

猪圆环病毒 2 型毒株分离鉴定和体外增殖特性研究

王贵华, 陈义锋, 汤波, 刘明明, 陈翠云, 赵亚荣

(北京大北农动物医学研究中心, 北京 100097)

摘要:为分离鉴定猪圆环病毒 2 型(PCV2)毒株并研究其体外增殖特性,本研究采用 PCR 法分别对从山东、山西、北京和河北收集的疑似断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)病猪的病料进行检测,将检测结果为 PCV2 阳性的病料处理后接种 PCV 阴性的 PK15A 细胞连续传代进行病毒分离,观察每代细胞是否有病变,采用 PCR、间接免疫荧光法(IFA)对第 3 代培养物进行鉴定,对各毒株的全基因组进行克隆、测序和系统进化分析,并将 PCV2 各分离株连续传 20 代,对其体外增殖特性进行了研究。结果共分离到 5 株猪圆环病毒 2 型毒株,分别命名为 DBN-SD02、DBN-SX07、DBN-BJ08、DBN-HB12 和 DBN-HB13 株,GenBank 登录号分别为 FJ660967、FJ660968、FJ660969、FJ660970 和 FJ660971。各分离株基因组全长均为 1767 bp,系统进化分析结果表明,除 DBN-BJ-08 属于 PCV2a 基因型外,其余均属于 PCV2b 基因型,基因组序列核苷酸同源性为 98.5%~99.7%,体外增殖特性研究结果表明,随着传代次数的增加病毒感染滴度均有明显的提高。

关键词:猪圆环病毒 2 型;分离;鉴定;增殖特性

中图分类号:S852.65+9.2

文献标识码:A

文章编号:1671-7236(2012)01-0017-06

由猪圆环病毒 2 型(PCV2)引起的断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)自 20 世纪 90 年代初被鉴定以来,已给世界养猪业造成了严重危害。研究表明,PCV2 感染除了造成 PMWS,同时还与猪呼吸道综合症(PRDC)、猪皮炎和肾病综合征(PNDS)、先天性震颤、繁殖障碍、胎儿心肌炎和扩张性坏死性肺炎等猪圆环病毒病(PCVAD)密切相关(Chae,2005),已成为影响世界养猪业的最重要的病毒性传染病。PCV2 属于圆环病毒科圆环病毒属,病毒粒子直径为 17 nm,呈二十面体对称、无囊膜,基因组为单股环状负链 DNA,是目前发现的最小的动物病毒。

流行病学调查结果表明,当前中国猪场的 PCV2 感染已相当普遍,由 PCV2 感染引起的 PCVAD 已经给中国养猪业造成了巨大的经济损失(周继勇等,2004;王忠田等,2002),而且 PCV2 基因组在不断地发生变异,PCV2b 基因型已取代 PCV2a 成为当前的优势基因型毒株(Long 等,2010),新毒株或新基因型仍在不断出现(郭抗抗等,2010)。为研究当前国内 PMWS 病例中 PCV2 的基因变异情况,并为 PCV2 的分子流行病学、感染及预防控制提供参考,本研究对来自山东、山西、北京和河北疑似 PMWS 病猪的病料进行 PCV2 分离鉴定,分别采用

PCR 和 IFA 检测方法对各分离的毒株进行鉴定,克隆各分离毒株全基因组并测序,并绘制系统进化树,最后为了进一步获得各分离株的体外增殖特性,分别将各分离株进行连续传代至 20 代,测定其第 5、10、15 和 20 代感染滴度。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 组织病料 采自山东、山西、北京和河北的具有 PMWS 症状和剖检病变的自然病例的淋巴结(气管支气管淋巴结、肠系膜淋巴结、腹股沟淋巴结)、肺脏、脾脏和扁桃体等组织,置于一 80 °C 冰箱中保存备用。

1.2 细胞和血清 PK15A 细胞,由中国科学院微生物研究所鉴定、保管和供应;感受态 JM109 细胞,购自北京索来宝公司;胎牛血清,购自 Gibco 公司;PCV2 阳性血清,由周继勇教授惠赠。

