

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2018.09.007

猪圆环病毒Ⅱ型吉林株对小鼠的致病力研究^①

苗丽娟^{1,2,3}, 李静姬^{2,3}, 李一经¹

1. 东北农业大学 动物医学学院, 哈尔滨 150030; 2. 吉林农业科技学院 动物科技学院, 长春 132101;
3. 预防兽医学吉林省重点实验室, 长春 132100

摘要: 选取磐石病毒株(PS0901)、蛟河病毒株(JH0901)、桦甸病毒株(HD0901)、舒兰病毒株(SL0901)为试验材料, 对猪圆环病毒Ⅱ型吉林株的致病力展开试验研究. 结果显示, 蛟河病毒株(JH0901)、桦甸病毒株(HD0901)对于小鼠脾脏和肾脏的致病力都比较明显.

关键词: 猪圆环病毒Ⅱ型; 吉林株; 亲嗜性; 致病力

中图分类号: S858.28 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-9868(2018)09-0042-06

猪圆环病毒Ⅱ型可引起断奶仔猪发生多系统衰竭、成年猪综合性肾病、成年猪坏死性肺炎、成年猪不孕不育、孕猪流产等多种疾病, 对肉猪的繁殖饲养具有重大威胁^[1-2]. 1974 年, 德国科学家首先发现了猪圆环病毒, 经过大量的临床试验研究, 不具有致病力的猪圆环病毒被称为Ⅰ型, 具有致病力的猪圆环病毒被称为Ⅱ型^[3-4]. 21 世纪初, 我国首次发现并从国内猪群中分离出了具有致病力的猪圆环病毒Ⅱ型. 在短短的 10 多年时间里, 我国已经成为猪圆环病毒Ⅱ型感染最为严重的国家之一^[5]. 猪圆环病毒Ⅱ型不仅引发疾病的种类多, 而且对两种性别、幼年到成年的猪均可感染, 一旦感染发病率超过 50%、致死率超过 3%、个别区域的致死率最大达到 40%^[6]. 猪圆环病毒Ⅱ型的病毒粒子没有囊膜, 粒子主要由核酸和衣壳蛋白构成, 从形状上看呈现 20 面体的对称结构, 直径大小为 17 个 nm^[7]. 从遗传特征上看, 猪圆环病毒Ⅱ型的基因组是单股环状双向的 DNA, 其基因序列全长, 或为 1 767 bp 或为 1 768 bp^[8]. 在世界各地发现的猪圆环病毒Ⅱ型, 具有较为保守的遗传特性. 从一些研究来看, 猪圆环病毒Ⅱ型的核苷酸同源性介于 93%~100%之间, 这表明猪圆环病毒Ⅱ型核苷酸地域分布差异不明显^[9-10]. 从组织亲嗜性来看, 猪圆环病毒Ⅱ型的亲嗜性非常广泛, 对于猪的淋巴结组织、心脏组织、肝脏组织、脾脏组织、肺脏组织、脑组织、胸腺组织、胰腺组织、肠管组织、膀胱组织都具有亲嗜性^[11-12]. 感染后的猪体内, 淋巴

① 收稿日期: 2018-02-24

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20150623004TC); 吉林市科技创新发展计划项目(20162005).

作者简介: 苗丽娟(1978-), 女, 满族, 博士研究生, 副教授, 主要从事预防兽医学研究.

通信作者: 李一经, 教授, 博士研究生导师.

结组织和脾脏组织中的病毒含量最高. 猪圆环病毒 II 型一般通过消化道、呼吸道进入猪体内对淋巴细胞进行感染, 这种感染会导致淋巴细胞的调亡进而损伤淋巴组织, 白细胞随之减少、血清抗体无法有效中和病毒, 最后病毒向猪体其他组织蔓延, 从而导致临床症状的发生^[13-15]. 因为个体差异、疫苗接种等因素, 感染猪圆环病毒 II 型的猪也可能不出现临床症状. 感染猪圆环病毒 II 型, 一旦出现临床症状, 猪的致死率将超过 70%^[16]. 本文将以猪圆环病毒 II 型吉林株为研究对象, 分析其对小鼠的致病力, 并以此对猪圆环病毒 II 型吉林株的致病力进行判断.

