 35 d 血清中 IFN- γ 和 IL-4 检测的结果表明，R2346 组诱导产生的两种细胞因子水平显著高于对照组，其他实验组无明显差异（图 3.6）。综上可知，R2346 重组表位蛋白可以刺激产生 PCV2 特异性抗体，引起机体产生体液免疫和细胞免疫应答，具有良好的免疫学活性。

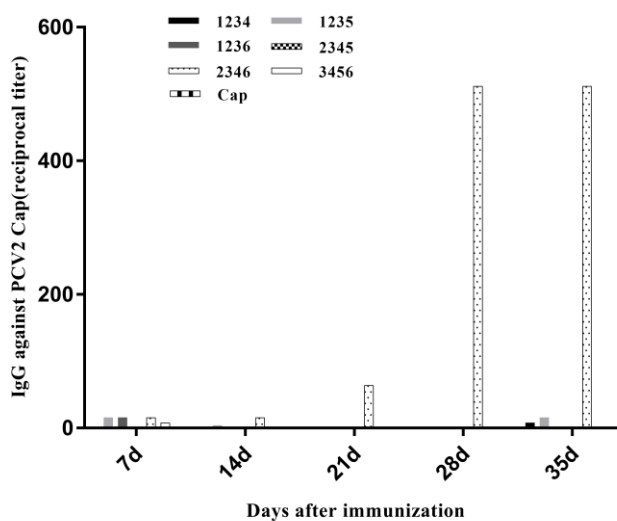


图 3.4 PCV2 Cap 重组表位蛋白免疫小鼠特异性抗体检测

Fig 3.4 Detection of specific antibody of PCV2 Cap recombinant epitope proteins in mice

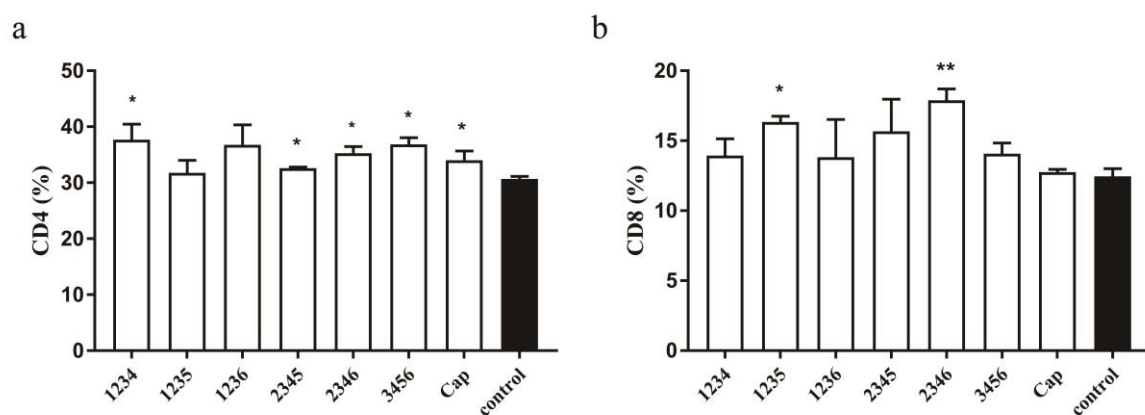


图 3.5 PCV2 Cap 重组表位蛋白免疫 35d 后小鼠脾脏淋巴细胞中 CD4、CD8 百分比

Fig 3.5 Percentage of CD4 and CD8 in spleen lymphocytes of mice immunized with PCV2 Cap recombinant epitope proteins after 35d

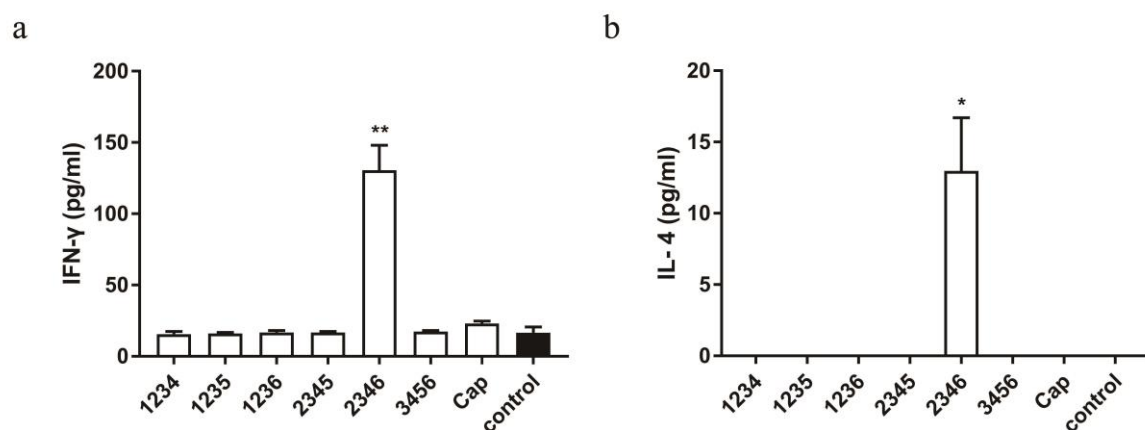


图 3.6 PCV2 Cap 重组表位蛋白免疫小鼠 35d 后血清中 IFN-γ 和 IL-4 检测

Fig 3.6 Detection of IFN-γ and IL-4 in serum of mice immunized with PCV2 Cap recombinant epitope proteins after 35d

4. 2. 4 样品盘的建立

通过 Western blot 的方法筛选出 30 份 PCV2 阴性血清和 20 份阳性血清，作为样品盘以建立该 ELISA 方法并确定 cut-off 值及其敏感性。

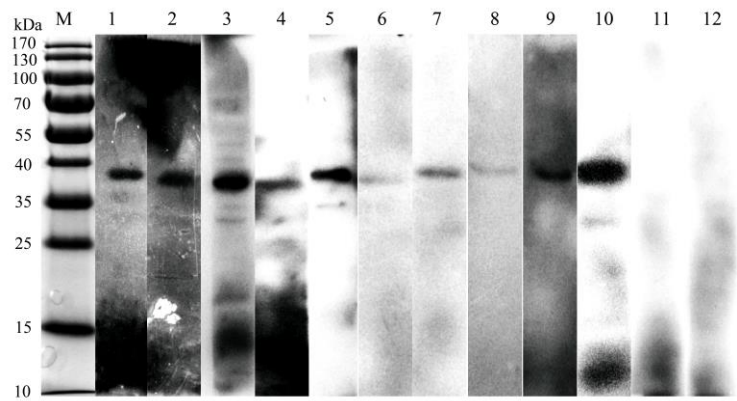


图 3.7 部分检测 IgM 抗体的标准血清

Fig 3.7 Partial standard serum of IgM antibody detection

M: 分子量为 10-170 kDa 的蛋白 Marker; 1-10: IgM 阳性标准血清; 11-12: IgM 阴性标准血清。
M: Protein molecular weight Marker(10-170 kDa); Line1 to Line10: IgM positive serum samples; Line11 and Line12: IgM negative serum samples.

