

猪圆环病毒 3c 型(HK 株)分离鉴定与遗传进化分析

严伟东^{1,3#}, 陈燕虹^{2,3#}, 李文杰², 李畅⁴, 李文涛^{2,3*}, 何启盖^{2,3*}

1 武汉科前生物股份有限公司, 湖北 武汉

2 华中农业大学 动物科技学院 动物医学院, 湖北 武汉

3 华中农业大学, 农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室, 湖北 武汉

4 湖北省农业科学院畜牧兽医研究所, 畜禽病原微生物学湖北省重点实验室, 湖北 武汉

严伟东, 陈燕虹, 李文杰, 李畅, 李文涛, 何启盖. 猪圆环病毒 3c 型(HK 株)分离鉴定与遗传进化分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(10): 4406-4419.

YAN Weidong, CHEN Yanhong, LI Wenjie, LI Chang, LI Wentao, HE Qigai. Isolation, identification, and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 3c (HK strain)[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(10): 4406-4419.

摘要:【目的】猪圆环病毒 3 型(porcine circovirus type 3, PCV3)与母猪繁殖障碍、仔猪皮炎及心肌炎等疾病的发生密切相关。病毒在细胞上难以稳定传代, 阻碍了 PCV3 动物感染模型的构建及其致病性的研究。【方法】利用 PCV3 阳性断奶仔猪的淋巴结病料接种 PK-15 细胞进行病毒分离, 通过 PCR、间接免疫荧光试验和透射电镜观察等方法对毒株进行鉴定, 成功分离到一株 PCV3 毒株(PCV3-HK 株), 并测定了该毒株的全基因组。使用毒价为 $10^{6.4}$ TCID₅₀/mL 的第 15 代病毒细胞培养物在接种 21 日龄未断奶仔猪, 通过临床症状、体重变化、排毒情况和病理变化等评价该毒株的致病性。【结果】病毒分离鉴定结果表明, PCV3-HK 株基因组全长 2 000 bp, 属于 PCV3c 基因亚型, 病毒粒子为圆球形、无囊膜、直径约 15-20 nm 的颗粒, 能够与 PCV3 Cap 蛋白单克隆抗体发生特异性反应; 仔猪感染试验结果显示, PCV3-HK 株感染猪出现皮炎、增重缓慢甚至消瘦等症状, 以及淋巴结水肿、间质性肺炎等剖检变化; 在感染的第 7-21 天, 口拭子和肛拭子中均可检测到病毒核酸, 并出现病毒血症。该病毒感染仔猪的心、肺、肾和淋巴结等器官, 尤其在肾脏和淋巴结中观察到炎性细胞浸润、坏死细胞聚集等病理变化。【结论】本研究分离到一株 PCV3c 毒株, 建立了仔猪感染模型, 为 PCV3 致病机制研究和疫苗研发提供了关键材料。

关键词: PCV3; 分离鉴定; 透射电镜; 临床症状; 病理变化

资助项目: 国家自然科学基金(32302866)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32302866).

#These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: LI Wentao, wentao@mail.hzau.edu.cn; HE Qigai, he628@mail.hzau.edu.cn

Received: 2025-02-27; Accepted: 2025-05-06; Published online: 2025-07-16

Isolation, identification, and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 3c (HK strain)

YAN Weidong^{1,3#}, CHEN Yanhong^{2,3#}, LI Wenjie², LI Chang⁴, LI Wentao^{2,3*}, HE Qigai^{2,3*}

1 Wuhan Keqian Biology Co., Ltd., Wuhan, Hubei, China

2 College of Animal Science and Technology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China

3 National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China

4 Hubei Provincial Key Laboratory of Animal Pathogenic Microbiology, Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan, Hubei, China

Abstract: [Objective] Porcine circovirus type 3 (PCV3) is associated with the development of reproductive disorders in sows, piglet dermatitis, and myocarditis. However, due to the difficulty in stably passing PCV3 *in vitro*, the animal infection model construction and specific pathogenicity of PCV3 remain to be investigated. This study aims to solve the above problems. [Methods] A PCV3 strain (PCV3-HK) was successfully isolated by inoculating PK-15 cells with lymph node samples from PCV3-positive weaned piglets. The strain was identified using PCR, indirect immunofluorescence assay, and transmission electron microscopy, and its complete genome was sequenced. The whole genome of the strain was sequenced. The pathogenicity of the strain was evaluated based on the clinical symptoms, body weight changes, virus excretion, and pathological changes of 21-day-old non-weaned piglets after inoculation with the 15th-passage viral cell culture at a dose of $10^{6.4}$ TCID₅₀/mL. [Results] PCV3-HK had a genome length of 2 000 bp and belonged to PCV3c subtype. The viral particles were spherical, non-enveloped, about 15–20 nm in diameter, and capable of reacting specifically with the monoclonal antibody against PCV3 Cap protein. The results of infection in piglets showed that the PCV3-HK infected pigs developed obvious symptoms such as dermatitis, slow weight gain and even wasting, as well as anatomical changes such as lymph node edema and interstitial pneumonia. The viral nucleic acid was detected in oral swabs and anal swabs on day 7–21 post infection, and viremia was observed. The virus infected multiple organs, including the heart, lungs, kidneys, and lymph nodes. Notably, inflammatory cell infiltration and aggregation of necrotic cells were observed in the kidneys and lymph nodes. [Conclusion] We isolate a PCV3 strain with classical circovirus morphology and establish a piglet infection model, which provides key materials for pathogenic mechanism study and vaccine development regarding PCV3.

Keywords: PCV3; isolation and identification; transmission electron microscopy; clinical symptom; pathological changes

猪圆环病毒(porcine circovirus, PCV)长期危害养猪业健康发展, 2016年以来出现的PCV3对全球猪业构成巨大威胁^[1-2]。目前已知PCV有

4种基因型: PCV1、PCV2、PCV3和PCV4。其中PCV1被认为对猪无致病性^[3], 可在猪肾细胞(PK-15)中增殖^[4]; PCV2则是猪圆环病毒相关

性疾病 (porcine circovirus-associated disease, PCVAD) 的主要病原, 可引起断奶后多系统衰竭综合征 (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 及猪皮炎和肾病综合征 (porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS) [5], 给全球养猪业造成严重经济损失 [6]。2016 年, Phan 等利用宏基因组技术从 PDNS 及繁殖障碍母猪的流产胎儿组织中鉴定出 PCV3 [7], 随后该病在全球主要的猪国家相继报道 [8-15]。

PCV3 在首次被报道前已在猪群中传播数十年 [6-8, 13]。随着 PCV3 特异性检测方法的快速发展, 在木乃伊胎儿、心肌炎死胎、脑炎或心肌炎的围产期母猪以及动脉周围炎生长猪中均检测到 PCV3。在临床表现上, PCV3 是 PDNS、繁殖障碍、多系统功能障碍的主要原因 [15-18], 并常与繁殖障碍、腹泻、呼吸系统及神经系统疾病并发 [19-21]。2019 年, Jiang 等 [22] 利用感染性克隆拯救 PCV3, 动物实验表明 4 周龄仔猪感染后死亡率高达 40%, 8 周龄仔猪出现 PDNS; PCV3 可在不同的组织和器官引发炎性病变, 导致淋巴细胞发育异常和坏死, 破坏免疫系统。研究还发现, PCV3 Cap 蛋白通过 Ras GTP 酶激活蛋白结合蛋白 1 (ras GTPase-activating protein-binding protein 1, G3BP1) 与信号转导和转录激活因子 2 (signal transducer and activator of transcription 2, STAT2) 相互作用, 抑制 IFN- β 介导的先天免疫, 造成免疫抑制 [23], 进而增加其他病原感染风险, 影响生长性能, 提高病率和死亡率。此外, 犬体内也检出 PCV3 核酸 [24]。全球范围针对 PCV3 分子特征和流行情况等方面的报道显示, PCV3 感染呈逐渐上升趋势。构建 PCV3 动物感染模型、阐明其致病性, 对疫病防控至关重要。分离并体外培养流行毒株是防控疾病和研发疫苗的基础, 然而 PCV3 细胞分离效率低、难以稳定培养制约了感染模型构建, 尤其 PCV3c 亚型在断奶仔猪中的感染模型迄今未见报道。

本研究在流行病学调查基础上对 PCV3 进行

分离鉴定, 采用 PCV3-HK 株细胞培养物经肌肉内注射和滴鼻途径感染仔猪, 通过临床症状与病理检查评估其致病性。本研究为阐明 PCV3 致病机制及疫苗研制提供重要依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 病料

