

Latvijas Lauksaimniecības universitāte
Veterinārmedicīnas fakultāte
Prekļīniskais institūts



Mg. VM06111. Inga Pigiņka-Vjačeslavova

**AR CIRKOVĪRUSU-2 INFICĒTU SIVĒNU LIMFMEZGLU
REAKTIVITĀTE**

***LYMPH NODES REACTIVITY IN PIGLETS INFECTED BY
CIRCOVIRUS-2***

Promocijas darba KOPSAVILKUMS

Dr. vet. med. zinātniskā grāda iegūšanai

SUMMARY

of the Doctoral thesis for the scientific degree of Dr. vet. med.

Jelgava

2018

Promocijas darba zinātniskā vadītāja:
Scientific supervisor:

Dr.habil.biol., profesore, LZA korespondētājlocekle
Edīte Birģe

Promocijas darbs izstrādāts:

- LLU Veterinārmedicīnas fakultātes Prekliniskajā institūtā
- Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskajā institūtā "BIOR", Dzīvnieku slimību diagnostikas laboratorijā
- Daugavpils Universitātē, Dzīvības zinātļu un Tehnoloģiju institūta Ekoloģijas departamentā, Parazitoloģijas un histoloģijas laboratorijā

Research has been carried out at the:

- *Preclinical Institute of the Faculty of Veterinary Medicine the Latvia University of Agriculture*
- *Animal Disease Diagnostic Laboratory of Institute of Food Safety, Animal Health and Environment "BIOR"*
- *Laboratory of Parasitology and Histology Department of Ecology Daugavpils University Institute of Life sciences and technology*

Oficiālie recenzenti:

Official reviewers:

- Dr.med., RSU profesore **Modra Murovska** (Rīgas Stradiņa universitāte / *Riga Stradins University*)
- Dr.med. vet., LLU profesore **Anda Valdovska** (Latvijas Lauksaimniecības universitāte / *Latvia University of Agriculture*)
- Dr.med. vet., LVZU profesors **Alius Pockevičius** (Lietuvas Veselības Zinātļu universitāte / *Lithuanian University of Health Sciences*)

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2018. gada 19. februārī, plkst. 14:00. LLU Veterinārmedicīnas fakultātē, Jelgavā, K.Helmaļa ielā 8, A300 auditorijā
The defence of theses will take place at the LUA Faculty of Veterinary Medicine, Jelgava, K.Helmana iela 8, A300 auditorium, on the 19 February, 2018 at 14:00 p.m.

Ar promocijas darbu var iepazīties Latvijas Lauksaimniecības universitātes Fundamentālajā bibliotēkā, Jelgavā, Lielajā ielā 2 un http://llufb.llu.lv/promoc_darbi.html

The thesis is available at the Fundamental Library of the Latvia University of Agriculture, Lielā iela 2, Jelgava and http://llufb.llu.lv/promoc_darbi.html

SATURA RĀDĪTĀJS

IEVADS	5
Darba aktualitāte	5
Darba hipotēze	6
Darba mērķis	6
Darba uzdevumi	6
Darba zinātniskā novitāte	6
PERSONĪGAIS IEGULDĪJUMS	7
PĒTĪJUMU REZULTĀTU APROBĀCIJA	7
PROMOCIJAS DARBA STRUKTŪRA UN APJOMS	10
MATERIĀLI UN METODES	10
Pētījuma laiks, vieta un materiāla raksturojums	10
Pētījumā izmantotās metodes	12
Limfmezglu histoloģiskā un imūnhistokīmiskā izmeklēšana	12
Asins paraugu seroloģiskā izmeklēšana uz PCV2 antivielu klātbūtni	16
Limfmezgla paraugu bakterioloģiskā izmeklēšana	17
Parauga mikroskopiskā novērtēšana	18
Datu statistiskā apstrāde	22
PĒTĪJUMU REZULTĀTI UN DISKUSIJA	23
Cūku cirkovīrusa-2 izplatība Latvijā (ELISA analīze)	23
Sivēnu limfmezglu morfoloģiskais raksturojums ar cirkovīrusa-2 antigēnu un bez tā	26
Sivēnu limfmezglu un asīļ u izmeklēšanas rezultāti uz baktēriju, cirkovīrusa-2 antigēna un antivielu klātbūtni	31
Bakteriālās infekcijas ietekme uz limfmezglu struktūru sivēniem slimiem ar pēcatšķiršanas novājēšanas sindromu (PMWS)	34
Cirkovīrusa-2 antigēna lokalizācija limfmezglā	36
T limfocītu un B limfocītu skaita izmaiņas limfmezglas ar cirkovīrusa-2 antigēna klātbūtni un bez tā	37
Ki67 proteīnu saturošu šūnu daudzuma izmaiņas limfmezglas ar cirkovīrusa-2 antigēna klātbūtni un bez tā	43
SECINĀJUMI	46
AIZSTĀVĒŠANAI IZVIRZĀMĀS TĒZES	47
IETEIKUMI PRAKSEI	47

CONTENTS

INTRODUCTION	48
Topicality of the research.....	48
Hypothesis of the research	49
Aim of the research	49
Objectives of the research	49
Scientific novelty of the research	50
PERSONAL CONTRIBUTION	51
APPROBATION OF THE STUDY RESULTS	7
STRUCTURE AND VOLUME OF DOCTORAL THESIS	51
MATERIALS AND METHODS	52
Carry out of study, source and characteristic of samples	52
Methods used in the research	53
Histological investigation and immunohistochemistry of lymph node.....	53
Serological investigation of blood samples for the detection of PCV2 antibodies.....	56
Bacteriological investigation of the lymph node samples	57
Sample microscopic evaluation.....	58
Statistical processing of data	60
RESULTS AND DISCUSSION	62
Seroprevalence of porcine circovirus-2 in Latvia (ELISA analysis).....	62
Morphological characteristics of piglets lymph nodes with and without circovirus-2 antigen in lymph nodes	64
Pig lymph node and blood samples investigation to the bacterial infection, PCV2 antibodies and antigen detection.....	66
The effects of bacterial infections on the lymph node structure in post- weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected piglets	67
Localization of circovirus-2 antigen in the lymph node.....	68
Changes of T and B lymphocyte number in the lymph nodes with and without circovirus-2 antigen.....	69
Changes of Ki67 positive cells number in the lymph nodes with and without circovirus-2 antigen.....	71
CONCLUSIONS	74
THESIS DEFENSE	75
RECOMMENDATIONS FOR PRACTICE	75

IEVADS

Darba aktualitāte

Pirmo reizi cūku pēcatšķiršanas novājēšanas sindroma (PMWS) uzliesmojumu novēroja Kanādā 1991. gadā. Šai slimībai cēloni atrada daudz vēlāk, tikai 1998. gadā, kad no slimiem ar PMWS sivēniem izolēja cūku cirkovīrusu-2 (PCV2) (Mankertz et al., 1998; Meehan et al., 1998). Eiropas valstis slimības uzliesmojumi sākās no 90. gadu beigām, piemēram Francijā un Spānijā 1997. gadā. Bet Lietuvā un Latvijā cirkovīrusu-2 (PCV-2) pirmo reizi konstatēja 2007. gadā (Stankevicius et al., 2007).

Vīruss galvenokārt skar sivēnus 5-15 nedēļu vecumā, izraisot to bojā eju vai hronisku nīkuļošanu un novājēšanu. Līdz ar to, pēcatšķiršanas novājēšanas sindroms izraisa lielus ekonomiskos zaudējumus cūkkopībā (Segales, Domingo, 2002; Karuppannan, Opriessnig, 2017), tieši tāpēc pasaule tika uzsākti intensīvi pētījumi par PCV2 izplatību, slimības patoģenēzi, tās gaitu, morfoloģiskajām audu izmaiļām un kopumā par šīs slimības kontroli.

Izrādījās, ka PMWS apstiprināšanu aprūtina slimības nespecifiskā klīniskā aina, kā arī nespecifiskās makroskopiskās iekšējo orgānu pārmaiļas. Specifiskās izmaiļas PCV2 parādās tikai limfmezglu mikroskopiskajā struktūrā, jo šis vīruss organismā vairojas makrofāgos, kuri slimības laikā lielā daudzumā savairojas tieši limfmezglos (Rosell et al., 1999; Sanchez et al., 2003; Rodriguez-Cariño et al., 2011; Ellis, 2014). Tā rezultātā limfmezglos limfocīti „aizvietojas” ar makrofāgiem. Tas, slimiem ar PMWS sivēniem, izraisa gan celulārās, gan humorālās imunitātes traucējumus. Līdz ar to, pēcatšķiršanas multisistēmiskās novājēšanas sindroms sivēniem, tiek uzskatīts par vispārēju imūndeficīta saslimšanu (Segales et al., 2004a; Ferrari et al., 2014).

Līdz šim vēl nav noskaidrots, kāpēc klīniski slimiem ar PMWS sivēniem novēro smagus limfocītu zudumus limfoīdos audos un arī asinīs.

Zināms, ka vairāki vīrusi cilvēkiem un dzīvniekiem var izraisīt limfoīdo audu pastiprinātu apoptozi (Benedict, Banks, Ware, 2003; Irusta et al., 2003; Neumann et al., 2015). Apoptoze, kā zināms, ir programmēta šūnu nāve, kas attīstās no specifiska fermenta kaspāzes aktivizēšanās (Hengartner, 2000; Lockshin, Zakeri, 2002; Neumann et al., 2015). Tomēr izrādījies, ka apoptozei nav būtiskas ietekmes uz limfocītu daudzuma samazināšanos limfmezglos cūkām ar PCV2 (Resendes et al., 2004; Kiupel et al., 2005; Resendes et al., 2011).

Darba hipotēze

Izvirzījām hipotēzi, ka limfocītu zudums limfmezglos cūkām ar PCV2 var būt saistīts ar limfocītu dzīvescikla aizkavēšanos. Šūnu dzīvescikla aktivitāti atspoguļo kodolu proteīns Ki67. Šo proteīnu konstatē visās aktīvās šūnas fāzēs, t.i. interfāzē G1, S, G2 un mitozē. Toties šūnu „klusajā” fāzē G0 proteīnu Ki67 nenovēro nemaz.

Darba mērķis

Izpētīt limfmezglu reaktivitāti cūkām inficētām ar cirkovīrusu-2.

Darba uzdevumi

1. Noteikt Latvijas teritorijā PCV2 izplatību mājas cūkām.
2. Izpētīt limfmezglā PCV2 daudzuma saistību ar tā morfoloģiskās struktūras izmaiľām.
3. Izpētīt bakteriālās infekcijas fonu limfmezglos sivēniem inficētiem ar PCV2.
4. Noteikt bakteriālās infekcijas ietekmi uz limfmezgla morfoloģisko struktūru sivēniem ar un bez PCV2 antigēna.
5. Izvērtēt cūku cirkovīrusa-2 daudzuma ietekmi uz multinukleāro gigantisko šūnu un virusālo ieslēguma ķermel'u parādīšanos attiecīgajos limfmezglos.
6. Noteikt nobriedušo T un B limfocītu daudzumu limfmezglos sivēniem ar daļādu PCV2 daudzumu tajos.
7. Noteikt proteīna Ki67 daudzuma izmaiľas limfmezglos dzīvniekiem ar daļādu PCV2 klātbūtni tajos.
8. Izpētīt saistību starp proteīna Ki67 daudzuma izmaiľu un limfocītu daudzuma izmaiľām limfmezglos ar daļādu PCV2 antigēna daudzumu tajos.

Darba zinātniskā novitāte

1. Iegūti oriģināli dati par PCV2 izplatību mājas cūku populācijā daļādos Latvijas reģionos un daļāda lieluma saimniecībās.

2. Iegūti jauni dati par sekundārās bakteriālās infekcijas klātbūtni slimiem ar PMWS sivēniem un tās ietekmi uz limfmezglu morfoloģisko izmaiļu smaguma pakāpi.
3. Iegūti oriģināli dati par sekundārās bakteriālās infekcijas ietekmi uz multinukleāro gigantisko šūnu un virusālo ieslēguma ķermel'u parādīšanos limfmezglos slimiem ar PMWS sivēniem.
4. Iegūti jauni dati par virusālo ieslēgumu un multinukleāro gigantisko šūnu parādīšanās biežumu limfmezglos sivēniem inficētiem ar PCV2 dabiskos apstākļos.
5. Iegūti jauni dati par PCV2 ietekmi uz limfocītu proliferācijas aktivitāti.

PERSONĪGAIS IEGULDĪJUMS

1. Pētījuma plāna sastādīšana.
2. Cūkkopības saimniecību apmeklēšana, epidemioloģiskās situācijas novērtēšana pēc cūku klīniskajām pazīmēm.
3. Vadoties pēc PMWS atbilstošām makroskopiskām audu pārmaiļām, kritušo sivēnu atlasiņšana sekcijai.
4. Sivēnu līķu sekcija un paraugu atlase histoloģiskai, imūnhistokīmiskai, bakterioloģiskai un seroloģiskai izmeklēšanai.
5. Histoloģisko un imūnhistokīmisko paraugu sagatavošana un mikroskopēšana.
6. Anamnēzes datu vākšana un analīze dzīvajām cūkām, kurām tika veikta seroloģiskā izmeklēšana uz PCV2 antivielu klātbūtni.
7. Histoloģiskās, imūnhistokīmiskās, bakterioloģiskās un seroloģiskās izmeklēšanas datu analīze un statistiskā apstrāde.

PĒTĪJUMU REZULTĀTU APROBĀCIJA / APPROBATION OF THE STUDY RESULTS

Zinātniskās publikācijas un tēzes / Scientific publications and theses:

1. Pīgil'ka-Vjačeslavova I., Birģele E., Šteingolde T. (2017) Seroprevalence of porcine circovirus-2 in domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) in Latvia. *Proceedings of the Latvian academy of sciences*. Akceptēts publicēšanai.

2. Piginka-Vjaceslavova I., Birgele E. (2017) Cell proliferation activity in lymph nodes infected by porcine circovirus-2. *Proceedings of 23th international scientific conference*, Jelgava, Latvia. Akceptēts publicēšanai.
3. Piginka-Vjaceslavova I., Avsejenko J., Birgele E. (2016) Bacterial co-infection impact on the lymph nodes morphology of PMWS infected pigs. *Journal of Comparative Pathology*, 154 (1), p. 123.
4. Piginka-Vjaceslavova I., Avsejenko J., Birgele E. (2015) Bacterial co-infection of pigs with porcine circovirus-2 in Latvia. *Proceeding of the 7th European symposium of porcine health management*. Nantes, Francija, pp.241.
5. Pīgil'ka I., Birģeļa E. Porcine circovirus-2 impact on the multinuclear giant cells and virus inclusion bodies appearances in pigs lymph nodes (2012) *Veterinārmedicīnas raksti*, Jelgava, Latvia, pp.124-130.
6. Pīgil'ka I., Birģeļa E. Porcine circovirus-2 impact on the morphological sight of pig lymph nodes (2012) In: Markevica A. (eds) Research for rural development. *Proceedings of 18th international scientific conference*, Jelgava, Latvia, pp. 203-210.
7. Pīgil'ka I., Birģeļa E. Histological status of lymph nodes for circovirus-2 seropositive and seronegative pigs (2011) In: Markevica A. (eds) Research for rural development. *Proceedings of 17th international scientific conference*, Jelgava, Latvia, pp.161-165.

Pētījuma rezultāti aprobēti šādās zinātniskās konferencēs / Research results were apporobated at the following international scientific conferences:

1. Maijs 17-19, 2017 “Cell proliferation activity in lymph nodes infected by porcine circovirus-2” 23th International Scientific Conference - Research for Rural Development, Latvijas Lauksaimniecības Universitāte, Jelgava (Latvija).
2. Septembris 02-05, 2015 “ Bacterial co-infection impact on the lymph nodes morphology of PMWS infected pigs”. European Society of Veterinary Pathology meeting, Helsinki (Somija).
3. Aprīlis 22-23, 2015 „Bacterial co-infection of pigs with porcine circovirus-2 in Latvia”. 7th European symposium of porcine health management. The European Association of Porcine Health Management, Nantes (Francija).