1.3 试剂 Ex Taq DNA 聚合酶(含 10× Buffer, dNTPs),购自 TaKaRa 公司;DL2000 DNA Marker,购自北京博迈德公司;猪圆环病毒聚合酶链式反应试剂盒,购自中国动物卫生与流行病学中心;FITC 标记羊抗猪 IgG,购自 Lifeholder 公司;MEM、EDTA、胰酶(1/250),购自 Gibco 公司;D-Glucosamine-HCl,购自 Sigma 公司;pMD18-T Simple 载体和 DNA Ligase,购自 TaRaKa 公司;细菌质粒 DNA 抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒和血液、组织细胞 DNA 抽提试剂盒,均购自天根生化科技有限公司。

1.4 病料 DNA 提取和 PCR 检测 按照猪圆环病毒聚合酶链式反应试剂盒说明书进行检测,反应条件为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,62 °C 退火 45 s,72

修回日期:2011-05-10

作者简介:王贵华(1979—),男,山东人,博士,主要从事动物疫病与诊断制品研究。

通信作者:赵亚荣。E-mail:yarongzhao_888@yahoo.com.cn

℃延伸 45 s, 35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。

1.5 PCV2 的分离 取 PCR 检测 PCV2 阳性的病料,按 1:5 的比例加入 0.01 mol/L pH 7.4 PBS,将组织研磨后,反复冻融 3 次,4000 r/min 离心 30 min,取上清经 0.22 μm 滤器除菌,加入青、链霉素至终浓度分别为 200 U/mL 和 200 μg/mL,4 ℃作用 6 h 后,按 5% (V/V) 接种 60%~70% 融合的 PCV 阴性的 PK15A 细胞,置 37 ℃含 5% CO₂ 培养箱中吸附 30 min,加入含 2% 新生牛血清和 3 mmol/L 的 D-氨基葡萄糖盐酸的 MEM 细胞维持液,37 ℃继续培养 48 h,连续盲传 3 代。观察是否有病变产生,并将第 3 代细胞置 -15 ℃/室温反复冻融 3 次,3000 r/min 离心 20 min,取上清进行 PCR(同 1.3)和 IFA 鉴定。

1.6 特异性鉴定 用 IFA 法,将已长成单层的 PK15A 细胞(24 孔板)倒去生长液,以 5% (V/V) 的比例接入各分离株的盲传细胞培养物并设重复孔 4 孔,同时设阴阳性对照。置 37 ℃含 5% CO₂ 培养箱中继续培养 24 h,换含 3 mmol/L 的 D-氨基葡萄糖盐酸的 MEM 维持液,继续培养 24 h。弃去维持液,用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 洗涤 3 次,冷丙酮固定细胞,50 μL/孔,4 ℃ 30 min,弃丙酮,室温下干燥,用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 洗涤 1 次,加入 1:100 稀释的 PCV2 抗体,50 μL/孔,37 ℃孵育 1 h;移去孔内液体,用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 洗涤 5 次,每次 3 min;加入 1:20 稀释的 FITC 标记的羊抗猪二抗,50 μL/孔,37 ℃孵育 1 h;移去孔内液体,用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 洗涤 5 次,每次 3 min,在荧光显微镜下观察结果。

1.7 基因组克隆和测序 参考冯志新等(2004)发表的 PCV2 全基因组克隆引物,合成了两对引物,P1: 5'-CGAATTCAACCTTAACCTTTCTTATTC-3'和 P2: 5'-ATGAATTCTGGCCCTGCTCCC-3',扩增条件为 95 ℃变性 5 min 后,按 94 ℃变性 45 s,54 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 1 min,共进行 35 个循

环。PCR 产物凝胶回收,连接至 pMD18-T Simple 载体,转化至 JM109 细胞,摇菌扩增,抽提质粒 PCR 鉴定,并将鉴定为阳性的重组质粒送检测序,序列提交 GenBank,利用 DNA Star V7.1K 中 MegAlign Clustral W 方法对本试验分离的 5 株和 GenBank 中发表的 25 株 PCV2 全基因组序列进行多重比对后绘制系统进化树。