4. 2. 5 ELISA 程序的优化

棋盘滴定法确定抗猪 IgM 最佳包被浓度为 4.4 ng/孔，即 1:1000 稀释，待检血清血清最佳稀释度为 1:100（图 3.8），两者于 37℃共孵育 0.5 h（图 3.9）；TBS-T 洗涤后，加入按照 1:100 脱脂奶粉稀释的 HRP-R2346 二抗（图 3.10），37℃反应 0.5 h（图 3.11）；再次洗涤后，加入 TMB 显色底物室温显色 10-15min，终止液终止显色，450nm 波长下迅速读取 OD 值。

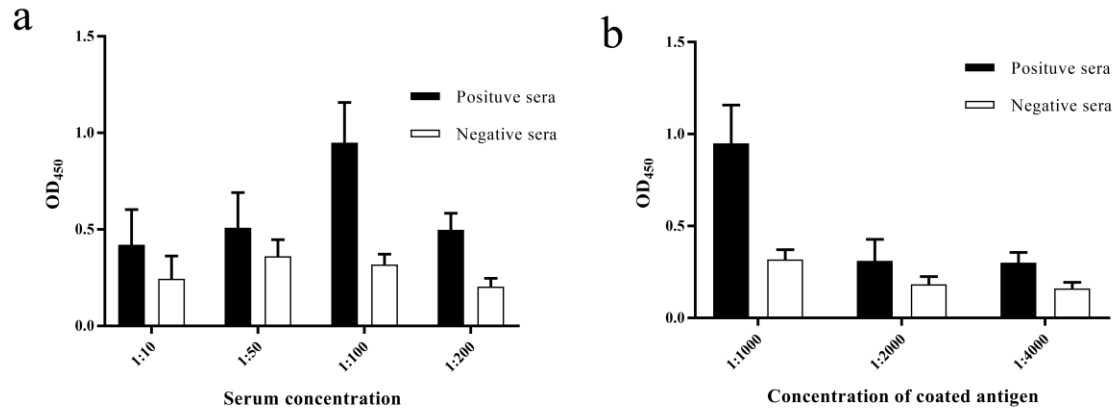


图 3.8 包被抗原和待检血清最佳浓度的确立

Fig 3.8 Determination of the optimal concentration of coated antigen and serum

由图可知，血清最佳稀释度为 1:100，包被抗原最佳稀释度为 1: 1000。

As shown in the figure, the optimal dilution of serum was 1:100, and the optimal dilution of coated antigen was 1:1000.

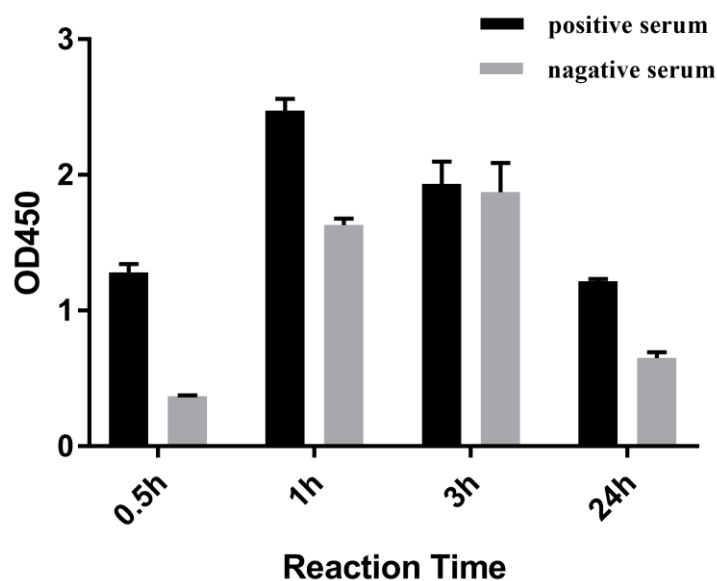


图 3.9 血清最佳孵育时间的确立

Fig 3.9 Determination of the optimal reaction time of serum samples

由图可知，血清最佳孵育时间可定为 0.5 h。

As shown in the figure, the optimal incubation time of serum can was 0.5 h.

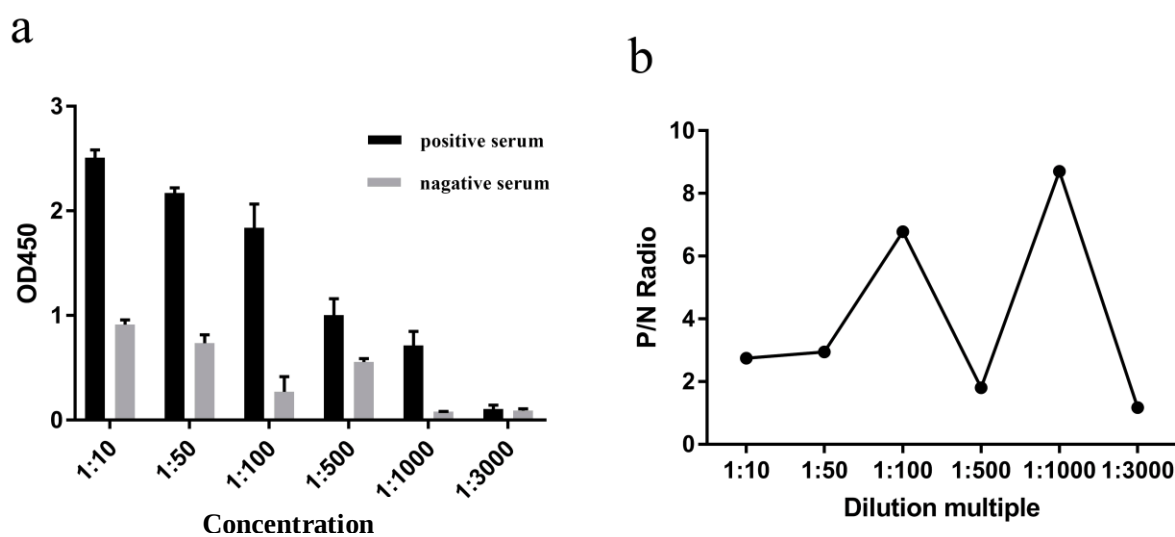


图 3.10 二抗最佳稀释度的确立

Fig 3.10 Determination of the optimal concentration of HRP-R2346

由图可知，二抗最佳稀释度为 1:100。

As shown in the figure, the optimal dilution of secondary antibody was 1:100.

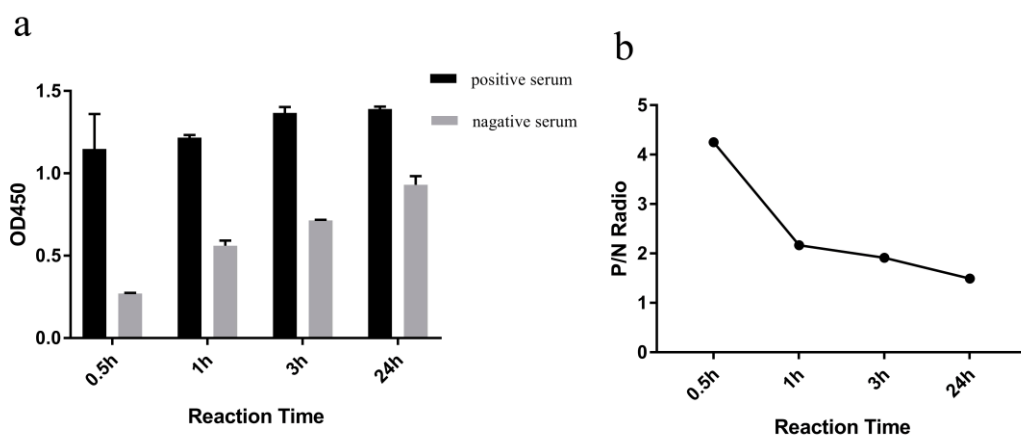


图 3.11 二抗最佳孵育时间的确立

Fig 3.11 Determination of the optimal reaction time of HRP-R2346

由图可知，二抗最佳反应时间为 0.5 h。

As shown in the figure, the optimal reaction time of secondary antibody was 0.5 h.