4. Maijs 16-18, 2012 “Porcine circovirus-2 impact on the morphological sight of pig lymph nodes” 18th International Scientific Conference - Research for Rural Development, Latvijas Lauksaimniecības Universitāte, Jelgava (Latvija).
5. Novembris 22-23, 2012 “Porcine circovirus-2 impact on the multinuclear gigant cells and virus inclusion bodies appearances in pigs lymph nodes”. Veterinārmēdīcīnas zinātnes un prakses aktualitātes kongress, Latvijas Lauksaimniecības Universitāte, Jelgava (Latvija).
6. Oktobris 29, 2011 “Lymph nodes’ histological status of pigs with porcine circovirus-2”. Dzīvnieki, veselība, pārtikas higiēnas kongress, Latvijas Lauksaimniecības Universitāte, Rīga (Latvija).
7. Septembris 15-16, 2011 “Lymphocytes, macrophages, plasma and histiocytic cells amount in lymph nodes of porcine circovirus-2 seropositive and seronegative pigs”. 3nd International Veterinary Laboratory Scientific and Applied Conference “Laboratory diagnostics today and its future challenges”, Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskais institūts „BIOR”, Rīga (Latvija).
8. Maijs 18-20, 2011 “Histological status of lymph nodes for circovirus-2 seropositive and seronegative pigs” 17th International Scientific Conference - Research for Rural Development, Latvijas Lauksaimniecības Universitāte, Jelgava (Latvija).
9. Aprīlis 28-30, 2011 “Cirkovīrusu-2 izplatību cūku populācijā Latvijā” International Scientific Conference of Daugavpils University - Research and conservation of biological diversity in baltic region, Daugavpils (Latvija).
10. Maijs 19-21, 2010 “Lymph node histological status for circovirus-2 seropositive pigs” 16th International Scientific Conference - Research for Rural Development, Latvijas Lauksaimniecības Universitāte, Jelgava (Latvija).
11. Maijs 19-20, 2008 “PCV-2 investigation experience in Latvia”, Workshop Nr.3 „PCVD: Towards improved food quality and safety within new members states and associated candidate countries” – support of Sixth Framework Programme, Budapest (Ungārija).
12. Maijs 21-23, 2008 “Pigs’ lymph node histological status, presumably infected with circovirus-2”, 14th International Scientific Conference - Research for Rural Development, Jelgava (Latvija).

PROMOCIJAS DARBA STRUKTŪRA UN APJOMS

Promocijas darbs noformēts 128 lappusēs ar 62 attēliem un 33 tabulām un sastāv no anotācijas, ievada, personīgā ieguldījuma, pētījumu rezultātu aprobācijas, literatūras apskata, materiāliem un metodem, pētījumu rezultātiem, diskusijas, secinājumiem, aizstāvēšanai izvirzāmām tēzem, ieteikumiem praksei un izmantotās literatūras saraksta ar 229 literatūras avotiem.

MATERIĀLI UN METODES

Pētījuma laiks, vieta un materiāla raksturojums

Paraugu vākšana un to izmeklēšana veikta divas aktivitātēs. **Pirmajā pētniecības aktivitātē** no 2008. līdz 2011. gadam paraugus ieguvām piecās cūkkopības saimniecībās Latvijā – Latgales, Vidzemes un Kurzemes reģionā: šajā laika periodā paraugus ieguvām no trim nosacīti lielām cūku saimniecībām (ar kopējo dzīvnieku skaitu virs 7000) un no divām nosacīti vidēji lielām saimniecībām (ar kopējo dzīvnieku skaitu 1000-7000).

Visās saimniecībās sivēniem klīniski novēroja tā saucamo cūku pēcatķiršanas novājēšanas sindromam līdzīgu ainu un sivēnu krišanu. Pirms nobeigšanās sivēniem novēroja svara zudumu, caureju vai respiratoras saslimšanas, gлотādu bālumu vai ikteriskumu, kas atbilst literatūrā aprakstītajai PMWS klīniskajai ainai (Clark, 1997; Rosell et al., 1999; Segales et al., 2004a; Segales, 2012; Ellis, 2014). Pētījumam katrā saimniecībā atlasījām desmit 5-15 nedēļu vecus nobeigušos sivēnus.

Paraugu izmeklēšanas procesu veicām Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskajā institūtā "BIOR" Dzīvnieku slimību diagnostikas laboratorijā. Rezultātu analīzi un interpretāciju pamatā veicām Latvijas Lauksaimniecības universitātē, Veterinārmedicīnas fakultātē Preklīniskajā Institūtā un Daugavpils Universitātē, Dzīvības zinātļu un Tehnoloģiju institūtā, Ekoloģijas departamentā, Parazitoloģijas un histoloģijas laboratorijā.

Kopumā tika izmeklēti 42 dzīvnieki. Visi nobeigušies sivēni bija vakcinēti pret cūku respiratori reproduktīvo sindromu. Pēc sivēnu nāves divpadsmīt stundu laikā veicām sekciju, no lēmām asinis turpmākajai serologiskajai izmeklēšanai un palēmām paraugus no stingri noteiktām limfmezglu grupām – *Inn. inguinales superficiales*, *Inn. jejunales* un *Inn. tracheobronchiales* histoloģiskai, imūnhistoloģiskai (IHĢ) un bakterioloģiskai izmeklēšanai.

Inn. inguinales superficiales veido divi limfmezgli, kas lokalizējas

cirkšļu rajonā zemādā labajā un kreisajā pusē (*Inn. inguinales superficiales sinister et dexter*). *Inn. inguinales superficiales* ir relatīvi lieli un pieaugušām cūkām sasniedz 5-8 cm garumu (Brūveris, 2007), tāpēc no katra limfmezglu nolēmti trīs šķērsgriezumi ar attālumu no 0,5 līdz 1,0 cm, lai iekļautu griezumus no limfmezglu vidusdaļas un malām.

Lnn. jejunales atrodas tievās zarnas apzarnī, to skaits var sasniegt 40 limfmezglu, kas stiepjas gar visu tievo zarnu. Mēs paraugus nolēmām pa vienam limfmezglam no *Inn. jejunales* tievās zarnas sākumdaļas, vidusdaļas un beigu daļas apvidus. No katra šī limfmezgla lēmām pa vienam šķērsgriezumam.

Lnn. tracheobronchales limfmezgli novietoti pie trahejas, bronhu sākuma apvidū. Izšķir *Inn. tracheobronchales dextri*, *sinistri* un *medii*. Cūkām papildus ir *Inn. tracheobronchales craniales*, kas lokalizējas tuvu *Inn. tracheobronchales dextri* un vizuāli ir grūti saskatāms, tāpēc pētījumam atlasīti tikai trīs limfmezgli – *Inn. tracheobronchales dextri*, *sinistri* un *medii*. Šo limfmezglu garums ir relatīvi neliels, pieaugušām cūkām tas ir apmēram 0,3-3,5 cm (Brūveris, 2007), tāpēc no katra atlasītā *Inn. tracheobronchales* izmeklēšanai palēmts tikai pa vienam šķērsgriezumam.

Kopumā no 42 sivēniem pētījumā iegūti un izmeklēti 336 limfmezgli, t.i., katram dzīvniekam divi *Inn. inguinales superficiales*, trīs *Inn. tracheobronchales* un trīs *Inn. jejunales*, kopumā 504 limfmezglu šķērsgriezumi.

Saskaņā ar promocijas darbā izvirzītajiem uzdevumiem, limfmezglu paraugu histologiskās un imūnhistoķimiskās izmeklēšanas rezultātus izmantojām PCV2-antigēna daudzuma noteikšanai limfmezglā, vīrusa lokalizācijas vietas noteikšanai limfmezglā, kā arī limfmezgla morfoloģiskā stāvokļa noteikšanai.

Otrajā pētniecības aktivitātē no 2006. līdz 2016. gadam izmeklējumi veikti, lai noskaidrotu PCV2 izplatību Latvijas teritorijā. Šajā pētījuma aktivitātē kopumā seroloģiski izmeklēti ZI „BIOR” uzraudzībā iesūtītie 963 mājas cūku asins paraugi, kas lēmti no dzīvām cūkām. Paraugi tika saļemti no 58 dažādu Latvijas reģionu saimniecībām – no deviļām nosacīti loti lielām cūku saimniecībām (ar kopējo dzīvnieku skaitu virs 5001), deviļām nosacīti lielām cūku saimniecībām (ar kopējo dzīvnieku skaitu 1001-5000), no astoļām nosacīti vidēji lielām saimniecībām (ar kopējo dzīvnieku skaitu 101-1000), 14 nosacīti mazām cūku saimniecībām (ar kopējo dzīvnieku skaitu 11-100) un 18 nosacīti loti mazām cūku saimniecībām (ar kopējo dzīvnieku skaitu līdz 10) (1. tabula). Asins paraugi tika nolēmti no dažāda vecuma un dzimuma klīniski slimām cūkām.

1. tabula / Table 1.

Dažāda lieluma cūku saimniecību skaits, kur veica dzīvnieku izmeklēšanu uz PCV2 antivielu klātbūtni /

Number of pig farms where animals were investigated to the presence of PCV2 antibodies

Saimniecības lielums / Farms scale	Ļoti maza / Very small	Maza / Small	Vidēja/ Medium	Liela / Large	Ļoti liela / Huge
Cūku saimniecību skaits Latvijā 01.01.2017. (dati no Lauksaimniecības datu centra, Publiskās datu bāzes) / Number of pig farms in Latvia at 01.01.2017 (data from Agricultural Data Centre, Public data base)	4831	579	45	21	20
Cūku saimniecību skaits, kur veica dzīvnieku izmeklēšanu uz PCV2 antivielu klātbūtni / Number of pig farms where animals were investigated to the PCV2 antibodies	18	14	8	9	9
Cūku saimniecību daudzums procentos, kur veica dzīvnieku izmeklēšanu uz PCV2 antivielu klātbūtni / Number of pig farms where animals were investigated to the PCV2 antibodies in %	0,4	2,4	17,8	42,9	45,0

Pētījumā izmantotās metodes

Limfmezglu histoloģiskā un imūnhistoķīmiskā izmeklēšana

Vispirms no katras limfmezgla parauga ($n=336$) tika sagatavoti 504 parafīna bloki turpmākai histoloģisko un imūnhistoķīmisko preparātu pagatavošanai. Audu paraugi sagatavoti un krāsoti ar klasiskām histoloģijas un imūnhistoķīmijas metodēm uz PCV2 antigēna klātbūtni, kas adaptētas un validētas BIOR institūta Dzīvnieku slimību diagnostikas laboratorijā. Metoņu validācijai tika izmantoti PCV2 antigēna pozitīvi un negatīvi references audu paraugi parafīna blokos un nokrāsotos priekšmetstiklī. Minētie references audu paraugi tika saļemti 2007. gadā no Polijas, Pulavas Nacionālā Veterināri Pētnieciskā Institūta.

Paraugu sagatavošana veikta pēc vispārpieļemtās metodikas. Tajā ietilpst audu fiksācija, atūdeļošana un attaukošana, ieguldīšana parafīna blokos un griezumu sagatavošana.

Cūku limfmezglus histoloģiskai un imūnhistoķīmiskai izmeklēšanai fiksējām 10% buferētā neutrālā formalīna šķidumā. Šis šķidums ir viens no visplašāk izmantotiem fiksācijas šķidumiem (Bancroft, Gamble, 2007). Tā pH ir apmēram 6,8. Vienā litrā fiksācijas šķiduma ir 100 ml 36-38 % formaldehīda, 900 ml destilēta ūdens, 4 g monobāzikā nātrija fosfāta ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) un 6,5 g dibāzikā nātrija fosfāta (Na_2HPO_4). Pilnīgai audu fiksācijai paraugu fiksācijas šķidumā nepieciešams izturēt 24-30 stundas istabas temperatūrā, turklāt limfmezglu parauga biezums nav lielisks par 5 mm (Boensch, 2001; Singh, 2003; Bancroft, Gamble 2007). Paraugu fiksācijas laiks tika stingri ievērots, jo ilgstoša (vairāku dienu) audu fiksācija izraisa proteīna denaturāciju, kas izmaina imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas rezultātus (Boensch, 2001; Bancroft, Gamble, 2007).

Tālāk limfmezglu paraugu atūdeļošanai un attaukošanai izmantojām Vācijā ražotu audu procesoru *Leica TP1020*, kura automātiskajā režīmā audu paraugi secīgi 1-2 stundas tika izturēti ūdensvada krāna ūdenī, „spiritu rindā”, ksilolā un šķidrā parafīnā. Kā zināms, ūdens izskalo no parauga formalīna šķidumu. Tālāk limfmezglu audi tika pārvietoti spiritu rindā, secīgi sākot no 70%, uz 80%, 96% etanolu un trim 100 % denaturēta spirta etapiem. Pierādīts, ka parauga izturēšana spiritu šķidumā no zemākas uz augstāku koncentrāciju ir nepieciešama, lai atūdeļošanas un attaukošanas procesa gaitā izslēgtu audu sadalīšanos. Pēc tam sekoja parauga „tīrišana” ksilolā, kas labi izvada spiritus un nodrošina vieglāku parafīna uzsūkšanu audos (Singh, 2003; Bancroft, Gamble, 2007). Mēs savā darbā audu paraugus izturējām divos ksilola šķidrumos un tālāk tie tika pārvietoti divās tvertnēs ar šķidru parafīnu.

Ar Vācijā ražotu mikrotomu *Leica RM 2255* parafīna preparātus sagriezām 4 µm biezos griezumos. No katras limfmezglas parauga tika gatavoti vismaz pieci griezumi:

1. Viens griezums tika uzlikts uz parastā priekšmetstikliņa turpmākai histoloģiskai krāsošanai, to tā vējām pie +58°C, 20 minūtes Vācijā ražotā *Binder 140KB 53* termostatā. Tālāk priekšmetstikliņš ar paraugu tika apstrādāts ar ksilolu un spirta rindu (sākot no 100% denaturēta spirta, tad 96% etanola, 90% un 70% etanola etapi), lai attaukotu un nolemtu parafīnu. Tālāk krāsojām ar hematoksilīnu un eozīnu, lai padarītu šūnas un tās struktūras redzamas. Tad paraugi tika dzidrināti ar 96% spiritu un ksilolu. Beigās uzlikām līmi ar segstikliņu un novērtējām limfmezglu vispārējo morfoloģisko stāvokli.
2. Četri griezumi no katras limfmezglas tika gatavoti turpmākajām imūnhistoķīmiskajām reakcijām. Šie griezumi tika uzlikti uz speciāliem

elektrostatiski uzlādētiem priekšmetstikliem *SuperfrostPlus* (*Menzel-Glasser*, Vācija) un tālāk tā vēti +37°C 15 stundas iepriekš minētajā termostatā *Binder 140KB* 53. Vienu griezumu imūnhistoķīmiski krāsojām, lai noteiktu PCV2 antigēnu, otru – T limfocītu noteikšanai ar raksturīgo CD3 virsmas proteīnu; un trešo – imūnhistoķīmiskos krāsojumus izmantojām B limfocītu identifikācijai – ar CD79α virsmas proteīnu. Ceturto limfmezgla griezumu krāsojām, lai imūnhistoķīmiski noteiktu Ki67 kodolu proteīnu, kas raksturo šūnu dzīvescikla aktivitāti.

Imūnhistoķīmiskā reakcija PCV2 antigēna noteikšanai. Vispirms vienu histoloģisko preparātu no katras limfmezgla krāsojām uz specifisko PCV2 antigēnu klātbūtni, izmantojot avidīna-biotīna-peroksidāzes imūnhistoķīmisko metodi (Szczotka, Stadejek, Pejsak, 2011). Šī PCV-2 antigēna klātbūtnes noteikšanas metode tiek uzskatīta par vienu no labākajām izmeklēšanas metodēm, jo tās jutīgums ir līdzvērtīgs polimerāzes kēdes reakcijai (PCR) un *in situ hybridization* metodei (McNeilly et al., 1999; Ha, Jung, Chae, 2005; Szczotka, Stadejek, Pejsak, 2011). Kaut gan daži autori uzskata, ka šī metode var uzrādīt negatīvu reakciju gadījumos ar ļoti zemu PCV2 koncentrāciju audos (Kim, Chae, 2003; Khaiseb et al., 2011). PCV2 antigēna imūnhistoķīmiskā vizualizācija parafīna griezumos dod iespēju noteikt precīzu PCV2 antigēna lokalizāciju audos, kas nav iespējams ar PCR (Ha, Jung, Chae, 2005; Khaiseb et al., 2011). Turklat, salīdzinājumā ar citām minētām metodēm, šī ir lētākā un ātrākā PCV2 antigēna klātbūtnes noteikšana (Szczotka, Stadejek, Pejsak, 2011). Tādēļ mēs savā darbā izvēlējāmies PCV2 klātbūtni limfmezglos noteikt tieši ar avidīna-biotīna-peroksidāzes imūnhistoķīmisko metodi.