病料采集自 2019 年河南省某规模化猪场发病断奶仔猪, 临床表现为体温升高、进行性消瘦、皮肤苍白、呼吸困难、厌食、精神沉郁和体表淋巴结肿大; 剖检见全身淋巴结异常肿大、肺脏萎缩不全、肾脏水肿等。荧光定量 PCR 检测 PCV2 阴性、PCV3 阳性, 采集肺脏、肾脏、肠道和淋巴结等组织, 置 -80°C 保存备用。

1.1.2 细胞

PK-15 细胞 (无 PCV1、PCV2、PCV3 污染) 购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。

1.1.3 主要试剂

Premix *Ex Taq*TM (Perfect Real Time)、蛋白酶 K、DL2000 DNA marker、*rTaq* DNA 聚合酶、dNTPs、荧光定量 PCR 试剂盒, 宝生物工程 (大连) 有限公司; Hank's 液, 上海捷瑞生物工程有限公司; 胰酶, Difco 公司; D-氨基葡萄糖 (D-glucosamine)、DNA 模板提取试剂, Sigma-Aldrich 公司; 荧光抗体 FITC-羊抗猪 IgG, 上海晶美生物技术有限公司; PCV3-Cap 蛋白特异性单克隆抗体由本实验室制备并保存; DMEM 培养基, Gibco 公司; 胎牛血清, 翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司。

1.2 病料处理

无菌采集病猪组织, 以无菌生理盐水冲洗 3 次, 于研磨器中加入 DMEM 制成 10% 组织悬液, 反复冻融 3 次, 5 000 r/min 离心 25 min 后取上清, 经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌, 置 -80°C 保存备用。

1.3 引物设计与合成

根据 NCBI PCV3/CH/HB/XY/2018 (GenBank 登录号为 MH607133.1)参考序列设计病毒检测、全基因组测序及 TaqMan 荧光定量 PCR 引物(表 1), 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 病料组织 DNA 提取及 PCR 检测

取 900 μL 待检样品于 2 mL 离心管, 加入 300 μL 消化液(255 μL TNE; 15 μL 10% SDS; 30 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K), 56 °C 水浴 3 h; 以等体积苯酚:氯仿:异丙醇(25:24:1, 体积比)抽提 3 次, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 加 2 倍体积无水乙醇-20 °C 沉淀 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 去上清; 加 75% 乙醇重悬, 7 500 r/min 离心 10 min, 干燥后以 50 μL TE 溶解, 加 RNA 酶 37 °C 消化 30 min, 置-20 °C 保存。

PCR 扩增体系: DNA 模板 3 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 10×Buffer 5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL, 双蒸水 35 μL, Taq 酶 (5 U/μL) 1 μL。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 60 s, 55 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 共 30 个循环; 72 °C 终延伸 8 min。PCR 产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 病毒分离

经 PCR 检测阳性病料制成悬液, 以 10% 同步接种新鲜消化的 PK-15 细胞, 37 °C 培养 24 h;

细胞单层形成后, 按 Tischer 等^[25]方法加入 300 mmol/L D-氨基葡萄糖处理, 37 °C 培养 30 min, 弃去 D-氨基葡萄糖, 加入含 2% 新生牛血清的 DMEM 继续培养 48 h, 收获病毒液, -20 °C 暂存(长期-80 °C)。

1.6 间接免疫荧光试验 (immunofluorescence assay, IFA)

将病毒悬液与 PK-15 细胞混匀, 接种 96 孔板(100 μL/孔), 37 °C 培养 24 h; 以 300 mmol/L D-氨基葡萄糖孵育 30 min, pH 7.4 的 10 mmol/L 无菌 PBS 洗涤 2 次, 换维持液继续培养, 设无病毒对照。培养 48 h 后弃去细胞维持液, PBS 洗涤, 冷无水乙醇固定 30 min, 晾干。将已固定的 96 孔板用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 自然干燥。向试验孔和对照孔中均分别滴加 100 μL PCV3-Cap 蛋白单克隆抗体(0.1 μg/mL), 37 °C 作用 1 h, PBS 洗涤 3 次(5 min/次)。向感染孔和对照孔中均滴加用 PBS 作 1:50 倍稀释 FITC-羊抗鼠 IgG, 50 μL/孔, 37 °C 作用 30 min, PBS 洗涤 3 次, 利用倒置荧光显微镜观察。

1.7 病毒电镜观察

PCV3 感染 PK-15 细胞 48 h 后反复冻融 3 次, 加 30% 蔗糖垫, 30 000 r/min 超速离心 2 h; 弃去上清, PBS 重悬, 再次超速离心洗去蔗糖。沉淀以等体积 PBS 稀释, 滴加于覆膜铜网,

表1 PCV3检测、全基因组测序及荧光定量PCR引物

Table 1 Primers for PCV3 detection, genome sequencing and qPCR primers

实验目的 Objective	引物名称 Primers name	引物序列 Primer sequences (5'-3')	产物长度 Product length (bp)
病毒检测 Virus detection	PCV3-F	TTAGAGAACGGACTTGTAACGAATCCA	645
	PCV3-R	ATGAGACACAGAGCTATATTCAGAAGAAGAC	
全基因组扩增 Whole genome amplification	PCV3-F1	TAGTATTACCCGGCACCTCGGAACC	1 257
	PCV3-R1	ACAGGTAAACGCCCTCGCATGTGGG	
	PCV3-F2	TTGCACTTGTGTACAATTATTGCG	1 075
	PCV3-R2	ATCTTCAGGACACTCGTAGCACCAC	
PCV3 定量 PCR 检测 Quantitative PCR detection of PCV3	PCV3-qF	TAAACGAATGGGAAACTGCC	179
	PCV3-qR	TTCCGCATAAGGGTCGTCT	
	PCV3-Probe	CACTCAGCCCTGTAAT	

5 min 后吸去多余液体，室温风干；以 2% 磷钨酸(pH 7.2)负染 2 min，滤纸吸去染色液，室温干燥，200 kV 透射电镜观察。

1.8 PCV3-HK 株遗传演化分析

测序获得 ORF2 序列后，利用 MEGA X 与 GenBank PCV3 参考序列比对同源性，并以最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统发育树，bootstrap 1 000 次检验节点可靠性。PCV3 参考毒株信息见表 2。

1.9 人工感染动物模型构建

购入 15 头 21 日龄 PCV1/2/3 抗原及抗体阴性仔猪，随机分为肌注组、肌注+滴鼻组和对照组，每组 5 头。取第 15 代病毒细胞培养物 ($10^{6.4}$ TCID₅₀/mL)用于感染。肌注组每头仔猪头颈部肌注 5 mL；肌注+滴鼻组每头滴鼻及肌注各 2.5 mL；对照组每头滴鼻及肌注无菌 PBS 2.5 mL，所有实验动物均在隔离条件下饲养。于 0、7、14、21 d 采血、测体重、记录体温及临

表2 PCV3参考毒株信息

Table 2 Information of PCV3 reference strains

GenBank 登录号 GenBank accession number	来源 Origins	毒株名称 Strain name	分离年 Separatist year	基因亚型 Genotype
NC031753	美国 USA	29160/2018/PCV3a	2018	PCV3a
MN698795	韩国 Korea	K-2010-1/2010/PCV3a	2010	PCV3a
KY996338	韩国 Korea	KU-1602/2016/PCV3a	2016	PCV3a
MF611876	韩国 Korea	1701/2016/PCV3a	2016	PCV3a
MN725087	马来西亚 Malaysia	KG194L/UPM/MY015/2020/PCV3a	2020	PCV3a
MH603543	美国 USA	KSU-IA-2017-PCV3-27/2016/PCV3a	2016	PCV3a
MG870103	中国 China	PCV3-China/JL17-45/2018/PCV3a	2018	PCV3a
MW167063	西班牙 Spain	PCV3-52/2020/PCV3a	2020	PCV3a
OQ469802	中国 China	SDAU-HZ/2023/PCV3a	2023	PCV3a
MF769805	中国 China	Pig/CN/Hebei/2017/PCV3a	2017	PCV3a
MF589107	中国 China	CN/Jiangxi-B1/2017/PCV3a	2018	PCV3a
MZ890322	加拿大 Canada	70-0004/2021/ON/2023/PCV3a	2023	PCV3a
MG372483	中国 China	CN/Heilongjiang/2017/PCV3a	2017	PCV3a
KY421347	中国 China	CHN/GD/2016/PCV3a	2016	PCV3a
MG727539	中国 China	PCV3/CH/HB/CZ-1/2017/PCV3a	2017	PCV3a
MF084994	中国 China	CN/Anhui-14/2016/PCV3a	2016	PCV3a
MF162298	意大利 Italy	IT/CO/2017/PCV3c	2017	PCV3c
MF069116	中国 China	CN/GDHE2/2016/PCV3c	2016	PCV3c
MG250179	中国 China	GXNN2016-4/2016/PCV3c	2016	PCV3c
MF677835	中国 China	JX-1/CH/2016/PCV3c	2016	PCV3c
OP948027	中国 China	CN-LuZhou/2023/PCV3c	2023	PCV3c
MG868941	中国 China	HBWH-201703/2017/PCV3c	2017	PCV3c
MK580468	中国 China	CN-Nanjing/2017/PCV3c	2017	PCV3c
MG250176	中国 China	GXYL2009-1/2017/PCV3c	2017	PCV3c
MH491016	中国 China	GDDH1/2018/PCV3c	2018	PCV3c
MG372488	中国 China	CN/Hunan/2/2006/PCV3b	2006	PCV3b
MG372490	中国 China	CN/Hunan/1/2006/PCV3b	2006	PCV3b

