

猪圆环病毒研究进展

李艳琴¹, 王振海², 赵东岗², 朱玉涛¹

(1.河北农业大学动物科技学院, 河北保定 071001; 2.河北省保定市畜牧水产局, 河北保定 071001)

摘要 综述了猪圆环病毒的病原特征及在流行病学、临床症状、致病机理方面的研究进展, 介绍了分子生物学诊断技术在该领域的应用。

关键词 猪圆环病毒; 研究进展

中图分类号 S858.28 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)17-07260-02

猪断奶后多系统衰竭综合征(Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS)是由猪圆环病毒2型(Porcine circovirus type 2, PCV2)引起的一种重要疾病^[1-2], PCV2往往与蓝耳病毒、细小病毒、弓形体、附红细胞体等联合感染, 并且是这些疾病发作的主要诱因。PMWS起病迅猛, 流行范围广, 发病率、死亡率高, 严重发病地区死淘率高达40%, 发病猪中约有1/2在2~8 d内死亡, 残存下来的病猪也极少康复。该病广泛流行于美国、法国、西班牙、意大利、德国、丹麦、荷兰等许多国家和地区, 给世界养猪业造成了巨大的经济损失, 引起了国内外学者的广泛关注。由于PCV2严重破坏了猪的免疫系统, 造成猪免疫功能低下, 抵抗力极弱, 一旦猪体内存在其他病毒或细菌、原虫感染, 就会暴发流行, 造成重大经济损失, 而且由于免疫系统的严重破坏, 导致各种疫苗接种应答效果差, 并且诱发其他疾病暴发。

1 病原特征

PCV在分类学上属于新的DNA圆环病毒科、圆环病毒属, 即小环状病毒属。PCV病毒粒子直径为16.5~17.0 nm, 呈20面体对称, 无囊膜, 基因组为单股环状DNA。PCV-1基因组长1 759 bp, PCV-2长1 768 bp, 二者核酸同源性在80%以下。

PCV对外界环境的抵抗力较强, 在70℃时可以存活15 min, 56℃不能将其灭活, 在酸性环境及氯仿中可以存活较长时间。PCV在原代胎猪肾细胞、恒河猴肾细胞、BHK-21细胞上不生长, PCV-1与PCV-2均可在PK-15细胞上增殖而不引起PK-15细胞产生细胞变, Stevenson等观察了感染PCV后PK-15细胞内的超微结构, 发现细胞质和细胞核中有包涵体。细胞质中包涵体数量较多, 包涵体呈卵圆形, 大小不一, 电子密度较高, 并大致分为2种类型: 一类直径0.1~0.5 nm, 无包膜; 另一类直径0.5~5.0 nm, 有包膜。Tischer等认为, PCV能在猪细胞中复制, 并且依赖细胞周期S表达的细胞蛋白, 在PK-15细胞培养物中加入d-氨基葡萄糖, 可促进感染细胞内形成包涵体, 病毒大量复制, 使含有PCV抗原的细胞数提高30%。PCV-1与PCV-2基本没有交叉反应。

2 流行病学

PCV在世界上流行的范围很广。德国某些猪群中血清阳性率高达77%~95%, 加拿大猪血清中的阳性率在26%~55%, 英国为86%, 爱尔兰达92%。我国自2000年开始有圆环病毒感染患猪的报道, 北京、河北等某些猪场发现疑似PMWS的病猪, 并从病料中分离到了PCV2病毒, 确定我国

也存在PMWS。郎洪武从北京等7个省市22个猪群采集各类猪血清样品, 采用ELISA方法检测PMWS抗体, 结果总阳性率为42.9%, 而且猪的年龄越大, PMWS的抗体阳性率越高, 确认了PCV2感染在我国猪群中存在的血清学证据。PCV主要感染猪, Tischer等^[3]报道, 在人、牛和鼠血清中也存在可与PCV发生特异性反应的低水平抗体。PCV对猪有较强易感性, 可经口腔、呼吸道感染, 其他未接种猪的同居感染率高达100%。猪感染PCV2后, 可于5~12周龄时发生PMWS, 发病率为5%~15%, 死亡率可达50%。少数怀孕母猪感染PCV后, 可经胎盘垂直感染给仔猪。感染猪可自鼻液、粪便等废物中排出病毒。该病毒在不同猪个体之间进行传播, 鸟类、啮齿动物如鼠等带毒时也会造成该病的传播。

