PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) Ở ĐÀN LỢN NUÔI TẠI MỘT SỐ TỈNH MIỀN BẮC VIỆT NAM

Huỳnh Thị Mỹ Lệ*, Nguyễn Văn Giáp

Khoa Thú y, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

Email: huynhtmle@yahoo.com*

Ngày gửi bài: 15.04.2013 Ngày chấp nhận: 15.06.2013

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục đích phân lập và xác định một số đặc tính sinh học của Porcine circovirus type 2 (PCV2) ở đàn lợn nuôi tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam (bao gồm Hà Nội, Hòa Bình, Hải Dương, Bắc Giang). Phân lập được PCV2 là tiêu chí để khẳng định chắc chắn có sự lưu hành PCV2 và PCVAD tại Việt Nam. Trong số 38 mẫu được lựa chọn để phân lập virus, chỉ phân lập được 8 chủng từ bệnh phẩm của lợn có triệu chứng bệnh liên quan đến PCV2. Virus phân lập được thuộc genotype PCV2b. Kết quả kiểm tra một số đặc tính sinh học cho thấy các chủng PCV2 phân lập được có khả năng nhân lên trên môi trường tế bào PK15 và có thể phát hiện được sự nhân lên của virus ở lần cấy chuyển đầu tiên hoặc thứ 2. Virus không gây bệnh tích tế bào (CPE - cytopathic effect). Hiệu giá virus ($TCID_{50}$) của các chủng PCV2 phân lập được dao động từ $10^{2,7}$ đến $10^{4,2}$ /ml.

Từ khóa: Lợn, PCV2, phân lập.

Isolation and Identification Biochemical Characteristics of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) from pigs in Some Northern Provinces of Vietnam

ABSTRACT

The aim of the present study was to isolate and identify biochemichal characteristics of Porcine circovirus type 2 (PCV2) as the cause of Porcine circovirus type 2-associated disease (PCVAD) of pigs in 4 nothern provinces of Vietnam (Hanoi, Hoa Binh, Bac Giang and Hai Duong). Isolation of PCV2 is a conclusive evidence to confirm the circulation of PCV2 and PCVAD in pigs of Vietnam. Eight isolates of PCV2 were isolated from 38 samples collected from pigs with suspected PCVAD. PCV2 isolates were of PCV2b genotype. Biochemical characterization of isolated PCV2 showed that PCV2 could multiply in PK15 cell culture from the first or second passage, but no CPE was observed. $TCID_{50}$ of all PCV2 isolates ranges from $10^{2.7}$ to $10^{4.2}$ /ml.

Keywords: Pigs, PCV2, isolation.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, ngành chăn nuôi lợn ở Việt Nam đã có những bước phát triển mạnh mẽ, đáp ứng nhu cầu thực phẩm trong nước cũng như một phần phục vụ xuất khẩu. Tuy nhiên, chăn nuôi lợn luôn phải đối mặt với tình hình dịch bệnh diễn biến rất phức tạp, phải kể đến những bệnh có tính chất cổ điển như dịch tả lợn, suyễn lợn, phó thương hàn lợn… và nhóm bệnh đường hô hấp phức hợp mới nổi như hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản (PRRS), bệnh do circovirus type 2, bệnh do vi khuẩn *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*… Đã có nhiều biện pháp được áp dụng nhằm hạn chế dịch xảy ra, trong đó phải kể đến việc sử dụng vacxin phòng bệnh; đặc biệt với những bệnh do virus gây ra.

Đối với ngành công nghiệp chăn nuôi lợn, Porcine circovirus type 2 (PCV2) là nguyên nhân khởi phát gây các bệnh liên quan tới PCV2, được gọi chung là Porcine circovirus type 2-associated disease (PCVAD) làm thiệt hại lớn về kinh tế, đặc biệt là chăn nuôi theo quy mô công nghiệp với mật độ chăn nuôi dày, môi

trường không được kiểm soát tốt cũng như các biện pháp quản lý phòng bệnh chưa hợp lý. Để phòng bệnh bằng vacxin cho lợn có hiệu quả, ngoài chế độ quản lý, chăm sóc, chất lượng vacxin, cần quan tâm đến yếu tố tính tương đồng của chủng virus vacxin và chủng gây bệnh thực địa. Vì vậy, vấn đề lựa chọn chủng virus gây bệnh đại diện từ thực địa làm nguồn giống sản xuất vacxin là một việc làm cần thiết.