床表现。感染第 28 日称量、采血、测病毒血症后剖杀, 取肾脏、肺脏、脾脏及淋巴结, 4% 多聚甲醛固定, 制成病理切片后通过 HE 染色观察。本研究的动物实验经武汉科前生物股份有限公司实验动物福利伦理委员会批准, 编号为 SOR-AR-002。

2 结果与分析

2.1 PCV3 分离结果

以临床病料核酸为模板, 用引物 PCV3-F/R 进行 PCR, 扩增出约 645 bp 的 PCV3-ORF2 特异性片段, 测序证实病料为 PCV3 阳性。如图 1 所示, 泳道 1-10 分别对应不同猪场及不同组织的病料。第 9 号样本 HK-淋巴结条带最清晰, 提示病毒载量最高, 因此选该样本进行后续病毒分离。

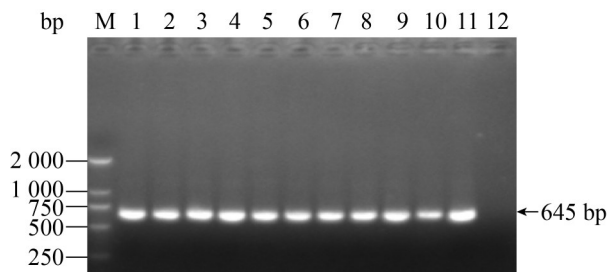


图 1 临床病料的 PCV3 PCR 鉴定。泳道 M: DL2000 DNA 相对分子质量标准; 泳道 1: XS-肺; 泳道 2: XS-肾; 泳道 3: AL-肺; 泳道 4: AL-肾; 泳道 5: AL-肺; 泳道 6: SX-肺; 泳道 7: XS-肾; 泳道 8: XS-肠; 泳道 9: HK-淋巴结; 泳道 10: SX-肺; 泳道 11: PCV3 阳性核酸对照; 泳道 12: 阴性对照。

Figure 1 PCR Identification of PCV3 in clinical samples. Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1: XS-Lung; Lane 2: XS-Kidney; Lane 3: AL-Lung; Lane 4: AL-Kidney; Lane 5: AL-Lung; Lane 6: SX-Lung; Lane 7: XS-Kidney; Lane 8: XS-Intestine; Lane 9: HK-Lymphatic node; Lane 10: SX-Lung; Lane 11: PCV3 positive nucleic acid control; Lane 12: Negative control.

2.2 PCV3-HK 株间接免疫荧光鉴定

取阳性病料 HK-淋巴结, 经处理的上清液接种 PK-15 细胞, 传至第 3 代后以 MOI=0.01 接种 PK-15 细胞, 37 °C 培养 48 h, 间接免疫荧光检测显示, 用 PCV3-Cap 蛋白单克隆抗体呈阳性, 感染细胞内可见特异性绿色荧光, 细胞对照无荧光(图 2)。

2.3 透射电镜结果

PCV3-HK 株经蔗糖梯度超速离心浓缩富集后, 磷钨酸负染, 电镜下可见病毒颗粒聚集, 呈圆形、无囊膜, 直径为 15-20 nm (图 3)。

2.4 PCV3-HK 株基因同源性及遗传进化分析

2.4.1 全基因组核苷酸同源性比对

以 PCV3-HK 株 DNA 为模板, 用引物 PCV3-F1/R1 和 PCV3-F2/R2 进行全基因组 PCR 扩增, 送武汉擎科生物科技有限公司测序。拼接完整序列上传至 NCBI GenBank (登录号为 MW767462), 命名为 PCV3-HK。MegAlign 分析显示, PCV3-HK 株与参考毒株全基因组核苷酸一致性为 86.0%-99.3% (图 4)。

2.4.2 PCV3-HK 株 ORF2 基因的系统发育分析

以最大似然法构建 ORF2 基因系统发育树, 结果显示 PCV3-HK 与 HBWH-201703、JX-1/CH 位于同一分支上, 具有较近的亲缘关系, 归为 PCV3c 亚型(图 5)。

2.5 动物实验

2.5.1 临床症状

感染组仔猪出现出被毛粗乱、消瘦、皮肤苍白、皮炎等症状; 剖检见腹股沟淋巴结水肿明显, 肺部有炎症和肿胀、呈弥漫性病变(图 6A)。对照组腹股沟淋巴结大小正常, 肺脏无异常(图 6B)。

2.5.2 感染仔猪的体重变化

在感染后每 7 d 称重并记录。结果显示(图 7),

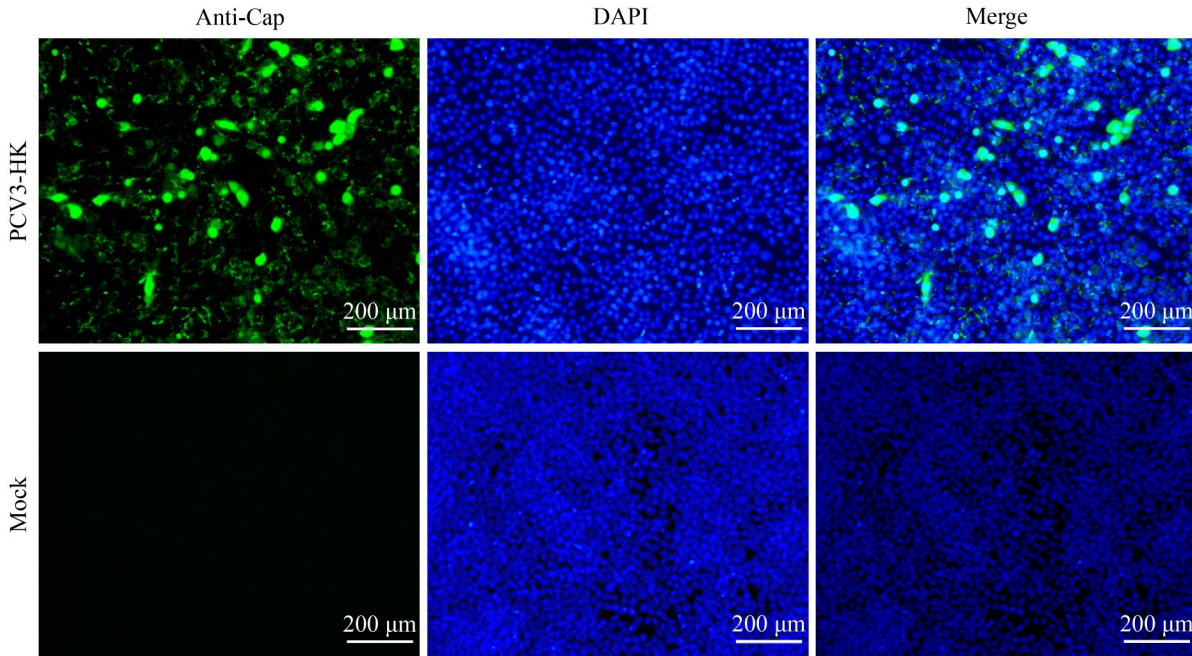


图2 PCV3-HK株间接免疫荧光鉴定

Figure 2 Identification of PCV3-HK by indirect immunofluorescence assay.