4.2.6 ROC 曲线确定 cut-off 值

为建立检测 PCV2 IgM 抗体定性方法，用 SPSS Statistics 17.0 软件对输入的 20 份阳性血清样品和 30 份阴性血清样品结果绘制 ROC 曲线进行分析，以确定 cut-off 值。结果显示，曲线下面积为 0.99，最大 Youden 指数为 0.9，对应的临界值为 0.479（图 3.12）。

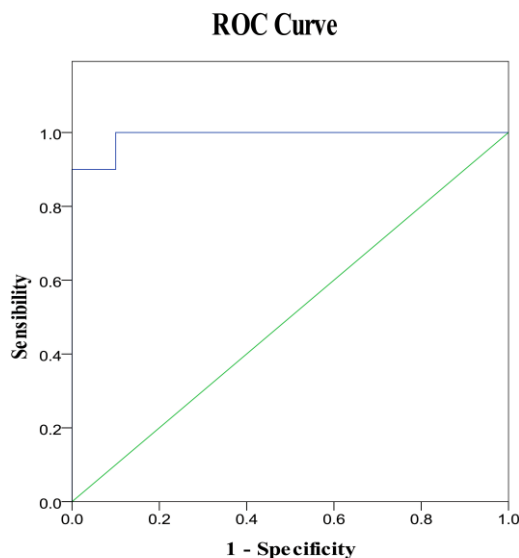


图 3.12 ROC 曲线确定临界值

Fig 3.12 Determination of cut-off value by ROC

曲线下面积为 0.99，cut-off 值为 0.479。

The area under the ROC curve is 0.99, when the optimal cut-off value was 0.479.

4. 2. 7 敏感性和特异性试验

三份 PCV2 IgM 阳性标准血清按照倍比稀释法从 1:50 稀释至 1:1600，同时设置阴性对照，由图可知，当稀释度为 1:800 时，阳性血清转为阴性（图 3.13），敏感性较高；对 CSFV、PEDV 和 FMDV 的阳性样品检测结果显示，该方法与其他血清均无交叉反应，特异性较好（表 3.3）。

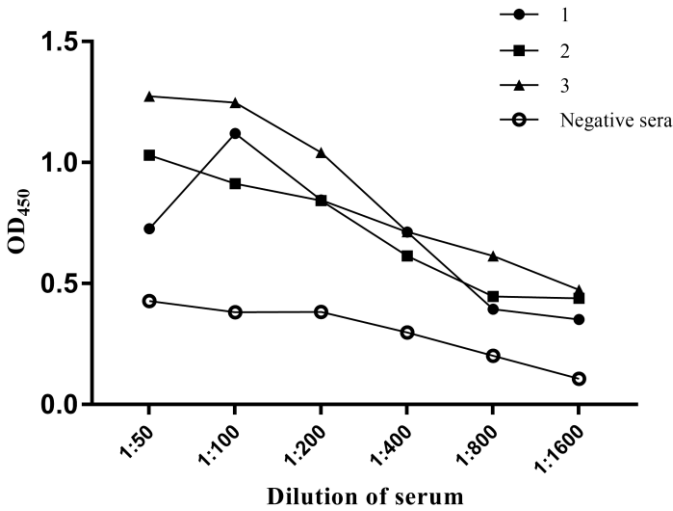


图 3.13 敏感性试验

Fig 3.13 Sensitivity of ELISA

表 3.3 特异性试验

Table 3.3 Specificity of ELISA

Samples	PCV2 +	PCV2-	CSFV	PEDV	FMDV
OD ₄₅₀	1.3723	0.3132	0.2815	0.4162	0.4419
Result	+	-	-	-	-

4. 2. 8 符合率试验

对 187 份田间血清的检测结果显示，49 份血清显示阳性，138 份显示为阴性，阳性检出率为 26.2%，商品化的 N-ELISA 检测结果为 55 份阳性，132 份阴性，阳性检出率为 29.41%；两种检测方法的结果符合率为 91.44%。两者之间的交叉分类试验结果见表 3.4。

表 3.4 交叉分类试验

Table 3.4 Cross-classified test results for the detection of PCV2 IgM antibodies in swine sera

IgM-ELISA	N-ELISA		Total
	Positive	Negative	
Positive	44	5	49
Negative	11	127	138
Total	55	132	187

注：建立的 IgM-ELISA 和商品化 N-ELISA 检测试剂盒分别对 187 份血清进行检测，符合率为 91.44%。

The established IgM-ELISA and commercial N-ELISA were used to detect 187 samples of serum respectively with a coincidence rate of 91.44%.

4.3 讨论

PCV2 被认为是导致 PMWS、PDNS、APE 等 PCVAD 的致病因素，对养猪业造成了巨大的经济损失(Hu et al., 2017)。PCVAD 的临床症状包括体重减轻、呼吸功能障碍、腹股沟浅淋巴结肿大、腹泻和淋巴细胞迅速减少(Vigreet al., 2005)。它可以通过猪之间的直接接触传播，一些研究表明，空气传播也可以引起感染。过去几年与 PCVAD 相关的发病率和病死率的激增是疾病传播和并发感染的直接结果。

免疫分析是评估病原体引起的免疫反应的主要工具，已广泛用于评估疫苗开发中疫苗制剂的免疫原性，但仍然需要新的和更加优化的读出方法来定义疫苗或致病菌诱导的免疫反应，最常用的免疫原性和效价检测方法是 ELISA。该方法是一种快速、高通量、准确测定血清抗体的方法，现有的基于 ELISA 的数据大多来自于对血清中 IgG 的评估，在评估疫苗的免疫原性时，相对较少关注 IgM 抗体的存在。IgM 占血清 Ig 总量的 5%-10%，单体 IgM 以膜结合型表达于 B 细胞表面，是 BCR 的主要构成成分；分泌型 IgM 为五聚体，不能通过血管壁，主要存在于血清中，因含 10 个 Fab 段，具有很强的抗原结合能力；含 5 个 Fc 段，比 IgG 更容易激活补体。IgM 是个体发育中最早合成的抗体，脐带血中 IgM 升高，提示胎儿宫内感染；IgM 也是初次体液免疫应答中最早产生的抗体，血清 IgM 的检出，表明新近感染发生，可用于感染的早期诊断(周光炎, 2018)。此外，评估 IgM 对疫苗接种或对病原体接触后的反应，可以对免疫反应的发生提供重要的见解，从而使其成为诊断的重要工具。

IgM 抗体检测广泛应用于人医方面的诊断，例如伤寒、急性黄病毒感染、Lassa 病毒感染（流行于非洲的一种地方病）、人细小病毒感染和登革热等。Emmerich, P.等使用反向 ELISA 方法，包被抗 IgM 抗体涂布微滴度板、采用标记的抗免疫球蛋白结合物对非洲的 Lassa 病毒感染产生的 IgM 进行检测(Emmerich et al., 2006)；免疫球蛋白抗体捕获 ELISA 是诊断急性黄病毒感染的一种有价值的工具，因为 IgM 抗体滴度可在感染后 2 周左右检测到，并在随后的几个月内下降到较低水平(Holmes et al., 2005)；Blacksell S.D.等在检测伊比奥斯氏斑疹伤寒感染患者血清中 IgM 时，建立了一种 ELISA 方法，与血清金标准 IFA 相比，ELISA 的 OD 值与 IFA IgM 滴度有很强的相关性，血清流行病学确定的最佳 ELISA 临界值与泰国先前描述的相应的 IFA 滴度 400 比较，其灵敏度

为 84%，特异性(Sp)为 98%(Blacksell et al., 2016)；Butchko, A.R.等利用一种或多种构象抗原检测 198 例孕妇血清中人细小病毒 b19 特异性 IgM 或 IgG 的三种 ELISA 方法的性能进行了分析研究，结果显示建立的 Biotrin 捕获法 ELISA 产生的不确定结果数量较少，与其他商业上可获得的检测 b19v 特异性 IgM 和 IgG 抗体的 ELISA 相比一致性较高(Butchko and Jordan, 2004)；Kuno, G.建立了一种简便、特异的双抗体夹心技术，用于检测人工抗登革热 IgM 免疫复合物(Kuno et al., 1987)。