Nghiên cứu này nhằm mục đích phân lập và xác định một số đặc tính sinh học của PCV2 từ đàn lợn nuôi tại một số tỉnh miền bắc Việt Nam. Phân lập được PCV2 là tiêu chí để khẳng định chắc chắn có lưu hành PCV2 và PCVAD tại Việt Nam. Nội dung nghiên cứu được thực hiện thành công sẽ tạo ra nguồn giống virus phục vụ cho những nghiên cứu sản xuất vacxin phòng bệnh do PCV2 gây ra trong tương lai.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Mẫu (gồm huyết thanh và phủ tạng) được lấy từ những đàn lợn chưa được tiêm phòng vacxin phòng bệnh PCV2 có triệu chứng PCVAD (tiêu chảy, có triệu chứng hô hấp, còi cọc, viêm da...) tại các trại chăn nuôi lợn thuộc 4 tỉnh miền Bắc gồm Hà Nội, Hòa Bình, Bắc Giang và Hải Dương. Bệnh tích khi mổ khám thường quan sát được là hạch lympho sưng, xuất huyết, phổi viêm.

Tế bào thận lợn PK15 (Pig Kidney) do Trung tâm Chẩn đoán thú y Trung ương, Cục Thú y cung cấp.

Nguyên liệu, hóa chất và trang thiết bị dùng để nuôi cấy tế bào và để làm phản ứng nested PCR.

Kit miễn dịch huỳnh quang (JENO Biotech Inc) do Phòng thí nghiệm virus học, Trường Đại học Thú y, Đại học Quốc gia Seoul cung cấp. Thành phần: 1X anti-PCV2 Monoclonal Antibody (8ml); 1X FITC Anti-Mouse Conjugate (8ml); 10X Washing Buffer (100ml); FA mounting fluid (3ml).

2.2. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành tại Bộ môn Vi sinh vật - Truyền nhiễm, Khoa Thú y, Phòng Thí nghiệm trung tâm, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội; cùng với sự giúp đỡ của Phòng virus, Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương, Cục Thú y.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp lấy mẫu

Huyết thanh: dùng seringe lấy máu vịnh tĩnh mạch cổ, để đông tự nhiên từ 1 -2 giờ, sau đó để qua đêm ở 4^0C. Tiến hành chắt huyết thanh vào ống eppendorf và bảo quản ở -20^0C cho đến khi kiểm tra.

Bệnh phẩm: gồm gan, hạch amidan, hạch lympho, thận, lách, phổi, ruột của lợn. Tiến hành đồng nhất mẫu và bảo quản ở -20^0C cho đến khi kiểm tra.

Mẫu huyết thanh và bệnh phẩm sau khi được kiểm tra dương tính với PCV2 bằng phản ứng nested PCR (Huỳnh Thị Mỹ Lệ và cộng sự, 2012). Những mẫu nào có phản ứng dương tính và có biểu hiện triệu chứng, bệnh tích rõ sẽ được lựa chọn để tiến hành phân lập virus.

2.3.2. Phương pháp phân lập PCV2

* Chuẩn bị tế bào

Do PCV2 nhân lên trong nhân của tế bào nên virus chỉ nhân lên trong kỳ phân chia của tế bào. Vì vậy, để tạo điều kiện cho virus nhân lên mạnh trên tế bào, cần sử dụng tế bào "non", với mật độ tế bào phủ đáy khoảng 30-50%.

* Chuẩn bị huyễn dịch bệnh phẩm 10%

- Dùng cối chày sứ đồng nhất hoàn toàn huyễn dịch bệnh phẩm, sau đó bổ sung DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) không có FBS (Fetal Bovine Serum) thành huyễn dịch 10%. Chuyển huyễn dịch bệnh phẩm vào ống eppendorf 1,5ml

- Ly tâm 4000 vòng/phút/4^0C/10 phút. Dùng seringe hút phần dịch trong sau ly tâm.