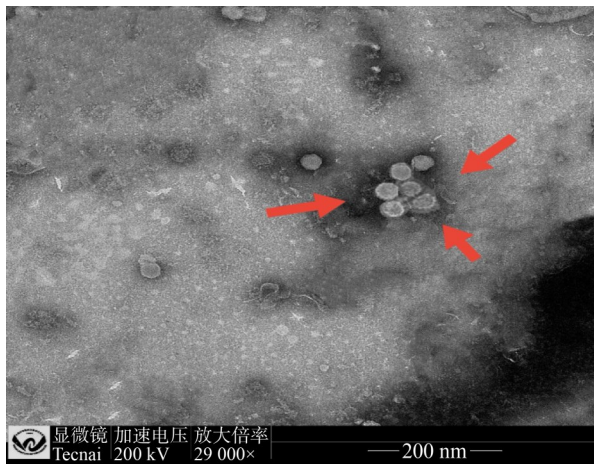


图3 PCV3-HK株透射电镜观察

Figure 3 Transmission electron microscopy observation of PCV3-HK.

对照组仔猪体重增加最快，肌注+滴鼻组次之，肌注组增重最少；在7 d时，肌注组(蓝线)与肌注+滴鼻组(红线)的体重增幅无明显差异，但在14 d和21 d时，肌注组仔猪体重明显低于肌注、滴鼻混合感染组仔猪。

2.5.3 感染仔猪的排毒变化

为了解 PCV3-HK 株在感染仔猪的排毒情况，将0、7、14、21 d采集的口拭子、肛拭子及血清进行荧光定量 PCR 检测。结果显示，肌注组和肌注+滴鼻混合感染组在第7天和第14天均可在口拭子、肛拭子以及血清中检测到 PCV3 病毒核酸，且两组同一时间点的病毒载量相近，但在第21天所有样品荧光定量 PCR 检测结果显示阴性。对照组仔猪样品试验期间均未检测到 PCV3-HK 株病毒核酸。

对感染后不同时间的血清样品进行检测，结果显示第一组 PCV3 肌注攻毒组和第二组 PCV3 肌注+滴鼻攻毒组在第7天开始出现病毒血症，可持续感染到第14天，但是在第21天的血清样品中未检测到核酸，病毒血症完全消失，而对照组仔猪试验期间均未出现病毒血症(图8)。

2.5.4 组织病理切片观察

将采集的组织样品进行 HE 染色，观察发现感染组的组织病理变化主要发生在心脏、肺脏、

Percent identity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28		
Divergence	1	97.7	91.0	90.9	91.7	91.8	91.0	90.9	90.9	91.7	92.4	90.9	91.1	92.2	90.3	28.8	91.1	91.9	28.6	91.0	28.7	28.4	91.8	91.2	91.2	91.0	91.3	90.9	1	MG372490-PCV3b
	2	2.3	90.7	90.7	91.4	91.5	90.7	90.7	90.6	91.4	92.0	90.6	90.8	91.9	89.9	28.4	90.8	91.6	28.4	90.7	28.5	28.3	91.4	90.9	90.9	90.7	91.0	90.5	2	MG372488-PCV3b
	3	8.8	9.1	99.8	99.1	98.9	99.6	99.7	100.0	99.2	98.2	99.3	99.2	98.7	97.2	31.7	99.5	98.8	32.3	99.4	32.1	32.0	98.8	99.4	99.5	99.5	99.3	99.2	3	MH491016-PCV3c
	4	8.9	9.1	0.2	98.9	98.7	99.4	99.7	99.8	99.0	98.0	99.1	99.0	98.5	97.0	31.7	99.3	98.6	32.2	99.2	32.0	32.0	98.6	99.2	99.3	99.3	99.1	99.0	4	MG250176-PCV3c
	5	8.7	9.1	0.2	0.4	99.7	98.9	98.8	99.1	99.8	99.1	98.8	98.7	99.6	97.9	31.8	99.0	99.6	32.3	98.9	32.1	32.1	99.7	98.9	99.0	99.0	98.8	98.6	5	MK580468-PCV3c
	6	8.6	8.9	0.4	0.6	0.4	99.1	98.7	98.9	99.7	98.8	98.5	98.3	99.2	97.7	31.6	98.7	99.3	32.1	98.5	31.9	31.9	99.3	98.5	98.6	98.7	98.5	98.9	6	MG868941-PCV3c
	7	8.7	9.1	0.5	0.7	0.5	0.2	99.3	99.5	98.9	98.0	99.1	98.9	98.4	97.0	31.6	99.3	98.5	32.2	99.1	32.0	31.9	98.5	99.1	99.2	99.3	99.1	99.4	7	MF677835-PCV3c
	8	8.9	9.1	0.3	0.3	0.5	0.6	0.8	99.7	98.9	97.9	99.0	98.9	98.4	96.9	31.7	99.2	98.5	32.2	99.1	32.0	32.0	98.5	99.1	99.2	99.2	99.0	99.0	8	MG250179-PCV3c
	9	8.9	9.2	0.1	0.3	0.3	0.5	0.5	0.4	99.1	98.2	99.3	99.1	98.6	97.2	31.7	99.5	98.8	32.2	99.3	32.0	32.0	98.7	99.3	99.4	99.5	99.3	99.2	9	MF069116-PCV3c
	10	8.8	9.1	0.2	0.4	0.2	0.4	0.5	0.2	98.9	98.6	98.5	99.4	98.0	31.7	98.8	99.4	32.3	98.7	32.1	32.0	99.5	98.7	98.8	98.8	98.6	98.6	10	MF162298-PCV3c	
	11	8.0	8.4	1.1	1.3	0.9	1.3	1.4	1.4	1.2	1.1	97.9	97.9	99.1	97.0	31.5	98.2	99.2	31.9	98.2	31.8	31.5	98.9	98.6	98.7	98.1	98.5	97.7	11	MF084994-PCV3a
	12	8.9	9.2	0.7	0.9	0.5	0.9	1.0	1.0	0.8	0.7	1.4	99.2	98.4	96.7	31.7	99.3	98.4	32.3	99.2	32.0	32.1	98.7	99.1	99.2	99.6	99.0	98.8	12	MG727539-PCV3a
	13	8.7	9.0	0.9	1.1	0.7	1.0	1.1	1.2	0.9	0.9	1.5	0.9	98.3	96.5	31.7	99.3	98.4	32.2	99.1	31.9	32.0	98.6	99.0	99.1	99.4	99.0	98.6	13	KY421347-PCV3a
	14	8.2	8.5	0.7	0.9	0.5	0.8	0.9	1.0	0.7	0.7	1.0	1.0	97.5	97.5	31.7	98.7	99.5	32.2	98.6	32.1	31.9	99.3	98.8	98.9	98.6	98.9	98.1	14	MG372483-PCV3a
	15	10.2	10.7	2.1	2.3	2.1	2.3	2.3	2.4	2.1	2.0	3.0	2.6	2.8	2.5	30.8	96.9	97.5	31.2	96.7	31.0	31.0	97.5	98.7	98.8	98.9	98.7	98.6	15	OP948027-PCV3c
	16	12.7	14.1	2.5	2.7	2.4	3.0	2.8	2.7	2.7	2.5	3.3	2.5	2.5	2.5	5.6	31.8	31.7	99.3	31.7	99.0	99.0	31.6	31.7	31.6	31.8	31.5	31.4	16	MZ890322-PCV3a
	17	8.6	9.0	0.5	0.7	0.3	0.7	0.8	0.8	0.6	0.5	1.1	0.7	0.8	0.7	2.4	2.2	98.7	32.3	99.5	32.1	32.0	98.9	99.4	99.5	99.5	99.3	99.0	17	MH607133-PCV3a
	18	8.5	8.9	0.5	0.7	0.4	0.8	0.9	0.8	0.6	0.6	0.8	0.9	1.0	0.6	2.5	2.5	0.6	32.2	98.6	32.0	31.9	99.4	99.0	99.1	98.6	98.9	98.2	18	MF769805-PCV3a
	19	13.5	14.1	0.8	0.9	0.6	1.3	1.1	0.9	0.9	0.8	2.0	0.8	1.1	0.9	4.1	2.4	0.6	0.9	32.2	99.5	99.5	32.3	32.2	32.1	32.3	32.0	31.9	19	OQ469802-PCV3a
	20	8.8	9.1	0.7	0.9	0.5	0.8	0.9	1.0	0.7	0.7	1.2	0.9	0.9	0.7	2.6	2.7	0.6	0.8	1.1	32.3	31.9	98.8	99.3	99.4	99.4	99.3	98.8	20	MW167063-PCV3a
	21	12.9	13.9	1.4	1.6	1.3	1.9	1.7	1.6	1.6	1.4	2.4	1.7	2.0	1.3	4.8	3.2	1.3	1.6	1.6	0.8	99.2	32.0	32.1	32.1	32.0	32.0	31.7	21	MG870103-PCV3a
	22	14.0	14.6	1.6	1.7	1.4	2.0	1.9	1.7	1.7	1.6	3.2	1.3	1.6	2.0	5.0	3.2	1.7	2.0	1.7	1.9	2.7	31.9	31.8	31.8	32.2	31.7	31.7	22	MN725087-PCV3a
	23	8.7	9.1	0.6	0.8	0.4	0.7	0.8	0.9	0.6	0.6	1.2	0.7	0.7	0.7	2.5	2.8	0.5	0.7	0.8	0.5	1.7	1.9	98.6	98.7	98.9	98.6	98.2	23	MH603543-PCV3a
	24	8.5	8.9	0.7	0.9	0.5	0.8	0.9	1.0	0.7	0.7	0.8	1.0	1.0	0.5	2.6	2.7	0.7	0.4	1.1	0.7	1.4	2.2	0.7	99.8	99.3	99.7	98.9	24	MF611876-PCV3a
	25	8.6	8.9	0.6	0.8	0.4	0.7	0.8	0.9	0.6	0.6	0.7	0.9	0.9	0.4	2.5	2.8	0.6	0.3	1.3	0.6	1.3	2.4	0.6	0.2	99.4	99.9	98.9	25	KY996338-PCV3a
	26	8.8	9.2	0.5	0.7	0.3	0.7	0.8	0.8	0.6	0.5	1.2	0.4	0.7	0.8	2.4	2.4	0.5	0.7	0.6	0.7	1.6	1.1	0.5	0.8	0.7	99.2	99.0	26	MN698795-PCV3a
	27	8.4	8.8	0.7	0.9	0.5	0.9	1.0	1.0	0.8	0.7	0.8	1.0	1.1	0.5	2.7	3.2	0.7	0.4	1.6	0.8	1.6	2.7	0.8	0.4	0.2	0.8	98.8	27	NC031753-PCV3a
	28	8.9	9.3	0.8	1.0	0.8	0.4	0.6	1.0	0.9	0.8	1.7	1.3	1.4	1.2	2.7	3.7	1.1	1.2	1.9	1.2	2.5	2.7	1.1	1.1	1.1	1.3	98.8	28	MW767462-PCV3-HK-PCV3c