与利用完整重组蛋白研发的疫苗或诊断方法相比，基于多表位肽的方法由于组合了来自病原微生物的多个抗原蛋白的优势性 B 细胞表位基序，可以诱导更强烈的免疫应答反应或具有更高的检测灵敏度(朱睿, 2017)。本研究选取定位于 Cap 蛋白的 B 细胞线性表位，不需要 APC 提成可直接激活 B 细胞产生特异性中和抗体(周光炎, 2018)，通过对表位重组，筛选出一组免疫原性较高的表位组合，命名为 R2346。该重组表位蛋白能最大限度地保留抗原性，免疫小鼠后产生的特异性抗体和 IFN- γ 、IL-4 细胞因子水平显著高于对照组，脾脏淋巴细胞中 CD4⁺和 CD8⁺比例也显著提高。这些数据表明，R2346 表位组合可以刺激产生 PCV2 特异性抗体，引起机体产生体液免疫和细胞免疫应答，具有良好的免疫学活性。

在此，我们建立了一种新的捕获 ELISA 检测血清中 PCV2 特异性 IgM 抗体，用于检测 PCV2 Cap 蛋白的血清 IgM 的应答反应。ROC 曲线确定 cut-off 值为 0.479，曲线下面积为 0.99；具有较高的敏感性和特异性；对田间样品的检测试验中，与商品化的 N-ELISA 相比检测结果符合率为 91.44%。该方法可用于快速、高通量的样品血清学检测，对评估 PCV2 疫苗效果与诊断 PCV2 早期感染提供重要工具。

第五章 全文结论

1. 阐明 PCV2 灭活疫苗免疫和病毒人工感染猪的 IgG 和 IgM 抗体产生特征，其中灭活疫苗免疫后血清中 IgM 抗体存在约 7-14 d，随后 IgG 抗体产生，且持续存在；而人工感染组 IgM 抗体存在约 20-30 d。PCV2 特异性 IgM 抗体的存在时间和存在状态在区分疫苗免疫和病毒感染方面发挥重要作用。
2. 利用 SPG 作为捕获待检血清中的 IgG 抗原，HRP 标记的 Cap 蛋白作为酶标二抗，建立了一种检测 PCV2 IgG 抗体亚型的捕获 ELISA 方法。该方法通过 ROC 曲线确定的 cut-off 值为 0.61，敏感度和特异性分别为 93.9%和 90.3%，与商品化的 IgG 抗体检测试剂盒符合率为 96.26%。
3. 利用兔抗猪 IgM 多抗作为捕获抗原，HRP 标记的 R2346 重组表位蛋白作为二抗，建立了一种检测血清中 PCV2 特异性 IgM 抗体的捕获 ELISA 方法。ROC 曲线确定 cut-off 值为 0.479，该方法具有较高的特异性和敏感性，分别为 96.7%和 97.2%，为早期诊断 PCV2 感染和优化疫苗免疫程序奠定基础。

参考文献

1. 符贻武,陈豪泽,党佳慧,等. 2 型猪圆环病毒研究进展. 吉林畜牧兽医,2019,1(3):10-12.
2. 刘颖映,周智,关婕葳,等. 猪圆环病毒 3 型感染的流行情况与检测方法研究进展. 畜牧与兽医,2019,01(4): 114-117.
3. 牛德料,周绪斌. 根据 IgM/IgG 血清 OD 值推断圆环疫苗免疫效果. 猪业科学,2018,35(10): 84-85.
4. 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京:科学出版社, 1997:1175-1182.
5. 周光炎. 免疫学原理. 北京:科学出版社, 2018: 79.
6. 周光炎. 免疫学原理. 北京:科学出版社, 2018: 89.
7. 朱睿, 李震, 董世娟,等. B细胞表位作图研究进展. 微生物学通报,2017,44(9):2172-2183.
8. Akerstrom, B., Bjorck, L. A physicochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties. Journal of Biological Chemistry , 1986, 261: 10240-10247.
9. Akerstrom, B., Bjorck, L. Protein L: an immunoglobulin light chain-binding bacterial protein. Characterization of binding and physicochemical properties. Journal of Biological Chemistry , 1989, 264: 19740-19746.
10. Allan, G. M., Phenix, K. V., Todd, D., et al. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B, 1994, 41: 17-26.
11. Allan, G.M., Kennedy, S., McNeilly, F., et al. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. Journal of Comparative Pathology, 1999, 121: 1-11.
12. Allan, G.M., McNeilly, F., Cassidy, J.P., et al. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. Veterinary Microbiology, 1995, 44: 49-64.
13. Altfeld, M., Gale, M., Jr. Innate immunity against HIV-1 infection. Nature Immunology, 2015, 16: 554-562.
14. An, D.J., Roh, I.S., Song, D.S., et al. Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. Virus Research, 2007, 129: 115-122.
15. Atre, T., Phillips, R.L., Modjarrad, K., et al. Development and characterization of a Zaire Ebola (ZEBOV) specific IgM ELISA. Journal of Immunological Methods, 2019, 468: 29-34.
16. Aybay, C. Differential binding characteristics of protein G and protein A for Fc fragments of papain-digested mouse IgG. Immunology Letters, 2003, 85: 231-235.
17. Balmelli, C., Steiner, E., Moulin, H., et al. Porcine circovirus type 2 DNA influences cytoskeleton rearrangements in plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. Immunology, 2011, 132: 57-65.
18. Bao, F., Mi, S., Luo, Q., et al. Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection reveals a

- novel genotype PCV2f. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65: 432-440.
19. Baumann, A., McCullough, K.C., Summerfield, A. Porcine circovirus type 2 stimulates plasmacytoid dendritic cells in the presence of IFN-gamma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2013, 156: 223-228.
 20. Bhullar, S.S., Kashyap, R.S., Chandak, N.H., et al. Protein A-based ELISA: its evaluation in the diagnosis of herpes simplex encephalitis. *Viral Immunology*, 2011, 24: 341-346.
 21. Bjorck, L., Kronvall, G. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *Journal of Immunology*, 1984, 133: 969-974.
 22. Blacksell, S.D., Tanganuchitcharnchai, A., Nawtaisong, P., et al. Diagnostic Accuracy of the InBios Scrub Typhus Detect Enzyme-Linked Immunoassay for the Detection of IgM Antibodies in Northern Thailand. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2016, 23: 148-154.
 23. Bouvet, J.P. Immunoglobulin Fab fragment-binding proteins. *Int J Immunopharmacol*, 1994, 16: 419-424.
 24. Burgara-Estrella, A., Montalvo-Corral, M., Bolanos, A., et al. Naturally co-infected boars with both porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2012, 59: 532-538.
 25. Butchko, A.R., Jordan, J.A. Comparison of three commercially available serologic assays used to detect human parvovirus B19-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera of pregnant women. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42: 3191-3195.
 26. Cao, S., Chen, H., Zhao, J., et al. Detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus and porcine pseudorabies virus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by multiplex PCR. *Veterinary Research Communications*, 2005, 29: 263-269.
 27. Caprioli, A., McNeilly, F., McNair, I., et al. PCR detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in blood, tonsillar and faecal swabs from experimentally infected pigs. *Research in Veterinary Science*, 2006, 81: 287-292.
 28. Chae, C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Veterinary Journal*, 2004, 168: 41-49.
 29. Chae, C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Veterinary Journal*, 2005, 169: 326-336.
 30. Chang, G.N., Hwang, J.F., Chen, J.T., et al. Fast diagnosis and quantification for porcine circovirus type 2 (PCV-2) using real-time polymerase chain reaction. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2010, 43: 85-92.
 31. Chen, H., Fang, J. Cloning and expression of Neisserial surface protein A gene and its application in detection of serum specific antibody. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2013, 29: 414-417.
 32. Chen, P., Zhang, L., Chang, N., et al. Preparation of virus-like particles for porcine circovirus type 2 by YeastFab Assembly. *Virus genes*, 2018, 54: 246-255.
 33. Cheung, A.K. Comparative analysis of the transcriptional patterns of pathogenic and nonpathogenic porcine circoviruses. *Virology*, 2003, 310: 41-49.