Vienlaicīgi ar pētījumā iekļautajiem preparātiem uz PCV2 antigēna klātbūtni krāsojām arī references kontroles pozitīvo un negatīvo paraugu. Pēc deparafinizācijas un rehidratācijas ar ksilolu un krītošas koncentrācijas etanoliem, preparātus izturējām 3% ūdeļraņa peroksidā 30 minūtes – lai paraugā bloķētu endogēno peroksidāzi. Antigēna „atkailināšanai” izmantojām enzīmu proteināzi K, kas izšķidināta 1:50 Tris-bufera šķidumā (TBS, pH=7,55), kurā preparātus izturējām 3 minūtes. Primāro PCV-2 monoklonālo antivielu (*Ingenasa 36A9*), atšķaidītu 1:250 ar TBS un albumīnu, uzlikām uz preparāta un inkubējām to +4°C temperatūrā 15 stundas. Kā sekundāro antivielu izmantojām biotinizēto poliklonālo kazas anti-peles imunoglobulinu (*Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulin Biotinylated*), ko atšķaidījām ar TBS 1:200 un preparātus izturējām 1 stundu istabas temperatūrā. Tad preparātiem uzpilinājām avidīna peroksidāzes konjugāta reāgentu komplektu un turējām tos divas stundas istabas temperatūrā. Tālāk preparātus apstrādājām ar hromogēn-substrātu (AEC) un nokrāsojām ar hematoksilīnu, noskalojām destilētā ūdenī un uzlikām līmi ar segstikliu. Imūnhistoķīmiskajā krāsojumā PCV2 antigēns vizualizējās kā viendabīgas granulas brūnā krāsā, dažādā lielumā šūnu citoplazmā vai starpšūnu telpā.

Imūnhistoķīmiskās reakcijas uz T limfocītiem un B limfocītu diferenciāciju, un šunu dzīvescikla aktivitātes proteīnu noteikšanu. Pārējos trīs preparātus no katra limfmezgla krāsojām ar imūnhistoķīmisko metodi (IHĶ), lai katrā preparātā vizualizētu vienu noteiktu specifisku proteīnu. Šai IHĶ izmantojām vienādu kopējo izmeklēšanas procedūru (protokolu), kurā mainījām tikai atbilstošās primārās antivielas – CD3 virsmas proteīna vizualizācijai (specifisks T limfocītu proteīns) un CD79 α virsmas proteīna vizualizācijai (kas ir raksturīgs B limfocītu proteīns), kā arī Ki67 kodola proteīna vizualizācijai (specifisks proteīns šunu dzīvescikla aktivitātes fāzēm).

Minētai izmeklēšanas procedūrai pielietojām Dako EnVision®+ System-HRP reāģēntu komplektu, K4007 (ražots Dānijā), kas balstās uz HRP (angl. *horseradish peroxidase*) markēta polimēra. Pēc deparafinizācijas un rehidratācijas ar ksilolu un krītošas koncentrācijas etanoliem, audu preparātus skalojām bufera šķīdumā Dako EnVision™ FLEX Wash Buffer (K8007). Antigēna „atkailināšanai” izmantojām mikroviļ'u krāsni, kur preparātus inkubējām 15 minūtes ar 350 W un 7 minūtes ar 750 W. Tad preparātus izturējām 3% üdeļraža peroksīdā 10 minūtes, kas paraugā blokē endogēno peroksidāzi. Tālāk preparātam sekoja primāro antivielu aplikācija istabas temperatūrā vienu stundu. Atgādinām, ka no katra limfmezgla paralēli krāsojām trīs preparātus, lai katrā preparātā vizualizētu vienu noteiktu specifisko proteīnu. Šajā etapā trim griezumiem no katra limfmezgla pievienojām īpašu primāro antivielu (no *Dako* firmas):

1. Vienam izmantojām primāro antivielu *Monoclonal Mouse Anti-Rat Ki-67 Antigen, Clone MIB-5*, uz Ki67 proteīna klātbūtni (specifisks proteīns šunu dzīvescikla aktivitātes fāzēm) (Polaček et al., 2007; Rekiel et al., 2010; Debeer et al., 2013).
2. Otram izmantojām primāro antivielu *Monoclonal Mouse Anti-Human CD3, Clone F7.2.38*, uz CD3 virsmas proteīnu klātbūtni (specifisks T limfocītu proteīns) (Polaček et al., 2007; García-Nicolás et al., 2015).
3. Trešajam griezumam uz priekšmetstikliņa pielietojām primāro antivielu *Monoclonal Mouse Anti-Human CD79 α , Clone JCB117* uz CD79 α virsmas proteīnu klātbūtni (specifisks B limfocītu proteīns) (Polaček et al., 2007; Debeer et al., 2013; García-Nicolás et al., 2015).

Jāatzīmē, ka visas primārās antivielas ir ražotas cilvēku proteīnu vizualizācijai, bet pētījumi pierāda, kas primārās antivielas cilvēku proteīnu vizualizācijai, īpaši T un B limfocītu, nokrāso arī cūku atbilstošos proteīnus (Polaček et al., 2007; Cino-Ozuna et al., 2012; García-Nicolás et al., 2015). Tāpēc bieži cūku specifisko proteīnu vizualizācijai izmanto cilvēkiem ražotās primārās antivielas (Rekiel et al., 2010; Debeer et al., 2013).

Primāro antivielu noskalojām ar jau minēto bufera šķīdumu Dako

EnVision™ FLEX Wash Buffer (K8007). Tālāk visiem preparātiem no katra limfmezglā izmantojām vienādas reaģētu aplikācijas. Preparātus izturējām 45 minūtes istabas temperatūrā Dako EnVision polimērā-HRP, kas ir konjugēts ar sekundāro antivielu *Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins*. Dako EnVision polimērs-HRP netika atšķaidīts. Visbeidzot, noskalojot preparātus ar jau minēto bufera šķīdumu, uzpilinājām hromogēn-substrātu (DAB), tad nokrāsojām ar hematoksilīnu, noskalojām destilētā ūdenī un uzlikām līmi ar segstikliļu. Imūnhistokīmiskajā krāsojumā CD3 un CD79 α proteīnu pozitīvas šūnas vizualizējās ar brūnu šūnas membrānu. Imūnhistokīmiskajā krāsojumā Ki67 proteīnu pozitīvas šūnas vizualizējās ar brūnu kodolu.

Asins paraugu seroloģiskā izmeklēšana uz PCV2 antivielu klātbūtni

Visus mājas cūku asins seruma paraugus (963 asins paraugi no dzīvām cūkām un 42 paraugi no kritušiem sivēniem) izmeklējām uz PCV2 antivielu klātbūtni ar bloķējošo ELISA *Synbiotics, Serelisa PCV2 Ab Mono Blocking* komerciālo diagnostisko komplektu (ražots Francijā). Katram izmeklējumam pielietojām arī pozitīvo un negatīvo kontroli, kas attiecīgi bija ieklauta komerciālajā komplektā. Cūku asins serumu atšķaidījām ar parauga atšķaidītāju līdz 1:100 un ievietojām īpašā mikrotitrētā plates iedobē, kas ir pārklāta ar anti-PCV2 antivielām. Tad paraugu izturējām vienu stundu + 37°C mikroplates inkubatorā *Labsystems iEMS Incubator/Shaker* (ražots Somijā).

Tālāk no mikrotitrētās plates iedobēm paraugu skalojām nost ar speciālas iekārtas palīdzību – Francijā ražoto *Bio-Rad PW41* ELISA mikroplašu mazgātāju. Šo mazgāšanas sistēmu izmantojām pēc katras nākošās reaģenta aplikācijas.

Pēc tam paraugam pievienojām 100 µl konjugātu anti-PCV2 Mab ar peroksodāzi (1:100) un izturējām vienu stundu + 37°C mikroplašu inkubatorā. Tad pievienojām 100 µl buferizētu peroksidāzes substrātu un izturējām 20 minūtes +20°C mikroplašu inkubatorā. Reakciju apstādinājām ar 50 µl Stop šķīdumu. Izmeklētā parauga optisko blīvumu (OD) izmērījām ar aparātu – *monochromatic ELISA reader ThermoLabsystems Multiskan Ascent* (ražots Somijā), izmantojot 450 nm filtru.

PCV2 antivielu klātbūtnē (S/N) bija izteikts ar optisko blīvumu un aprēķinats pēc formulas: parauga OD / negatīvā parauga OD. Tieši S/N radītājs norada uz seroloģiskās izmeklēšanas rezultāta interpretāciju. Izmantotajā diagnostiskajā komplektā ir noteikta tā saucamā *Cut off* robeža. *Cut-off* skaitlis dod iespēju izreķināto S/N radītāju novērtēt kā pozitīvu, negatīvu vai aizdomīgu.

Ja S/N radītājs ir mazāks par *cut off* robežu, tāds paraugs ir seropozitīvs uz PCV2. Ja S/N radītājs ir lielāks par *cut off* robežu – paraugs ir PCV2 seronegatīvs. Izmeklēšanas gaitā diagnostikuma rāt otājs vairākas reizes mainīja *cut off* robežas. No 2006. g. līdz 2008. g. bija divas *cut off* robežas: zema – ar S/N vērtību 0,15 un augsta – ar S/N vērtību 0,2. Tātad izmeklētie paraugi ar S/N radītāju $\leq 0,15$ ir PCV2 seropozitīvi, paraugi ar S/N radītāju $\geq 0,2$ ir PCV2 seronegatīvi, bet paraugi ar S/N radītāju no 0,15 līdz 0,2 ir PCV2 seroaizdomīgi. No 2008. g. *cut off* robeža bija tikai viena, sadalot visus paraugus uz PCV2 seropozitīviem vai seronegatīviem. 2008.g. *cut off* robeža bija ar S/N vērtību 0,5. 2010.g. vidū *cut off* robeža bija nomainīta uz S/N vērtību 0,4.

Limfmezglu parauga bakterioloģiskā izmeklēšana

Lēmot vērā, ka pēcatķiršanas novājēšanas sindroms sivēniem ir multisistēmiska saslimšana, tā tiek uzskatīta arī par vispārēju imūnundeficītu saslimšanu (Segales et al., 2004a; Ferrari et al., 2014), turklāt sivēniem ar PMWS parasti pievienojas viena vai vairākas sekundārās infekcijas (Chae, 2004; Gu et al., 2014; Opriessnig et al., 2017). Dabīgos apstākļos cūku cirkovīrus-2 organismu pārsvarā ietekmē kopā ar citu vīrusu un baktēriju izraisītajām infekcijām (Albina et al., 2001; Bolin et al., 2001; Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2002; Okuda et al., 2003; Hasslung et al., 2005; Ellis, 2014). Tikai 15% PMWS gadījumos sivēniem netiek novērota sekundārās infekcijas pievienošanās (Kim et al., 2002), tāpēc, saskaņā ar darba uzdevumiem, mēs visiem kritušajiem sivēniem veicām limfmezglu bakterioloģisko izmeklēšanu, lai noteiktu sekundārās bakterioloģiskās infekcijas sastopamības biežumu sivēniem slimiem ar PMWS, izpētiņu bakteriālo fonu limfmezglos ar PCV2 inficētiem sivēniem, ka arī novērtētu bakteriālās infekcijas ietekmi uz limfmezgla struktūru sivēniem slimiem ar PMWS.

Sekcijas laikā no katras sivēna ($n=42$) sterilos apstākļos nolemts paraugs no diviem *Inn. inguinales superficiales*, trim *Inn. tracheobronchiales* un trim *Inn. jejunales* tālākai bakterioloģiskai izmeklēšanai. Katrs paraugs tika izmeklēts paralēli ar trim diagnostiskām metodēm: natīvā nospieduztriepes mikroskopija, uzsējums uz barotnēm un bioraudze.

Natīvā nospieduztriepes mikroskopija. No katras limfmezglu parauga gatavojām divas nospieduztriepes. Sākumā limfmezgla virsmu piededzinājām ar špāteli; ar sterilām grieznēm vai sterilu skalpeli piededzinājuma vietā izdarījām griezumu un izgriezām audu gabaliļu. Nospiedumu preparātus gatavojām tūlīt pēc audu gabaliļa izgriešanas, ar svaigi griezto virsmu pieskaroties sterīlam priekšmetstikliņam. Pēc tam priekšmetstikliņu turējām ar uztriopi uz augšu un 3-4 reizes izvilkām caur liesmu, lai nofiksētu uztriopi.

Tālāk krāsojām ar metilēnzo un mikroskopējām.

Uzsējums uz barotnēm. No katra sivēna (n=42) noļemtā limfmezglu parauga veicām uzsējumu vienlaicīgi uz sešām barotnēm (ražots *Biolife*, Itālija): Asins agara, Barojošā agara, EMB agara, XLD agara, MacConkey agara un Brain Heart Infusion agara ar asinīm. Minētās barotnes izvēlētas ar nolūku, lai varētu kultivēt maksimāli plašu baktēriju spektru, tādu, kurš visbiežāk izraisa saslimšanu cūkām (Markey et al., 2013). Katru limfmezglu nogrieza ar sterilām šķērēm un ar nogriezto virsmu pieskārāmies pie barotnes virsmas, atstājot nospiedumu. Uzsējumus inkubējām +37°C° no 24 līdz 72 stundām. Jāatzīmē, ka uzsējumiem uz barotnes Brain Heart Infusion agara tika nodrošināti īpaši inkubācijas apstākļi, jo tās tika turētas anaerobā vidē. Izolēto baktēriju tūrkultūru krāsojām pēc Grama metodes un mikroskopējām. Lai precīzi identificētu baktērijas tipu, attiecīgo baktēriju tūrkultūru pārbaudījām ar papildus bioķīmiskiem testiem (*API testi*, *BioMerieux* (Francija) un *BBL crystal testi*, *Becton Dickinson* (ASV)).

Bioraudze. No katra dzīvnieka limfmezglu paraugus sagriezām ar šķērēm sīkos gabaliņos, pievienojām fizioloģisko šķīdumu 1:10 un ievietojām maisīšanas aparātā *Stomacher*, lai pagatavotu emulsiju, no kuras 0,5 ml injicējām divām baltajām laboratorijas pelēm zemādā. Ja peles desmit dienu laikā pēc injekcijas nobeidzās, tad paraugus no peles iekšējiem orgāniem izmeklējām ar uzsējumu uz barotnēm un ar naīvās nospieduztriepes mikroskopijas metodi. Bioraudzi veicām pēc akreditētās BIOR metodes DC-RI-M-323.

Parauga mikroskopiskā novērtēšana

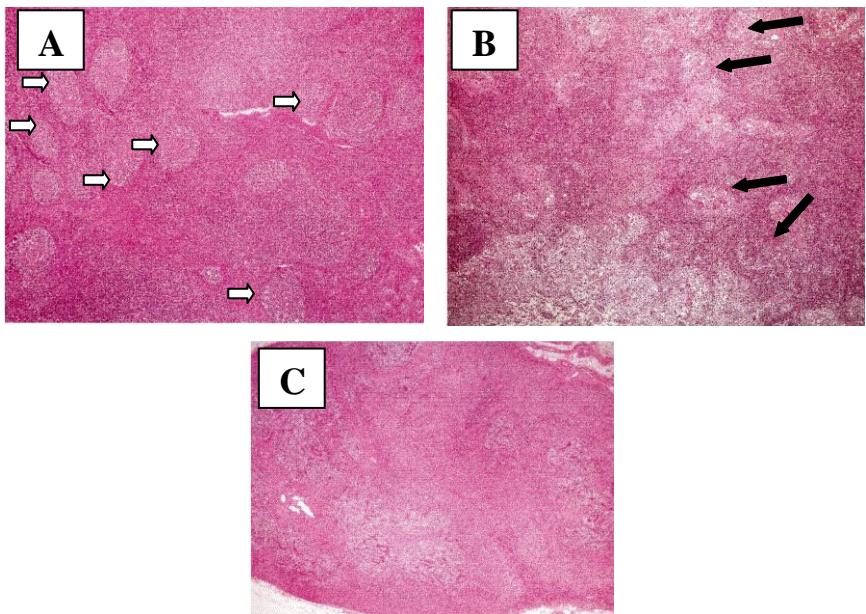
Preparātus analizējām Nicon gaismas mikroskopā Latvijas Lauksaimniecības universitātes, Veterinārmedicīnas fakultātes Preklīniskajā Institūtā un *Zeissa* gaismas mikroskopā Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskajā institūtā "BIOR" Dzīvnieku slimību diagnostikas laboratorijā.