1 材 料

本次对于致病力的研究, 主要针对笔者所在地区进行. 因此, 选取了吉林省 4 个县市的猪圆环病毒 II 型病毒株, 分别是磐石病毒株(PS0901)、蛟河病毒株(JH0901)、桦甸病毒株(HD0901)、舒兰病毒株(SL0901). 在试验中还采用了猪圆环病毒 II 型阳性血清和阴性血清, 实验小鼠 100 只. 所用的主要仪器包括荧光定量分析仪、超净工作台等.

2 方 法

2.1 攻毒试验

选取 5 周大小的小鼠 100 只, 分为 5 组, 每组 20 只. 其中, 第 1 组小鼠注入浓度为 2% 的 DMEM 细胞培养液, 第 2 组小鼠注入 PS0901 株细胞毒, 第 3 组小鼠注入 JH0901 株细胞毒, 第 4 组小鼠注入 HD0901 株细胞毒, 第 5 组小鼠注入 SL0901 株细胞毒. 病毒液的注入, 采用腹腔注射方式为主, 时间间隔周期为 7 d, 每隔 7 d 注射 1 次. 第 1 组小鼠是其余 4 组小鼠的参照对象.

2.2 组织亲嗜性检测

在小鼠第一次感染猪圆环病毒 II 型吉林株后, 对下一个注射周期内处死的小鼠, 执行解剖处理并观察小鼠体内各个脏器的病变情况, 包括肝脏组织、肺脏组织、脾脏组织、肾脏组织、肠道组织膜内淋巴结. 对这些脏器组织采用 TaqMan 荧光执行定量的 PCR 检测, 对检测结果进一步采用 Eviews 进行方差比较.

2.3 小鼠病理组织切片制作与观察

取出已经感染的小鼠各脏器组织进行石蜡切片制作, 进一步经过染色处理便于各个脏器病理变化的观察. 病理切片的制作过程为: ① 病理组织取材, 组织大小设定为 0.5 cm^3 ; ② 病理组织固定, 将病理组织投入到浓度为 10% 的甲醛溶液中固定处理 24 h; ③ 脱水处理, 将固定好的病理组织脱水处理, 分别采用浓度为 30%, 50%, 70%, 80%, 95% 的酒精处理; ④ 透明化处理, 采用二甲苯溶液对病理组织进行透明脱水处理; ⑤ 浸蜡处理, 将透明处理的病理组织分别放在一杯软石蜡和量杯硬石蜡中; ⑥ 包埋处理, 将浸蜡处理后的病理组织放置在包埋框中; ⑦ 切片处理, 将包埋后的病理组织蜡块运用切片机切成 $5\sim 7\text{ }\mu\text{m}$ 之间的切片; ⑧ 贴片处理, 让切片自然伸展后放在载玻片上烘干; ⑨ 染色封装处理, 将贴片处理的病理组织, 采用二甲苯、各种浓度酒精、染色液执行脱蜡进水染色处理, 进而盖上盖玻片完成封装, 以备镜检.

3 结果与分析

3.1 组织亲嗜性

检测猪圆环病毒 II 型吉林株的组织亲嗜性, 分别考察小鼠肺脏、脾脏、肾脏 3 个部分的情况。

猪圆环病毒 II 型吉林株对于肺脏组织亲嗜性的结果, 如图 1 所示。

图 1 中分别显示了病毒感染后 7 d, 14 d, 21 d, 28 d, 5 组注入肺脏组织的病毒含量变化. 从图 1 中可以看出, SL0901 组猪圆环病毒 II 型的核酸浓度一直比其他 3 组高, 并且在第 21 d 达到最大值, 说明猪圆环病毒 II 型吉林株 SL0901 对于小鼠肺部组织的亲嗜性最强。