34. Cheung, A.K. Homologous recombination plays minor role in excision of unit-length viral genomes from head-to-tail direct tandem repeats of porcine circovirus during DNA replication in *Escherichia coli*. *Archives of Virology*, 2007, 152: 1531-1539.
35. Choi, C.Y., Oh, H.N., Lee, S.J., et al. ORF2 protein of porcine circovirus type 2 promotes phagocytic activity of porcine macrophages by inhibiting proteasomal degradation of complement component 1, q subcomponent binding protein (C1QBP) through physical interaction. *Journal of General Virology*, 2015, 96: 3294-3301.
36. Cino-Ozuna A.G., Henry S., Hesse R., et al. Characterization of a new disease syndrome associated with porcine circovirus type 2 in previously vaccinated herds. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49: 2012-2016.
37. De Boisseson, C., Beven, V., Bigarre, L., et al. Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. *Journal of General Virology*, 2004, 85: 293-304.
38. De Chateau, M., Nilson, B.H., Erntell, M., et al. On the interaction between protein L and immunoglobulins of various mammalian species. *Scand Journal of Immunology*, 1993, 37: 399-405.
39. Deng, Y., Sun, C.Q., Cao, S.J., et al. High prevalence of bovine viral diarrhea virus 1 in Chinese swine herds. *Veterinary Microbiology*, 2012, 159: 490-493.
40. Dias, A.S., Gerber, P.F., Araujo, A.S., et al. Lack of antibody protection against Porcine circovirus 2 and Porcine parvovirus in naturally infected dams and their offspring. *Research in Veterinary Science*, 2013, 94: 341-345.
41. Drolet, R., Larochelle, R., Morin, M., et al. Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia. *Veterinary Pathology*, 2003, 40: 143-148.
42. Eddicks, M., Szikora, F., Walhofer, N., et al. Occurrence of genotypes of porcine circovirus (PCV2) in pig farms using different vaccination strategies against PCV2. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Grosstiere-Nutztiere*, 2017, 45: 90-97.
43. Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., et al. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Veterinary Journal*, 1998, 39: 44-51.
44. Emmerich, P., Thome-Bolduan, C., Drosten, C., et al. Reverse ELISA for IgG and IgM antibodies to detect Lassa virus infections in Africa. *Journal of Clinical Virology*, 2006, 37: 277-281.
45. Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., et al. Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication in vitro and attenuated the virus in vivo. *Journal of Virology*, 2004, 78: 13440-13446.
46. Finsterbusch, T., Mankertz, A. Porcine circoviruses--small but powerful. *Virus Research*, 2009, 143: 177-183.
47. Firth, C., Charleston, M.A., Duffy, S., et al. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. *Journal of Virology*, 2009, 83: 12813-12821.

48. Fort M. Detection of neutralizing antibodies in post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Veterinary Microbiology*, 2007, 125: 244-255.
49. Fort M. Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2009a, 129: 101-107.
50. Gagnon, C.A., del Castillo, J.R., Music, N., et al. Development and use of a multiplex real-time quantitative polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of Porcine circovirus-2 genotypes 2a and 2b in an epidemiological survey. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2008, 20: 545-558.
51. Gagnon, C.A., Music, N., Fontaine, G., et al. Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): a type 1 and type 2 PCV recombinant. *Veterinary Microbiology*, 2010, 144: 18-23.
52. Gillespie, J., Opriessnig, T., Meng, X.J., et al. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2009, 23: 1151-1163.
53. Gilpin, D.F., McCullough, K., Meehan, B.M., et al. In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2003, 94: 149-161.
54. Graille, M., Stura, E.A., Corper, A.L., et al. Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97: 5399-5404.
55. Gresham, A., Giles, N., Weaver, J. PMWS and porcine dermatitis nephropathy syndrome in Great Britain. *Veterinary Record*, 2000, 147: 115.
56. Gu, J., Zhang, Y., Lian, X., et al. Functional analysis of the interferon-stimulated response element of porcine circovirus type 2 and its role during viral replication in vitro and in vivo. *Virology Journal*, 2012, 9: 152.
57. Ha, Y., Ahn, K.K., Kim, B., et al. Evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in milk from experimentally infected sows. *Research in Veterinary Science*, 2009, 86: 108-110.
58. Ha, Y., Jung, K., Kim, J., et al. Outbreak of salmonellosis in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary Record*, 2005, 156: 583-584.
59. Ha, Y., Lee, Y.H., Ahn, K.K., et al. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by prenatal porcine circovirus 2 infection and postnatal porcine parvovirus infection or immunostimulation. *Veterinary Pathology*, 2008, 45: 842-848.
60. Hamel, A.L., Lin, L.L., Nayar, G.P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal of Virology*, 1998, 72: 5262-5267.
61. Harding, J.C., Ellis, J.A., McIntosh, K.A., et al. Dual heterologous porcine circovirus genogroup 2a/2b infection induces severe disease in germ-free pigs. *Veterinary Microbiology*, 2010, 145: 209-219.
62. Harms, P.A., Sorden, S.D., Halbur, P.G., et al. Experimental reproduction of severe disease in

- CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Pathology*, 2001, 38: 528-539.
63. Hesse, R., Kerrigan, M., Rowland, R.R. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus Research*, 2008, 132: 201-207.
64. Holmes, D.A., Purdy, D.E., Chao, D.Y., et al. Comparative analysis of immunoglobulin M (IgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay using virus-like particles or virus-infected mouse brain antigens to detect IgM antibody in sera from patients with evident flaviviral infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43: 3227-3236.
65. Housden, N.G., Harrison, S., Roberts, S.E., et al. Immunoglobulin-binding domains: Protein L from *Peptostreptococcus magnus*. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31: 716-718.
66. Hu, Y., Zhan, Y., Wang, D., et al. Evidence of natural co-infection with PCV2b subtypes in vivo. *Archives of Virology*, 2017, 162: 2015-2020.
67. Huang, Y., Shao, M., Xu, X., et al. Evidence for different patterns of natural inter-genotype recombination between two PCV2 parental strains in the field. *Virus Research*, 2013, 175: 78-86.
68. Huang, Z., Su, S., Wei, C.Y., et al. Complete genome sequence of a novel field strain of rearranged porcine circovirus type 2 in southern China. *Journal of Virology*, 2012, 86: 10895.
69. Huang, Z., Su, S., Wei, C.Y., et al. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 in piglets from PMWS-affected and -negative farms in Thailand. *Virology Journal*, 2011, 8: 88.
70. Jiang, C.G., Wang, G., Tu, Y.B., et al. A novel diagnostic platform based on multiplex ligase detection-PCR and microarray for simultaneous detection of swine viruses. *Journal of Virology Methods*, 2011, 178: 171-178.
71. Jiang, Y., Guo, Y., Wang, P., 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. *Veterinary Journal*, 2010, 183: 172-175.
72. Jiang, Y., Shang, H., Xu, H., et al. Genetic analysis of porcine circovirus type 2 in China. *Archives of Virology*, 2017, 162: 2715-2726.
73. Jung, K., Ha, Y., Ha, S.K., et al. Identification of porcine circovirus type 2 in retrospective cases of pigs naturally infected with porcine epidemic diarrhoea virus. *Veterinary Journal*, 2006, 171: 166-168.
74. Kang, S.H., Shin, G.W., Palaksha, K.J., et al. Efficacy of protein A-HRP in an immunological study of black rockfish (*Sebastes schlegeli* Higendorf) humoral immune responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20: 295-304.
75. Karuppannan, A.K., Opriessnig, T. Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccines in the Context of Current Molecular Epidemiology. *Viruses*, 2017, 9(5): 99.
76. Kekarainen, T., McCullough, K., Fort, M., et al. Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2010, 136: 185-193.
77. Kennedy, S., Moffett, D., McNeilly, F., et al. Reproduction of lesions of postweaning

- multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology*, 2000, 122: 9-24.
78. Kennedy, S., Segales, J., Rovira, A., et al. Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2003, 15: 151-156.
79. Khaïseb, S., Sydler, T., Zimmermann, D., et al. Coreplication of the major genotype group members of porcine circovirus type 2 as a prerequisite to coevolution may explain the variable disease manifestations. *Journal of Virology*, 2011, 85: 11111-11120.
80. Kim, H.R., Park, Y.R., Lim, D.R., et al. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology*, 2003a, 128: 52-59.
81. Kim, J., Choi, C., Chae, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Veterinary Journal*, 2003b, 166: 251-256.
82. Kim, J., Chung, H.K., Chae, C. Multiplex real-time polymerase chain reaction for the differential detection of porcine circovirus 2 and 3. *Journal of Virology Methods*, 2017, 250: 11-16.
83. Klaumann, F., Correa-Fiz, F., Franzo, G., et al. Current Knowledge on Porcine circovirus 3 (PCV-3): A Novel Virus With a Yet Unknown Impact on the Swine Industry. *Frontiers in Veterinary Science*, 2018, 5: 315.
84. Klausmann, S., Sydler, T., Summerfield, A., et al. T-cell reprogramming through targeted CD4-coreceptor and T-cell receptor expression on maturing thymocytes by latent Circoviridae family member porcine circovirus type 2 cell infections in the thymus. *Emerging Microbes & Infections*, 2015, 4: e15.
85. Kmiecik, S., Kolinski, A. Folding pathway of the b1 domain of protein G explored by multiscale modeling. *Biophysical Journal*, 2008, 94: 726-736.
86. Koonin, E.V., Ilyina, T.V. Computer-assisted dissection of rolling circle DNA replication. *Biosystems*, 1993, 30: 241-268.
87. Kreikemeier, C.A., Engle, T.B., Lucot, K.L., et al. Genome-wide analysis of TNF-alpha response in pigs challenged with porcine circovirus 2b. *Animal Genetics*, 2015, 46: 205-208.
88. Kronvall, G., Jonsson, K. Receptins: a novel term for an expanding spectrum of natural and engineered microbial proteins with binding properties for mammalian proteins. *Journal of Molecular Recognition*, 1999, 12: 38-44.
89. Kuno, G., Gomez, I., Gubler, D.J. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1987, 36: 153-159.
90. Kwon, T., Lee, D.U., Yoo, S.J., et al. Genotypic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) and genotype shift to PCV2d in Korean pig population. *Virus Research*, 2017, 228: 24-29.
91. Lawman, M.J., Ball, D.R., Hoffmann, E.M., et al. Production of Brucella abortus-specific protein A-reactive antibodies (IgG2) in infected and vaccinated cattle. *Veterinary Microbiology*, 1986, 12:

- 43-53.
92. Lawman, M.J., Thurmond, M.C., Reis, K.J., et al. Solid-phase radioimmunoassay for the detection of immunoglobulins against bovine *Brucella abortus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1984, 6: 291-305.
 93. Lee, Y., Lin, C.M., Jeng, C.R., et al. The pathogenic role of torque teno sus virus 1 and 2 and their correlations with various viral pathogens and host immunocytes in wasting pigs. *Veterinary Microbiology*, 2015, 180: 186-195.
 94. Lekcharoensuk, P., Morozov, I., Paul, P.S., et al. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *Journal of Virology*, 2004, 78: 8135-8145.
 95. Li, W., Liu, S., Wang, Y., et al. Transcription analysis of the porcine alveolar macrophage response to porcine circovirus type 2. *BMC Genomics*, 2013a, 14: 353.
 96. Li, X., Qiao, M., Sun, M., et al. A Duplex Real-Time PCR Assay for the Simultaneous Detection of Porcine Circovirus 2 and Circovirus 3. *Virologica Sinica*, 2018, 33: 181-186.
 97. Li, S., Wei, Y., Liu, J., et al. Prevalence of porcine hokovirus and its co-infection with porcine circovirus 2 in China. *Archives of Virology*, 2013b, 158: 1987-1991.
 98. Li, L., Yuan, W., Guo, H., et al. Prevalence and genetic variation of porcine circovirus type 2 in Hebei, China from 2004 to 2014. *Gene*, 2016, 586: 222-227.
 99. Lin, W.L., Chien, M.S., Wu, P.C., et al. The Porcine Circovirus Type 2 Nonstructural Protein ORF3 Induces Apoptosis in Porcine Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Open Virology Journal*, 2011a, 5: 148-153.
 100. Lin, C.M., Jeng, C.R., Hsiao, S.H., et al. Monocyte-derived dendritic cells enhance cell proliferation and porcine circovirus type 2 replication in concanavalin A-stimulated swine peripheral blood lymphocytes in vitro. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2012, 145: 368-378.
 101. Lin, K., Wang, C., Murtaugh, M.P., et al. Multiplex method for simultaneous serological detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011b, 49: 3184-3190.
 102. Liu, J., Chen, I., Kwang, J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *Journal of Virology*, 2005, 79: 8262-8274.
 103. Liu, Q., Tikoo, S.K., Babiuk, L.A. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology*, 2001a, 285: 91-99.
 104. Liu, J.K., Wei, C.H., Yang, X.Y., et al. Multiplex PCR for the simultaneous detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, classical swine fever virus, and porcine circovirus in pigs. *Molecular and Cellular Probes*, 2013, 27: 149-152.
 105. Liu, Q., Willson, P., Atttoh-Poku, S., et al. Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2 ORF2 fusion protein. *Protein Expression and Purification*, 2001b, 21: 115-120.

106. Liu, Y.B., Zhang, L., Xue, Q.H., et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for porcine circovirus type 2. *Virologica Sinica*, 2011, 26: 214-220.
107. Ma, C.M., Hon, C.C., Lam, T.Y., et al. Evidence for recombination in natural populations of porcine circovirus type 2 in Hong Kong and mainland China. *Journal of General Virology*, 2007, 88: 1733-1737.
108. Mahe, D., Blanchard, P., Truong, C., et al. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *Journal of General Virology*, 2000, 81: 1815-1824.
109. Mankertz, A., Domingo, M., Folch, J.M., et al. Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Research*, 2000, 66: 65-77.
110. Martin, H., Le Potier, M.F., Maris, P. Virucidal efficacy of nine commercial disinfectants against porcine circovirus type 2. *Veterinary Journal*, 2008, 177: 388-393.
111. McNeilly, F., Kennedy, S., Moffett, D., et al. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Virology Methods*, 1999, 80: 123-128.
112. Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., et al. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology*, 1998, 79 (Pt 9): 2171-2179.
113. Meert P. Correlation between type of adaptive immune response against porcine ciircovirus type 2 and level of virus replication. *Viral Immunology*, 2005,18: 333-341.
114. Meert P. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Veterinary Rraearch*, 2006, 2: 6.
115. Meng, X.J. Porcine circovirus type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2013, 1: 43-64.
116. Misinzo, G., Delputte, P.L., Lefebvre, D.J., et al. Porcine circovirus 2 infection of epithelial cells is clathrin-, caveolae- and dynamin-independent, actin and Rho-GTPase-mediated, and enhanced by cholesterol depletion. *Virus Research*, 2009, 139: 1-9.
117. Misinzo, G., Delputte, P.L., Meerts, P., et al. Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. *Journal of Virology*, 2006, 80: 3487-3494.
118. Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S.R., et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *Journal of General Virology*, 2000a, 81: 2281-2287.
119. Nawagitgul, P., Morozov, I., Sirinarumitr, T., et al. Development of probes to differentiate porcine circovirus types 1 and 2 in vitro by in situ hybridization. *Veterinary Microbiology*, 2000b, 75: 83-89.
120. Nicholson, T.L., Kukiela, D., Vincent, A.L., et al. Utility of a panviral microarray for detection of swine respiratory viruses in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49:

- 1542-1548.
121. Niederwerder, M.C., Jaing, C.J., Thissen, J.B., et al. Microbiome associations in pigs with the best and worst clinical outcomes following co-infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). *Veterinary Microbiology*, 2016, 188: 1-11.
 122. Nielsen, K., Smith, P., Yu, W., et al. Enzyme immunoassay for the diagnosis of brucellosis: chimeric Protein A-Protein G as a common enzyme labeled detection reagent for sera for different animal species. *Veterinary Microbiology*, 2004, 101: 123-129.
 123. Nilsson, B., Moks, T., Jansson, B., et al. A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. *Protein Engineering*, 1987, 1: 107-113.
 124. O'Dea, M.A., Hughes, A.P., Davies, L.J., et al. Thermal stability of porcine circovirus type 2 in cell culture. *Journal of Virology Methods*, 2008, 147: 61-66.
 125. Ogawa, H., Taira, O., Hirai, T., et al. Multiplex PCR and multiplex RT-PCR for inclusive detection of major swine DNA and RNA viruses in pigs with multiple infections. *Journal of Virology Methods*, 2009, 160: 210-214.
 126. Olvera, A., Cortey, M., Segales, J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology*, 2007, 357: 175-185.
 127. Okuda Y. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in cesarean-derived, colostrum-deprived piglets inoculated with porcine circovirus type 2 (PCV2): investigation of quantitative PCV2 distribution and antibody responses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2003, 15: 107-114.
 128. Opriessnig, T., Halbur, P.G. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus Research*, 2012, 164: 20-32.
 129. Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2007, 19: 591-615.
 130. Opriessnig, T., Xiao, C.T., Gerber, P.F., et al. Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. *Veterinary Microbiology*, 2013, 163: 177-183.
 131. Opriessnig, T., Xiao, C.T., Gerber, P.F., et al. Mutant USA strain of porcine circovirus type 2 (mPCV2) exhibits similar virulence to the classical PCV2a and PCV2b strains in caesarean-derived, colostrum-deprived pigs. *Journal of General Virology*, 2014, 95: 2495-2503.
 132. Park, J.S., Ha, Y., Kwon, B., et al. Detection of porcine circovirus 2 in mammary and other tissues from experimentally infected sows. *Journal of Comparative Pathology*, 2009, 140: 208-211.
 133. Park, J.S., Kim, J., Ha, Y., et al. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *Journal of Comparative Pathology*, 2005, 132: 139-144.
 134. Pensaert, M.B., Sanchez, R.E., Jr., Ladekjaer-Mikkelsen, A.S., et al. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Veterinary*

- Microbiology, 2004, 98: 175-183.
135. Qi, P., Ding, Y., Wu, L., et al. In vitro evolutionary selection of a combinatorial phage library displaying randomly-rearranged various binding domains of SpA and SpG with four human IgG subclasses. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2012, 28: 1093-1105.
 136. Palinski, R., Piñeyro, 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. *Journal of virology*, 2017, 91(1): e01879-16.
 137. Ramos, N., Porley, D., Mirazo, S., et al. Molecular study of porcine circovirus type 2 in wild boars and domestic pigs in Uruguay from 2010 to 2014: Predominance of recombinant circulating strains. *Gene*, 2017, 637: 230-238.
 138. Rashidieh, B., Madani, Z., Azam, M.K., et al. Molecular docking based virtual screening of compounds for inhibiting sortase A in *L.monocytogenes*. *Bioinformation*, 2015, 11: 501-505.
 139. Ren, L., Chen, X., Ouyang, H. Interactions of porcine circovirus 2 with its hosts. *Virus genes*, 2016, 52: 437-444.
 140. Saekhow, P., Kishizuka, S., Sano, N., et al. Coincidental detection of genomes of porcine parvoviruses and porcine circovirus type 2 infecting pigs in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2016, 77: 1581-1586.
 141. Salgado, R.L., Vidigal, P.M., de Souza, L.F., et al. Identification of an Emergent Porcine Circovirus-2 in Vaccinated Pigs from a Brazilian Farm during a Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome Outbreak. *Genome Announc*, 2014, 2(2): e00163-14.
 142. Segales, J., Calsamiglia, M., Olvera, A., et al. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Microbiology*, 2005, 111: 223-229.
 143. Segales, J., Olvera, A., Grau-Roma, L., et al. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Veterinary Record*, 2008, 162: 867-868.
 144. Segales, J., Piella, J., Marco, E., et al. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. *Veterinary Record*, 1998, 142: 483-486.
 145. Seo, H.W., Park, C., Kang, I., et al. Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. *Archives of Virology*, 2014, 159: 3107-3111.
 146. Sharma, R., Saikumar, G. Porcine parvovirus- and porcine circovirus 2-associated reproductive failure and neonatal mortality in crossbred Indian pigs. *Tropical Animal Health and Production*, 2010, 42: 515-522.
 147. Shen, H.G., Halbur, P.G., Opriessnig, T. Prevalence and phylogenetic analysis of the current porcine circovirus 2 genotypes after implementation of widespread vaccination programmes in the USA. *Journal of General Virology*, 2012, 93: 1345-1355.
 148. Shibata, I., Okuda, Y., Yazawa, S., et al. PCR detection of Porcine circovirus type 2 DNA in whole

- blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2003, 65: 405-408.
149. Sinha, A., Shen, H.G., Schalk, S., et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) influences infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) subtypes PCV2a and PCV2b by prolonging PCV2 viremia and shedding. *Veterinary Microbiology*, 2011, 152: 235-246.
150. Sipos, W., Duvigneau, J.C., Willheim, M., et al. Systemic cytokine profile in feeder pigs suffering from natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) as determined by semiquantitative RT-PCR and flow cytometric intracellular cytokine detection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2004, 99: 63-71.
151. Sliz, I., Vlasakova, M., Jackova, A., et al. Characterization of Porcine Parvovirus Type 3 and Porcine Circovirus Type 2 in Wild Boars (*Sus Scrofa*) in Slovakia. *Journal of Wildlife Diseases*, 2015, 51: 703-711.
152. Steiner, E., Balmelli, C., Herrmann, B., et al. Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. *Virology*, 2008, 378: 311-322.
153. Stevenson, L.S., Gilpin, D.F., Douglas, A., et al. T lymphocyte epitope mapping of porcine circovirus type 2. *Viral Immunology*, 2007, 20: 389-398.
154. Stura, E.A., Graille, M., Housden, N.G., et al. Protein L mutants for the crystallization of antibody fragments. *Acta Crystallographica Section D-Structural Biology*, 2002, 58: 1744-1748.
155. Sun, J., Huang, L., Wei, Y., et al. Prevalence of emerging porcine parvoviruses and their co-infections with porcine circovirus type 2 in China. *Archives of Virology*, 2015, 160: 1339-1344.
156. Phan, T. G., Giannitti, F., Rossow, S., et al. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virology Journal*, 2016, 13: 184.
157. Timmusk, S., Fossum, C., Berg, M. Porcine circovirus type 2 replicase binds the capsid protein and an intermediate filament-like protein. *Journal of General Virology*, 2006, 87: 3215-3223.
158. Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, 1982, 295: 64-66.
159. Tischer, I., Miels, W., Wolff, D., et al. studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Archives of Virology*, 1986, 91: 271-276.
160. Tischer, I., Rasch, R., Tochtermann, G. Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriell Orig A*, 1974, 226: 153-167.
161. Togashi, K., Mawatari, T., Mitobe, S., et al. Reproductive losses associated with porcine circovirus type 2 in a Japanese herd of seronegative sows. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2011, 73: 941-944.
162. Vigre, H., Baekbo, P., Jorsal, S.E., et al. Spatial and temporal patterns of pig herds diagnosed with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) during the first two years of its occurrence in Denmark. *Veterinary Microbiology*, 2005, 110: 17-26.
163. Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Herrmann, B., et al. Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *Journal of*