Vispirms analizējām limfmezgla preparātus krāsotus ar hematoksilīnu un eozīnu, lai novērtētu limfmezgla vispārējo morfoloģisko stāvokli.

Katrā histoloģiskajā preparātā izvērtējām trīs limfmezgla struktūras parametrus, kuru izmaiņas ir vispārpielēmts izteikt ballēs no 0 līdz 3 (Opriessing et al., 2004):

- folikulu vizuālais izskats (0 – izmaiļu nav, 1 – folikulu vizuālais izskats nedaudz izplūdis, 2 – folikulu struktūra vāji saskatāma, 3 – folikuli vispār nav saskatāmi), 1. attēls;

- limfocītu daudzuma samazināšanās limfmezglā kopumā (0 – izmaiļu nav, 1 – limfocītu daudzums nedaudz samazināts, 2 – limfocītu daudzums vidēji samazināts, 3 – novēro ļoti lielu limfocītu zudumu), 2. attēls;
- histiocītu daudzums (0 – histiocītu preparātā nav, 1 – konstatētas atsevišķas šūnas, 2 – vidēji daudz histiocītu, 3 – histiocītu ļoti daudz).

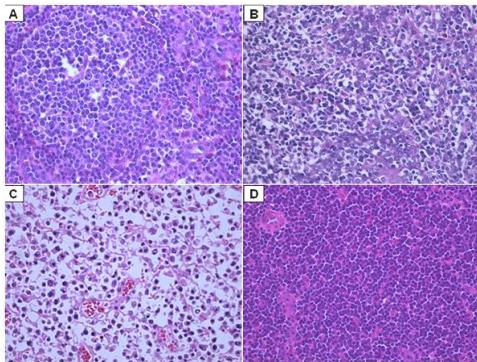


1.att. **Limfmezglu folikulu izskata novērtējums** (Darwiche et al., 2002)

A – vesela dzīvnieka limfmezglu struktūra ar labi vizualizētiem folikuliem, kas norādīti ar bultiņām (0 balles). B – folikulu struktūra vāji saskatāma (2 balles). C – folikuli vispār nav saskatāmi (3 balles)

Fig.1. Evaluation of the follicle structure in lymph nodes (Darwiche et al., 2002)

A – health animal lymph node without changes in the follicle structure, this is indicated by arrows (0 score). B – follicle structure poorly visualized (2 score). C – loss of the lymphoid follicle structure (3 score)



2.att. **Limfmezglu limfocītu daudzuma novērtējums** (Guo et al., 2012)

A – limfocītu daudzums nedaudz samazināts (1 balle). B – limfocītu daudzums vidēji samazināts (2 balles). C – novēro ļoti lielu limfocītu zudumu (3 balles). D – izmaiļu nav (0 balles)

Fig.2. Evaluation of lymphocyte number in lymph nodes (Guo et al., 2012)

A – a mild amount of lymphocyte depletion (1 score), B – a moderate amount of lymphocyte depletion (2 score), C – a severe amount of lymphocyte depletion (3 score), D – normal, no changes (0 score)

Katrā histoloģiskajā preparātā novērtējām arī rādītājus, kuri papildus liecina par PCV2 klātbūtni – multinuklearās gigantiskās šūnas un PCV2 vīrusa citoplazmatisko ieslēguma ķermel'u klātbūtnē. Tās novērtējām daļādajās limfmezglas struktūrās – limfmezglas kortikālajā, parakortikālajā, un medulārajā slānī, kā arī subkapsulāros un trabekulāros sīnusos. Katrā limfmezglas reģionā izmeklējām 10 mikroskopā redzeslaukus ar palielinājumu x200.

Tālāk analizējām imūnhistoķīmiskos preparātus krāsotus uz PCV2 antigēna klātbūtni. Imūnhistoķīmiskajā krāsojumā PCV2 antigēns vizualizējās kā viendabīgas granulas brūnā krāsā, daļādā lielumā šūnu citoplazmā vai starpšūnu telpā. Izvērtējumu veicām pēc vispārielpēmtās sistēmas, kurā PCV2 antigēna daudzums izvērtēts plusu sistēmā:

- ja PCV2 antigēna klātbūtni novērojām mazāk nekā 10% folikulu (Opriessnig, Meng, Halbur, 2007) vai limfmezglu parenhīmas, tādu PCV2 antigēna daudzumu uzskatījām par nelielu (+);
- ja PCV2 antigēna klātbūtni novērojām no 10% līdz 50% folikulu (Opriessnig, Meng, Halbur, 2007) vai limfmezglu parenhīmas, tādu PCV2 antigēna daudzumu uzskatījām par vidēju (++);
- ja PCV2 antigēna klātbūtni novērojām vairāk nekā 50% folikulu (Opriessnig, Meng, Halbur, 2007) vai limfmezglu parenhīmas, tādu

PCV2 antigēna daudzumu uzskatījām kā lielu (+++).

Papildus tam PCV2 antigēna daudzumu noteicām arī procentuāli, izmantojot datorprogrammu *Pannoramic DensitoQuant* (3DHISTECH), novērtējot procentuālo limfmezgla laukumu ar PCV2 antigēna klātbūtni. Šo analīzi mēs veicām Daugavpils Universitātē, Dzīvības zinātņu un Tehnoloģiju institūtā, Ekoloģijas departamentā, Parazitoloģijas un histoloģijas laboratorijā. Katrā imūnhistokīmiskajā preparātā novērtējām PCV2 antigēna daudzumu daļādos limfmezgla slāļos – folikulos, parakortikālajā slānī folikulu apvidū, parakortikālajā slānī sinusu apvidū un limfmezgla medulārajā slānī. Katrā limfmezgla slānī izmeklējām piecus mikroskopā redzeslaukus 200 μm x 200 μm lielumā. Imūnhistokīmiski krāsota parauga analīzei mūsdienās plāsi izmanto datorprogrammas, kas paātrina un atvieglo parauga analīzi (Tuominen et al., 2010; Schuffler et al., 2013).

Visbeidzot analizējām imūnhistokīmiskos preparātus krāsotus uz CD3 virsmas proteīnu klātbūtni (specifisks T limfocītu proteīns), uz CD79 α virsmas proteīnu klātbūtni (specifiskie B limfocītu proteīni), kā arī Ki67 kodolu proteīna klātbūtni (specifisks proteīns šūnu dzīvescikla aktivitātes fāzēm). Imūnhistokīmiskajā krāsojumā CD3 un CD79 α proteīnu pozitīvas šūnas vizualizējās ar brūnu šūnas membrānu. Imūnhistokīmiskajā krāsojumā Ki67 proteīnu pozitīvas šūnas vizualizējās ar brūnu kodolu.

Apkopojoj literatūras datus konstatējām, ka šobrīd šūnu skaitīšana un interpretācija imūnhistokīmiski krāsotā paraugā ir viena no sarežģītākajām un diskutējamām tēmām (Fedchenko, Reifenrath, 2014). Nav vienādas skaitīšanas un preparāta analīzes sistēmas. Katrs patologs, balstoties uz savu individuālo pieredzi, izvēlas piemērotāko šūnu analīzes un skaitīšanas tehniku. Pētnieki pārsvarā iesaka izmantot vienkāršākas un viegli saprotamas skaitīšanas sistēmas (Fedchenko, Reifenrath, 2014). Tāpēc savā darbā CD3, CD79 α un Ki67 proteīna analīzei izmantojām literatūrā vienu no biežāk aprakstītajām skaitīšanas metodēm. Tā ir kvantitatīva imūnhistokīmiski pozitīvo šūnu skaitīšana, uz kopējo šūnu daudzumu, vienā izmeklējām audu paraugā (Louis et al., 1991; Muskhelishvili et al., 2003; Bologna-Molina et al., 2011; Fedchenko, Reifenrath, 2014). Katrā imūnhistokīmiskajā preparātā novērtējām CD3, CD79 α un Ki67 proteīna daudzumu daļādos limfmezgla slāļos – folikulos, parakortikālajā slānī folikulu apvidū, parakortikālajā slānī sinusu apvidū un limfmezgla medulārajā slānī. Katrā paraugā un katrā limfmezgla slānī analizējām piecus redzeslaukus, kas tika izvēlti pēc nejaušības principa. Katrā redzeslaukā skaitījām 100 šūnas, izmantojot mikroskopu *Zeiss Axiolab* ar šūnu skaitīšanas programmu *Zeiss version 4.10*. Vieglākai šūnu skaitīšanai izmantojām t.s. „režīga sistēmu”. Uz katru izmeklējamo redzeslauku uzlikām režīgi ar *Zeiss version 4.10*, un ar datorprogrammas palīdzību skaitījām 100 šūnas atbilstošajā virzienā (Bologna-Molina et al., 2011).

Datu statistiskā apstrāde

PCV2 seropozitīvo dzīvnieku skaits procentos, no visa izmeklēto dzīvnieku skaita, tika statistiski apstrādāts un noteikts 95% ticamības intervāls. Minētā metode nosaka datu svārstības jeb ticamības intervālu ar 95% varbūtību (Wilson, 1927; Newcombe, 1998). Šo ticamības intervālu ar varbūtību 95% noteicām PCV2 seropozitīvo cūku skaitam daļādās saimniecībās, Latvijas reģionos un daļādos izmeklējuma gados. Serologisko rezultātu interpretācijai izmantojām t.s. statistisko kalkulatoru *Collection of JavaScript E-labs Learning Objects*.

Izmantojām arī *t-test*, kas ir visbiežāk lietotā metode, lai noteiktu, vai starp divu izlašu aritmētiskajiem vidējiem pastāv statistiski nozīmīgas atšķirības (Paura, Arhipova, 2002). *T-testu* izmantojām, lai noteiktu statistiskās atšķirības PCV2 seropozitīvo cūku daudzumam daļādās saimniecībās, daļādos Latvijas reģionos un daļādos izmeklējuma gados.

Rezultātu statistiskās atšķirības noteicām arī limfmezglu struktūru izmaiļu vidējiem rādītājiem limfmezglos ar nelielu (+), vidēju (++) un lielu (+++) PCV2 antigēna daudzumu, kā arī bez PCV2 antigēna klātbūtnes tajos. Testa rezultāti ļāva secināt, vai pastāv daļāda daudzuma PCV2 antigēna būtiska ietekme uz limfmezglu strukturālām izmaiļām.

Tāpat *t-testu* izmantojām, lai noteiktu statistiskās atšķirības limfmezglu strukturālajās izmaiļās limfmezglos ar PCV2 antigēnu, kuros bija konstatētas baktērijas un tādos, kuros baktēriju klātbūtnē nebija konstatēta. Testa rezultāti ļāva secināt, vai pastāv baktēriju klātbūtnes ietekme uz strukturālajām izmaiļām limfmezglos ar PCV2 antigēnu. Papildus izmantojām korrelācijas koeficientu, lai noteiktu saistību starp baktēriālās infekcijas daudzuma pieaugumu limfmezglā un limfmezgla struktūras izmaiļām.

Šūnām ar specifiskiem proteīniem Ki67, CD3 un CD79 α aprēķinājām to vidējo daudzumu un standarta novirzi.

Izanalizējām Ki67 pozitīvo šūnu, kā arī T un B limfocītu daudzuma izmaiļas daļādos limfmezgla slāļos atkarībā no PCV2 antigēna daudzuma tajos, izmantojot Spīrmena rangu korelācijas koeficientu un apstrādājot ar SPSS programmu, 22. versiju (IBM Corporation, Chicago, Illinois).

PĒTĪJUMU REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Cūku cirkovīrusa-2 izplatība Latvijā (ELISA analīze)

Mūsu pētījumā vispirms svarīgi bija noteikt cirkovīrusa-2 izplatību Latvijas teritorijā un PCV2 seropozitīvo dzīvnieku daudzumu daļ ādos Latvijas reģionos. Laika periodā no 2006. līdz 2016. gadam izmeklēti 963 cūku asins serumu paraugi ar ELISA metodi uz cūku cirkovīrusa-2 antivielu klātbūtni. Kopumā no visām izmeklētajām cūkām, antivielas pret PCV2 konstatētas 75,9% dzīvniekiem (2. tab.).

2. tabula / Table 2.

PCV2 seropozitīvo cūku daudzums 2006-2016 /
Number of PCV2 seropositive pigs 2006-2016

Gads / Year	Izmeklēto dzīvnieku skaits/ PCV2 seropozitīvo dzīvnieku skaits / <i>Number of investigated animals/ Number of PCV2 seropositive pigs</i>	PCV2 seropozitīvo dzīvnieku daudzums % / 95% CI* / <i>Quantity of PCV2 seropositive pigs %/ 95% CI*</i>
2006	22 / 16	72,7 / 54,1-91,3
2007	75 / 33	44,0 / 32,8-55,2
2008	72 / 55	76,4 / 66,6-86,2
2009	96 / 91	94,8 / 90,2-99,3
2010	218 / 196	89,9 / 85,9-93,9
2011	21 / 8	38,1 / 17,3-58,9
2012	79 / 54	68,4 / 58,2-78,7
2013	65 / 51	78,5 / 68,5-88,5
2014	126 / 91	72,2 / 64,4-80,0
2015	104 / 71	68,3 / 58,4-77,1
2016	85 / 65	76,5 / 66,0-85,0
Kopā	963 / 731	75,9 / 73,6-79,0

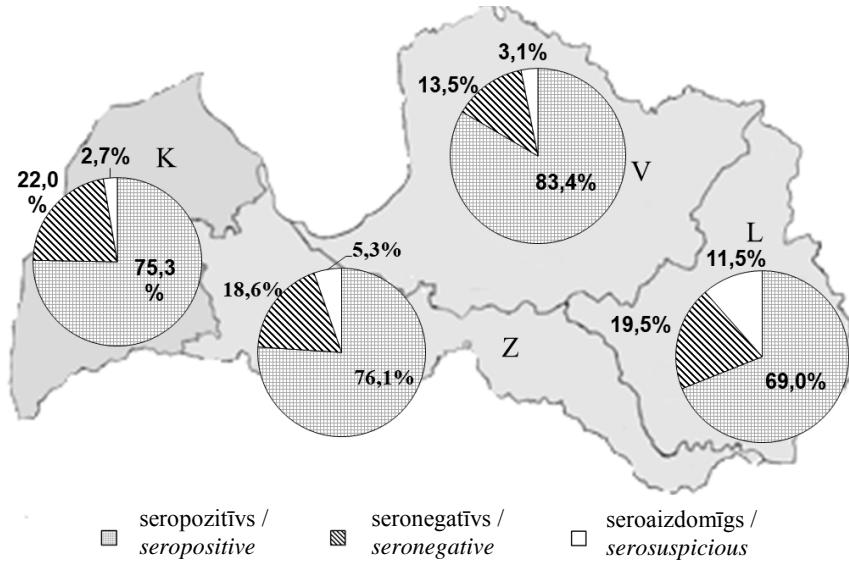
*CI – ticamības intervāls / *CI – confidence interval

Citās pasaules valstis t. sk. arī Eiropas valstis, PCV2 seropozitīvo cūku daudzums tuvojas 100 %, piemēram, Kanādā, Francijā, Vācijā, Jaunzēlandē, Lielbritānijā un ASV (Tischer et al., 1982; Tischer et al., 1986; Dulac, Afshar, 1989; Horner, 1991; Allan et al, 1994; Tischer et al., 1995a; Tischer et al., 1995b; Edwards, Sands, 1994; Hines, Lukert, 1995; Magar et al., 2000; Walker et al., 2000; Reiner, Hofmeister, Willems, 2015; Xiao et al., 2016; Karuppannan, Opruessnig, 2017).

Latvijā visaugstākais PCV2 seropozitīvo cūku daudzums tika konstatēts 2009. (94,8%) un 2010. (89,9%) gadā, un vislielākais paraugu izmeklēšanas skaits arī bija 2009. un 2010. gadā. Tas acīmredzot bija saistīts ar PMWS

uzliesmojumu saimniecībās. Savukārt 2011. gadā tika konstatēts viszemākais cūku daudzums ar PCV2 antivielām – 38,1% un līdz ar to arī viszemākais izmeklējumu skaits (2. tab.). Tas nozīmē, ka PCV2 infekcija bija mazinājusies un, sprieto t pēc zema PCV2 seropozitīvo cūku daudzuma, saimniecībās bija veikti atbilstoši profilaktiskie un apkarošanas pasākumi.

Izvērtējot PCV2 seropozitīvo dzīvnieku daudzumu dažādos reģionos, konstatējām, ka seropozitīvo cūku daudzums visos reģionos ir relatīvi augsts (3. att.).



