

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.01.13

猪圆环病毒 2 型疫苗及其效力评价方法比较研究

徐 媛, 彭国瑞, 徐小艾, 吴睿智, 赵启祖, 朱元源, 李 翠,
王团结, 邹兴启, 李 琰, 刘业兵*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2023-09-14 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 01-0087-08 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 为探索对不同猪圆环病毒 2 型(Porcine circovirus type 2, PCV2)疫苗产品进行统一质量评价的可行性, 对国内该类疫苗产品及其现有效力评价方法进行了归纳和比较研究。结果发现, 目前猪圆环病毒 2 型疫苗类产品种类有 25 个, 且疫苗毒株数量多达 10 余个, 效力检验方法包括传统的免疫攻毒法、血清学方法和多种不同的替代方法, 但尚没有统一的效力评价体系。本研究可为进一步完善 PCV2 疫苗效力评价方法、统一评价疫苗效力、提高产品质量提供参考。

[关键词] 猪圆环病毒 2 型; 疫苗; 效力评价方法

Comparative Study on Porcine Circovirus Type 2 Vaccine and Its Efficacy Evaluation Method

XU Yuan, PENG Guo-rui, XU Xiao-ai, WU Rui-zhi, ZHAO Qi-zu, ZHU Yuan-yuan, LI Cui,
WANG Tuan-jie, ZOU Xing-qi, LI Yan, LIU Ye-bing*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081)

Corresponding author: LIU Ye-bing, E-mail: zjsliuyebing@163.com

Abstract: In order to explore the feasibility of conducting a unified quality evaluation of different Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccine products, this paper has conducted a comparative study on the PCV2 vaccine products and their existing efficacy evaluation methods in China. The results showed that there are currently 25 PCV2 vaccine products, with more than 10 vaccine strains. The efficacy test methods include the traditional vaccinate-challenge method, serology test, and various alternative methods. However, there is no unified efficacy evaluation system. This paper provides a reference for further improving PCV2 vaccines efficacy evaluation methods, unifying the evaluation of vaccines efficacy and improving the quality of vaccine products.

Key words: Porcine circovirus type 2; vaccines; efficacy evaluation method

基金项目: 中国兽医药品监察所兽药行业公益性重点专项(GY202102)

作者简介: 徐 媛, 高级兽医师, 从事猪用病毒类生物制品检验和研究。

通讯作者: 刘业兵。E-mail: zjsliuyebing@163.com

猪圆环病毒 2 型 (porcine circovirus type 2, PCV2) 是圆环病毒科 (*Circoviridae*) 圆环病毒属 (*Circovirus*) 成员, 病毒粒子无囊膜, 呈二十面体对称结构, 基因组为闭环单股 DNA, 直径 20 nm 左右, 是迄今发现的最小的动物病毒。自 20 世纪 80 年代以来, 由 PCV2 感染引发的“猪圆环病毒相关疾病” (porcine circovirus-associated disease, PCVAD/PCVD) 对养猪业造成了严重威胁, 是影响全球生猪生长的重要经济问题之一^[1-2]。PCVD 的临床表现包括 PCV2 系统性疾病 (PCV2-SD), 以前称为仔猪断奶后多系统衰竭综合征 (PMWS), 和 PCV2 亚临床感染 (PCV2-SI)^[3-5]。PCV2-SD 严重感染的猪会有高病毒血症、组织内高滴度的病毒、淋巴组织的衰竭和肉芽肿性炎症等表现, 并且常出现和其他病原体共感染的情况^[6-7]。而 PCV2-SI 引发的非典型的临床症状, 也直接导致了生产性能降低^[8-9]。

随着越来越多的 PCV2 毒株被分离鉴定和基因分型方法的发展, PCV2 出现了越来越多的基因型^[10], 其中, PCV2a、PCV2b、PCV2d 先后成为流行于我国的优势基因型, 并且 PCV2d 已在我国形成较大流行^[11-13]。PCV2 灭活疫苗的早期应用对于预防和控制 PCVD 发挥了关键作用。随后, PCV2 基因工程亚单位疫苗、合成肽疫苗相继研发成功并应用。根据国家兽药基础数据库显示, 目前 PCV2 疫苗产品的批准文号近 70 个, 生产企业 40 余家, 涉及生产用 PCV2 毒株 10 余个^[14], 且已有 5 个国外商品化 PCV2 疫苗在我国取得了《进口兽药注册证书》。面对田间 PCV2 流行毒株的变化, 如何科学、务实地对众多 PCV2 疫苗产品的效力与田间流行毒株的匹配程度进行统一评价是具有挑战性的工作。本文旨在对各种 PCV2 疫苗及其效力评价方法进行比较研究, 以期探索统一的 PCV2 效力评价方法和标准提供参考。