* Gây nhiễm tế bào

- Dùng lọc vô trùng 0,25um lọc 200µl huyễn dịch bệnh phẩm 10% vào 1 giếng của đĩa 24 giếng, mỗi mẫu bệnh phẩm gây nhiễm cho 4 giếng.

- Ủ huyễn dịch bệnh phẩm + tế bào: 37^0C/5%CO_2/60 phút

- Loại bỏ toàn bộ dung dịch bên trong các giếng.

+ Lưu ý: trường hợp quan sát thấy tế bào đã bám và vươn ra mặt đĩa (không có dạng co tròn bám trên mặt đĩa), có thể rửa bằng 500µl PBS 1X/giếng để loại bỏ hoàn toàn huyễn dịch gây nhiễm).

- Bổ sung môi trường nuôi cấy tế bào: 500µl/giếng/đĩa 24 giếng.

* Thu tế bào sau gây nhiễm

- Nuôi tế bào $37^0C/5\%CO_2$ trong vòng 48 - 72 giờ. Sau gây nhiễm 24 giờ, theo dõi và đánh dấu những giếng bị tạp.

- Đông tan tế bào 3 lần ở tủ -20^0C trước khi tiếp đời.

* Kiểm tra kết quả phân lập

Đối với PCV2, sau khi tiếp đời khoảng 7 lần, cần khẳng định sự thích nghi và nhân lên của virus. Do virus không gây bệnh tích tế bào nên để xác định sự có mặt của PCV2, khẳng định kết quả phân lập virus trên môi trường tế bào cần sử dụng phản ứng nested PCR và/hoặc phản ứng miễn dịch huỳnh quang. Sau khi chắc chắn đã phân lập được chủng virus, nhân lên trên chai T75 (dùng khoảng 2ml huyễn dịch virus/chai; nuôi trong vòng 4 ngày). Đông tan tế bào 3 lần, chia ra các ống eppendorf 1,5ml và bảo quản ở nhiệt độ -80^oC. Trường hợp bảo quản tốt, có thể giữ khoảng 6 tháng - 12 tháng. Cấy chuyển giống sau khoảng 3 tháng bảo quản.

2.3.3. Phương pháp xác định khả năng nhân lên và gây bệnh tích của PCV2

Trong mỗi lần cấy chuyển, hàng ngày quan sát sự hình thành bệnh tích tế bào và sau khi cấy chuyển tiến hành thu lấy huyễn dịch tế bào làm phản ứng nested PCR và/hoặc miễn dịch huỳnh quang xác định sự có mặt của virus sau mỗi lần cấy chuyển.

2.3.4. Phương pháp xác định hiệu giá virus trên môi trường tế bào

Chủng virus phân lập được pha loãng bằng môi trường DMEM không có FBS theo cơ số 10 (từ nồng độ 10^{-1} đến 10^{-6}) rồi tiến hành gây nhiễm vào môi trường tế bào. Mỗi độ pha loãng gây nhiễm 4 giếng, mỗi giếng 200µl. Tiến hành tương tự như mục 2.3.2. Nuôi tế bào $37^oC/5\%CO_2$ trong vòng 48 - 72 giờ. Đông tan tế bào và xác định sự có mặt của virus bằng phản ứng miễn dịch huỳnh quang.

2.3.5. Phương pháp miễn dịch huỳnh quang xác định PCV2 trong môi trường tế bào

Sử dụng kit (JENO Biotech Inc- Korea)

* Các bước thực hiện:

- Cố định tế bào sau gây nhiễm:

+ Loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy trong giếng

+ Rửa bằng dung dịch PBS 3 lần, 200µl/giếng/lần

+ Thêm 500µl cồn tuyệt đối/giếng và cố định ở -20oC trong vòng 2 giờ (hoặc có thể để qua đêm)

+ Loại bỏ hoàn toàn cồn

- Hydrat hóa tế bào

+ Nhỏ 500µl PBS (ngập thảm tế bào)

+ Ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 tiếng

- Ủ kháng thể đặc hiệu

+ Nhỏ ngập thảm tế bào kháng thể đơn dòng kháng PCV2 (1X anti-PCV2 mAb). Ủ ở 37^oC/60 phút.