该病发展缓慢, 猪群一次发病可持续12~18个月。Larochelle等^[4]报道, PCV2可间歇性地自公猪精液中排出, 感染公猪的精液可看作一种潜在的PCV2病毒来源。Kiupel等^[5]报道, 被PCV2感染的小鼠能否排毒尚不清楚, 但小鼠的先天性及出生后的感染现象说明, 野生小鼠可能是PCV2的宿主或成为传媒使鼠群感染。

3 致病机理

Joaguin等认为, PCV-2的感染, 对免疫系统的效应来讲似乎是一把“双刃剑”。试验证明: 一方面PCV-2和PRRSV或PPV共同感染, 表明这些病毒能刺激和激活免疫系统, 增进了PCV-2的增殖。另一方面, PMWS病猪产生严重的淋巴组织病损, 包括淋巴细胞缺失和淋巴组织的巨噬细胞浸润等, 是严重发病猪的规律性特征。Rosell等^[6]发现, 含包涵体的细胞多见于淋巴器官, 如支气管、淋巴结、肺和扁桃体中均有PCV粒子存在的证明, PCV复制的靶细胞包括单核细胞/巨噬细胞系、抗原递呈细胞(APC)、上皮细胞(肾小管上皮细胞和支气管上皮细胞)、内皮细胞、肝实质细胞和淋巴细胞。据报道, Segales等^[7]利用流式细胞计数器分析感染猪外周血液中白细胞变化, 发现单核细胞增加, T淋巴细胞(主要是CD4+)和B淋巴细胞减少, 不成熟粒细胞的密度偏低。以上表明, PCV引起了淋巴细胞凋亡, APC递呈抗原能力的减弱, 同时降低了B淋巴细胞和CD4+T细胞的机能。因此推断, PMWS感染猪对其他免疫原(如疫苗接种)不能增加有效的免疫应答, 成为该病致病机制的重要原因。

4 临床症状

猪感染PCV后主要表现为渐进性消瘦, 生长迟缓, 采食量下降, 被毛粗乱, 精神差, 有的猪出现贫血, 皮肤苍白, 个别猪出现黄疸症状, 皮肤和被毛发黄, 有相当一部分猪只出现呼吸困难、喘气, 呈腹式呼吸, 少数猪只有拉稀症状。剖检病死猪可见猪全身淋巴结水肿, 切面硬度增大, 呈苍白

作者简介 李艳琴(1963-), 女, 河北深州人, 硕士, 副教授, 从事畜牧兽医研究。

收稿日期 2008-04-07

色;肠系膜及腹股沟淋巴异常肿大;肺部呈灰褐色炎症病变,肺肿胀,坚硬或似橡皮,表面点缀有灰褐色小叶,严重病例肺泡出血;肝脏萎缩,肝小叶间结缔组织增生;脾肿大;肾水肿;盲肠和结肠黏膜充血或瘀血;心脏有轻度或中度的心肌炎。

5 分子生物学诊断技术

5.1 原位核酸分子杂交技术 原位核酸分子杂交技术简称原位杂交(in situ hybridization, ISH),是应用已知碱基顺序并带有标记物的核酸探针与组织、细胞中待检测的核酸按碱基配对的原则进行特异性结合而形成杂交体,然后再应用与标记物相对应的检测系统,通过组织化学或免疫组织化学方法在被检测的核酸原位形成带颜色的杂交信号,在显微镜或电子显微镜下进行细胞内定位。Nawagitgul 等^[8]用合成的 PCV2 ORF2 反义探针来区别 PCV1 和 PCV2。Sirinarumitr 等^[9]利用增速杂交(Rate Enhancement Hybridization, REH)缓冲系统进一步发展了原位杂交技术,该缓冲系统只需 67℃、2 h,即可检测到细胞培养物和组织中的 PCV。Kim 等^[10]利用地高辛标记的探针包埋在石蜡中的 PMWS 病料进行检测,结果发现 30 份为 PCV2 阳性,10 份为 PCV1 和 PCV2 同时阳性,并且表明 PCV1 和 PCV2 主要存在于淋巴结和脾脏巨嗜细胞中,而且多在细胞质中,偶尔在细胞核中。

5.2 间接免疫荧光试验(IIF) IIF 是一种比较特异的血清学方法,将病料接种 PK-15 细胞,用兔抗 PCV 高免血清与细胞培养物中的 PCV 反应,可对 PCV 进行检测和定型。试验时可用 PCV-1 和 PCV-2 2 种高免血清分别与 PCV 的细胞培养物反应,虽然这 2 种血清与 PCV 结合时会出现一些反应,但同型抗原与抗体反应时,血清的稀释效价要高于异型反应。