1 PCV2 疫苗概况

1.1 PCV2 疫苗种类 PCV2 疫苗作为养猪行业防控 PCVD 的有效手段受到高度重视。由法国梅里亚公司研发的 PCV2 全病毒灭活疫苗 Circovac 于 2006 年上市; 随后, 我国多个科研团队研发的 PCV2

灭活疫苗 SH 株、LG 株、DBN-SX07 株等陆续上市^[15-17]。PCV2 疫苗产品以传统的灭活疫苗数量居多, 包括单苗和联苗, 此外还包括, 以 PCV1 为骨架嵌合 PCV2 ORF2 基因的嵌合体疫苗, 通过大肠杆菌或杆状病毒昆虫细胞表达 PCV2 免疫原性蛋白 Cap 研发而成的亚单位疫苗, 和按照抗原氨基酸序列人工方法合成保护性短肽而研制的合成肽疫苗。其中, 亚单位疫苗已经成为近几年的研究热点, 表达衣壳蛋白 Cap 的亚单位疫苗有较好的免疫原性和安全性, 但生产成本较高。PCV2 弱毒疫苗、活载体疫苗、核酸疫苗目前均仅在实验室研究阶段^[18-20]。在 2022 年, 我国 PCV2 疫苗的批签发数量仅次于猪瘟疫苗和伪狂犬病疫苗, 位居猪病毒类疫苗批签发第三位, 国内生产企业超过 40 家, 其中国产单苗和联苗共 20 个, 进口疫苗产品 5 个, 详见表 1。

1.2 毒株及基因型 随着 PCV2 感染在全世界范围内的发生和流行, 对各地 PCV2 毒株之间的系统发育关系研究逐渐深入。根据对衣壳蛋白 Cap 基因的成对序列比较法, 2008 年提出 PCV2 基因型的定义, 并且已鉴定的基因型有 PCV2a、PCV2b、PCV2c、PCV2d 和 PCV2e^[21]。近些年的研究表明, 新基因型的出现可能源于动物体内感染的不同毒株间的重组, 而现有的分类方法已不能适用所有 PCV2 毒株。我国流行毒株的基因型为 PCV2a、PCV2b、PCV2d。目前国内灭活疫苗 PCV2 毒株基因型包括 PCV2a、PCV2b、PCV2d, 并且疫苗毒株的数量随着新产品的上市也在逐渐增加。

1.3 用法与用量 由于疫苗毒株、技术路线、抗原含量以及联用情况的不同, 各疫苗的用法与用量也存在差异, 主要表现在以下两方面。

1.3.1 仔猪首免日龄及是否需要加强免疫 首免日龄的选择是权衡母源抗体水平与疫苗效力受其影响程度的结果, 已批准的疫苗中, 有 2/3 选择 14~21 日龄 (2 周龄) 首免, 其余选择 21 日龄 (3 周龄) 首免; 而是否需要加强免疫则是权衡接种量 (抗原含量) 与预期效力及安全性 (不良反应) 的结果, 已批准的疫苗中, 半数的国产疫苗接种量定为 1 mL/头的疫苗需要间隔 2 或 3 周进行加强免疫,