1.8 体外增殖及毒价测定 将各分离株的细胞培养物接种 PK15A 细胞连续传代至 20 代,并分别测定其第 5、10、15 和 20 代 TCID₅₀。首先将各代病毒液用 MEM 维持液做 10 倍系列稀释,取 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 4 个稀释度,分别接种含 PK15A 细胞单层的 96 孔培养板 6 孔,100 μL/孔,置 37 ℃含 5% CO₂ 培养箱中继续培养 24 h,换含 3 mmol/L 的 D-氨基葡萄糖盐酸的 MEM 维持液,继续培养 48 h。弃去维持液,用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 洗涤细胞 3 次;加入冷丙酮(80%丙酮、20%双蒸水),150 μL/孔,4 ℃ 30 min;弃丙酮,在室温下干燥,用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 洗涤 1 次;每孔加入 1:100 倍稀释的 PCV2 抗体 50 μL,37 ℃孵育 1 h;弃去孔内液体,用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 洗涤 5 次;加入 1:100 稀释的 FITC 标记羊抗猪 IgG 50 μL/孔,37 ℃孵育 1 h,移去孔内液体,用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 洗涤 5 次;荧光显微镜下观察,细胞对照孔应无荧光物质着染,而有绿色荧光物质着染的细胞孔判为 PCV2 感染阳性。统计每个稀释度病毒接种细胞孔中 PCV2 阳性孔数,计算病毒 TCID₅₀。

2 结果

2.1 细胞病变观察情况 分别将来自山东、山西、北京和河北的 PCV2 阳性病料处理后接种 PK15A 细胞,并连续盲传 3 代,观察细胞生长状况良好,形态与未接种正常细胞相同,未发现细胞任何病变。图 1 为接种病料前和接种病料后盲传 3 代后 PK15A 细胞形态对比。由图 1 可知,接种病料前后形态一致,细胞未发生任何病变。

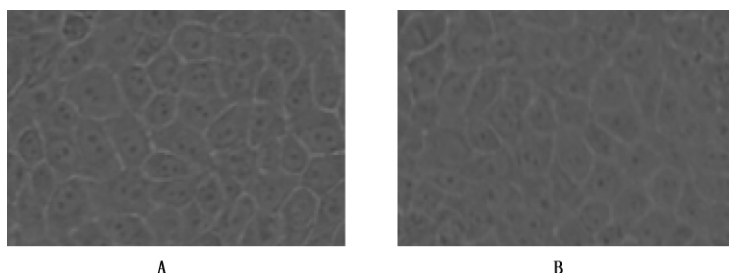


图 1 接种病料前后 PK15A 细胞形态(200×)

注:A,接种病料前 PK15A 细胞;B,接种病料连续盲传 3 代后的 PK15A 细胞。

2.2 PCR 检测结果 接种 PCV2 阳性病料的 PK15A 细胞连续盲传 3 代后, 分别置 -15 °C/室温反复冻融 3 次, 3000 r/min 离心 20 min 后, 收集上清, 并以病料来源地和序号分别标记为 DBN-SD02、DBN-SX07、DBN-BJ08、DBN-HB12 和 DBN-HB13 株, 并对其进行 PCR 检测, PCR 检验结果见图 2。

PCR 检测结果表明, 来自北京、天津、山东、山西和河北的 PCV2 阳性病料接种 PK15A 细胞后连续盲传 3 代, PCR 均可检测到 PCV2 特异性核酸片段, 该片段大小与 PCV2 阳性对照片段一致, 均为 1154 bp, 而均未检测到与 PCV1 阳性对照一致大小 (652 bp) 的特异性片段。

2.3 特异性鉴定结果 PCV2 各分离株 DBN-SD02、DBN-SX07、DBN-BJ08、DBN-HB12 和 DBN-HB13 株感染 PK15A 细胞后, 感染细胞均可与 PCV2 阳性血清特异性结合, 并被 FITC 标记的羊

抗猪二抗标记, 荧光显微镜下见到感染细胞的细胞浆内和胞核内均有大量绿色荧光物质着染, 而健康细胞对照孔则未见到特异性荧光(图 3), 表明 PCV2 各分离株均可被 PCV2 阳性血清特异性识别。