3. att. PCV2 seropozitīvo cūku izplatība dažādos Latvijas reģionos
Fig. 3. The prevalence of PCV2 seropositive pigs in different Latvian regions

K – Kurzeme, Z – Zemgale, V – Vidzeme, L – Latgale

Literatūrā atzīmēts, ka saimniecībās kurās dzīvniekiem konstatē raksturīgo cūku pēcatķiršanas novājēšanas sindroma (PMWS) klīnisko ainu, kā arī saimniecībās kuru dzīvniekiem tā nav konstatēta, tāpat izdalās liels daudzums PCV2 seropozitīvo cūku (Allan, Ellis, 2000; Sibila et al., 2004; Segales et al., 2005; Karuppannan, Opriessnig, 2017). Tomēr lielākais PCV2 seropozitīvo cūku daudzums novērots saimniecībās kurās dzīvniekiem bija raksturīgā PMWS klīniskā ainā (Sibila et al., 2004; Dvorak et al., 2016). Latvijā saimniecībās Kurzemes, Zemgales un Vidzemes reģionā, kur PCV2 seropozitīvo cūku daudzums sasniedz attiecīgi 75,3%, 76,1% un 83,4% iespējami cūku pēcatķiršanas novājēšanas sindroma uzliesmojumi (3. att.).

Kopumā pēc seroloģiskās izmeklēšanas rezultātiem varējām secināt, ka cūku cirkovīruss-2 ir visai plaši izplatīts Latvijas teritorijā. Par to liecina lielais seropozitīvo cūku skaits Latvijas reģionos – attiecīgi 69,0% - 83,4%.

Kas attiecas uz PCV2 izplatību daļā lieluma cūku saimniecībās, konstatējām, ka PCV2 seropozitīvo dzīvnieku daudzums ir vienlīdzīgi augsts ($p>0,05$) no 70,0% līdz 79,7% (3. tab.).

3. tabula / Table 3.

**PCV2 seropozitīvo cūku daudzums dažāda lieluma Latvijas saimniecībās /
Number of PCV2-seropositive pigs in different type of farms**

Saimniecības lielums / <i>Farm scale</i>	Izmeklēto dzīvnieku skaits/ PCV2 seropozitīvo dzīvnieku skaits <i>/ Number of investigated animals/ Number of PCV2 seropositive pigs</i>	PCV2 seropozitīvo dzīvnieku daudzums % / 95% CI* / <i>Quantity of PCV2 seropositive pigs % / 95% CI*</i>
Ļoti lielas / <i>Huge</i>	207 / 165	79,7** / 73,6-85,0
Lielas / <i>Large</i>	343 / 261	76,1** / 71,2-80,5
Vidējas / <i>Medium</i>	26 / 20	76,9** / 56,4-91,0
Mazas / <i>Small</i>	88 / 68	77,3** / 67,1-85,5
Ļoti mazas / <i>Very small</i>	30 / 21	70,0** / 50,6-85,8

*CI – ticamības intervāls / *CI – confidence interval

** $p>0,05$

Tik plašs PCV2 seropozitīvo cūku daudzums Latvijā un pasaule varētu būt saistīts ar PCV2 klātbūtni daļā dzīvnieku organismā izdalījumos un līdz ar to vieglu aerogēnu, *per os* un horizontālo cūku inficēšanos (Madson et al., 2009; Eddicks et al., 2016). Zināms, ka slimām cūkām ar PMWS un kliniski veselām cūkām ar polimerāzes lēdes reakciju PCV2 ir konstatēts fekālijū, urīna, siekalu paraugos un paraugos no acu, nāsu gлотādas un mandelēm (Hamel et al., 2000; Krakowka et al., 2000; Larochelle et al., 2000; Magar et al., 2000; Kim et al., 2001; Celer, Carasova, 2002; Segales et al., 2005; Kim, Chae, 2003; Shibata et al., 2003; Yang et al., 2003; Caprioli et al., 2006). Kā arī eksperimentāli un dabiski inficētām cūkām ar PCV2, vīruss ir izolēts no spermas (Larochelle et al., 2000; Kim et al., 2003), ovocītiem (Bielanski et al., 2004a; Bielanski, Larochelle, Magar, 2004b), auglūdeļiem (Rodriguez-Arrioja et al., 2002), augliem un abortētiem augliem (Pensaert et al., 2004). Eksperimentāli ir pieradīts, kā PCV2 izplatās arī horizontālā ceļā (Albina et al., 2001; Bolin et al., 2001; Shibata et al., 2003), un PCV2 spēj iziet cauri placentārai barjerai un infiltrēties augļa organismā (Park et al., 2005; Eddicks et

al., 2016). Tomēr var būt arī citi PCV2 izplatīšanās ceļi. PCV2 DNS tika konstatēts ūdens paraugos Brazīlijā, lauksaimniecības teritoriju gaisā Kanādā, mājas mušām Lielbritānijā, un pat moskītiem *Culex* Ķīnā (Verreault et al., 2010; Blunt et al., 2011; Garcia et al., 2012; Yang et al., 2012; Zhai, 2014). Turklatā, PCV2 ir diezgan izturīgs pret dažādām temperatūras iedarbībām (O'Dea et al., 2008), un dažādiem pH apstākļiem (Kim, Lyoo, Joo, 2009). Tas varētu izskaidrot plašo PCV2 izplatību cūku populācijā visā pasaulē.

PMWS uzliesmojuma risku samazina PCV2 infekcijas profilaktiskie un apkarošanas pasākumi, kas galvenokārt saistīti ar labu menedžmentu, kas iekļauj novietļu dezinfekciju, jebkāda veida stresa mazināšanu cūkām, sivēnmāšu mazgāšanu un dehelināciju pirms atnešanās u.c. pasākumiem (Madec et al., 2000; Lopez-Soria et al., 2005). Jāatzīmē, ka pat ganāmpulka vakcinācija pilnībā nepasargā cūkas no inficēšanās ar PCV2 (Karuppannan, Opriessnig, 2017). Vīrus var proliferēt arī vakcinēto cūku organismā (Reiner, Hofmeister, Willems, 2015; Xiao et al., 2016), tāpēc PCV2 uzliesmojums var atkārtoties pēc vakcinācijas programmas pārtraukšanas un profilaktisko pasākumu neievērošanas.

Sivēnu limfmezglu morfoloģiskais raksturojums ar cirkovīrusa-2 antigēnu un bez tā

Nākamajā darba etapā izmeklējām nobeigušos sivēnus ar aizdomām uz PMWS saslimšanu. Kopumā no 42 izmeklētajiem šādiem sivēniem tikai 38% dzīvniekiem konstatējām PCV2 antigēnu limfmezglos (4.tab.).

4. tabula / Table 4.

PCV2 antigēna sastopamība cūku limfmezglos / PCV2 antigen detection in pig lymph nodes

PCV2 antigēns limfmezglos / PCV2 antigen in lymph nodes:	Dzīvnieku skaits / Number of animals (n=42):	Izmeklēto limfmezglu skaits / Number of investigated lymph nodes (n=336):
Konstatēts / Found	16 (38,0%)	128 (38,0%)
Nav konstatēts / Not found	26 (62,0%)	208 (62,0%)

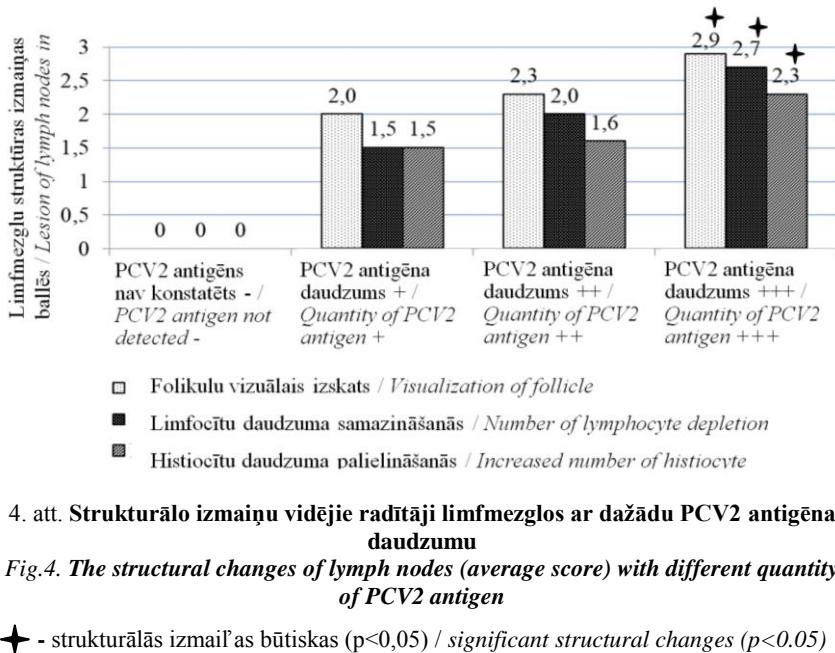
Tas var būt saistīts ar to, ka cūkām, inficētām ar PCV2, slimības klīniskā izpausme un iekšējo orgānu patologanatomiskās izmaiņas ir ļoti variablas un nespecifiskas (Harding, 2004; Opriessnig et al., 2017). Pēcatšķiršanas novājēšanas sindroma diagnoze apstiprinās, ja sivēniem ir novājēšanas pazīmes, limfmezglu histoloģiskajā izmeklēšanā redzama folikulu vizuālizācijas samazināšanās, limfocītu zudums un histiocītu proliferāciju, kā arī limfmezgla audos konstatēts PCV2 antigēns (Sorden, 2000; Quintana et al.,

2001; Segales, 2012). Visiem 38% mūsu izmeklētajiem sivēniem ar PCV2 antigēnu limfmezglos tika konstatētas novājēšanās pazīmes un limfmezglos bija raksturīgās iepriekš minētās specifiskās histoloģiskās izmaiļas. Līdz ar to varam secināt, ka no mūsu 42 izmeklētajiem dzīvniekiem 38% sivēniem bija pēcatšķiršanas novājēšanas sindroms.

Arī mēs šiem dzīvniekiem konstatējām limfadenopātiju, turklāt limfmezglu griezuma virsma bija viendabīga un pelēka. Šādas izmaiļas tiek atzīmētas arī citu autoru pētījumos (Segales, 2012; Ellis, 2014). Literatūrā minēts, ka atsevišķos gadījumos slimiem ar PWMS sivēniem var konstatēt limfmezglu nekrozi. Atzīmēts ka 9,9% gadījumu limfmezglos konstatēja multifokālu un vietām koalescējošu (angl. *coalescing*) koagulācijas nekrozi (Segales et al, 2004b; Kim, Chae, 2005; Opriessnig, Janke, Halbur, 2006b). Slimiem ar PMWS sivēniem, nekrozes veidošanos limfmezglos saista ar sīko asinsvadu trombozi, kaut gan trombu veidošanās patogēneze šīs slimības laikā joprojām nav skaidra (Opriessnig, Janke, Halbur, 2006b; Segales, 2012). Jāuzsver, ka mēs sivēniem ar PCV2 nekrotiskus bojājumus limfmezglos nekonstatējām. Acīmredzot sivēniem, slimiem ar PMWS, limfmezglu nekroze ir netipiska pazīme.

Svarīgs jautājums bija strukturālas izmaiļas limfmezglos ar dažādu PCV2 daudzumu tajos. Vispirms mums nācas noteikt PCV2 daudzumu limfmezglos. Savā pētījumā PCV2 antigēna daudzuma izvērtēšanai izmantojām vispāripielēmto sistēmu (Opriessnig, Meng, Halbur, 2007) ar nelielu tās korekciju. Parasti PCV2 antigēna daudzumu novērtē pēc tā daudzuma tikai limfmezglu folikulos.

Tālāk analizējām strukturālās izmaiļas limfmezglos ar dažādu PCV2 antigēna daudzumu. Lai salīdzinātu limfmezglu atsevišķo strukturālo izmaiļu izteiktības stipruma saistību ar PCV2 antigēna daudzumu tajos, 4. attēlā atspoguļojām limfmezglu strukturālo izmaiļu vidējos radītājus ballēs kopumā visos izmeklētajos limfmezglos.



4. att. Strukturālo izmaiņu vidējie radītāji limfmezglos ar dažādu PCV2 antigēna daudzumu

Fig.4. The structural changes of lymph nodes (average score) with different quantity of PCV2 antigen

★ - strukturālās izmaiļas būtiskas ($p<0,05$) / significant structural changes ($p<0.05$)

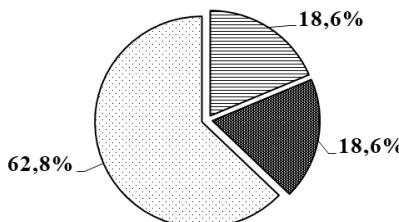
Iezīmējās zināma likumsakarība: jo lielāks PCV2 antigēna daudzums konstatēts limfmezglos, jo stiprāk izmaiņas to folikulu struktūra un līdz ar limfocītu daudzuma samazināšanos limfmezglos, tajos vienlaicīgi paaugstinās histiocītu daudzums. Tātad, limfocītu daudzums kopumā limfmezglos samazinājās līdz ar PCV2 antigēna daudzuma pieaugumu tajos. Līdzīgu tendenci novēroja arī citi autori (Darwiche et al., 2004; Segales et al., 2004b; Ostanello et al., 2005; Opriessnig, Meng, Halbur, 2007; Ellis, 2014).

Uzskatām, ka, ja limfmezglos ar nelielu (+) PCV2 antigēna daudzumu visas strukturālās izmaiļas kopumā bijušas vieglas (izmaiļas 1 balle), tad PCV2 infekcija bijusi vairāk akūta, bet ja limfmezglos, jau bija izteiktas strukturālās izmaiļas (izmaiļas 3 balles), tad saslimšana dzīvniekiem bijusi ilgstošāka.

Atsevišķos izmeklētajos limfmezglos ar PCV2 antigēnu tika konstatētas arī citas specifiskās morfoloģiskās izmaiļas – parādījās tādas histoloģiskās struktūras kā multinukleārās gigantiskās šūnas un PCV2 citoplazmatiskie ieslēgumi ķermel'i. Ieslēguma ķermel'i ir sfēriski, eozinofili, viendabīgi, turklāt tie šūnu citoplazmā var būt lielā skaitā. Kā zināms, multinukleārās gigantiskās šūnas ir lieli makrofāgi, kuri rodas makrofāgiem savstarpējas saplūstot (Möst et al., 1997; Cheville, 1999; Zachary, McGavin, 2012; Milde et al., 2015). Kā jau

iepriekš minējām, limfmezglos ar PCV2 antigēnu uzkrājas makrofāgi jeb histiocīti, kuri arī kļūst par multinukleāro gigantisko šūnu (MGŠ) avotu.

Turklāt limfmezglos bez PCV2 antigēna, tātad bez PCV2 vīrusa citoplazmatiskie ieslēguma ķermel'i un multinukleārās gigantiskās šūnas netika konstatētas. Izrādījās, ka limfmezglos ar PCV2 antigēnu vienādi bieži 18,6% gadījumos tika konstatēti PCV2 vīrusa citoplazmatiskie ieslēguma ķermel'i un multinukleārās gigantiskās šūnas - MGŠ (5. att.).



- PCV2 citoplazmatisko ieslēguma ķermel'u klātbūtnē / Appearance of PCV2 cytoplasmic inclusions body
- Multinukleāro gigantisko šūnu klātbūtnē / Appearance of multinucleate giant cells
- Multinukleārās gigantiskās šūnas un PCV2 citoplazmatiskie ieslēguma ķermel'i netika konstatēti / Multinucleate giant cells and PCV2 cytoplasmic inclusions body not observed

5. att. Cūku limfmezglu daudzums ar PCV2 antigēnu un konstatētām histoloģiskām struktūrām (n=128)

Fig.5. Number of pigs lymph nodes with PCV2 antigen and it is observed structural changes (n=128)

Līdzīgus rezultātus apraksta arī citi autori, kuri MGŠ konstatējuši 21,2% gadījumos (Krakowka et al., 2005). Bet ir arī pētījumi, kuros aprakstīta 27,1% (Segales et al, 2004b) multinukleāro gigantisko šūnu parādīšanās limfmezglos, vai pat 28,8% (Segales et al, 2002).

Jāatzīmē, ka dzīvniekiem, slimiem ar PMWS, multinukleārās gigantiskās šūnas netika konstatētas visos limfmezglos. Tos varēja konstatēt tikai 45,45% sivēnu.

