

文章编号: 0529-6579 (2000) 03-0125-03

首例肺病变型犬细小病毒的发现及防治^{*}

杨德威, 杨 林, 刘福安, 王珣章

(中山大学生物防治国家重点实验室/生物医药中心, 广东 广州 510275)

摘 要: 将在华南地区分离到的犬细小病毒(*Canine parvovirus*, CPV)致病和致死强毒株经 65℃高温处理纯化后, 得到一株新型犬小病毒株 HN-1, HN-1 基因组成部分序列测定结果显示与犬细小病毒 CPV, N 株比较有 85% 以上的同源性. 人工攻毒发现能导致犬肺病变, 为世界首例能引起肺病变的犬细小病毒的报道. 同时就该病的防治进行了有效的尝试.

关键词: 犬细小病毒; 肺病变; 防治

中图分类号: S852.65⁺9.2 文献标识码: A

犬细小病毒(*Canine parvovirus*, CPV)隶属于细小病毒科(Parvoviridae), 细小病毒属(*Parvovirus*)^[1], 1978年由 Kelly 和 Thomson 首次从患肠炎的病犬中分离得到, 然后各国病毒学家也自不同地区的患心肌炎和出血性肠炎的病犬中分离到不同强弱的犬细小病毒株^[1,2]. 犬细小病毒主要引起犬出血性腹泻和心肌炎, 并使白细胞大量减少, 在幼犬中的发病率和死亡率都很高. 犬细小病毒还经常与其它病毒, 特别是与引起肺病变的犬瘟热(*Canine distemper virus*)一起形成混合感染. 故一般将肺病变当成上述 2 种病毒共同作用的结果, 但单独由犬细小病毒引起肺病变的病例至今仍未见报道.

犬细小病毒为单链 DNA 病毒, 基因组全长 5 323 nt^[1,2], 只含有 3 个读码框, 分别编码为 VP1 (70 000~90 000)、VP2 (62 000~76 000)、VP3 (39 000~69 000), 其中 VP2 是构成衣壳蛋白的主要部分^[1,2].

1 材料与方法

1.1 材料 犬细小病毒及其混合感染病料(肝、肺、肠、心脏和肾)采自广东省中山、顺德、香港等地饲养病犬; 犬胎肾细胞(MDCK)为华南农业大学动物医学系保存; 实验用犬由广东省中山市新安第畜牧有限公司提供; Advantage-HF PCR Kit 购自 Clontech 公司; RPM 1640 培养基购自 GibcoBRL 公司; 犬细小病毒及犬瘟热病毒抗血清为中山大学昆虫研究所研制保存.

引物: 合成自上海生工公司, 用于扩增细小病毒 VP2 基因的抗原域部分, 共计约 511 bp.

Y3 : 5' CCG AAT TCC GGG TAC TTT CAA TAA TCA G3'

Y4 : 5' TTT CCC GGG AGT TGG TAT GGT TGG TTT CC3'

* 收稿日期: 1999-10-28; 作者简介: 杨德威(1966~), 男, 博士研究生, 高级兽医师.

1.2 方法

(1) 病毒的分离和纯化: 将 10 管含犬细小病毒的不同病料磨碎, 经 $2.2\ \mu\text{m}$ 孔径的滤膜过滤后, 各取 0.2 mL 接种 MDCK 细胞, 48 h 后取细胞培养上清进行 ELISA 检测. 之后将各 1.5 mL 的阳性培养液于 $65\ ^\circ\text{C}$ 水浴处理 30 min, 重复 3 次. 再各取 0.2 mL 经高温处理的培养液分别接种 MDCK 细胞和 9 日龄鸡胚, 48 h 后收集鸡胚, ELISA 检测是否含犬瘟热病毒; 3 d 后收集 MDCK 细胞及其培养上清, $-20\ ^\circ\text{C}$ 冻融 3 次, ELISA 检测是否含犬细小病毒.

(2) 攻毒试验: 用 (1) 所获犬细小病毒上清液以 1 mL/头的剂量, 对隔离饲养的健康幼犬 (2 月龄) 进行口服接种, 共接种 10 组, 每组各 10 头幼犬.

(3) 病理检测: 常规方法剖检肺部、心脏和肠道.

(4) ELISA 检测: 参照文献 [1, 3] 所述方法进行.

(5) 病毒 DNA 的制备: 参照文献 [4] 所述方法进行.