- Virology, 2003, 77: 13288-13300.
164. Wang, C., Pang, V.F., Jeng, C.R., et al. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 in China between 1999-2017. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66: 599-605.
165. Wang, F., Guo, X., Ge, X., et al. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2. *Virus Research*, 2009, 145: 151-156.
166. Wang, H., Gu, J., Xing, G., et al. Detection of porcine circovirus type 1 in commercial porcine vaccines by loop-mediated isothermal amplification. *Folia Microbiologica(Praha)*, 2011, 56: 483-489.
167. Wen, S., Sun, W., Li, Z., et al. The detection of porcine circovirus 3 in Guangxi, China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65: 27-31.
168. Wernike, K., Hoffmann, B., Beer, M. Single-tube multiplexed molecular detection of endemic porcine viruses in combination with background screening for transboundary diseases. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51: 938-944.
169. West, K.H., Bystrom, J.M., Wojnarowicz, C., et al. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1999, 11: 530-532.
170. Xu, X.G., Chen, G.D., Huang, Y., et al. Development of multiplex PCR for simultaneous detection of six swine DNA and RNA viruses. *Journal of Virology Methods*, 2012, 183: 69-74.
171. Yang, W., Guo, D., Harris, M.A., et al. Bmp2 in osteoblasts of periosteum and trabecular bone links bone formation to vascularization and mesenchymal stem cells. *Journal of Cell Science*, 2013, 126: 4085-4098.
172. Yang, X., Ma, T., Ouyang, H., et al. Effect of atorvastatin treatment on porcine circovirus 2 infection in BALB/c mice. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2015, 42: 817-821.
173. Ye, X., Berg, M., Fossum, C., et al. Detection and genetic characterisation of porcine circovirus 3 from pigs in Sweden. *Virus genes*, 2018, 54: 466-469.
174. Yin, S.H., Yang, S.L., Tian, H., et al. An ELISA based on a truncated soluble ORF2 protein for the detection of PCV2 antibodies in domestic pigs. *Virologica Sinica*, 2010, 25: 191-198.
175. 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. *Virus genes*, 2009, 38: 392-397.
176. Zhai, S., Yue, C., Wei, Z., et al. Co-existence of multiple strains of porcine circovirus type 2 in the same pig from China. *Virology Journal*, 2011, 8: 517.
177. Zhai, S.L., Chen, S.N., Wei, Z.Z., et al. High prevalence of torque teno sus virus in China and genetic diversity of the 5' non-coding region. *Archives of Virology*, 2013, 158: 1567-1573.
178. Zhai, S.L., Long, J.X., Wei, W.K., et al. High prevalence of a novel porcine bocavirus in weanling piglets with respiratory tract symptoms in China. *Archives of Virology*, 2010, 155: 1313-1317.
179. Zhan, Y., Wang, N., Zhu, Z., et al. In silico analyses of antigenicity and surface structure variation

- of an emerging porcine circovirus genotype 2b mutant, prevalent in southern China from 2013 to 2015. *Journal of General Virology*, 2016, 97: 922-933.
180. Zhang, H.B., Huang, L., Liu, Y.J., et al. Porcine bocaviruses: genetic analysis and prevalence in Chinese swine population. *Epidemiology and Infection*, 2011, 139: 1581-1586.
181. Zhang, H., Liu, C., Cheng, S., et al. Porcine CD74 is involved in the inflammatory response activated by nuclear factor kappa B during porcine circovirus type 2 (PCV-2) infection. *Archives of Virology*, 2013, 158: 2285-2295.
182. Zhang, L., Luo, Y., Liang, L., et al. Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 3 and porcine circovirus type 2 in China detected by duplex nanoparticle-assisted PCR. *Infection Genetics and Evolution*, 2018, 60: 1-6.
183. Zhao, D., Wang, X., Gao, Q., et al. Retrospective survey and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 3 in Jiangsu province, China, 2008 to 2017. *Archives of Virology*, 2018, 163: 2531-2538.
184. Zheng, L.L., Wang, Y.B., Li, M.F., et al. Simultaneous detection of porcine parvovirus and porcine circovirus type 2 by duplex real-time PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. *Journal of Virology Methods*, 2013, 187: 15-19.
185. Zheng, S., Wu, X., Zhang, L., et al. The occurrence of porcine circovirus 3 without clinical infection signs in Shandong Province. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64: 1337-1341.
186. Zhou, S., Han, S., Shi, J., et al. Loop-mediated isothermal amplification for detection of porcine circovirus type 2. *Virology Journal*, 2011, 8: 497.

致 谢

论文掩卷之际，心中感慨万分。三年的硕士研究生生涯即将画上句号，感谢一路陪我走来的可亲可敬的老师，是你们的耐心鼓励和教导帮助我树立信心克服研究中的种种困难。

首先感谢我的导师尹双辉副研究员，在学习中您是一位严师，时刻指导我的学业，帮助我分析解决试验过程中遇到的难题，拓宽我的研究思路，坚实的奠定了我的科研基础；在生活中您让我明白了很多为人处世的道理，给予我无私的帮助和热心的照顾，感恩之情溢于言表。

同时，感谢蔡建平研究员提供良好的科研平台，营造良好的学术氛围，您一丝不苟的严谨的学术态度让我获益匪浅。

最后，感谢杨顺利老师在试验方法和试验思路方面的教导，让我掌握基本的研究方法，论文的每个试验细节和每个数据，都离不开你的悉心指导。

在这段充满奋斗的历程中，感谢张辛铭和肖星星对我试验上的帮助，感谢党玉惠对实验动物的饲养和实验材料的准备，也感谢刘保红老师、杨彬老师、曲自刚、马雪婷、王文青、王恒、蒋保余、许笑、何雪阳、张艳冰、汪靖等所有帮助过我的人，祝你们天天开心，实验顺利进行。

最后，感谢我的父母，感谢我的男朋友，谢谢你们在生活中无微不至的关心和呵护，你们是我求学之路的坚强后盾，感谢你们给我的动力和鼓励！

本研究在中国农业科学院兰州兽医研究所家畜疫病病原生物学国家重点实验室完成，获得国家自然科学基金（31602085）和中国农业科学院农业科技创新工程专项（2014-LVRI-09）资金支持。

作者简历

高雪，女，汉族，中共党员，1993年9月出生，来自山东省临沂市。2012年考入山东农业大学动物医学专业，2016年获得农学学士学位；同年考入中国农业科学院兰州兽医研究所，研究方向为预防兽医学，依托家畜疫病病原生物学国家重点实验室平台，在导师尹双辉副研究员指导下，进行“PCV2感染与免疫血清IgG、IgM抗体变化特征研究及其ELISA检测方法的建立”硕士学位论文研究。文章发表情况如下：

高雪，张辛铭，肖星星，杨顺利，尚佑军，尹双辉*，蔡建平*. 猪圆环病毒2型衣壳蛋白优势B细胞表位重组蛋白免疫原性研究. 动物医学进展[J]. （已接收）

Xue Gao, Shunli Yang, Youjun Shang, Xinming Zhang, Shuanghui Yin*, Jianping Cai*. Development of a capture ELISA using streptococcal protein G for the detection of porcine circovirus type 2 specific IgG. Research in Veterinary Science[J]. （投稿中）

Xue Gao, Xinming Zhang, Shunli Yang, Youjun Shang, Shuanghui Yin*, Jianping Cai*. Establishment of capture ELISA assay for detection of PCV2 IgM antibody and its application in distinguishing PCV2 virus infection from vaccine immunity. （撰写中）