- Rửa đĩa:

+ Chuẩn bị dung dịch rửa 1X từ 10X washing solution

Cho 500µl dung dịch rửa 1X/giếng, để trong vòng 3 phút rồi loại bỏ hàn toàn dung dịch rửa. Lặp lại 2 lần.

- Ủ kháng kháng thể

+ Nhỏ ngập thảm tế bào kháng kháng thể gắn huỳnh quang (1X FITC anti-mouse conjugate)

+ Ủ 37^oC/60 phút rồi tiến hành rửa đĩa (như hướng dẫn ở trên).

* Đọc kết quả: Khi quan sát, cần có đối chứng âm để đối chiếu. Do PCV2 nhân lên trong nhân tế bào, vì vậy chỉ khi thấy tín hiệu huỳnh quang ở nhân tế bào mới coi là đặc hiệu.

2.3.6. Phương pháp xử lý số liệu

Tính toán kết quả TCID50 theo công thức Spearman Karber

$$\text{Log TCID50} = (Xo + d/2) - d \times (\sum ri/n)$$

Trong đó:

Xo là log của bậc pha loãng virus cao nhất; d là log của bậc pha loãng; ri là số giếng tế bào âm tính ở mỗi bậc pha loãng; n là số giếng tế bào được gây nhiễm ở mỗi bậc pha loãng.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập PCV2

Trong quá trình thực hiện, các mẫu bệnh phẩm là huyết thanh và phủ tạng có kết quả PCR dương tính đã được lựa chọn, tiến hành phân lập PCV2 trên môi trường tế bào PK15. Việc phân lập PCV2 gặp nhiều khó khăn do đặc tính của virus rất dễ tự dung giải trong mô bào lưu giữ; khi nuôi cấy trên môi trường tế bào không gây bệnh tích, phải cấy chuyển 7 lần, đòi hỏi nhiều thời gian và công sức.

Đã tiến hành phân lập trên 38 mẫu bệnh phẩm gồm 4 mẫu huyết thanh và 34 mẫu bệnh phẩm của lợn có triệu chứng và bệnh tích điển hình thu thập tại 4 tỉnh (Hình 1). Kết quả phân lập PCV2 được trình bày ở bảng 1.

Toàn bộ mẫu huyết thanh được sử dụng để phân lập virus đều cho kết quả âm tính; có thể do lượng virus trong huyết thanh quá ít. Tỷ lệ phân lập được PCV2 từ các mẫu bệnh phẩm chỉ đạt 23,53%; cũng có thể do lượng virus trong bệnh phẩm ít hoặc virus đã bị chết trong quá trình bảo quản bệnh phẩm.

Tại Việt Nam, Nguyễn Thị Thu Hồng và cộng sự (2008) cũng đã phân lập được 2 trong tổng số 6 (33,33%) mẫu mô của lợn con có biểu hiện còi cọc sau cai sữa ở các tỉnh phía Nam. Đề tài nghiên cứu của Nguyễn Viết Không và cộng sự (tài liệu chưa xuất bản) cho biết đã phân lập được 2 chủng PCV2 từ 3 mẫu bệnh phẩm và 3 mẫu huyết thanh.

Guo và cộng sự (2010) cũng cho biết phân lập PCV2 khó khăn, chỉ thu được 19 chủng PCV2 từ 42 mẫu bệnh phẩm lợn còi cọc của Trung Quốc, chiếm tỷ lệ 45,24%.

Như vậy, với 8 chủng PCV2 phân lập được từ bệnh phẩm trong nghiên cứu này sẽ bổ sung, góp phần làm cho nguồn giống virus này ở Việt Nam được phong phú. Khi kiểm tra bằng phản ứng nested PCR, 8 chủng phân lập được đều thuộc genotype PCV2b.