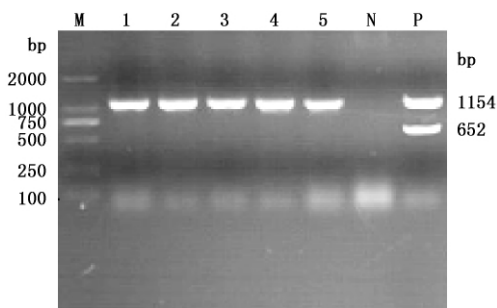


图 2 病料中 PCV2 的 PCR 检测结果

注: M 为 DL2000 DNA Marker; 1~5 分别为 DBN-BJ08、DBN-HB12、DBN-HB13、DBN-SX07、DBN-SD02 株 PCR 检测结果; N 为阴性对照; P 为 PCV1 和 PCV2 阳性对照。

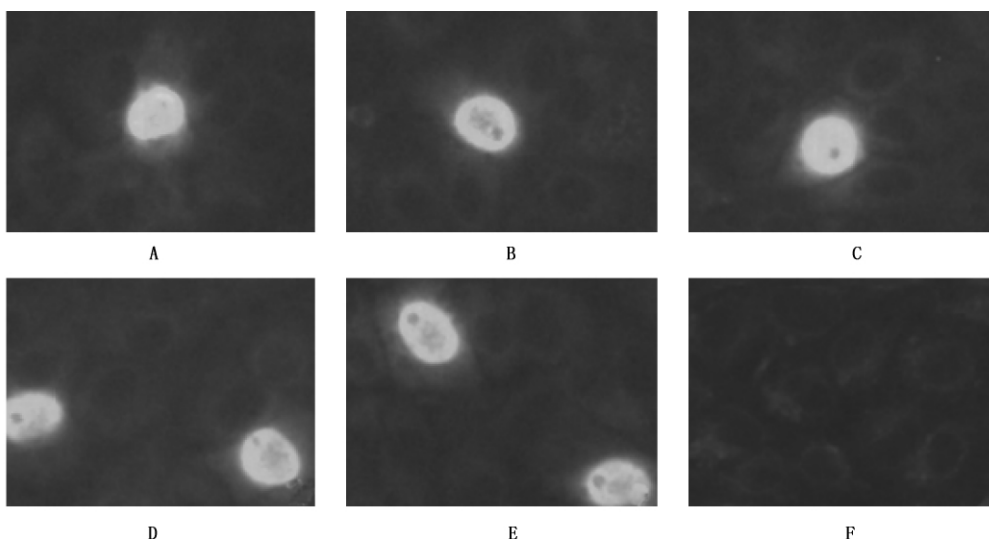


图 3 PCV2 各分离株特异性鉴定结果(200×)

注: A~E 分别为 DBN-SD02 株、DBN-SX07 株、DBN-BJ08 株、DBN-HB12 株和 DBN-HB13 株特异性鉴定结果; F 为阴性细胞对照。

2.4 基因组克隆及测序 用全基因组序列扩增引物分别对 PCV2 DBN-SD02、DBN-SX07、DBN-BJ08、DBN-HB12 和 DBN-HB13 株的基因组进行 PCR 扩增, 扩增结果见图 4。

将扩增产物分别切胶回收纯化并连接至 pMD18-T Simple 载体, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 涂板挑菌摇菌扩增, 并用质粒抽提试剂盒抽提质粒, PCR 检测重组质粒, 重组质粒 PCR 检测结果见图 5。

分别将各分离株基因组重组 T 载体检测阳性样本分别送北京博迈德测序, 测序结果提交 GenBank, 登录号分别为 FJ660967、FJ660968、

FJ660969、FJ660970 和 FJ660971。

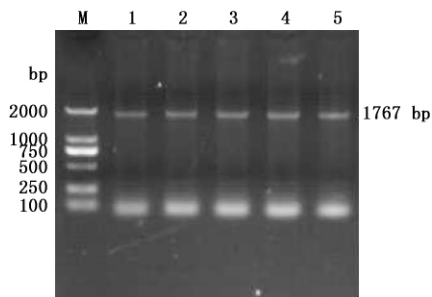


图 4 PCV2 各分离毒株全基因组扩增结果

注: M 为 DL2000 DNA Marker; 1~5 分别为 DBN-BJ08、DBN-HB12、DBN-HB13、DBN-SX07、DBN-SD02 株全基因组 PCR 扩增结果。