Kopumā secinājām, ka, slimiem ar PMWS sivēniem, multinukleāro gigantisko šūnu parādīšanās limfmezglos ir viens no specifiskiem izmaiļu parametriem, kas saistīts ar PCV2 infekcijas klātbūtni. Bet jāuzsver, ka, vērtējot MGŠ parādīšanos limfmezglos, dzīvniekam noteiki jāizmeklē vairākas limfmezglu grupas – vismaz *lnn. inguinales superficiales*, *lnn. jejunales* un *lnn. tracheobronchiales*.

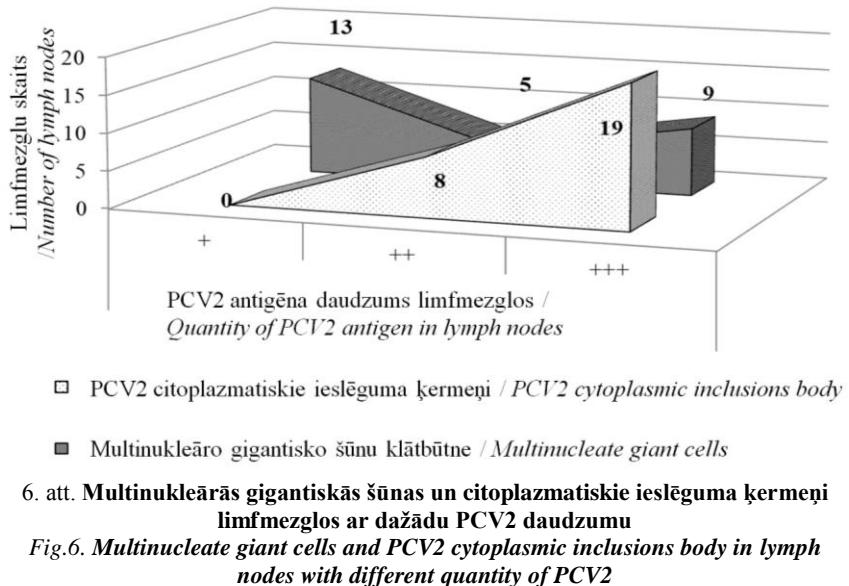
Attiecībā uz MGŠ izskatu, mūsu pētījuma rezultāti visumā sakrīt ar citu autoru novērojumiem. Cūku limfmezglos ar PCV2 antigēnu multinukleārajās gigantiskajās šūnās mēs konstatējām kodolu skaitu virs 10, un tie pārsvarā lokalizējās šo šūnu perifērijā. Cits autors norāda, ka no slimām ar PMWS cūkām limfmezglos multinukleārajās gigantiskajās šūnās kodolu skaits var būt no 5 līdz pat 20, un tie pārsvarā lokalizējas šo šūnu perifērijā (Chae, 2004; Ellis, 2014).

Kas attiecas uz multinukleāro šūnu lokalizāciju limfmezglos, tās var būt limfmezglu folikulos, limfmezgla parakortikālajā slānī un arī sīnusos (Clark, 1997; Rosell et al, 1999; Segales et al, 2004b; Ellis, 2014). Mēs uzskatām, ka MGŠ lokalizācija ir visai cieši saistīta ar PCV2 antigēna lokalizāciju limfmezglā. Sākumā cūku cirkovīruss-2 parādās tieši limfmezglu folikulos. Līdz ar folikulu vizuālā izskata zudumu, PCV2 antigēns nokļūst parakortikālajā slānī un arī sīnusu apvidū.

Pašlaik nav vēl noskaidrots, kā īsti PCV2 izraisa multinukleāro gigantisko šūnu parādīšanos audos. Ja PCV2 tieši ietekmē MGŠ veidošanos audos, tad šo šūnu parādīšanos limfmezglos varētu saistīt ar paša vīrusa patoģenitāti. Bet, ja MGŠ veidošanās audos saistīta ar PCV2 netiešu ietekmi, piemēram, caur sekundāriem iekaisuma mediatoriem, tad šo šūnu parādīšanās limfmezglos varētu būt saistīta ar paša dzīvnieka organismā reaktivitāti. Pēc pētījumu rezultātiem *in vitro* šūnu kultūrā, daļi autori uzskata, ka tieši cūku cirkovīruss-2 pats stimulē citokīnu izdalīšanu, kā arī makrofāgu proliferāciju (Tsai et al., 2010; Li et al., 2013).

Mūsu pētījumā iezīmējās sakarība – jo lielāks PCV2 antigēna daudzums limfmezglos, jo tajos samazinās MGŠ parādīšanās (6. att.).

Tas varētu liecināt par cūku cirkovīrusa-2 netiešo ietekmi uz multinukleāro gigantisko šūnu veidošanos audos. Kā jau minējām, liels (+++) PCV2 daudzums limfmezglos saistīts ar ilgstošu slimības gaitu un smagiem audu bojājumiem. Visticamāk, ka ilgstošajā slimības gaitā izmainās sekundāro iekaisuma mediatoru kvalitatīvais un kvantitatīvais sastāvs, kas attiecīgi arī var ietekmēt MGŠ sastopamības samazināšanos limfmezglos. Šo pielēmumu apstiprina mūsu iegūtie rezultāti – proti, sivēniem slimiem ar PMWS, bet bez bakteriālās infekcijas limfmezglos MGŠ netika konstatētas (7. att.).



Kas attiecas uz PCV2 virusālo ieslēgumu parādīšanos līmfmezglos, pašlaik nav zināms kādi tieši faktori to ietekmē. Kaut gan atšķirīgu cūku šķirļu limfoīdo audu reakcija uz cirkovīrusu-2 var būt dažāda (Oppriessnig et al., 2009). Pēc mūsu domām, tieši tas varēja ietekmēt mūsu konstatēto, procentuāli salīdzinoši zemo PCV2 citoplazmatisko ieslēgumu ķermel'u parādīšanos līmfzmeglos - 18,6% gadījumos (sk. 5.att.). Pēc daļu autoru datiem, virusālo ieslēgumu parādīšanos līmfmezglos novēro daudz biežāk - 27,8% (Kim et al., 2002), 33,3% (Krakowka et al., 2005) vai arī 34,6% gadījumos (Segales et al., 2004b) no izmeklētajām inficētām ar PCV2 cūkām.

Jāatzīmē gan, ka vienlaicīgi PCV2 virusālie ieslēguma ķermel'i un multinukleārās gigantiskās šūnas līmfmezglos netika konstatētas.

Sivēnu līmfmezglu un asiņu izmeklēšanas rezultāti uz baktēriju, cirkovīrusa-2 antigēna un antivielu klātbūtni

Nākamais darba uzdevums bija izmeklēt asiļu un līmfmezglu paraugus 5-15 nedēļu vecumā kritušiem sivēniem ar aizdomām par PMWS saslimšanu. Šādi izmeklējām 42 nobeigušos dzīvniekus (5. tab.).

5. tabula / Table 5.

Seroloģiskās, bakterioloģiskās un imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas rezultāti sivēniem ar aizdomām par PMWS saslimšanu (n=42) / Serological, bacteriological and immunohistochemical investigation results of piglets with suspicion of PMWS (n=42)

Izmeklēšanas parametrs / Investigation parameters	Cūku skaits / Number of pigs	Cūku daudzums / Quantity of pigs (%)
PCV2 antigēna klātbūtne limfmezglos / PCV2 antigen detected in lymph nodes	16	38,1%
PCV2 antivielu klātbūtne asinīs / PCV2 antibody found in the blood	25	59,5%
Baktērijas limfmezglos / Bacteria in the lymph nodes	31	73,8%

Lielākais sivēnu daudzums – 33,3% bija PCV2 seropozitīvi dzīvnieki bez PCV2 antigēna klātbūtnes limfmezglos. Tas arī bija sagaidāms, jo cirkovīrus-2, kā jau iepriekš minējām, ir plaši izplatīts.

Jāatzīmē, ka ne visiem sivēniem ar PCV2 antigēnu asinīs bija konstatētas vīrusa antivielas. Zināmā mērā mūs pārsteidza šie darba rezultāti, ka PCV2 antivielas nebija konstatētas visiem slimiem ar PMWS sivēniem. Mēs neatradām izskaidrojumu tādai nesakritībai, jo zināms, ka PCV2 infekcija ir hroniska infekcija. Un ja dzīvnieks nobeidzās no PCV2 infekcijas, tad arī antivielām vajadzētu parādīties dzīvnieka asinīs. Kritušā sivēna asins parauga nolemšana nepārsniedza 12 stundas pēc dzīvnieka nāves, kas minimizēja antivielu postmortālās sadalīšanās risku.

Nākamais darba uzdevums bija noteikt bakteriālo spektru limfmezglos. Kopumā no visiem izmeklētiem sivēniem daļādas baktērijas to limfmezglos konstatējām 73,8 % gadījumos, t.i. 31 sivēniem (5. tab.). Tomēr ne visiem sivēniem ar PCV2 antigēnu limfmezglos konstatējām baktērijas (6. tab.).

6. tabula / Table 6.

Bakterioloģiskās un imūnhistoķīmiskās izmeklēšanas rezultāti sivēniem ar aizdomām par PMWS saslimšanu (n=42) / Bacteriological and immunohistochemical investigation results of piglets with suspicion of PMWS (n=42)

PCV2 antigēna klātbūtne limfmezglos / PCV2 antigen in lymph nodes:	Cūku daudzums ar bakteriālo infekciju limfmezglos / Number of pigs with bacterial infection in lymph nodes	Cūku daudzums bez bakteriālas infekcijas limfmezglos / Number of pigs without bacterial infection in lymph nodes
Ir konstatēta / found	11 (26,2%)	5 (11,9%)
Nav konstatēta / not found	20 (47,6%)	6 (14,3%)

Kas attiecas uz bakteriāliem ierosinātājiem, tad jāatzīmē, ka vienam dzīvniekam limfmezglos varēja konstatēt no viena līdz četriem ierosinātājiem (7. tab.).

7. tabula / Table 7.

Cūku skaits ar dažādu bakteriālu infekcijas daudzumu limfmezglos / Number of pigs with different quantity of bacterial infection in lymph nodes

PCV2 antigēna klātbūtne limfmezglos // PCV2 antigen in lymph nodes:	Cūku daudzums ar vienu bakteriālu infekciju limfmezglos / Number of pigs with one bacterial infection in lymph nodes	Cūku daudzums ar vairāk par vienu bakteriālu infekciju limfmezglos / Number of pigs with more than one bacterial infection in lymph nodes
Ir konstatēta / found (n=11)	45,5 %	54,5 %
Nav konstatēta / not found (n=20)	90 %	10 %

Limfmezglos ar PCV2 antigēnu bieži – 54,5 % gadījumu konstatē divus, trīs un pat četru bakteriālo ierosinātājus, bet limfmezglos bez PCV2 antigēna vairumā – 90% gadījumu konstatē tikai vienu bakteriālo ierosinātāju. Līdz ar to, limfmezglos ar PCV2 antigēnu statistiski biežāk konstatējām vairāk nekā vienu bakteriālo ierosinātāju, bet limfmezglos bez PCV2 antigēna statistiski biežāk konstatējām tikai vienu bakteriālo ierosinātāju. Tas var būt saistīts ar to, ka PCV2 dzīvniekam izraisa vispārējo imūndeficītu, kā rezultātā bakteriālie ierosinātāji lielākā daudzumā var pievienoties slimam organismam. Jāatzīmē, ka šāda veida pētījumus, sivēniem ar PMWS par bakteriālo ierosinātāju daudzumu limfmezglos, mēs literatūrā neatradām.

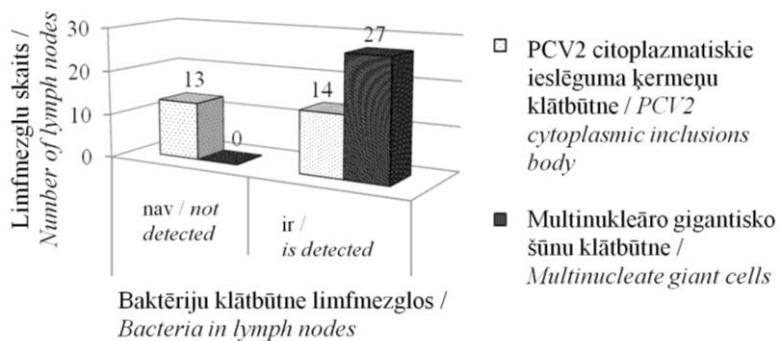
Mūsu pētījuma rezultāti parāda, ka biežāk sastopami četri bakteriālie ierosinātāji, kas konstatēti sivēniem limfmezglos bez PCV2 antigēna klātbūtnes, un tika konstatēti arī limfmezglos ar PCV2 – t.i. *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp. un *Escherichia coli*. Minētās baktērijas ir bieži izplatītas apkārtējā vidē, kas arī izskaidro to klātbūtni sivēnu limfmezglos. Citi autori konstatējuši arī *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Arcanobacterium pyogenes* un *Bordetella bronchiseptica* baktēriju pievienošanos PCV2 infekcijai (Halbur, 1997; Brogden, Guthmiller, 2002; Savic et al., 2015). Mūsu pētījumā, daļējiem sivēniem limfmezglos ar PCV2 antigēnu bija konstatētas arī nepatogēnas baktērijas, tādās kā *Citrobacter freundii* un *Corynebacterium* spp. Tikai retos gadījumos atsevišķas *Corynebacterium* sugas var būt nosacīti patogēnas. Mēs uzskatām, ka nepatogēnas mikrofloras parādīšanās sivēnu limfmezglos ir saistīta ar to, ka

PCV2 izraisa vispārēju imūnedeficītu, kā rezultātā pat nepatogēnas baktērijas var pievienoties slimajam organismam.

Bakteriālās infekcijas ietekme uz limfmezglu struktūru sivēniem slimiem ar pēcatšķiršanas novājēšanas sindromu (PMWS)

Nākamais darba uzdevums bija noteikt baktēriju ietekmi uz limfmezglu morfoloģisko stāvokli. Sākumā novērtējām sekundārās bakteriālās infekcijas ietekmi uz MGŠ parādīšanos limfmezglos ar PCV2 antigēnu. Sivēniem ar PMWS, kuru limfmezglos konstatēja vienu vai vairākas bakteriālas infekcijas, tajos attiecīgi novēroja arī multinukleārās gigantiskās šūnas (7. att.). Acīmredzot, PCV2 netieši ietekmēja MGŠ veidošanu, jo baktēriju klātbūtne audos varēja papildus stimulēt iekaisuma procesu un, līdz ar to, arī sekundāro iekaisuma mediatoru producēšanu. Jāatzīmē, ka šāda veida pētījumus par bakteriālo ierosinātāju ietekmi uz MGŠ parādīšanos limfmezglos sivēniem ar PMWS mēs literatūrā neatradām.

Pēc tam novērtējām sekundārās bakteriālās infekcijas ietekmi uz PCV2 citoplazmatisko ieslēguma ķermel'u parādīšanos limfmezglos ar PCV2 antigēnu. Savā pētījumā konstatējām, ka PCV2 citoplazmatiskie ieslēguma ķermeli parādās vienlīdz bieži ($p>0,05$) limfmezglos ar baktērijām un bez tām (sk. 7. att.). Turklāt, pieaugot PCV2 antigēna daudzumam limfmezglos, tajos pieaug PCV2 citoplazmatisko ieslēguma ķermel'u klātbūtne (sk. 6.att.).



7. att. Limfmezglu skaits ar dažādu bakteriālo ierosinātāju daudzumu un multinukleāro gigantisko šūnu un PCV2 citoplazmatisko ieslēguma ķermelu klātbūtni tajos

Fig. 7. Number of lymph nodes with different bacterial infections and presence of multinuclear giant cells and PCV2 cytoplasmic inclusions in them

Kopumā secinājām, ka PCV2 citoplazmatisko ieslēguma ķermel' u parādīšanās histiocītos nav saistīta ar baktēriju klātbūtni limfmezglos, bet tā ir cieši saistīta ar PCV2 antigēna daudzuma pieaugumu limfmezglā. Proti, samazinoties PCV2 antigēna daudzumam limfmezglos, samazinājās citoplazmatisko ieslēguma ķermel' u parādīšanās biežums tajos, un otrādi, pieaugot PCV2 antigēna daudzumam limfmezglos, tajos palielinājās citoplazmatisko ieslēguma ķermel' u parādīšanās biežums.