猪圆环病毒 II 型吉林株对于脾脏组织亲嗜性的结果, 如图 2 所示。

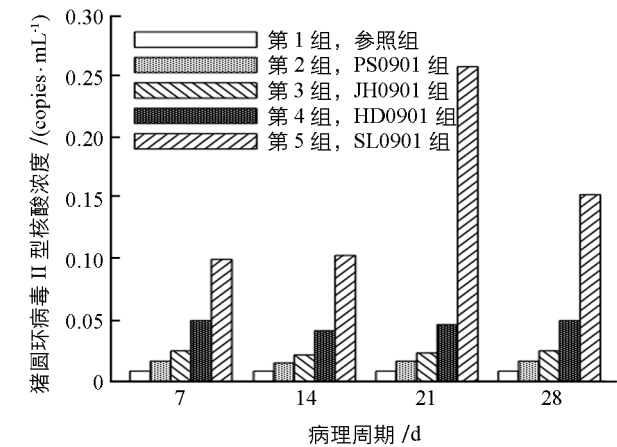


图 1 猪圆环病毒 II 型吉林株对于肺脏组织的亲嗜性

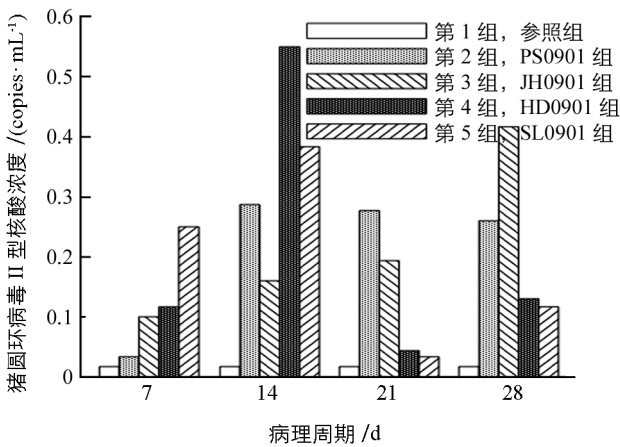


图 2 猪圆环病毒 II 型吉林株对于脾脏组织的亲嗜性

图 2 中分别显示了病毒感染后 7 d, 14 d, 21 d, 28 d, 5 组注入脾脏组织的病毒含量变化. 从图 2 中可以看出, 第 4 组 HD0901、第 5 组 SL0901 猪圆环病毒 II 型的核酸浓度都呈现出先升后降的趋势, 随后又有一定程度升高. 第 2 组 PS0901 猪圆环病毒 II 型的核酸浓度先升后趋于平稳, 第 3 组 JH0901 猪圆环病毒 II 型的核酸浓度呈稳步上升的趋势。

猪圆环病毒 II 型吉林株对于肾脏组织亲嗜性的结果, 如图 3 所示。

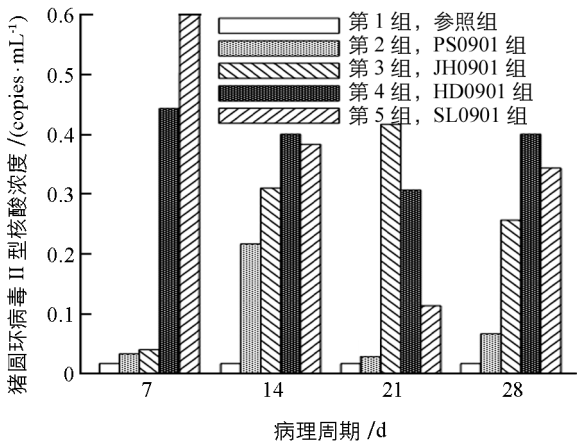


图 3 猪圆环病毒 II 型吉林株对于肾脏组织的亲嗜性

图 3 中分别显示了病毒感染后 7 d, 14 d, 21 d, 28 d, 5 组注入肾脏组织的病毒含量变化. 从图 3 中可以看出, 第 2 组 PS0901、第 4 组 HD0901、第 5 组 SL0901 猪圆环病毒 II 型的核酸浓度变化趋势接近, 都在 21 d 最低, 第 3 组 JH0901 猪圆环病毒 II 型的核酸浓度则恰好相反, 在第 21 d 达到最高。