Bảng 1. Kết quả phân lập PCV2

Địa điểm lấy mẫu	Huyết thanh		Phủ tạng		
	Số mẫu	(+)	Số mẫu	(+)	Tỷ lệ (%)
Hà Nội	1	0	7	1	14,29
Hải Dương	1	0	11	1	9,09
Bắc Giang	2	0	13	5	38,46
Hòa Bình	0	0	3	1	33,33
Tổng hợp	4	0	34	8	23,53

Hình 1. Phân lập PCV2 trên môi trường tế bào PK15

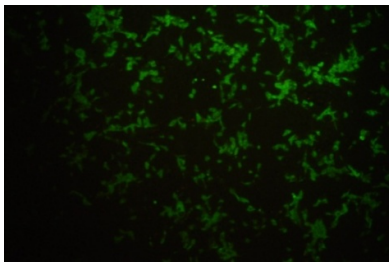
3.2. Khả năng nhân lên của PCV2 trên môi trường tế bào

Từ những tài liệu tham khảo, được biết rằng: để phân lập được PCV2 phải qua nhiều lần cấy chuyển, ví dụ 4 lần theo Zhou và cộng sự (2006), 10 lần của Yang và cộng sự (2003); đồng thời qua một số tài liệu trao đổi cá nhân, 7 lần cấy chuyển đã được lựa chọn để sử dụng cho nghiên cứu này. Ở các lần cấy chuyển PCV2, việc lấy mẫu xác định sự nhân lên của virus đã được thực hiện. Kết quả cho thấy từ lần cấy chuyển thứ 2 đã có sự nhân lên của virus, đều phát hiện được khi kiểm tra bằng kỹ thuật nested PCR (Bảng 2). Đồng thời kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang cũng đã được sử dụng để khẳng định phát hiện virus sống trong tế bào, tránh trường hợp phản ứng PCR chỉ phát hiện được kháng nguyên trong huyễn dịch tế bào nuôi cấy.

Hình 2 và 3 minh họa cho kết quả kiểm tra sự có mặt của PCV2 trong tế bào nuôi cấy

Bảng 2. Kết quả theo dõi sự nhân lên của PCV2 trên môi trường tế bào

TT	Nguồn gốc	Ký hiệu mẫu	Sự nhân lên của virus ở các lần cấy chuyển						
			1	2	3	4	5	6	7
1	Hà Nội	PCV2 -Han1	-	+	+	+	+	+	+
2	Hải Dương	PCV2-HD1	-	+	+	+	+	+	+
3	Bắc Giang	PCV2-BG1	-	+	+	+	+	+	+
4	Bắc Giang	PCV2-BG2	+	+	+	+	+	+	+
5	Bắc Giang	PCV2-BG3	+	+	+	+	+	+	+
6	Bắc Giang	PCV2-BG4	+	+	+	+	+	+	+
7	Bắc Giang	PCV2-BG5	+	+	+	+	+	+	+
8	Hòa Bình	PCV2-HB1	+	+	+	+	+	+	+



Hình 2. Tín hiệu huỳnh quang khi có mặt virus trong tế bào

Hình 3. Không có tín hiệu huỳnh quang, mẫu tế bào âm tính PCV2

3.3. Khả năng gây bệnh tích tế bào

Trong suốt quá trình nuôi cấy PCV2 không gây bệnh tích tế bào. Đặc tính này của virus cũng đã được khẳng định bởi nhiều tác giả (Todd và cộng sự, 2001; Yang và cộng sự, 2003; Zhou và cộng sự, 2006; Opriessnig và cộng sự, 2007). Vì vậy để khẳng định sự nhân lên của virus, phản ứng miễn dịch huỳnh quang hoặc kỹ thuật nested PCR đã được sử dụng.

3.4. Xác định hiệu giá TCID50/ml

Hiệu giá của các chủng PCV2 phân lập được trình bày ở bảng 3.

Như vậy, virus chỉ có khả năng nhân lên ở nồng độ pha loãng $\leq 10^{-4}$. Toàn bộ mẫu pha loãng virus ở nồng độ 10^{-5} và 10^{-6} đều không thấy sự có mặt của PCV2.

Kết quả cho thấy hiệu giá ($TCID_{50}$) của các chủng PCV2 phân lập được dao động từ $10^{2,7}$ đến $10^{4,20}$/ml.