Tālāk salīdzinājām limfmezglu struktūru izmaiļu vidējos rādītājus slimiem ar PMWS sivēniem, kuriem tika konstatētas baktērijas limfmezglos, un kuriem bakteriālas infekcijas limfmezglos netika konstatētas (8. tab.).

8. tabula / Table 8.

**Limfmezglu struktūru izmaiņu vidējo rādītāju atšķirību būtiskums limfmezglos ar un bez baktēriju klātbūtnes tajos sivēniem ar PCV2 antigenu limfmezglos /
Significance of mean score of structural changes in lymph nodes with and without bacteria in piglets with PCV2 antigen in lymph nodes**

Parametra vidējais radītājs limfmezglos / Mean score of parameters in lymph nodes:	Folikulu vizuālais izskats / Visualization of follicle	Limfocītu daudzuma samazināšanās / Number of lymphocyte depletion	Histiocītu daudzuma palielināšanās / Increased number of histiocyte
<u>ar</u> bakteriālās infekcijas klātbūtni / <u>with</u> bacterial infections	2,52*	2,27*	1,94*
<u>bez</u> bakteriālās infekcijas klātbūtnes / <u>without</u> bacterial infections	2,00*	1,40*	1,47*

* - $p<0,05$ statistiski būtiska atšķirība / $p<0.05$ significant difference

Sivēniem, aizdomīgiem uz saslimšanu ar PMWS, būtiski atšķīras ($p<0,05$) limfmezglu visu struktūru izmaiļas - tajos, kuros bija baktēriju klātbūtnē un tajos, kuros baktērijas nekonstatēja (sk. 8. tab.). Arī citi autori norāda, ka PCV2 izraisa smagākas strukturālas izmaiļas limfmezglos, ja tas kombinējas ar citām infekcijām (Segales et al., 2004b; Gu et al., 2014; Niederwerder et al., 2016). Jāatzīmē, ka lielākā daļa baktēriju organismā parasti izraisa strutainu iekaisumu ar neutrofilo leikocītu infiltrāciju audos (Zachary, McGavin, 2012). Uzskatam, ka baktēriju klātbūtnē limfmezglos palielina cūku cirkovīrusa-2 ietekmi uz organisma atbildes reakcijas aktivitāti, zināmā mērā pastiprinot to.

Turklāt salīdzinājām limfmezglu struktūru izmaiļas sivēniem slimiem ar PMWS, kuriem tika konstatēts viens bakteriāls ierosinātājs limfmezglos, un kuriem konstatētas divas un vairāk bakteriālas infekcijas limfmezglos. Izrādījās, ka statistiski netika atrasta sakarība ($r<0,5$) starp baktēriju infekcijas

daudzuma pieaugumu un limfmezgla struktūras parametru izmaiľām. Līdzvērtīgu pētījumu mēs literatūrā neatradām.

Cirkovīrusa-2 antigēna lokalizācija limfmezglā

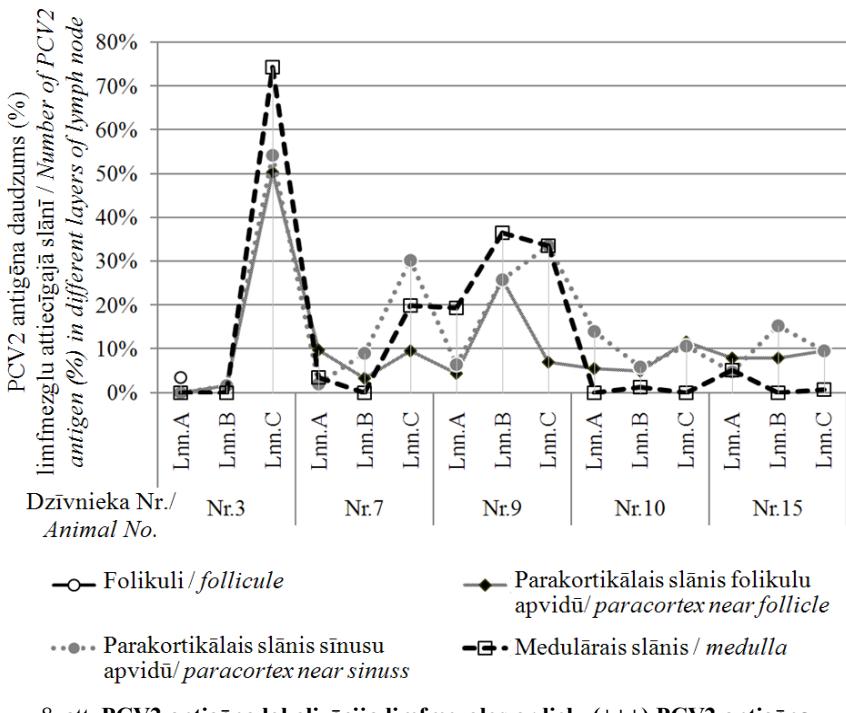
Pārsvarā PCV2 antigēns konstatēts limfmezglu makrofāgu citoplazmā, kaut gan nelielu PCV2 antigēna daudzumu novērojām arī intersticiālajā telpā. Cirkovīrusa-2 antigēnu konstatējām visās limfmezgla zonās – folikulos, parakortikālajā slānī un medulārajā slānī.

Pētījuma laikā pamanījām, ka limfmezglos ar stiprām strukturālām izmaiľām, kad folikulu struktūra vispār nav saskatāma, PCV2 antigēna daudzums ir stipri variabls. Lai precīzāk izanalizētu PCV2 antigēna daudzuma izmaiľas limfmezglos, vērtējām tā procentuālo daudzumu ne tikai limfmezglu folikulos, bet arī to parenhīmā.

Lai padarītu imūnhistokīmiskās analīzes rezultātus skaitiskus un objektīvus, PCV2 antigēna daudzumu noteicām arī procentuāli, izmantojot datorprogrammu *Pannoramic DensitoQuant* (3DHISTECH).

Tā kā mēs PCV2 daudzumu noteicām gan limfmezglu folikulos, gan arī to parenhīmā, varējām konstatēt, ka process neapstājas, sasniedzot PCV2 antigēna lielāko daudzumu limfmezglos (+++) un izraisot tajos stipras strukturālas izmaiľas (izmaiľas 3 balles). Procesam turpinoties, PCV2 antigēna daudzums limfmezglos sāk nedaudz samazināties (8. att.). PCV2 antigēna procentuālais daudzums vienam dzīvniekam var sasniegt līdz 75% (dzīvnieks Nr.3.), bet citam dzīvniekam tikai līdz 15% (dzīvnieks Nr.15.), sk. 8. att.

Ar šiem izmeklēšanas rezultātiem mums zināmā mērā izdevās parādīt PCV2 dinamiku limfmezglā. Cirkovīrus-2 sākotnēji lokalizējas limfmezglu folikulos, tad tālāk tas „iziet” ārpus folikula robežām un nokļūst parakortikālajā slānī folikulu apvidū, tālāk parakortikālajā slānī sīnusu apvidū un visbeidzot tas nonāk limfmezgla medulārajā slānī. Kopumā PCV2 vīrusa dinamika limfmezglos ir virzienā no garožas uz medulāro slāni, kas atbilst limfas plūsmas ceļam. Tālāk vīrus var nokļūt organismā kopējā limfātiskajā sistēmā. Jāatzīmē, ka mums nav izdevies atrast līdzīgus pētījumus, par PCV2 antigēna procentuālo daudzumu daļās limfmezgla slāļos.



8. att. PCV2 antigēna lokalizācija limfmezglos ar lielu (+++) PCV2 antigēna daudzumu tajos

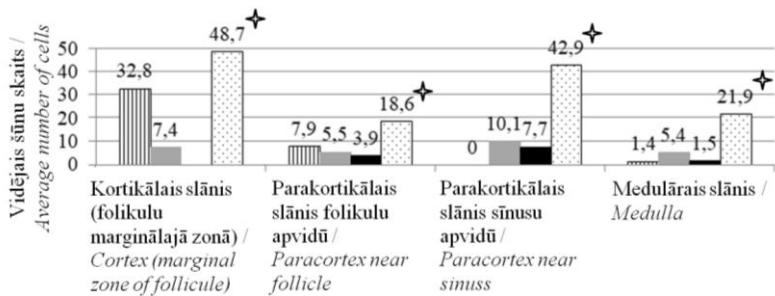
Fig.8. PCV2 antigen localization in lymph nodes with high (++) quantity of PCV2 antigen

Lnn. A. – lnn. inguinales. Lnn. B. – lnn. tracheobronchales. Lnn. C. – lnn. jejunaes

T limfocītu un B limfocītu skaita izmaiņas limfmezglos ar cirkovīrusa-2 antigēna klātbūtni un bez tā

Nākamais darba uzdevums bija noteikt CD79α proteīnu saturošu **B limfocītu** daudzuma izmaiņas limfmezglos dzīvniekiem ar daļādu cūku cirkovīrusa-2 klātbūtni tajos. Atgādinām, ka nobriedušam B limfocītam ir raksturīgs CD79α virsmas proteīns, kuru mēs vizualizējām imūnhistotekniskajā izmeklēšanā (IHĶ pozitīvās šūnas).

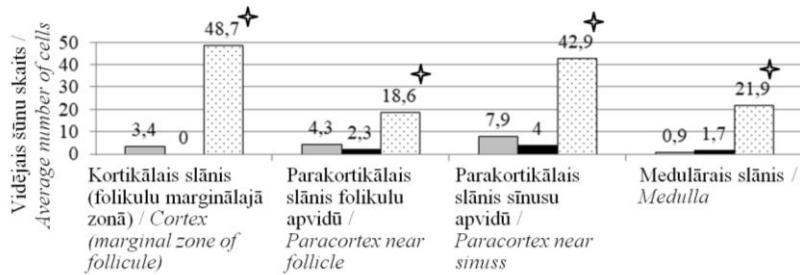
Jāuzsver, ka limfmezglos ar PCV2 antigēnu visos limfmezgla slāļos bija būtiski pazeminājies B limfocītu daudzums (9. un 10.att.). Kritisks B limfocītu zudums parādījās limfmezglu folikulos.



- Folikulu vizuālais izskats - 1 balle limfmezglos ar PCV2 / Visualization of the follicle - 1 score in lymph nodes with PCV2
 - Folikulu vizuālais izskats - 2 balles limfmezglos ar PCV2 / Visualization of the follicle - 2 score in lymph nodes with PCV2
 - Folikulu vizuālais izskats - 3 balles limfmezglos ar PCV2 / Visualization of the follicle - 3 score in lymph nodes with PCV2
 - Limfmezglos nav PCV2 / Lymph nodes without PCV2
9. att. **CD79a virsmas proteīnu saturošo B limfocītu daudzums limfmezglos ar dažādās pakāpes folikulu vizuālajām izmaiņām un nelielu PCV2 antigēna daudzumu (+). ***
- * - p<0,05

*Fig.9. Number of B lymphocytes (CD79a) in lymph nodes with different score of follicle visualization and mild quantity of PCV2 antigen (+). * - p<0.05*

Limfmezglos, ar nedaudz izplūdušu folikulu vizuālo izskatu (izmaiľu skalā 1 balle) un nelielu PCV2 antigēna daudzumu tajos, konstatējām vidēji 32,8 B limfocītus (sk. 9.att.), bet, pieaugot PCV2 antigēna daudzumam limfmezglos, B limfocītu daudzums samazinājās līdz 3,4 (sk.10. att.).



- Vidējs (++) PCV2 antigēna daudzums limfmezglos / Moderate (++) quantity of PCV2 antigen in lymph nodes
- Liels (+++) PCV2 antigēna daudzums limfmezglos / Severe (++) quantity of PCV2 antigen in lymph nodes
- Limfmezglos nav PCV2 / Lymph nodes without PCV2

10. att. **B limfocītu skaits ar CD79a virsmas proteīnu limfmezglos ar vidēju (++) un lielu (++) PCV2 antigēna daudzumu. *** - p<0,05

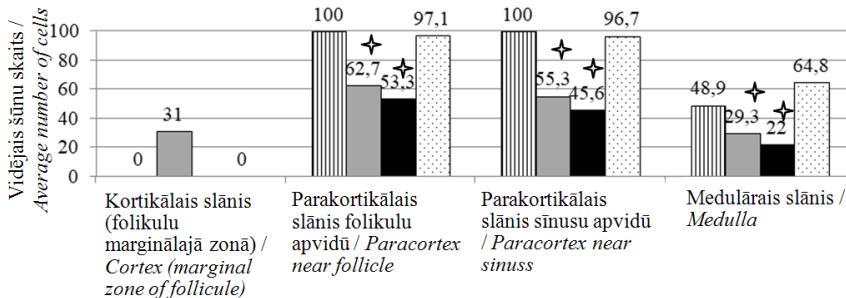
*Fig.10. Number of B lymphocytes (CD79a) in lymph nodes with moderate (++) and severe (++) quantity of PCV2 antigen. * - p<0.05*

Turklāt limfmezglos ar lielu PCV2 antigēna daudzumu novērojām pilnīgu folikulu zudumu (sk. 10.att.). Jāatzīmē, ka ir autori, kuri vispār nav konstatējuši CD79 α pozitīvas šūnas limfmezglos ar vidēji lielu un lielu PCV2 antigēna daudzumu tajos (Chianini et al., 2003). Citi turpretī limfmezglos ar lielu PCV2 antigēna daudzumu konstatējuši vidēji 25 CD79 α pozitīvas šūnas visā limfmezglā kopumā, izmeklējot 10 redzes laukus ar palielinājumu $\times 200$, t.i. apmēram no 1000 izmeklēto šūnu (Shibahara et al., 2000). Viena pētnieku grupa norāda, ka B limfocīti var pilnībā pazust vai kritiski samazināties limfmezglos ar PCV2 antigēnu (Segales et al., 2004a; Ellis, 2014). Jāatzīmē gan, ka ir autori, kuri veikuši B un T limfocītu analīzi limfmezglos, izmantojot trīs krustu sistēmu, bet citi izmantojuši kvantitatīvo šūnu skaitīšanu. Jāuzsver, ka neviens no autoriem nav analizējis limfocītu daudzuma izmaiļas katrā limfmezglu zonā atsevišķi. Mūsu pētījums, bija virzīts uz limfocītu daudzuma izmaiļām noteiktajā limfmezgla zonā, kas deva iespējas precīzāk raksturot limfocītu daudzuma izmaiļas. Lēmot vērā, ka PCV2 antigēns sākumā parādās tieši limfmezglu folikulos, tad tieši folikuli bija tie, kas pirmie reaģēja uz cirkovīrusa ietekmi. Tāpēc varam secināt, ka PCV2 sākumā ietekmē tieši B limfocītu populācijas samazināšanos limfmezglos, ko atzīmējuši arī daļi citi autori (Lin et al., 2008). Turklat atzīmēts, ka arī asinīs, slimiem ar PMWS sivēniem, B limfocītu daudzums samazinās līdz ar PCV2 daudzuma pieaugumu limfmezgla audos (Darwich et al., 2002; Ferrari et al., 2014).

Kā zināms, B limfocīti saistīti ar humorālo imūnatbildi uz daļādām parazitārām, bakteriālām, virusālām infekcijām, iekaisumiem un autoimūnām patoloģijām (Kitamura et al., 1991; Jakobovits et al., 1993; Maxie, 2016). Tādējādi var uzskatīt, ka, PCV2 ietekmē, cūkas organismā samazinās antivielas, padarot to uzlēmīgu pret infekcijām.

Tālāk analizējām **T limfocītu** daudzumu daļādos limfmezgla slāļos sivēniem ar un bez PCV2 antigēna tajos (11. un 12 att.). Atgādinām, ka T limfocītus diferencējām pēc CD3 virsmas proteīna vizualizācijas tajos.

Konstatējām būtisku T limfocītu daudzuma samazināšanos parakortikālajā un medulārajā slānī limfmezglos ar vidēji lielu un lielu PCV2 antigēna daudzumu (sk. 12.att.), kā arī limfmezglos ar nelielu PCV2 daudzumu un vāji saskatāmiem vai vispār nesaskatāmiem limfmezgla folikuliem (sk. 11.att.).