3.2 病理组织切片结果

分别对小鼠的脾脏和肾脏进行了 H. E. 染色观察。

小鼠脾脏组织的 5 组切片结果, 如图 4 所示。

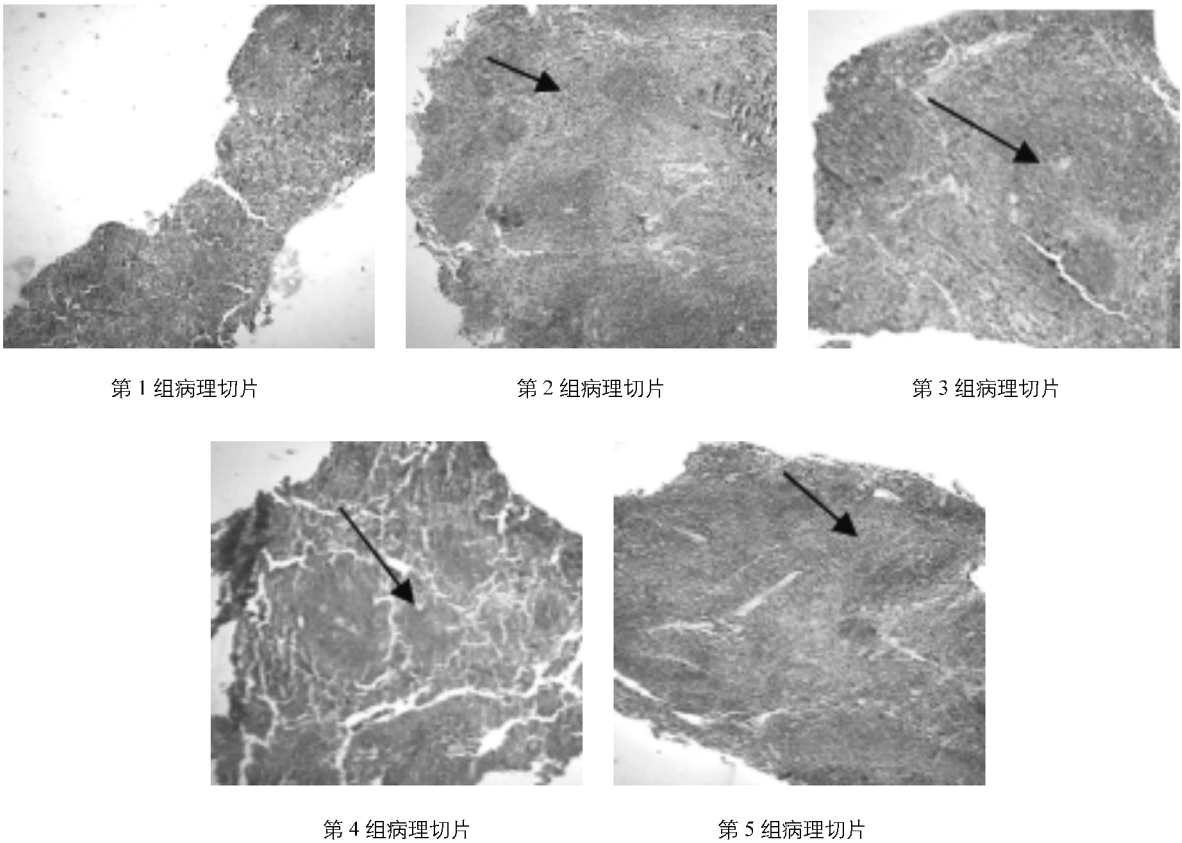


图 4 小鼠脾脏组织的病理切片

从图 4 中可以看出,猪圆环病毒Ⅱ型吉林株对于小鼠脾脏组织的感染,大小及结构分布都表现得不均匀,并且出现了和小鼠脾脏小体融合的情况.其中,第 2 组 PS0901、第 3 组 JH0901 出现的融合最为严重.小鼠肾脏组织的 5 组切片结果,如图 5 所示.

从图 5 中可以看出,猪圆环病毒Ⅱ型吉林株对于小鼠肾脏组织感染,都造成了不同程度的细胞增生.第 2 组 PS0901、第 3 组 JH0901 的情况最为严重,导致了较为明显的肾脏病变,包括肾小球囊腔出现萎缩、毛细血管出现破裂.

4 讨 论

从组织亲嗜性来看,猪圆环病毒Ⅱ型的亲嗜性非常广泛,对于猪的多种组织具有亲嗜性,从而导致猪的某些脏器组织衰竭,诱发严重的疾病并导致高致死率.但是,猪圆环病毒Ⅱ型在不同地区的变种,以及侵入个体的不同会表现出一些差异.