图4 PCV3-HK株全基因组核苷酸同源性比对

Figure 4 PCV3-HK strain whole genome nucleotide homology comparison.

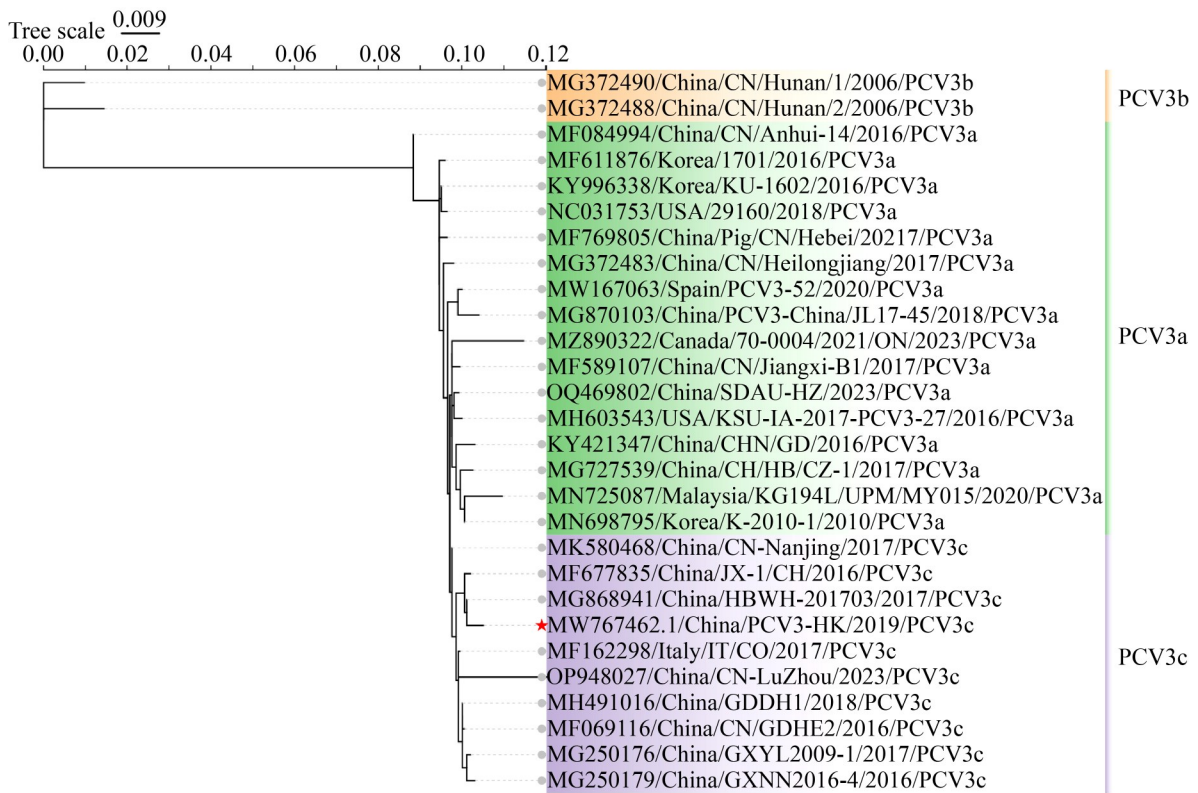


图5 PCV3-HK株的ORF2基因系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of the full-length PCV3-HK strain ORF2 gene.

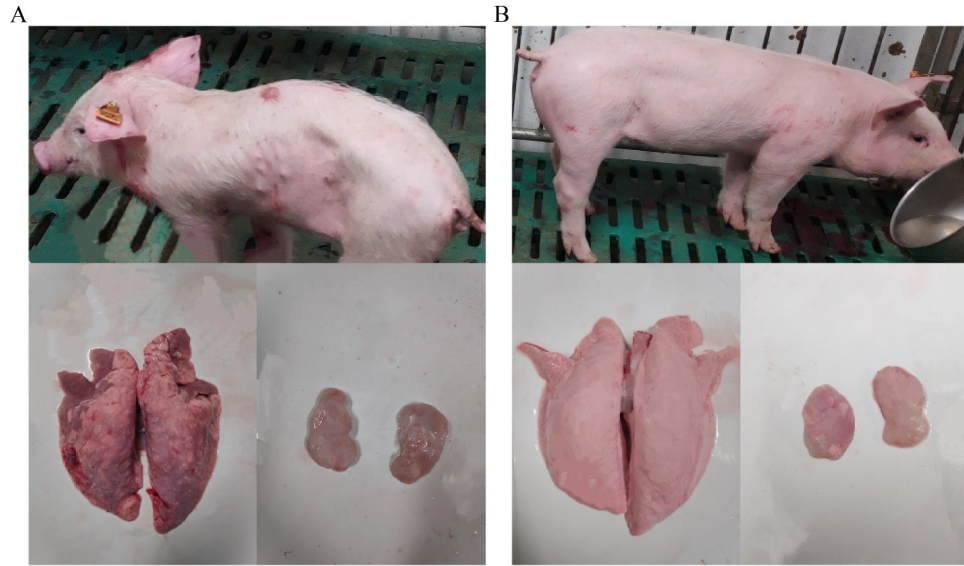


图6 PCV3-HK株动物实验临床症状及剖检观察。A: 感染组; B: 对照组。

Figure 6 Clinical and necropsy observations of PCV3-HK-infected piglets. A: PCV3-HK infected group; B: Blank control group.

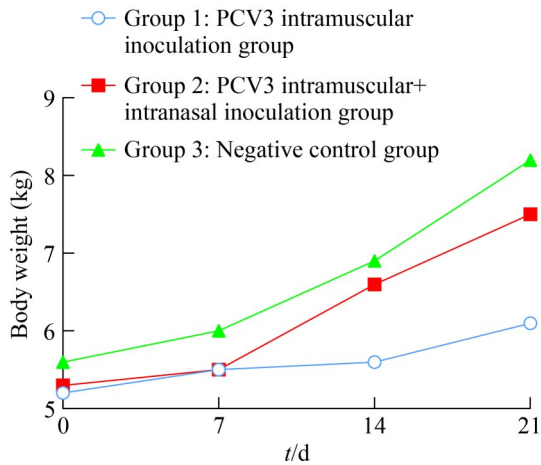


图7 PCV3-HK株感染仔猪体重变化

Figure 7 Variation in body weight of PCV3-HK-infected piglets.