(6) PCR 扩增: 参照试剂盒说明进行, 序列测定在香港大学完成.

2 结果

(1) 病毒的分离和纯化: ELISA 检测结果显示在采集到的病料中均含有犬细小病毒, 经过 $65\ ^\circ\text{C}$ 水浴高温处理 3 次和 MDCK 细胞传代培养, ELISA 检测的结果表明分离到纯的犬细小病毒, 而对鸡胚的 ELISA 检测结果则显示没有发现犬瘟热病毒.

(2) 接种和攻毒: 纯化的犬细小病毒接种 10 组幼犬 72 h 后, 第 1、2、4、5、8、9、10 组的粪便样品中即可检测到犬细小病毒. 临床表现方面则出现体温升高、精神抑郁、脱水、呕吐、排出粘液状或带血的稀便等犬细小病毒常见症状. 剖检结果显示幼犬肺部出现大量的白红色斑块, 并伴随肠道出血和肠套. ELISA 检测均只发现细小病毒阳性, 其他病毒为阴性.

(3) PCR 扩增和序列分析: PCR 扩增获得了预期大小的 511 bp 的 DNA 片段, 序列测定显示与 CPV-N 株的 VP2 基因抗原域序列有 85% 以上的同源性. 而用该引物扩增犬瘟热病毒 DNA 的结果为阴性.

(4) 防治效果: 本文利用所获得的 CPV HN-1 株试制了强毒灭活苗和高免血清, 其中强毒灭活苗对幼犬的保护预防率高达 99% 以上, 而高免血清对各临床阶段治疗的幼犬成活高达 87% 以上.

3 讨论

本文首次报道了能引起肺病变的犬细小病毒. 由于犬细小病毒常和犬瘟热病毒混合感染幼犬, 因此通常将肺病变看成是犬瘟热病毒作用的结果, 但本文分离到的犬细小病毒 HN-1 株, 能引起幼犬肺部的明显病变. 犬瘟热病毒在 $32\ ^\circ\text{C}$ 以上的温度即可被灭活^[1], 因此在 $65\ ^\circ\text{C}$ 高温作用 3 次仍能存活的概率应为 0, 而犬细小病毒无囊膜, 不含脂质和糖类, 结构坚实紧密与绝大多数的细小病毒属病毒能耐受 $65\ ^\circ\text{C}$ 高温 30 min 而不失其感染性^[1], 同时也因此将犬细小病毒纯化出来; PCR 扩增和基因序列测定结果均显示能导致肺病变的 HN-1 株病毒与已报道的犬细小病毒 VP2 基因抗原高度同源, 而由 1978 年发现犬细小病毒至今, 犬细小病毒也由 1978 年的 CPAV2 型, 1984 年的 CPAV2a 型和 1986 年以后的 CPAV2b 型^[1, 2], 因此 HN-1 株应是一种肺病变型犬细小病毒病. 但需要指出的是, 能引起肺病变的犬细小病毒的作用机理仍不清楚. 需要作进一步的深入研究.

参考文献:

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996. 84 ~ 85, 1145 ~ 1174.
- [2] REED A P, JONES E V, MILLER T J. Nucleotide sequence and genome organization of Canine Parvovirus[J]. J Virol 1988 266 ~ 276.
- [3] 杨德威, 刘福安. 不同种类犬细小病毒疫苗在临床应用效果的检测[J]. 广东畜牧兽医科技, 2000(3): 1.
- [4] 萨姆布鲁克. 精编分子生物学实验指南[M]. 第二版. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1998. 1 ~ 68.

The First Report of Pulmonary Lesions Caused by *Canine Parvovirus* and Its Effective Control

YANG De-wei (Waisæes YEUNG)^{*}, YANG Lin, LIU Fu-an, WANG Xun-zhang

Abstract: A Virulent *Canine parvovirus* (CPV) stain showing high pathogenicity and lethality was isolated after purification by heat treatment at 65 °C during the last two years in South China. This unusual isolate, designated HN-1, could produce pulmonary lesions in artificially infected dogs, and partial nucleotide sequence of the viral genome showed over 85% homology with the CPV-N strain reported. This is the first report of a canine parvovirus capable of inducing lung lesions. Also described in this paper are attempts at effective control of the disease.

Keywords: *Canine parvovirus*; pulmonary lesions; disease control