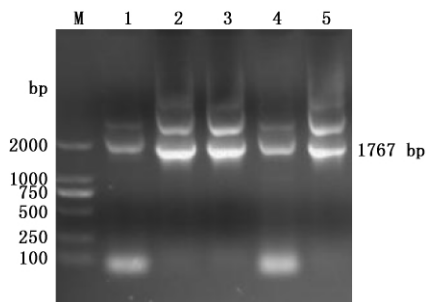


图5 PCV2各分离毒株全基因组重组T载体PCR检测结果
注: M为DL2000 DNA Marker; 1~5分别为含DBN-BJ08、DBN-HB12、DBN-HB13、DBN-SX07、DBN-SD02株全基因组的重组T载体PCR鉴定结果。

2.5 同源性比对和系统进化分析 利用DNASar V7.1K中MegAlign Clustral W方法将所分离5株PCV2全基因序列(方框)与PCV2国内外参考毒株和PCV2a、PCV2b和PCV2c亚型参考毒株(带下划线)进行同源性比对和系统进化树分析,结果见图6。比对结果显示,所分离5株PCV2毒株核苷酸序列同源

性为95.2%~99.7%,其中有4株(DBN-HB12、DBN-SD02、DBN-SX07和DBN-HB13)同源性为98.5%~99.7%与PCV2b基因型参考株AF055394位于同一进化分枝上,与国内报道的SH株、HZ0201、HZ0202和NB0301均处于同一个进化分支上,全基因组核苷酸序列同源性为98.1%~99.1%;而PCV2 DBN-BJ08株处于遗传进化树上的一个独立分枝上,与中国BF株、中国台湾株(AF166528、AY146993)和美国株(AY094619)、加拿大株(AF027217)及日本株(AB426905)核苷酸序列同源性为95.3%~96.5%,均与PCV2a基因型参考毒株AF055392亲缘关系较近,处在PCV2的同一个大的进化分支上,均属于PCV2a基因型。此外,由图还可以看出2个丹麦株(EU148503、EU148505)与PCV2c基因型参考毒株EU148503在系统进化树上单独构成一个分枝,距PCV2a和PCV2b基因型进化关系较远,为PCV2c亚型。