肾脏及腹股沟淋巴结等组织。感染组心脏出现间质性心肌炎、浆膜疏松、心内膜下及心肌间大量的单核淋巴细胞浸润, 部分心肌细胞变性坏死; 肺部出现间质性肺炎, 肺泡壁明显增厚, 肺泡腔变小或消失, 部分出现肺泡腔内和细支气管周围可见变性坏死的嗜中性粒细胞, 部分

化脓性肺炎, 支气管管腔内均为脓液(变性坏死的嗜中性粒细胞), 肺泡壁上皮细胞肿胀, 变性坏死脱落入肺泡腔, 肺泡腔塌陷; 肾小球及肾小囊的壁层细胞增生导致肾小囊呈不规则形, 相邻的肾小管上皮增生, 病变肾小球逐渐被周围增生的结缔组织机化后消失, 偶见单核淋巴细胞浸润; 淋巴结被膜下轻微出血, 淋巴小结明显减小, 小结周围出现较多深染的坏死细胞聚集, 部分小结内巨噬细胞中疑似有核内嗜酸性包涵体。

对照组心脏心肌细胞结构正常, 未有炎症出现; 肺部肺泡壁略增厚, 肺泡腔大小正常; 肾脏组织结构较正常, 偶见单核淋巴细胞聚集的炎灶; 淋巴结组织结构清晰, 淋巴小结明显, 部分淋巴小结内的巨噬细胞中疑似有核内嗜酸性包涵体(图 9)。

3 讨论与结论

猪圆环病毒在体外增殖时通常不引起明显的细胞病变效应, 这为病毒分离和增殖带来一定难度。此前, Zhu 等^[26]发现 PK-15 细胞群体存

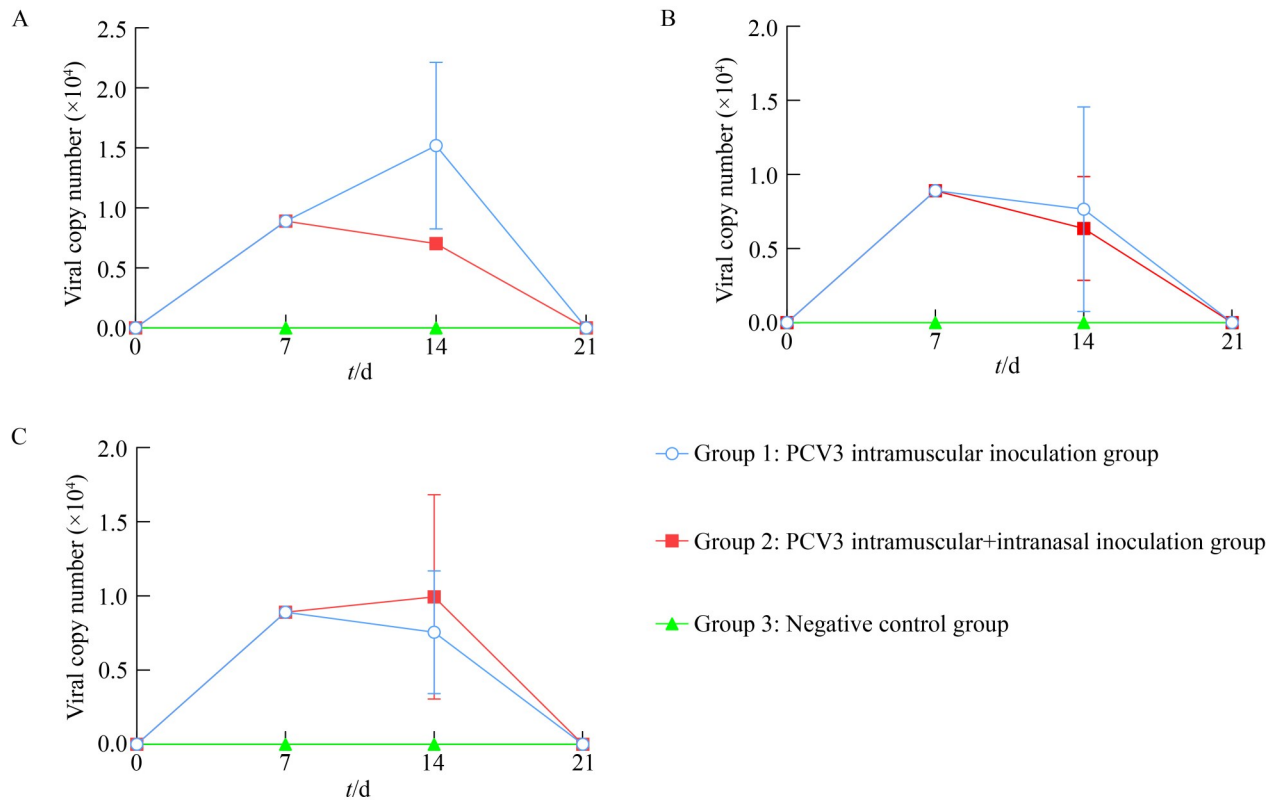


图8 PCV3-HK株感染仔猪不同时间口拭子、肛拭子和血清中的排毒情况。A: 口拭子样品; B: 肛拭子样品; C: 血清样品。

Figure 8 Viral shedding dynamics in oral swabs, rectal swabs, and serum of piglets infected with the PCV3-HK strain at different times. A: Oral swab samples; B: Rectal swab samples; C: Serum samples.

在异质性, 接种 PCV2 后仅约 20% 的细胞呈阳性, 导致病毒培养的滴度难以超过 10^5 TCID₅₀/mL。此外, 已有研究发现 PCV1 的胞内复制效率高于 PCV2, 而 PCV2 在 PK-15 细胞中的增殖效率高于 PCV3^[27]。

进一步研究发现, PCV3 的体外复制效果在有丝分裂活性的 PK-15 半融合单层细胞中更佳, 提示其复制过程可能依赖于宿主细胞处于 S 期时表达的特定因子, 与 PCV2 的复制机制具有相似性。在自然感染过程中, 病毒通常在细胞通过有丝分裂时才启动复制^[25]。另有研究报道使用 D-氨基葡萄糖处理被感染的细胞可显著提升 PCV2 的滴度^[13]。鉴于 PCV2 与 PCV3 的生物学特性存在一定相似性, 本研究在分离病毒和培养病毒时使用 D-氨基葡萄糖处理细胞, 并在细

胞处于有丝分裂的 S 期时与 PCV3 进行同步接种, 以提高 PCV3 的增殖效率。PCV3-HK 株的成功分离和体外培养是研究新型病毒及其致病机理、病毒与宿主相互作用的重要一步。本研究成功利用猪肾细胞(PK-15)分离获得了一株 PCV3c 分离株。

系统发育分析已被广泛应用于分析病毒的亲缘关系^[28-29]。本研究测定了所分离 PCV3 毒株的全基因组序列, 并与 GenBank 数据库中已报道的 PCV3 代表性毒株进行比对分析, 结果显示该毒株在全基因组核苷酸水平上与其他 PCV3 毒株具有高度同源性。序列分析和系统发育树构建结果表明, 本研究分离的毒株 PCV3c-HK 分离株属于 PCV3c 亚型。Fu 等^[30]研究指出, Cap 蛋白第 24 位和 27 位氨基酸的突变可能是区分