表 1 我国已批准使用的商品化 PCV2 相关疫苗

Tab 1 Approved commercial PCV2 vaccines in China

	疫苗名称	生产企业数量	效力评价方法
单苗	猪圆环病毒 2 型灭活疫苗 (SH 株)	9 家	仔猪免疫攻毒法、小鼠免疫试验法 (ELISA)
	猪圆环病毒 2 型灭活疫苗 (LG 株)	6 家	仔猪抗体检测法 (IPMA)、仔猪免疫攻毒法
	猪圆环病毒 2 型灭活疫苗 (DBN - SX07 株)	10 家	仔猪免疫攻毒法、ELISA 抗体检测法
	猪圆环病毒 2 型灭活疫苗 (WH 株)	5 家	仔猪抗体检测法 (ELISA)、仔猪免疫攻毒法
	猪圆环病毒 2 型灭活疫苗 (ZJ/C 株)	6 家	仔猪免疫攻毒法、小鼠免疫攻毒法
	猪圆环病毒 2 型灭活疫苗 (YZ 株)	5 家	血清学方法 (IFA)、仔猪免疫攻毒法
	猪圆环病毒 2 型灭活疫苗 (SH 株, II)	3 家	仔猪免疫攻毒法、小鼠免疫试验法 (ELISA)
	猪圆环病毒 2 型灭活疫苗 (SD 株)	1 家	血清学方法 (ELISA)、仔猪免疫攻毒法
	猪圆环病毒 2 型基因工程亚单位疫苗 (大肠杆菌源)	1 家	仔猪免疫攻毒法、小鼠免疫试验法 (ELISA)
	猪圆环病毒 2 型亚单位疫苗 (重组杆状病毒 OKM 株)	3 家	蛋白抗原含量 (相对效力法)、仔猪免疫攻毒法
	猪圆环病毒 2 型基因工程亚单位疫苗	1 家	抗原含量检测 (琼扩效价测定、BCA 法)、仔猪免疫攻毒法
	猪圆环病毒 2 型杆状病毒载体灭活疫苗 (CP08 株)	2 家	相对效力法、仔猪免疫攻毒法
	猪圆环病毒 2 型灭活疫苗 (1010 株)	1 家	抗原含量检测法 (ELISA)、仔猪免疫攻毒法
	猪圆环病毒 2 型杆状病毒载体灭活疫苗	1 家	相对效力法、仔猪免疫攻毒法
	猪圆环病毒 1 - 2 型嵌合体灭活疫苗	1 家	相对效力法、仔猪免疫攻毒法
联苗	猪圆环病毒 2 型合成肽疫苗 (多肽 0803 + 0806)	1 家	仔猪免疫攻毒法、小鼠血清学法 (ELISA)
	猪圆环病毒 2 型、猪肺炎支原体二联灭活疫苗 (SH 株 + HN0613 株)	4 家	仔猪免疫攻毒法、小鼠免疫试验法 (ELISA)
	猪圆环病毒 2 型、猪肺炎支原体二联灭活疫苗 (重组杆状病毒 CP08 株 + JM 株)	2 家	相对效力法
	猪圆环病毒 2 型、副猪嗜血杆菌二联灭活疫苗 (SH 株 + 4 型 JS 株 + 5 型 ZJ 株)	1 家	仔猪免疫攻毒法、小鼠免疫试验法 (ELISA)
	猪圆环病毒 2 型、猪肺炎支原体二联灭活疫苗 (重组杆状病毒 DBN01 株 + DJ - 166 株)	1 家	相对效力法、仔猪免疫攻毒法
	猪圆环病毒 2 型、猪肺炎支原体二联灭活疫苗 (Cap 蛋白 + SY 株)	2 家	仔猪免疫攻毒法
	猪圆环病毒 2 型、副猪嗜血杆菌二联亚单位疫苗	1 家	血清学方法 (ELISA)、仔猪免疫攻毒法
	猪圆环病毒 1 - 2 型嵌合体、支原体肺炎二联灭活疫苗	1 家	相对效力法、仔猪免疫攻毒法
	猪圆环病毒 2 型、猪肺炎支原体二联灭活疫苗 (重组杆状病毒 P 株 + P 株)	/	相对效力法、仔猪免疫攻毒法
	猪圆环病毒 2 型、猪肺炎支原体二联灭活疫苗 (162 株 + HP - G 株)	/	血清学方法 (ELISA)、仔猪免疫攻毒法