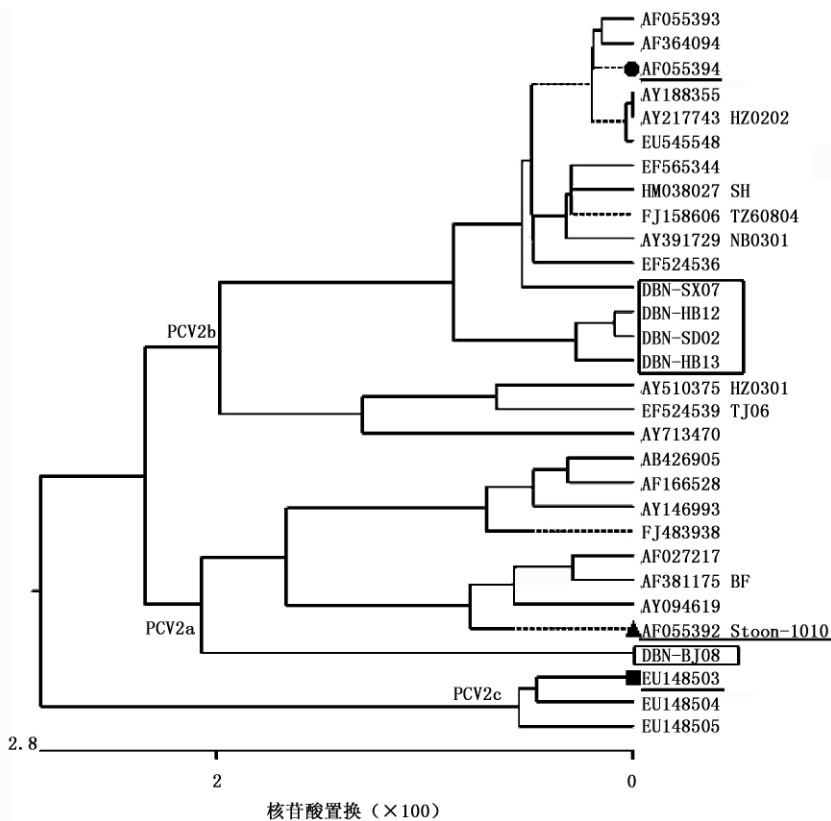


图6 系统进化树分析

注:▲为PCV2a基因型参考株;●为PCV2b基因型参考株; 为PCV2c基因型参考株。

系统进化分析结果表明,本试验分离的5株PCV2有4株(大框)位于一个较大的分枝上,属于PCV2b亚型,仅DBN-BJ08株(小框)为PCV2a基因型,表明PCV2b基因型是中国当前PCV2的主要

流行血清型。

2.6 病毒的体外增殖特性研究 病毒含量用Reed-Muench法计算各分离株病毒的F5、F10、F15和F20代病毒的TCID₅₀,测定结果见表1。

表 1 PCV2 各分离株 F5、F10、F15 和 F20 代病毒含量检测结果

分离株	F5(TCID ₅₀ /mL)	F10(TCID ₅₀ /mL)	F15(TCID ₅₀ /mL)	F20(TCID ₅₀ /mL)
DBN-SD02	10 ^{2.36}	10 ^{4.16}	10 ^{5.36}	10 ^{5.42}
DBN-SX07	10 ^{2.64}	10 ^{4.28}	10 ^{5.52}	10 ^{5.64}
DBN-BJ08	10 ^{2.50}	10 ^{4.25}	10 ^{5.5}	10 ^{5.54}
DBN-HB12	10 ^{2.69}	10 ^{4.12}	10 ^{5.25}	10 ^{5.39}
DBN-HB13	10 ^{2.52}	10 ^{4.15}	10 ^{5.32}	10 ^{5.30}

由表 1 可知, PCV2 DBN-SD02、DBN-SX07、DBN-BJ08、DBN-HB12、DBN-HB13 各分离株经过连续传代, 毒价均有明显的提升, 当传至 15 代时, 均可达到 10^{5.25} TCID₅₀/mL 以上。

本研究共分离鉴定了 5 株 PCV2 分离毒株, 其中有 4 株为 PCV2b 亚型, 1 株为 PCV2a 亚型。所分离的 5 株病毒的感染滴度均随着传代次数的增加有明显的提高。

3 讨论

PCV2 不仅靶向攻击淋巴组织细胞、损伤免疫系统, 而且常常侵袭猪的多个器官, 造成 PMWS, 此外还与 PRDS、PNDS、先天性震颤、繁殖障碍、胎儿心肌炎和扩张性坏死性肺炎等多种疾病密切相关, PCVAD 已成为当前影响世界养猪业的最重要的病毒性传染病。研究资料表明, PCV2 是引起 PMWS 的主要病原, 但普通商品仔猪单独感染 PCV2 并不表现 PMWS 临床症状 (Krakowka 等, 2001), SPF 猪、剥夺初乳的仔猪和悉生猪单独感染 PCV2 仅表现温和的临床症状, 临床上, 普通商品仔猪或猪剥夺初乳的仔猪通常需要其他病原, 如与 PRRSV (Rovira 等, 2002; Allan 等, 2000)、PPV (Allan 等, 1999)、肺炎支原体 (Oppiessnig 等, 2004) 共同感染或化学试剂的刺激 (如钥匙孔血蓝蛋白 (KLH)、弗氏不完全佐剂 (ICFA) 和巯基乙酸液体培养) 方可表现明显的 PMWS 症状。