本文重点考察了猪圆环病毒Ⅱ型吉林株的致病力影响,分别对比了磐石病毒株(PS0901)、蛟河病毒株(JH0901)、桦甸病毒株(HD0901)、舒兰病毒株(SL0901)的不同情况.通过一系列组织亲嗜性实验发现:

- 1) 猪圆环病毒Ⅱ型吉林株 SL0901 对于小鼠肺部组织的亲嗜性最强;
- 2) 猪圆环病毒Ⅱ型吉林株 HD0901 在第 14 d 时对于小鼠脾脏组织的亲嗜性最强;
- 3) 猪圆环病毒Ⅱ型吉林株 SL0901 在第 7 d 时对于小鼠肾脏组织的亲嗜性最强;

而从组织切片结果可以看出,猪圆环病毒Ⅱ型吉林株 PS0901,JH0901 一旦对脏器组织构成感染,其病变情况则更为严重,会出现肾小球囊腔萎缩、毛细血管破裂等病情.

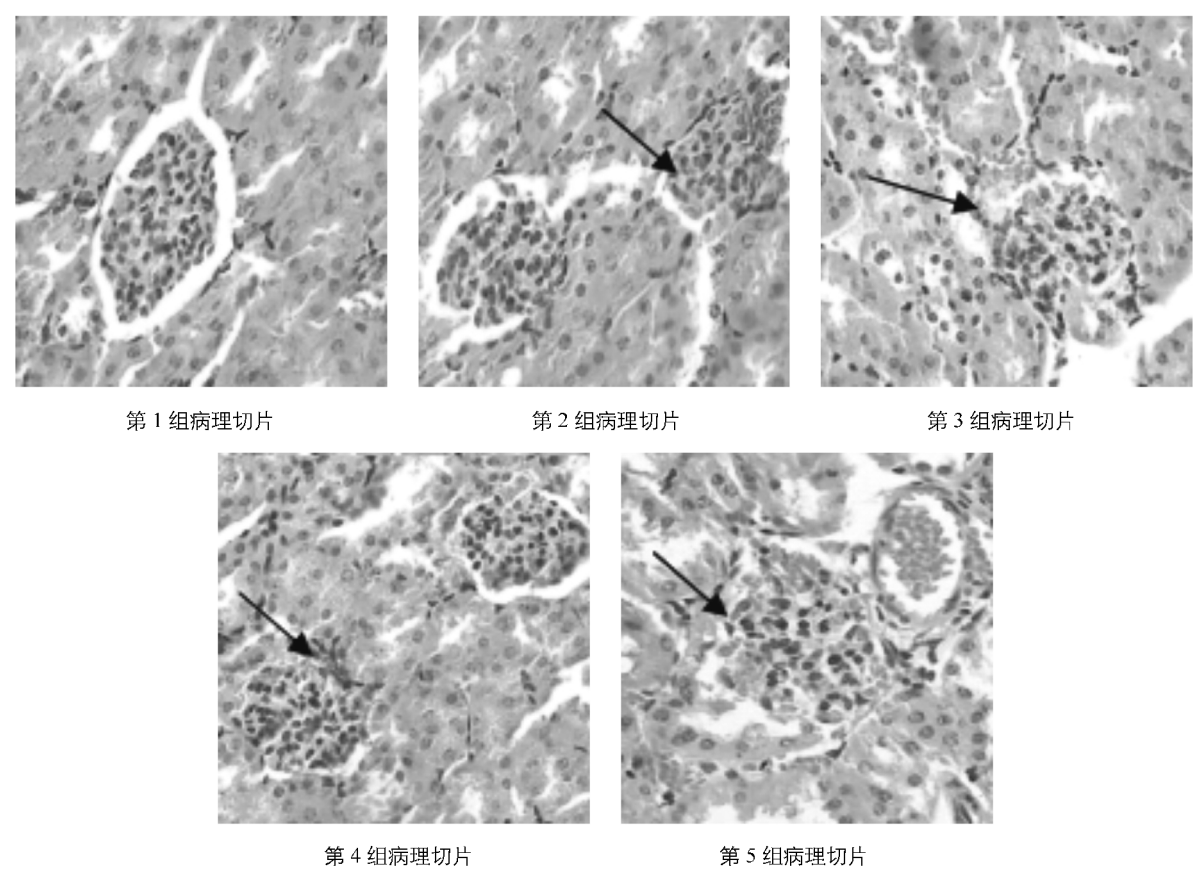


图 5 小鼠肾脏组织的病理切片

参考文献:

[1] 刘艳芳. 运用 Markov 链对我国猪肉产量进行趋势预测 [J]. 中国猪业, 2012, 10(3): 7—10.