接种量定为 2 mL/头的疫苗通常未作要求。进口疫苗均是单次免疫。

1.3.2 成年猪的免疫程序 已批准的疫苗中,部分疫苗明确写明可用于成年母猪(后备、怀孕、经产)及种公猪,但免疫程序各有规定。对于成年母猪,通常要在配种前至分娩前的生产阶段进行多次免疫,目的是在保护母猪的同时为新生仔猪准备充足的母源抗体;对于种公猪在内的其他成年猪,通常要求根据疫苗免疫期定期免疫。

2 PCV2 疫苗效力检验方法比较分析

有效性是疫苗的一项重要评价指标,直接影响了疫病防控的效果。PCV2 疫苗效力检验方法包括体内效力检验法和体外效力检验法。前者是通过免疫接种靶动物或替代靶动物的实验动物后,检测其免疫攻毒保护率或诱导产生的抗体效价;后者则是不使用动物,通过生化或免疫学等方法检测其中的抗原含量,以间接评价疫苗效力^[22]。下文将对 PCV2 疫苗效力检验方法进行分析。

2.1 体内效力检验法

2.1.1 靶动物免疫攻毒法 靶动物免疫攻毒法是兽用疫苗最常用且最直观的效力检验方法。PCV2 的易感动物是猪。对血清、鼻腔分泌物和粪便中的动态研究发现,大多数猪在 4~11 周龄感染 PCV2,感染母猪可通过胎盘感染胎儿,并通过呼吸道分泌物、初乳等传染给哺乳仔猪^[23-24]。受 PCV2 单一病原感染的猪往往仅出现亚临床症状,早期病症较为隐匿,较难呈现典型直观的发病模型^[25-26]。PCV2 疫苗效力检验用猪的日龄范围最低至 10 日龄,最高至 35 日龄,不同质量标准在检验用猪日龄上的要求有所不同,最为常见的范围是 14~21 日龄。免疫程序分为单次免疫和两次免疫,免疫后 2~5 周进行攻毒,攻毒前后是否有免疫刺激,依不同标准而定,目前进口疫苗都无需该步操作。由于攻毒后发病温和,发病的判定较为困难,因此标准中往往结合多项指标综合判定,主要包括体温变化、相对日增重差异、免疫组织化学法(immunohistochemistry, IHC)检测病毒抗原、DNA 扩增技术(polymerase chain reaction/quantitative real-time polymerase chain

reaction, PCR/qPCR)检测血液或组织中的病毒抗原、间接免疫荧光(indirect immunofluorescence assay, IFA)检测组织中分离培养的病毒抗原等方法,进行判定和评价。其中,病毒分离方法因操作复杂、耗时长,且受细胞敏感性的影响,可能导致病毒滴度降低,而影响检测敏感度,国内外都少有使用。国内产品多以检测病毒抗原、相对日增重和体温变化综合判定发病。进口疫苗产品则多是在攻毒后以 IHC 和 PCR/qPCR 检测病毒抗原,结合统计学分析进行结果判定,各组动物数量往往不低于 10 只,较国内各组动物 5~6 只多出至少一倍。

有超过一半的 PCV2 疫苗产品的抗原检测使用 PCR/qPCR。其中有多数疫苗产品使用普通 PCR,仅有 5 个产品使用 qPCR。基于 Taqman 探针的 PCV2 的 qPCR 检测方法的灵敏度约是普通 PCR 的 100 倍。IHC 是几乎所有产品都用到的抗原检测技术,IHC 通过标记的抗体或抗原对细胞相应抗原或抗体进行定性、定位或定量检测,经过化学呈色反应,用显微镜或电子显微镜观察结果。PCV2 感染后的病理表现主要见于淋巴组织,应用该方法检测 PCV2 抗原采集的病料包括:腹股沟淋巴结、肠系膜淋巴结、肺门淋巴结、支气管淋巴结和扁桃体等。IHC 在 PCV2-SD 的个体诊断中发挥了重要作用,同时也要求实验人员熟练掌握组织病理学操作技术。

靶动物免疫攻毒法有以下几方面值得注意。第一,选用靶动物免疫攻毒法进行效力检验的 PCV2 疫苗,需要使用各自质量标准中的攻毒毒株进行攻毒,所用攻毒毒株繁多且毒力强弱有别,从而导致发病模型存在差别;第二,尚未统一标准实验用猪,因日龄和健康背景不同,产生的免疫应答存在差异,也是导致发病模型差异的原因;第三,目前的发病判定方法较多且尚未统一,尚未科学地比较方法的优劣。可见,目前评价 PCV2 疫苗效力的靶动物免疫攻毒法无法对众多疫苗进行统一的效力评价和比较。此外,随着 PCV2 疫苗临床接种率的逐年上升和其他感染因素的存在,筛选双阴性仔猪的难度也随之增大。