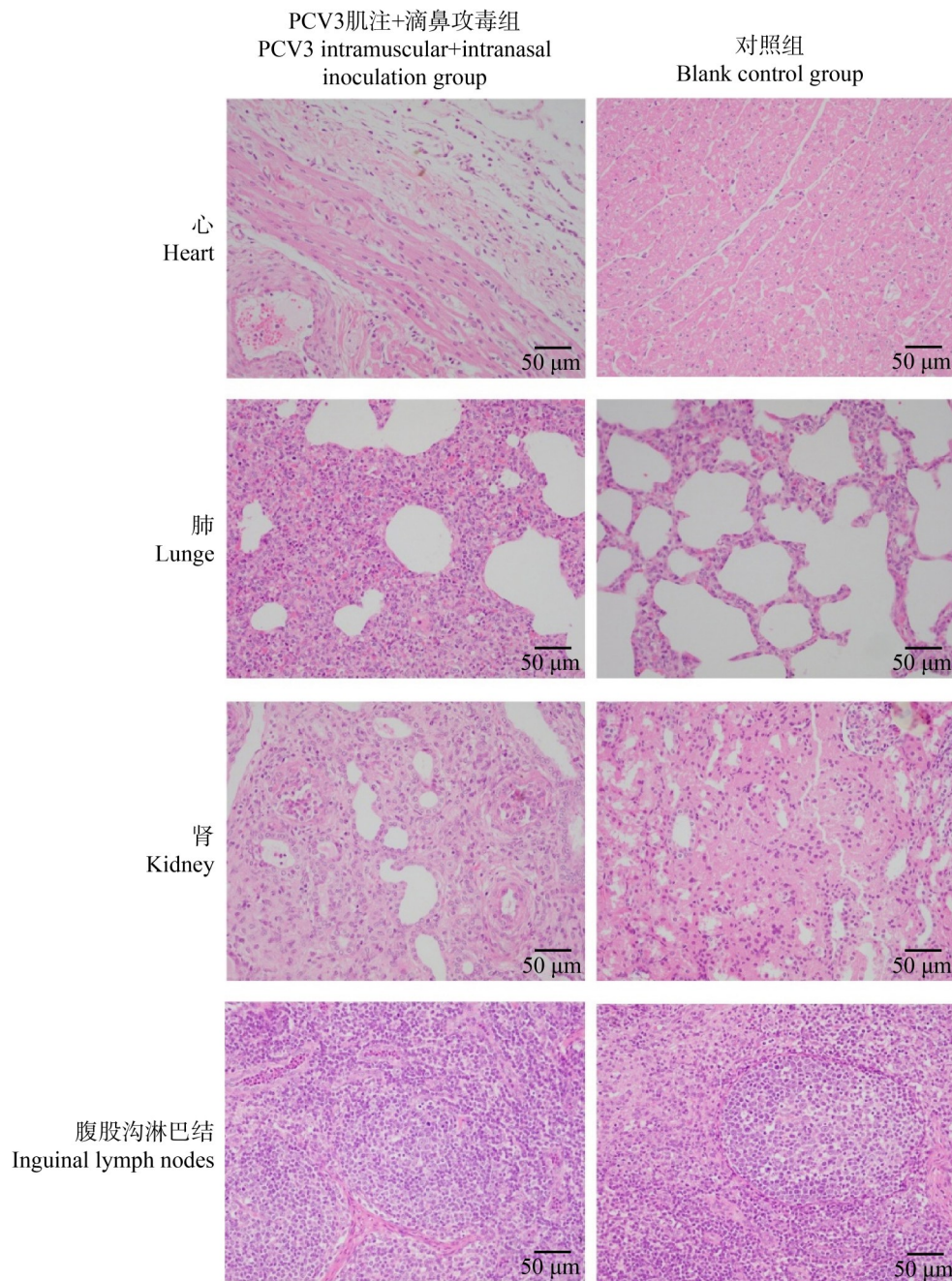


图9 PCV3-HK株感染仔猪病理变化(HE染色)

Figure 9 Pathological changes in PCV3-HK infected piglets (HE staining).

不同 PCV3 分支的潜在分子标记。本研究中 PCV3-HK 株分离株的 ORF2 比对结果显示, 该分离株在第 24 位为缬氨酸(V), 第 27 位为赖氨酸(K), 系统发育树分析将其归为 PCV3c 分支。本研究进一步证明了 Cap 蛋白 V24 和 K27 突变

可作为本研究分离株系统发育分类的分子标记。

PCV3 与繁殖障碍性疾病和多系统炎症似乎是密切相关的^[31-32]。自然感染条件下, 在保育猪和育肥猪中观察到以动脉血管周围炎为代表的典型病理变化^[33]。此外, 有研究利用反向

遗传学方法发现 PCV3 可通过激活缺氧诱导因子-1 (HIF-1)信号通路、糖酵解以及晚期糖基化终产物-受体(AGE/RAGE)信号通路引发炎症反应, 进一步阐明了 PCV3 诱导炎症的致病机制^[34]。

Mora-Díaz 等^[35]于 2020 年首次从围产期及生殖障碍相关病例中分离到 PCV3 病毒, 并在体外(PK-15 细胞)与体内(剖宫产不喂初乳仔猪, CD/CD 猪)系统构建了感染模型, 对病毒的复制特性和致病性进行了初步表征。结果显示, 感染的 8 头仔猪中有 4 头发生心肌炎和多系统血管周围炎。Kedkovid 等^[36]研究报道一例在泰国养殖场暴发的猪呼吸道疾病综合征(PRDC)中检出 PCV3 感染, 提示 PCV3 可广泛存在于生长猪群中, 并可能引发呼吸系统疾病。

此外, Gao 等^[37]研究表明某些病原体可在免疫刺激背景下加重疾病发生, 而免疫刺激也被认为是 PCV2 相关断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)发病机制中的关键因素之一。因此, PCV3 是否同样依赖免疫刺激发挥致病作用, 以及免疫状态与病变严重程度之间是否存在关联, 仍需进一步研究。目前 PCV3 感染的发病机制尚不清楚, PCV3 是否是导致多系统炎症的直接原因仍需在感染模型的基础上进行深入研究。

本研究在借鉴既有 PCV3 动物感染模型研究的基础上^[38]成功分离并获得一株具有感染性的 PCV3c 毒株(PCV3-HK)。该毒株经 PCR 和间接免疫荧光试验鉴定, 并通过透射电子显微镜观察其典型的病毒颗粒结构。利用该毒株, 第 15 代病毒液以肌肉注射和滴鼻联合方式感染 21 日龄仔猪, 显著提高了病毒的感染效率与体内复制能力。感染仔猪在第 7-14 天出现病毒血症并持续排毒, 表现出被毛粗乱、消瘦、皮炎等临床症状。组织病理学检查显示, 心、肺、肾、淋巴结等多个脏器发生炎症和坏死病变。口拭子和肛拭子检测证实病毒可经体外排出, 提示该毒株具有一定传播性。上述结果表明, 本研究不仅实现了 PCV3c 毒株的成功分离和表征, 还建

立了可复制典型临床表现的仔猪感染模型, 为深入研究 PCV3 的感染动态、致病机制及疫苗研发提供了关键实验基础。

作者贡献声明

严伟东: 病毒分离与感染模型构建, 数据收集与监管, 数据分析, 撰写文章; 陈燕虹: 数据采集, 数据分析, 撰写文章, 完成呈现; 李文杰: 文章修改; 李畅: 审阅文章; 李文涛: 实验设计, 数据分析, 审阅文章, 监督管理; 何启盖: 实验设计, 病理观察, 数据分析, 文章修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] FRANZO G, LEGNARDI M, TUCCIARONE CM, DRIGO M, KLAUMANN F, SOHRMANN M, SEGALÉS J. Porcine circovirus type 3: a threat to the pig industry[J]. *The Veterinary Record*, 2018, 182(3): 83.
- [2] OUYANG T, NIU GY, LIU XH, ZHANG XW, ZHANG Y, REN LZ. Recent progress on porcine circovirus type 3[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019, 73: 227-233.
- [3] TISCHER I, MIELDS W, WOLFF D, VAGT M, GRIEM W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus[J]. *Archives of Virology*, 1986, 91(3): 271-276.
- [4] TISCHER I, GELDERBLOM H, VETTERMANN W, KOCH MA. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA[J]. *Nature*, 1982, 295(5844): 64-66.
- [5] WELTI S, SYDLER T, WIEDERKEHR D, POSPISCHIL A, HÄSSIG M, BÜRGI E, SIDLER X. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) in Switzerland in the years 2003-2006[J]. *Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde*, 2012, 154(10): 417-427.
- [6] BAO F, MI S, LUO Q, GUO H, TU C, ZHU G, GONG W. Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection reveals a novel genotype PCV2f[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(2): 432-440.
- [7] PHAN TG, GIANNITTI F, ROSSOW S, MARTHALER D, KNUTSON TP, LI LL, DENG XT, RESENDE T, VANNUCCI F, DELWART E. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation[J]. *Virology Journal*, 2016, 13(1): 184.
- [8] SUKMAK M, THANANTONG N, POOLPERM P,