关于 PCV2 两种基因型的命名, 不同的研究组织常使用不同的命名, 如 “A” 和 “B”、“SG1” 和 “SG2”、“1” 和 “2”、“b” 和 “a”, 以及根据限制性多态性片段 (RFLP) 模式分成的 “321” 和 “422” 等, 面对这种命名的混乱局面, 欧盟委员会关于猪圆环病毒的框架 6 研究项目 (PCVD 513928; www.pcvd.org) 提出了一种统一的命名 PCV2 基因型的方法, 统一命名为 PCV2a 和 PCV2b, 并将只有 20 世纪 80 年代在丹麦发现过 PCV2 命名为 PCV2c (Segalés 等, 2008)。资料显示, 1997—2003 年之间, PCV2 以 PCV2a 基因型病毒为主, 2004 年 PMWS 暴发之后, PCV2b 毒株则变得越来越普遍。当

前中国猪群中流行的猪圆环病毒 2 型以 PCV2b 基因型为主, 少数为 PCV2a 基因型, 这与先期的研究结果一致, 同时国内也可能存在一些其他基因型 (李文洁等, 2009)。

PCV2 控制的关键在于良好的饲养管理和生物安全措施, 同时加强免疫接种 (Fort 等, 2008, 2009; Fabio 等, 2010; Jake 等, 2010)。而疫苗的免疫效果与病毒在体外的增殖滴度密切相关。因此对分离鉴定的 PCV2 毒株进行体外增殖特性研究是疫苗研究的基础。鉴于 PCV 在体外细胞上不易培养, 病毒增殖常依赖于细胞 S 期 DNA 聚合酶 (Ilse 等, 1987), 因此在病毒分离初期, 在细胞维持液中加入低浓度的 D-氨基葡萄糖进行持续刺激, 通过对所分离鉴定的 5 株 PCV2 毒株进行连续传代并分别测其第 5、10、15 和 20 代毒的感染滴度, 研究发现所分离的 PCV2 毒株连续传代 15 代以后, 感染滴度均能达到 10^{5.25} TCID₅₀/mL 以上, 表明各分离株在 PK15A 细胞上经过连续传代明显增加了对该细胞的易感性。另外, 有研究资料表明, 通过细胞克隆筛选高度均一和易感性的 PK15 细胞, 也可明显提高病毒 PCV2 的感染滴度 (Yu 等, 2007)。显然, 两者分别从病毒对细胞的适应性和宿主细胞对病毒的易感性阐明了 PCV2 和 PK15 细胞之间的相互作用机制, 为如何提高 PCV2 感染滴度指明了方向。

另外, 由于 PK15 细胞中 PCV1 污染较为普遍, PCV2 临床病料中也常有 PCV1 的存在, 因此为了排除 PCV1 的干扰, 本研究选用了可鉴别 1 型和 2 型 PCV 的 PCR 检测方法对病料和扩毒过程进行检测控制。