2.1.2 小鼠免疫攻毒法 小鼠是应用最广泛的实验动物,研究表明,PCV2 可以人工感染 Balb/c 小鼠、C57BL/6 小鼠、C3H/HeJ 小鼠、ICR 小鼠等啮齿动物,小鼠作为 PCV2 感染的动物模型,已用于病毒与宿主相互作用研究、疫苗效力评估、抗病毒药物和疫苗佐剂的评估^[27]。吴佳鑫^[28]对 6~8 周龄 SPF 级 Balb/c 小鼠进行免疫攻毒保护研究,攻毒后第三天,应用 qPCR 方法可在小鼠多个脏器组织中检测出病毒,试验疫苗可对小鼠提供一定的保护。目前仅有一个国内产品的效力检验同时涉及仔猪免疫攻毒法和小鼠免疫攻毒法,通过采集组织,进行病毒分离培养,比较免疫组和对照组的病毒分离结果来评价免疫效果。用易感的小型实验动物进行免疫攻毒效力检验能够降低检验成本和操作难度,但因物种差异,可能导致与靶动物免疫攻毒评价结果不一致,故需要经过大量试验验证两者的平行关系。

2.1.3 血清学检验法 血清学检验法属于体内效力检验方法,国内外 PCV2 疫苗产品多有应用该方法评价疫苗的免疫效果,使用的动物同样是双阴性健康仔猪和 Balb/c 小鼠。接种疫苗 2~3 周后,产生针对 PCV2 的特异性免疫应答,血清中的特异性抗体水平能够反应疫苗的保护效果。PCV2 疫苗中,涉及血清学效力评价方法的产品占到半数以上,其中三分之一使用小鼠免疫试验,不同产品的免疫程序和采血时间存在差异,判定方法和标准也不一致。

通过对免疫动物的血清抗体效价进行检测,评价疫苗的保护效果,使用最多的检测方法是酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA),其次是免疫过氧化物酶单层细胞试验 (immunoperoxidase monolayer cell assay, IPMA) 和间接免疫荧光检测,后两种方法需要进行细胞培养,耗时较长,对人员操作水平要求较高。ELISA 是检测血清中抗体水平的常用方法,目前国内已有商品化猪 PCV2 抗体检测试剂盒,吴华伟^[29]曾对 5 种试剂盒进行评价,发现不同产品在敏感性和符合率上的差别较大。ELISA 方法对试剂盒质量提出了更

高的要求。

2.2 体外效力检验法

2.2.1 相对效力法 相对效力法即参考疫苗法,基于量反应平行线测定法和 ELISA 原理,将被检疫苗与已经检验合格或经靶动物免疫攻毒试验证明效力合格的参考疫苗同时进行检测,检验结果成立时,通过软件计算被检疫苗的相对效力值,每次检测样品时不需要重复建立标准曲线^[30]。该方法是一种操作简单,省时高效的替代方法。近三分之一的 PCV2 疫苗使用了相对效力法。参考疫苗在其中尤为关键,只有制备出质量可靠的参考疫苗才能对样品进行有效评价。近年来对该方法的应用逐渐增多。参考疫苗作为标尺必须确保其具有优秀的保护力和稳定性,并且与免疫攻毒法具有高度相关性。目前,不同疫苗的效力检验使用的参考疫苗都由各研发单位制备,尚无通用性参考疫苗,因此该方法无法客观统一地对产品进行比较^[31]。