- BOONSOONGNERN A, RATANAVANICHROJN N, JIRAWATTANAPONG P, WOONWONG Y, SODA N, KAMINSONSAKUL T, PHUTTAPATIMOK S, WAJJWALKU W. The retrospective identification and molecular epidemiology of porcine circovirus type 3 (PCV3) in swine in Thailand from 2006 to 2017[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(1): 611-616.
- [9] FENAUX M, OPRIESSNIG T, HALBUR PG, MENG XJ. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs[J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(20): 11232-11243.
- [10] KWON T, YOO SJ, PARK CK, LYOO YS. Prevalence of novel porcine circovirus 3 in Korean pig populations[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 207: 178-180.
- [11] STADEJEK T, WOŹNIAK A, MILEK D, BIERNACKA K. First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(5): 1350-1353.
- [12] TOCHETTO C, LIMA DA, VARELA AM, LOIKO MR, PAIM WP, SCHEFFER CM, HERPICH JI, CERVA C, SCHMITD C, CIBULSKI SP, SANTOS AC, MAYER FQ, ROEHE PM. Full-genome sequence of porcine circovirus type 3 recovered from serum of sows with stillbirths in Brazil[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(1): 5-9.
- [13] YE XY, BERG M, FOSSUM C, WALLGREN P, BLOMSTRÖM AL. Detection and genetic characterisation of porcine circovirus 3 from pigs in Sweden[J]. *Virus Genes*, 2018, 54(3): 466-469.
- [14] KEKARAINEN T, McCULLOUGH K, FORT M, FOSSUM C, SEGALÉS J, ALLAN GM. Immune responses and vaccine-induced immunity against porcine circovirus type 2[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2010, 136(3/4): 185-193.
- [15] FACCINI S, NIGRELLI AD, FRANZINI G, ROSIGNOLI C, BARBIERI I, ALBORALI GL, BONIOTTI MB. Effects of DNA extraction method on porcine circovirus-2 real-time polymerase chain reaction quantification in swine lymph node samples[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2011, 23(6): 1189-1196.
- [16] FACCINI S, BARBIERI I, GILIOI A, SALA G, GIBELLI LR, MORENO A, SACCHI C, ROSIGNOLI C, FRANZINI G, NIGRELLI A. Detection and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in Italy[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(6): 1661-1664.
- [17] YUZHAVKOV AG, RAEV SA, ALEKSEEV KP, GREBENNIKOVA TV, VERKHOVSKY OA, ZABEREZHNY AD, ALIPER TI. First detection and full genome sequence of porcine circovirus type 3 in Russia[J]. *Virus Genes*, 2018, 54(4): 608-611.
- [18] KU X, CHEN F, LI P, WANG Y, YU X, FAN S, QIAN P, WU M, HE Q. Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(3): 703-708.
- [19] SHEN H, LIU X, ZHANG P, WANG L, LIU Y, ZHANG L, LIANG P, SONG C. Genome characterization of a porcine circovirus type 3 in South China[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(1): 264-266.
- [20] CHEN GH, TANG XY, SUN Y, ZHOU L, LI D, BAI Y, MAI KJ, LI YY, WU QW, MA JY. Development of a SYBR green-based real-time quantitative PCR assay to detect PCV3 in pigs[J]. *Journal of Virological Methods*, 2018, 251: 129-132.
- [21] SIRISEREewan C, THANAWONGNUWECH R, KEDKOVID R. Current understanding of the pathogenesis of porcine circovirus 3[J]. *Pathogens*, 2022, 11(1): 64.
- [22] JIANG HJ, WANG D, WANG J, ZHU SS, SHE RP, REN XX, TIAN JJ, QUAN R, HOU L, LI ZX, CHU J, GUO YX, XI YY, SONG HQ, YUAN F, WEI L, LIU J. Induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in piglets by infection with porcine circovirus type 3[J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(4): e02045-18.
- [23] SHEN HQ, LIU XH, ZHANG PF, WANG SY, LIU YL, ZHANG LY, SONG CX. Porcine circovirus 3 Cap inhibits type I interferon signaling through interaction with STAT2[J]. *Virus Research*, 2020, 275: 197804.
- [24] SUN WC, WANG W, XIN JL, CAO L, ZHUANG XY, ZHANG C, ZHU YL, ZHANG H, QIN YH, DU Q, HAN ZX, LU HJ, ZHENG M, JIN NY. An epidemiological investigation of porcine circovirus 3 infection in dogs in the Guangxi from 2015 to 2017, China[J]. *Virus Research*, 2019, 270: 197663.
- [25] TISCHER I, PETERS D, RASCH R, POCIULI S. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence[J]. *Archives of Virology*, 1987, 96(1/2): 39-57.
- [26] ZHU Y, LAU A, LAU J, JIA Q, KARUPPANNAN AK, KWANG J. Enhanced replication of porcine circovirus type 2 (PCV2) in a homogeneous subpopulation of PK15 cell line[J]. *Virology*, 2007, 369(2): 423-430.
- [27] FENAUX M, OPRIESSNIG T, HALBUR PG, ELVINGER F, MENG XJ. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(12): 6297-6303.
- [28] FUX R, SÖCKLER C, LINK EK, RENKEN C, KREJCI R, SUTTER G, RITZMANN M, EDDICKS M. Full genome characterization of porcine circovirus type 3 isolates reveals the existence of two distinct groups of virus strains[J]. *Virology Journal*, 2018, 15(1): 25.
- [29] LI GR, HE WT, ZHU HN, BI YH, WANG RY, XING G, ZHANG C, ZHOU JY, YUEN KY, GAO GF, SU S. Origin, genetic diversity, and evolutionary dynamics of novel porcine circovirus 3[J]. *Advanced Science*, 2018, 5(9): 1800275.
- [30] FU X, FANG B, MA J, LIU Y, BU D, ZHOU P, WANG H, JIA K, ZHANG G. Insights into the epidemic characteristics and evolutionary history of the novel porcine circovirus type 3 in Southern China[J].

- Transboundary and Emerging Diseases, 2018, 65(2): e296-e303.
- [31] PALINSKI R, PIÑEYRO P, SHANG PC, YUAN FF, GUO R, FANG Y, BYERS E, HAUSE BM. A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(1): e01879-16.
- [32] 孙庆帅, 陈燕虹, 姚伦, 孙琪, 于学祥, 吴昊, 阮胜男, 雷铭楷, 严伟东, 何启盖. 猪圆环病毒2型和3型混合感染引起的母猪繁殖障碍诊治[J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(10): 3982-3993.
- SUN QS, CHEN YH, YAO L, SUN Q, YU XX, WU H, RUAN SN, LEI MK, YAN WD, HE QG. Diagnosis and treatment of reproductive disorders in sows caused by co-infection of PCV2 and PCV3[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 49(10): 3982-3993 (in Chinese).
- [33] ARRUDA B, PIÑEYRO P, DERSCHEID R, HAUSE B, BYERS E, DION K, LONG DE, SIEVERS C, TANGEN J, WILLIAMS T, SCHWARTZ K. PCV3-associated disease in the United States swine herd[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2019, 8(1): 684-698.
- [34] CHANG CC, WU CY, WU CM, WU CW, WANG YC, LIN GJ, CHIEN MS, HUANG C. Cytotoxicity effect and transcriptome analysis of PCV3-infected cells revealed potential viral pathogenic mechanisms[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2024, 192: 106715.
- [35] MORA-DÍAZ J, PIÑEYRO P, SHEN HG, SCHWARTZ K, VANNUCCI F, LI GW, ARRUDA B, GIMÉNEZ-LIROLA L. Isolation of PCV3 from perinatal and reproductive cases of PCV3-associated disease and *in vivo* characterization of PCV3 replication in CD/CD growing pigs[J]. *Viruses*, 2020, 12(2): 219.
- [36] KEDKOVIT R, WOONWONG Y, ARUNORAT J, SIRISEREewan C, SANGPRATUM N, LUMYAI M, KESDANGSAKONWUT S, TEANKUM K, JITTIMANEE S, THANAWONGNUWECH R. Porcine circovirus type 3 (PCV3) infection in grower pigs from a Thai farm suffering from porcine respiratory disease complex (PRDC)[J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 215: 71-76.
- [37] GAO YY, WANG Q, LI HW, ZHANG S, ZHAO J, BAO D, ZHAO H, WANG K, HU GX, GAO FS. Genomic composition and pathomechanisms of porcine circoviruses: a review[J]. *Virulence*, 2024, 15(1): 2439524.
- [38] 库旭钢, 于学祥, 孙琪, 李盼盼, 张梦佳, 罗锐, 钱平, 何启盖. 猪圆环病毒3型的分离及致病性分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(4): 1568-1578.
- KU XG, YU XX, SUN Q, LI PP, ZHANG MJ, LUO R, QIAN P, HE QG. Isolation and pathogenicity analysis of porcine circovirus type 3[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54(4): 1568-1578 (in Chinese).