Kết quả này cũng phù hợp với Zhou và cộng sự (2006), sau 4 lần cấy chuyển phân lập được PCV2 với hiệu giá $TCID_{50}$ là 10^4/ml. Tuy nhiên, so với thông báo của Nguyễn Viết Không và cộng sự (tài liệu chưa xuất bản) chủng PCV2 phân lập được có hiệu giá $10^{4,5}$/ml thì hiệu giá của những chủng virus phân lập được là thấp hơn.

Nguồn virus đã phân lập được này sẽ phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo trong sản xuất vacxin phòng bệnh PCVAD ở đàn lợn nuôi tại Việt Nam, góp phần hạn chế thiệt hại cho người chăn nuôi.

Bảng 3. Hiệu giá TCID50/ml của các chủng PCV2 phân lập được

TT	Chủng PCV2	Số giếng tế bào nhiễm virus/Số giếng gây nhiễm						Hiệu giá (logTCID50/ml)
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	
1	PCV2 -Han1	3	3	2	1	0	0	3,45
2	PCV2-HD1	3	2	2	0	0	0	2,95
3	PCV2-BG1	3	3	2	1	0	0	3,45
4	PCV2-BG2	4	4	3	1	0	0	4,20
5	PCV2-BG3	4	3	2	2	0	0	3,95
6	PCV2-BG4	3	2	1	0	0	0	2,70
7	PCV2-BG5	4	2	2	1	0	0	3,45
8	PCV2-HB1	3	3	1	1	0	0	3,20

4. KẾT LUẬN

Đã phân lập được 8 chủng PCV2 từ mẫu bệnh phẩm của lợn có triệu chứng và bệnh tích liên quan đến bệnh do PCV2 gây ra. Virus được xác định thuộc genotype PCV2b.

Chủng PCV2 phân lập được có khả năng nhân lên trên môi trường tế bào PK15, nhưng không gây bệnh tích tế bào. Có thể phát hiện được sự nhân lên của virus ở lần cấy chuyển đầu tiên hoặc thứ 2 bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang hoặc PCR.

Hiệu giá virus ($TCID_{50}$) của PCV2 phân lập được dao động từ $10^{2,7}$ đến $10^{4,2}$/ml.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Guo, L., Y. Lu,, Y. Wei, L. Huang and C. Liu (2010) Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. Virology Journal 7(1): 273.

Nguyễn Thị Thu Hồng, Lê Thị Thu Phương, Đặng Hùng, Nguyễn Tiến Hà, Nguyễn Ngọc Hải, Chris. J. Morrissy, Darren Schfer (2008). Phân tích di truyền circovirus lợn typ 2 (PCV2) trên lợn tại khu vực Nam Bộ. Khoa học kỹ thuật Thú y, 15(2): 5-12.

Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Nguyễn Văn Giáp, Đặng Hữu Anh, Trần Thị Hương Giang, Mai Thị Ngân, Vũ Thị Ngọc, Lê Văn Trường, Ngô Minh Hà và Bong Kyun Park (2012). Ứng dụng kỹ thuật nested-PCR phát hiện và định typ Porcine circovirus typ 2 (PCV2) ở đàn lợn nuôi tại một số tỉnh miền Bắc. Tạp chí khoa học kỹ thuật Thú y, 19(5): 18-25.

Opriessnig Tanja, Xiang-Jin Meng, Patrick G. Halbur, (2007). Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. J Vet Invest 19: 591-615.

Todd D., M. S. McNuliy, B. M. Adair, and G. M. Allan (2011). Animal Circoviruses, In: Advance in virus research, Vol 57, Academic Press.

Yang Jeong S., Dae S. Song, So Y. Kim, Kwang S. Lyoo, Bong K. Park (2003). Detection of porcine circovirus type 2 in feces of pigs with or without enteric disease by polymerase chain reaction. J Vet Diagn Invest 15: 369-373.

Zhou J.-Y., Q.-X. Chen, J.-X. Ye, H.-G. Shen, T.-F.Chen and S.-B. Shang (2006). Serological investigation and genomic characterization of PCV2 isalates from different geographic regions of Zhejiang province in China. Veterinary Research Communications 30: 205-220.