2.2.2 抗原含量测定法 疫苗中抗原含量的高低直接影响到疫苗的免疫效果。目前的 PCV2 疫苗产品中分别有一个灭活疫苗和一个亚单位疫苗对抗原含量进行测定,测定方法包括琼脂扩散试验法、BCA 蛋白含量检测法和夹心 ELISA 法。琼脂扩散的结果受多种因素影响,对抗原的定量而言准确性较差。其他两种方法结果的准确性也同样受试剂质量影响。随着分离纯化技术的发展,色谱技术越来越多地被用于兽用生物制品的质量控制,应用高效体积排阻色谱技术 (high performance size exclusion chromatography, HPSEC) 检测 PCV2 疫苗中抗原含量的方法已初步建立,但由于疫苗的研发工艺不同,疫苗中成分复杂等因素,想要建立通用的抗原含量测定方法尚需要大量的研究工作^[32]。

3 讨论与展望

PCV2 对猪群健康造成了持续且广泛的影响,接种疫苗是目前最有效的防控措施。随着病毒流行趋势的复杂多变、研发技术的革新以及使用者对疫苗效果的更高期待,新型疫苗产品层出不穷,从而增大了对该类产品的质量评价和监管难度。

从广义上讲,效力评价是伴随疫苗全生命周期的、重复而渐进的、最为关键的事件之一,包括研发早期探索阶段的概念验证 (proof - of - concept, POC) 效力评价、以申报注册为目标的实验室和临床效力评价、申报注册过程中必要的第三方或官方效力评价 (临床验证或复核检验)、完成上市许可之后的出厂检验效力评价以及客户或官方要求的准入或监督效力评价。就单一产品而言,其效力评价方法在上述演变过程中,应当遵从化繁为简、深入浅出的原则;尤其是完成上市许可之后的效力评价,应以稳定的生产工艺和符合良好生产管理规范 (good manufacturing practice, GMP) 的生产过程为基石,科学、客观、精准地反映产品的预期保护力,而这正是本文所关注的产品质量标准的效力评价方法。由于病原及疫病的特殊性,在实验室内使用健康靶动物进行“攻毒致病”难免会因为生物源因素 (实验动物个体及批次差异)、攻毒材料因素 (来源、毒力差异) 以及人源因素 (操作、判定差异) 等,而极易出现偏差、甚至不可重复。就 PCV2 及其造成的 PCVD 而言,病原在不同年龄段靶动物中展现的毒力差异明显,各强毒力毒株在同一年龄段靶动物中展现的毒力也难言一致,且在临床环境变化及高强度免疫压力下,流行毒株也随之演变,所带来的是更多的亚临床感染和症状,给疫病防控带来压力的同时,也提升了效力评价的难度。

实现对众多 PCV2 疫苗产品进行统一的效力评价,是一项极具挑战的工作。体内效力检验靶动物免疫攻毒法是当前应用最为广泛的方法,但在靶动物筛选标准、发病指标、保护标准、攻毒毒株及免疫攻毒程序等关键方面,各疫苗厂家均制定了“专属”标准,若要统一建立通用于所有疫苗的体内效力检验方法,需开展包括通用靶动物筛选及供应保障,通用攻毒毒株流调、筛选、建库及更新判定,通用免疫攻毒程序、发病及保护标准探索性实验,以及方法学验证等大量研究工作,要求巨大的人力、物力、财力投入,但预期结果的不确定性极高。相对而言,体外效力检验方法不涉及标准严苛的检验

用动物以及繁冗复杂的免疫和/或攻毒操作、观察、取样及检测,影响变量更少、可控性更高、检验成本更低且符合 3R 原则。在众多 PCV2 疫苗中,体外效力检验相对效力法通常作为效力检验的“二选其一”之方法,但各产品的“专属”方法仍然各异,若能够开发研制通用参考疫苗及配套检验用抗体和试剂,统一“度量用尺”,进而制定各个疫苗的相对效力合格限值,可有望间接实现疫苗效力的统一评价;而体外效力检验抗原含量测定法也有望成为直接实现疫苗效力统一评价的潜在方法,通过制备标准抗原,不论使用 ELISA 还是色谱技术,均可以实现抗原含量的精准测定,但是,如何通过科学合理的前处理,最大程度保留不同成品疫苗中的抗原,以满足体外效力检验上样要求,需开展大量的交叉学科探索研究,这是监管机构与生产企业携手共进、双向奔赴之方向。

参考文献:

- [1] Meehan B M, McNeilly F, Todd D, *et al.* Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs[J]. *Journal of General Virology*, 1998, 79 (Pt 9): 2171 - 2179.
- [2] Wiederkehr D D, Sydler T, Buergi E, *et al.* A new emerging genotype subgroup within PCV - 2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland [J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 136 (1/2): 27 - 35.
- [3] Nayar G P, Hamel A, Lin L. Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs [J]. *Canadian Veterinary Journal*, 1997, 38 (6): 385 - 386.
- [4] Afghah Z, Webb B, Meng X J, *et al.* Ten years of PCV2 vaccines and vaccination: Is eradication a possibility? [J]. *Veterinary Microbiology*, 2017 (206): 21 - 28.
- [5] Ouyang Y, Nauwynck H J. PCV2 uptake by porcine monocytes is strain - dependent and is associated with amino acid characteristics on the capsid surface [J]. *Microbiol Spectr*, 2023, 11 (2): 3805 - 3822.
- [6] Ramos - Vara J A, Duran O, Render J A, *et al.* Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in the USA [J]. *Veterinary Record*, 1997, 141 (18): 479 - 480.
- [7] Eddicks M, Eddicks L, Stadler J, *et al.* The porcine respiratory

- disease complex (PRDC) – a clinical review[J]. *Tieraerztliche Praxis Ausgabe Grosstiere Nutztiere*, 2021,49(2):120–132.
- [8] Chae C. A review of porcine circovirus 2 – associated syndromes and diseases [J]. *Veterinary Journal*, 2005, 169 (3): 326–336.
- [9] Jeffrey J. Zimmernan, Locke Karriker, Alejandro Ramirez, *et al.* Diseases of swine[M]. Iowa State University Press, 2021.
- [10] Karuppannan A K, Opriessnig T. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines in the context of current molecular epidemiology[J]. *Viruses*, 2017,9(5): 1–15.
- [11] Xu T, Zhang Y H, Tian R B, *et al.* Prevalence and genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) and type 3 (PCV3) between 2018 and 2020 in central China[J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2021, 94: 105016.
- [12] Xia D, Huang L, Xie Y, *et al.* The prevalence and genetic diversity of porcine circovirus types 2 and 3 in Northeast China from 2015 to 2018[J]. *Archives of Virology*, 2019, 164(10): 2435–2449.
- [13] Davies B, Wang X, Dvorak C M, *et al.* Diagnostic phylogenetics reveals a new Porcine circovirus 2 cluster[J]. *Virus Research*, 2016, 217: 32–37.
- [14] 国家兽药基础数据库[DB/OL]. <http://vdtc.org.cn:8081/cx/> National Veterinary Drug Basic Information Database[DB/OL]. <http://vdtc.org.cn:8081/cx/>
- [15] 欧阳海平, 潘永飞, 宋延华. 猪圆环病毒 2 型疫苗研究进展[J]. *动物医学进展*, 2020, 41(01): 98–103.
Ou Yang H P, Pan Y F, Song Y H. Research progress of porcine circovirus type 2 vaccine[J]. *Progress In Veterinary Medicine*, 2020, 41(01): 98–103.
- [16] 刘长明, 危艳武, 陆月华, 等. 猪圆环病毒 2 型灭活疫苗 (LG 株) 的研制与应用[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2010(09): 29–30.
Liu C M, Wei Y W, Lu Y H, *et al.* Development and application of porcine circovirus type 2 inactivated vaccine (LG strain) [J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*. 2010(09): 29–30.
- [17] 郭佳慧. 猪圆环病毒 2b 和 2 d 基因型 Cap 蛋白的重组表达及其免疫原性研究[D]. 扬州大学, 2019.
Guo J H. Porcine circovirus 2b and 2 d genotypes Cap protein recombinant expression and its immunogenicity [D]. Yangzhou University, 2019.
- [18] 王先炜, 李玉峰, 姜平, 等. 表达猪圆环病毒 2 型 Cap 和猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 融合蛋白重组腺病毒的构建和免疫原性测定[J]. *生物工程学报*, 2009, 25(11): 1639–1645.
Wang X W, Li Y F, Jiang P, *et al.* Construction and immunogenicity of recombinant adenoviruses expressing Cap protein of PCV2 and GP5 protein of PRRSV in mice[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25(11): 1639–1645.
- [19] 金宁一, 秦晓冰, 郑敏, 等. 猪 2 型圆环病毒核酸疫苗的接种 Balb/c 小鼠实验免疫研究[J]. *生物工程杂志*, 2005(07): 76–79.
Jin N Y, Qin X B, Zheng M, *et al.* PCV2 nucleotide vaccines [J]. *China Biotechnology*, 2005(07): 76–79.
- [20] Jinshuo Guo, Lei Hou, Jianwei Zhou, *et al.* Porcine circovirus type 2 vaccines: commercial application and research advances [J] *Viruses*, 2022,14(9):1–12.
- [21] Segalés J, Olvera A, Grau – Roma L, *et al.* PCV – 2 genotype definition and nomenclature [J]. *Veterinary Record*, 2008, 162(26): 867–868.
- [22] 杨京岚, 陈光华, 夏业才, 译. 美国兽医生物制品法规和技术标准[M]. 北京: 中国农业出版社, 2019.
Yang J L, Chen G H, Xia Y C, *et al.* The Laws, Regulations, and Technical Standards on Veterinary Biologics in the United States[M] Beijing: China Agriculture Press, 2019.
- [23] Carasova P, Celer V, Takacova K, *et al.* The levels of PCV2 specific antibodies and viremia in pigs [J]. *Research in Veterinary Science*, 2007, 83(2): 274–278.
- [24] Grau – Roma L, Fraile L, Segales J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2 [J]. *Veterinary Journal*, 2011, 187(1): 23–32.
- [25] Rose N, Opriessnig T, Grasland B, *et al.* Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) [J]. *Virus Research*, 2012, 164(1/2): 78–89.
- [26] 杨汉春, 主译. 猪病学 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2022.
Yang H C. Diseases of Swine [M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, 2022.
- [27] 何天慈, 万建青, 邹启启, 等. 国内商品化猪圆环病毒 2 型疫苗效力检验方法之比较[J]. *中国兽医杂志*, 2018, 54(11): 107–110.
Comparison of efficacy testing methods for commercial porcine circovirus type 2 vaccine in China [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2018, 54(11): 107–110.
- [28] 吴佳鑫. 猪圆环病毒 2 型 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 检测方法的建立以及 PCV2 疫苗对 Balb/c 小鼠的攻毒保护性研究[D]. 南京农业大学, 2020.