本研究共从疑似 PMWS 病例中分离鉴定了 5 株 PCV2 毒株, 其中有 4 株为 PCV2b 亚型, 1 株为 PCV2a 亚型, 表明 PCV2b 基因型是中国当前 PCV2 的主要流行血清型, 同时还存在 PCV2a 基因型, 也为 PCV2 的分子流行病学调查、感染及预防控制提供了参考依据。所分离的 5 株病毒经体外细胞连续传代, 感染滴度均随着传代次数的增加有明显的提高, 为下一步的 PCV2 疫苗研究奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 王忠田,杨汉春,郭鑫. 规模化猪场猪圆环病毒 2 型感染的流行病学调查[J]. 中国兽医杂志, 2002, 38(10): 3~6.
- 2 王宪文,姚四新,刘兴友,等. 猪圆环病毒 2 型复制及其影响因素[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(3): 220~223.
- 3 冯志新,范伟兴,李晓成,等. PMWS 病猪猪圆环病毒 2 型全基因组序列分析[J]. 中国病毒学, 2004, 19(5): 454~457.
- 4 李文洁,李文涛,严伟东,等. 中国部分地区猪圆环病毒 2 型的基因型分析[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(9): 1358~1362.
- 5 周继勇,陈庆新,叶菊秀,等. 猪圆环病毒 2 型感染的血清学分析[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(1): 1~3.
- 6 郭抗抗,张彦明,张红,等. 猪圆环病毒 2 型分离株优势基因型分析与检测[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(10): 808~811.
- 7 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[J]. Comp Path, 1999, 121(1): 1~11.
- 8 Allan G M, McNeill Y F, Ellis J, et al. Experimental infection of colostrums deprived piglets with porcine circovirus (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication[J]. Arch Virol, 2000, 145(11): 2421~2429.
- 9 Chae C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases[J]. Veterinary Journal, 2005, 169(3): 326~336.
- 10 Fabio B R, Alberto Y I, Gilberto S, et al. Evaluation of the efficacy of an adjuvanted subunit vaccine in the prevention of PMWS under field conditions in Vietnam[A]. Sylvie, D'Allaire, Robert. Proceedings of the 21st IPVS Congress[C]. Vancouver, Canada, 2010.
- 11 Fort M, Sibila M, Allepuza A, et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins[J]. Vaccine, 2008, 26: 1063~1071.
- 12 Fort M, Sibila M, Pérez-Martín E, et al. One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) subunit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model[J]. Vaccine, 2009, 27: 4031~4037.
- 13 Ilse T, Peters D, Rasch R, et al. Replication of porcine circovirus; induction by glucosamine and cell cycle dependence[J]. Archives of Virology, 1987, 96: 39~57.
- 14 Krakowka S, Ellis J A, Mcneilly F, et al. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2)[J]. Vet Pathol, 2001, 38: 31~42.
- 15 Long J G, Yue H L, Yan W W, et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China[J]. Virology Journal, 2010, 7: 273.
- 16 Opriessnig T, Thacker E L, Yu S, et al. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2[J]. Vet Pathol, 2004, 41(6): 624~640.
- 17 Rovira A, Balasch M, Segalés J, et al. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2[J]. Journal of Virology, 2002, 76(7): 3232~3239.
- 18 Segalés J, Olvera A, Grau-Roma L, et al. PCV-2 genotype definition and nomenclature[J]. Veterinary Record, 2008, 162: 867~868.
- 19 Yu Z, Adeline L, Jennifer L, et al. Enhanced replication of porcine circovirus type 2 (PCV2) in a homogeneous subpopulation of PK15 cell line[J]. Virology, 2007, 369: 423~430.

Research on Isolation, Identification and Characteristic of Vitro Propagation of Isolates of Porcine Circovirus Type 2

WANG Gui-hua, CHEN Yi-feng, TANG Bo, LIU Ming-ming, CHEN Cui-yun, ZHAO Ya-rong
(Veterinary Medicine Research Center of Beijing Da Bei Nong Group, Beijing 100097, China)

Abstract: To isolate and identify porcine circovirus type 2 (PCV2) strains, and investigate its' characteristic of vitro propagation, polymerase chain reaction (PCR) was utilized in this study to detect the specimens of suspected PMWS cases collected from Shangdong, Shangxi, Beijing and Hebei province, the positive samples were dealt with and inoculated into the PCV-free PK15A cells which were then propagate continuously to isolate PCV2 strains. The cytopathic effect (CPE) was examined each time and the cultures of the 3rd time were identified by PCR and indirect immunofluorescence assay (IFA). The genome of each isolates were then cloned and sequenced. The sequence was submitted to the GenBank. Based on the sequence phylogenetic tree analysis was made too, subsequently these PCV2 strains' characteristic of vitro propagation were studied by propagated continuously to the 20th generation, and the 5th, 10th, 15th and 20th generation's titer known as 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) were detected. These results showed that there were five strains of PCV2 were isolated and identified named PCV2 DBN-SD02, DBN-SX07, DBN-BJ08, DBN-HB12 and DBN-HB13 respectively, and the GenBank submission number were FJ660967, FJ660968, FJ660969, FJ660970, FJ660971, respectively. The genome of five isolates was all 1767 bp. Four of five isolates were belong to the PCV2b genotype and share a 98.5%—99.7% identity except PCV2 DBN-BJ08 strain which belong to the PCV2a genotype. The vitro propagation study showed that the TCID₅₀ increase obviously with the times of propagation.

Key words: porcine circovirus type 2; isolation; identification; characteristic of propagation