5.3 间接免疫过氧化物酶技术 将 PK-15 细胞在 96 孔微量培养板上长成单层后,加入 10 倍稀释的待检猪血清,作用一定时间后吸干洗涤,每孔加入 50 μl 1 000 倍稀释的 HRP 标记的兔抗猪 IgG,30℃ 孵育 15 min,吸干洗涤后加入 50 μl 底物溶液,然后终止反应,用显微镜读取结果,观察到棕色感染细胞即为阳性。

5.4 PCR 方法 PCR 方法是一种快速、简便、特异的诊断方法。Larochelle 等根据 PCV2 的基因序列设计出特异的 PCR 引物进行 PCR 检测,建立了特异的 PCR 方法。Kim 等建立了巢式 PCR 方法,通过试验表明,该方法可用于 PCV2

的检测。芦银华等^[11]建立了一种简单的复合 PCR 法,可对 PCV 进行检测和分型。

6 小结与展望

PCV 作为一种新发现的病毒,给养猪业带来了巨大的经济损失。尤其是近年来,很多学者相继报道该病毒能够感染牛、羊、马等动物,更是引起了极大的反响。尽管世界许多实验室对 PPV 和 PRRSV 与 PCV 在致病方面的协同机制、该病毒对其所导致的各种疾病及 PMWS 的人工复制等方面进行了大量的研究,但对其分子生物学特性、病毒对动物免疫系统的影响、致病机理等方面缺乏全面而系统的了解,相关的研究工作有待进一步深入。

参考文献

- [1] ALLAN G M, MCNEILLY F, CASSIDY J P, et al. Pathogenesis of porcine circovirus -experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material [J]. Vet Microbiol, 1995, 44: 49-64.
- [2] ALLAN G M, MEEHAN B, TODD D, et al. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes [J]. Vet Rec, 1998, 142: 467-468.
- [3] TISCHER I, RASCH R, TOCHTERMANN G, et al. Characterization of papovavirus and picornavirus like particles in permanent pig kidney cell lines [J]. Zbl Bakt Hyg1 Abt Orig A, 1974, 226: 153-167.
- [4] LAROCHELLE R, BIELANKI A, MULLER P, et al. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(12): 4629-4632.
- [5] KUIPEL M, STEVENSON G W, KANITZ L, et al. Cellular localization of porcine circovirus in postweaning pigs with chronic wasting disease [J]. Eur J Vet Pathol, 1999(5): 77-82.
- [6] ROSELL C, SEGALÉS J, PLANA DURAN J, et al. Pathological immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs [J]. J Comp Pathol, 1999, 120: 59-78.
- [7] SEGALÉS J, DOMINGO M. Post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs [J]. A review Vet Q, 2002, 24: 109-124.
- [8] NAWAGITGUL P, MOROZOV I, SIRINARUMITR T, et al. Development of probe to differentiate porcine circovirus type 1 and type 2 in vitro by in situ hybridization [J]. Vet Micro, 2000, 75(1): 83-89.
- [9] SIRINARUMITR T, MOROZOV I, NAWAGITGUL P, et al. Utilization of a rate enhancement hybridization buffer system for rapid in situ hybridization for the detection of porcine circovirus in cell culture and in tissues of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. J Vet Diagn Invest, 2000, 12(6): 562-565.
- [10] KIM J, CHAE C. Differentiation of porcine circovirus 1 and 2 in formalin-fixed, paraffin-wax-embedded tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by in situ hybridization [J]. Res Vet Sci, 2001, 70(3): 265-269.
- [11] 芦银华, 陈德胜, 戴亚斌, 等. 用复合 PCR 方法检测猪圆环病毒 [J]. 中国兽医杂志, 2001, 31(9): 829.

(上接第 7201 页)

续表 1

系列 Series	类 Classes	类别 Types	种类及类型 Species and types	系列 Series	类 Classes	类别 Types	种类及类型 Species and types
		小果型	深沟中果形中熟绿空心李 平沟中果形特晚熟绿空心李 不对称中果形特晚熟绿空心李 圆小果形特晚熟绿空心李 扁圆小果形特晚熟绿空心李 椭圆小果形特晚熟绿空心李 果尖歪小果形特晚熟绿空心李 果尖尖小果形特晚熟绿空心李				浅沟中果形特晚熟绿空心李 果尖突小果形特晚熟绿空心李 果尖平小果形特晚熟绿空心李 果尖下陷小果形特晚熟绿空心李 深沟小果形特晚熟绿空心李 浅沟小果形特晚熟绿空心李 平沟小果形特晚熟绿空心李 不对称小果形特晚熟绿空心李

参考文献

- [1] 邓中美, 何正权, 陈发菊, 等. 秭归空心李选育 [J]. 中国林副特产, 2007, 90(5): 58.