Wu J X. Establishment of Taqman probes fluorescence – based quantitative real – time PCR and protective effect of PCV2 vaccine on Balb/c mice[D]. Nanjing Agricultural University, 2020.

[29] 吴华伟, 高金源, 邓 永, 等. 国内 5 种猪圆环病毒 PCV2 抗体检测试剂盒的比较试验[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45 (6) : 11 – 15.

Wu H W, Gao J Y, Deng Y, *et al.* Comparison of 5 domestic PCV2 antibody detection kits[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2011, 45(6) : 11 – 15.

[30] 汤 波, 车艳杰, 徐慧敏, 等. 猪肺炎支原体灭活疫苗相对效力值竞争 ELISA 检测方法的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022 (02) :118 – 121.

Tang B, Ce Y J, Xu H M, *et al.* Establishment of a competitive ELISA method to detect relative efficacy value of *Mycoplasma suis* pneumoniae inactivated vaccine[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2022(02) :118 – 121.

[31] 王晓卉. 猪圆环病毒 2 型灭活疫苗参考品的研制及定值方法研究[D]. 中国兽医药品监察所, 2015.

Wang X H, The research and evaluation of reference standard of porcine circovirus type 2 inactivated vaccine[D]. China Institute of Veterinary Drug Control, 2015.

[32] 徐 嫻, 杨延丽, 邹兴启, 等. 应用高效体积排阻色谱偶联多角度激光散射鉴定猪圆环病毒 2 型灭活疫苗及病毒样颗粒疫苗抗原[J]. 生物工程学报, 2022, 38(8) :2948 – 2958.

Xu Y, Yang Y L, Zou X Q, *et al.* Characterization of the antigens in inactivated porcine circovirus type 2 vaccines and virus – like particle vaccines by high – performance size – exclusion chromatography coupled with multi – angle laser light scattering[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(8) : 2948 – 2958.

(编 辑:李文平)