[2] MAGAR R, MULLER P, LAROCHELLE R. Retrospective Serological Survey of Antibodies to Porcine Circovirus Type 1 and Type 2 [J]. Can Vet Res, 2015, 64(8): 184—186.

[3] 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]. 畜牧兽医科学信息, 2015, 29(9): 29—30.

[4] 崔尚金, 蔡 阳, 陈 欣. 检测猪圆环病毒 DNA 的竞争定量 PCR 方法的建立及初步应用 [J]. 中国预防兽医学报, 2004, 26(5): 347—352.

[6] TUIJA KEKARAINEN T M, MONTOYA M, MATEU E, et al. Porcine Circovirus Type 2-Induced Interleukin-10 Modulates Recall Antigen Responses [J]. Journal of General Virology, 2015, 89(11): 760—765.

[7] TIMMUS S, FOSSUM C, BERG M. Porcine Circovirus Type 2 Replicase Binds the Capsid Protein and an Intermediate Filament-Like Protein [J]. Gen. Virol, 2016, 87(11): 315—323.

[8] 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 [J]. Journal of Virology, 2014, 13(4): 440—446.

[9] CHEUNG A K. Comparative Analysis of the Transcriptional Patterns of Pathogenic and Nonpathogenic Porcine Circoviruses [J]. Virol, 2013, 310(1): 41—49.

[10] 罗玉均, 张桂红, 陈建红, 等. 圆环病毒 2 型对 BALB/c 小鼠的感染试验研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008(10): 55—57.

- [11] ALLAN G M, ELLIS J A. Porcine Circoviruses: a Review [J]. Vet Diagn Invest, 2015, 12(4): 3—14.
- [12] RUIZ F F, VICENTE J, VIDAL D, et al. Seroprevalence of Six Reproductive Pathogens in European Wild Boar(Susscrofa) from Spain: the Effect on Wild Boar Female Reproductive Performance [J]. Theriogenology, 2016, 65(4): 731—743.
- [13] 苗岚飞, 崔尚金, 张超范, 等. 猪圆环病毒 2 型感染昆明小鼠模型的建立 [J]. 中国兽医科学, 2008, 38(6): 475—478.
- [14] SHAN Y, SUSAN C, TANJA O, et al. Development of a Reverse Transcription-PCR Assay to Detect Porcine Circovirus Type 2 Transcription as a Measure of Replication [J]. Journal of Virological Methods, 2015, 123(1): 109—112.
- [15] LIPEJ Z, SEGALES J, JEMERSIC L, et al. First Description of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in Wild Boar (Susscrofa) in Croatia and Phylogenetic Analysis of Partial PCV2 Sequences [J]. Acta Vet Hung, 2017, 55(3): 389—404.
- [16] OPRIESSNIG T, RAMAMOORTHY S, MADSON D M, et al. Differences in Virulence among Porcine Circovirus Type 2 Isolates are Unrelated to Cluster Type 2a or 2b and Prior Infection Provides Heterologous Protection [J]. Journal of General Virology, 2016, 89(5): 2482—2491.

The Pathogenicity Study of Porcine Circovirus Type 2 Jilin Strain to Mice

MIAO Li-juan^{1,2,3}, LI Jing-ji^{2,3}, LI Yi-jing¹

1. College of veterinary medicine, Northeast Agricultural University, Haerbin 150030, China;

2. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural Science and Technology University, Changchun 132101, China;

3. Key Lab of Preventive Veterinary Medicine in Jilin Province, Changchun 132100, China

Abstract: The virus strain of Panshi (PS0901), Jiaohe (JH0901), Huadian (HD0901) and Shulan (SL0901) were selected as experimental materials to study the pathogenicity of porcine circovirus type II strain Jilin. The results showed that the virus strain of Jiaohe (JH0901) and Huadian (HD0901) had obvious pathogenicity to spleen and kidney of mice.

Key words: porcine circovirus type II; Jilin strain; tropism; pathogenicity

责任编辑 夏 娟