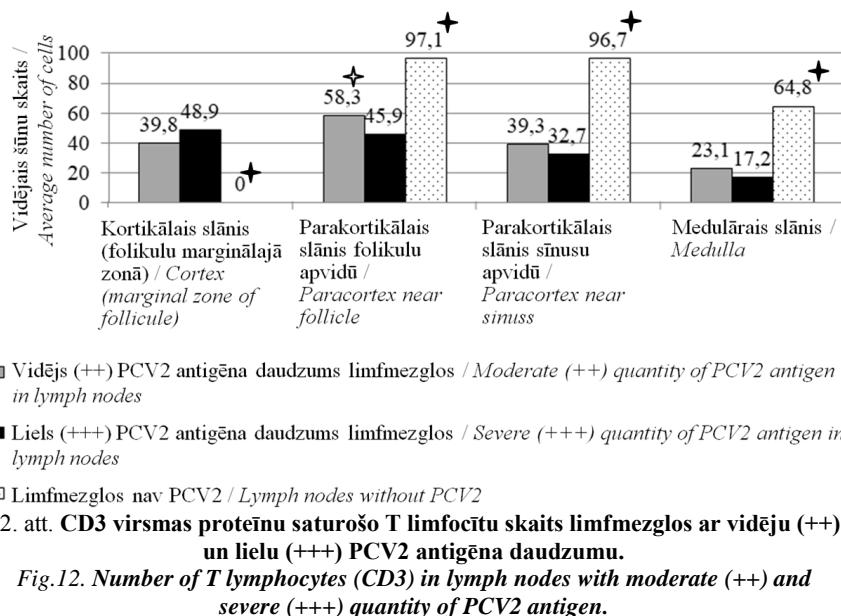


- Folikulu vizuālais izskats - 1 balle limfmezglos ar PCV2 / *Visualization of the follicle - 1 score in lymph nodes with PCV2*
- Folikulu vizuālais izskats - 2 balles limfmezglos ar PCV2 / *Visualization of the follicle - 2 score in lymph nodes with PCV2*
- Folikulu vizuālais izskats - 3 balles limfmezglos ar PCV2 / *Visualization of the follicle - 3 score in lymph nodes with PCV2*
- Limpmezglos nav PCV2 / *Lymph nodes without PCV2*

11. att. **Vidējais CD3 virsmas proteīnu saturošo T limfocītu skaits limfmezglos saistībā ar folikulu vizuālo izskatu un ar (pārvarā) nelielu (+) PCV2 antigēna daudzumu tajos (n=56).** ♦ - p<0,05

Fig.11. Number of T lymphocytes (CD3) in lymph nodes with different score of follicle visualization and mild quantity of PCV2 antigen (+). ♦- p<0.05

Piemēram, T limfocītu daudzums parakortikālajā slānī sīnusu apvidū samazinās vidēji līdz 32,7 CD3 pozitīvām šūnām. Arī daži citi pētnieki konstatējuši līdzīgu tendenci (Segales et al., 2004a; Segalless, 2012; Kekarainen, Segales, 2015). Tomēr jāatzīmē, ka vienā pētījumā konstatēts relatīvi vienāds ($p>0,05$) CD3 pozitīvo T limfocītu daudzums limfmezglos ar un bez PCV2 antigēna (Shibahara et al., 2000). Iespējams tas ir tādēļ, ka T limfocīti skaitīti redzes laukos, kurus izvēlējās nejauši, nevis tika skaitīti katrā limfmezgla zonā atsevišķi, kā to darījām mēs.



→ – CD3 pozitīvo šūnu daudzums parakortikālajā slānī folikulu apvidū ir būtiski ($p<0,05$) atšķirīgs limfmezglos ar vidēju un lielu PCV2 antigēna daudzumu / Number of CD3 positive cells in the paracortex near follicles is significantly ($p <0.05$) different in lymph nodes with moderate and severe quantity of PCV2 antigen.

→ – CD3 pozitīvo šūnu daudzums atbilstošajā slānī ir būtiski ($p<0,05$) atšķirīgs limfmezglos ar un bez PCV2 antigēna / Number of CD3 positive cells in the relevant layer is significantly ($p <0.05$) different in lymph nodes with and without PCV2 antigen.

Jāatzīmē, ka, līdz ar PCV2 antigēna daudzuma pieaugumu limfmezglā, T limfocīti sāk virzīties uz B limfocītu atkarīgo zonu, t.i. uz limfmezgla folikuliem, kas, jādomā, saistīts ar limfmezgla folikulu neatgriezeniskām struktūrlām izmaiļām.

Atsevišķos pētījumos konstatēts, ka arī asinīs samazinās T limfocītu daudzums un šī limfopēnija ir saistīta ar T helperu un citotokskiso T limfocītu daudzuma samazināšanos (Darwich et al., 2002; Ferrari et al., 2014). Klausmann et al. (2015) pētījums demonstrē, ka PCV2 ietekmē T limfocītu atlases procesu tīmusā.

Zināms, ka T limfocīti organismā ir galvenais celulārās imunitātes komponenti, kas nodrošina pretinfekciju un pretaudzēju imūnreakciju (Kitamura et al., 1991, Jakobovits et al., 1993, Maxie, 2016). Lemot vērā visu augstāk minēto, jāsecina, ka sivēniem, klīniski slimiem ar PMWS, var konstatēt gan celulārās, gan humorālās imunitātes traucējumus. Līdz ar to pēcatšķiršanas

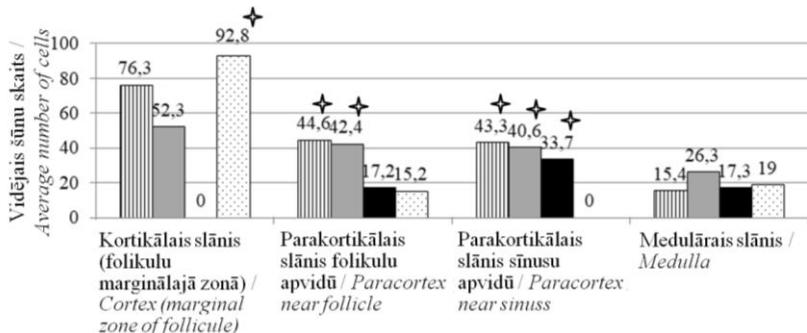
multisistēmiskās novājēšanas sindroms sivēniem kopumā ir organismā vispārēja imūndeficīta saslimšana (Segales et al., 2004a; Ellis, 2014; Karuppannan, Opriessnig, 2017).

Limfocītu samazināšanās cēlonis, slimiem ar PMWS sivēniem, ir viens no galveniem jautājumiem, kas joprojām nav līdz galam izprasts. Tieši limfocītu samazināšanās iemesls varētu izskaidrot šīs slimības patoģēnēzi un PCV2 ietekmi uz sivēnu organismu. Uzskatam, ka limfocītu zudumam var būt divi iemesli. Tie ir - pastiprināta limfocītu apoptoze un, otrs, – samazināta šūnu veidošanās aktivitāte. Li et al. (2013), vērtējot citokīnu sintēzi ar PCV2 klātbūtni, uzskata, ka teorētiski PCV2 var ietekmēt šūnu apoptozi. Vairāki autori pierādījuši, ka apoptozei nav bijis būtiskas ietekmes uz limfocītu daudzuma samazināšanos limfmezglos cūkām ar PCV2 (Kiupel et al., 2005; Resendes et al., 2004; Resendes et al., 2011; Zhou et al., 2015). Tikai viena pētnieku grupa atrada pozitīvu korelāciju starp PCV2 daudzuma pieaugumu audos un šūnu apoptozi limfmezglos (Lin et al., 2011).

Turpretī ir ļoti maz pētījumu, kas saistīti ar PCV2 ietekmes izpēti uz šūnu vairošanās spējām. Tāpēc viens no šī darba uzdevumiem bija šūnu vairošanās pētīšana, t.i. limfocītu proliferācijas aktivitātes izmaiļu noteikšana limfmezglos ar dažādu cūku cirkovīrusa-2 klātbūtni tajos. Kā jau minēts, šūnu dzīvescikla aktivitāti atspoguļo tā saucamais proteīns Ki67, jeb šūnu proliferācijas indekss (Scholzen, Gerdes, 2000; Booth et al., 2014).

Ki67 proteīnu saturošo šūnu daudzuma izmaiņas limfmezglos ar cirkovīrusa-2 antigēna klātbūtni un bez tā

Analizējām Ki67 proteīnu saturošo šūnu vidējo skaitu limfmezglos sivēniem saistībā ar daļādu PCV2 antigēna daudzumu limfmezglos (13. un 14. att.).

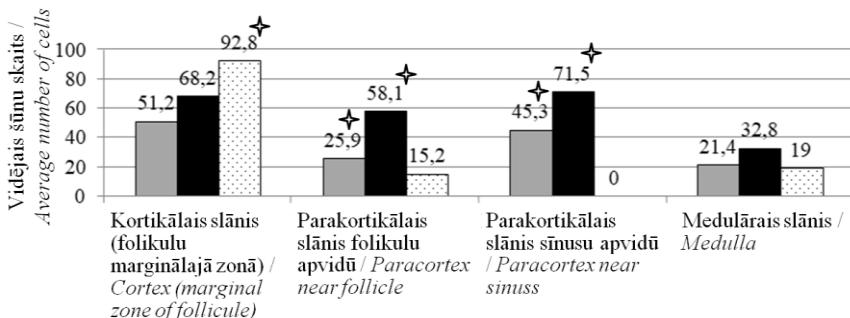


- Folikulu vizuālais izskats - 1 balle limfmezglos ar PCV2 / Visualization of the follicle - 1 score in lymph nodes with PCV2
- Folikulu vizuālais izskats - 2 balles limfmezglos ar PCV2 / Visualization of the follicle - 2 score in lymph nodes with PCV2
- Folikulu vizuālais izskats - 3 balles limfmezglos ar PCV2 / Visualization of the follicle - 3 score in lymph nodes with PCV2
- Limfmezglos nav PCV2 / Lymph nodes without PCV2

13. att. **Ki67 proteīnu saturošo šūnu daudzums limfmezglos ar dažādas pakāpes folikulu vizuālajām izmaiņām un ar (pārsvarā) nelielu (+) PCV2 antigēna daudzumu tajos.** ↗ - p<0,05

Fig.13. Number of Ki67 positive cells in lymph nodes with different score of follicle visualization and mild (+) quantity of PCV2 antigen. ↗-p<0.05

Izrādījās, ka līdz ar PCV2 daudzuma pieaugumu limfmezglos, šūnu proliferācijas aktivitāte to folikulos stipri samazinās, bet tas pieaug limfmezglu parakortikālajā slānī un sīnusu apvidū (sk. 13. un 14. att.). Līdzīgu tendenci, kaut tā nav bijusi statistiski būtiska, atzīmējuši arī citi autori (Lin et al., 2011). Mūsu pētījumā pierādījām, ka PCV2 būtiski ietekmē šūnu proliferācijas aktivitātes samazināšanos limfmezglu folikulos ($p<0,05$). Tā kā limfmezglu folikulu zonā prevalē B limfocīti, tas nozīmē, ka tieši ar šūnu vairošanās spējas samazināšanos saistīta kopējā B limfocītu daudzuma samazināšanās limfmezglos.



■ Vidējs (++) PCV2 antigēna daudzums limfmezglos / Moderate (++) quantity of PCV2 antigen in lymph nodes

■ Liels (+++) PCV2 antigēna daudzums limfmezglos / Severe (++) quantity of PCV2 antigen in lymph nodes

□ Limfmezglos nav PCV2 / Lymph nodes without PCV2

14. att. Šūnu skaits ar Ki67 proteīnu limfmezglos ar vidēju (++) un lielu (+++) PCV2 antigēna daudzumu. † - p<0,05

Fig.14. Number of Ki67 positive cells in lymph nodes with moderate (++) and severe (++) quantity of PCV2 antigen. †- p<0.05

Mēs arī pierādījām, ka līdz ar PCV2 antigēna daudzuma palielināšanos limfmezglos, palielinās arī šūnu proliferācija tā parakortikālajā slānī, īpaši sīnusu apvidū (sk. 14.att.). Jāatgādina, ka Ki67 proteīnu var saturēt jebkura šūna, tāpēc nav iespējams precīzi noteikt, kādas šūnas tieši iesaistītas dalīšanās procesā. Zināms, ka parakortikālais slānis ir T limfocītu atkarīgā zona. Kā iepriekš bija parādīts, PCV2 ietekmē histiocītu proliferāciju limfmezglā, tāpēc parakortikālajā slānī konstatētās Ki67 pozitīvās šūnas varēja būt, kā T limfocīti, tā arī histiocīti. Jāatzīmē, ka līdz ar PCV2 antigēna daudzuma palielināšanos limfmezglos, kopējais limfocītu daudzums samazinās, turpretī histiocītu daudzums pieaug. Tāpēc iespējams, ka Ki67 proteīna pozitīvās šūnas bijušas tieši histiocīti.

Jāatgādina, ka Ki67 proteīnu konstatē visās aktīvās šūnas fāzēs, t.i. interfāzē G1, S, G2 un mitozē. Toties šūnu „klusajā” fāzē G0, proteīnu Ki67 nenovēro nemaz (Scholzen, Gerdes, 2000; Booth et al., 2014).

Tas nozīmē, ja PCV2 antigēna ietekmē samazinās šūnu skaits ar Ki67 proteīnu, tad PCV2 neaizkvāvē šūnu dalīšanos kādā noteiktā etapā, bet stimulē šīs šūnas pāriešanu tieši neaktīvajā formā (G0 fazē). Šādā formā šūnas var atrasties ilgu laiku, lai nepieciešamības gadījumā atkal varētu iesaistīties dalīšanās procesā. Tomēr šūnas G0 fazē var arī novērot un pat neatjaunot savu dzīves ciklu (Scholzen, Gerdes, 2000; Booth et al., 2014). Quan et al. (2016) *in vitro* pētījums liecina, ka PCV2 izraisīta šūnas dzīvescikla apstāšanās G0 fāzē,

var nodrošināt labvēlīgus apstākļus vīrusa proteīna ekspresijai un vīrusa replikācijai. Pašlaik paliek jautājums, vai PCV2 aizkavē šūnu dzīves ciklu G0 fāzē, vai izraisa DNS bojājumu, līdz ar to pāātrinot šūnu novecošanās procesu. Lai noskaidrotu šo jautājumu, nepieciešams veikt papildus *in vitro* izmeklējumus šūnu kultūrā.

In vitro pētījumā konstatēja, ka PCV2 ietekmē Ca^{+2} pieaugumu šūnu citoplazmā (Gu et al., 2016). Tas nozīmē, ka PCV2, iespējams, izraisa šūnu nekrozi, jo Ca jonu palielināšanās citoplazmā aktivizē vairākus fermentus (endonukleāze, proteāze, ATF-āze), kas izraisa šūnu bojāeju (Zachary, McGavin, 2012). Ja PCV2 vienlaikus ietekmē šūnu proliferāciju un šūnu nekrozi, tas var izskaidrot tik smagu imūndeficitu un limfopēniju slimiem ar PMWS sivēniem. Līdz ar to vīrusa patoģēnēzē joprojām paliek neatrisināti jautājumi. Piemēram, kāpēc vieni sivēni ar PCV2 klātbūtni paliek veseli, bet ciem sivēniem attīstās klīniskās pazīmes un parasti nāve.

Tātad kopumā, izvērtējot visus darba rezultātus, varam secināt, ka cūku cirkovīrus-2 Latvijā ir visai plaši izplatīts, un ka arī seroprevalence ir augsta visos reģionos. Tas palielina pēcatšķiršanas novājēšanas sindroma uzliesmojuma risku Latvijas cūku saimniecībās. Savā pētījumā, no potenciāli slimiem ar PMWS sivēniem, pēcatšķiršanas novājēšanas sindroms apstiprinājās 38 % gadījumu. Šo sivēnu limfmezglos novērojām vairākas likumsakarības. Izrādījās, ka jo lielāks PCV2 antigēna daudzums konstatēts limfmezglā, jo stiprāk izmainās tā folikulu struktūra, un – līdz ar limfocītu daudzuma samazināšanos limfmezglos, tajos vienlaicīgi paaugstinās histiocītu daudzums. PCV2 limfmezglā izplatās noteiktā virzienā – no limfmezgla garozas uz medulāro slāni, kas atbilst limfas plūsmas ceļam.

PCV2 antigēna daudzums limfmezglos ietekmē PMWS saslimšanai raksturīgo virusālo ieslēguma ķermel'u un multinukleāro gigantisko šūnu parādīšanos. Jāatzīmē gan, ka vienlaicīgi abas šīs struktūras limfmezglos netika konstatētas. Izrādījās, ka limfmezglu strukturālās izmaiņas būtiski ietekmē ne tikai PCV2 klātbūtnē, bet arī baktēriju klātbūtnē limfmezglos. Sivēniem, slimiem ar PMWS, baktēriju klātbūtnē limfmezglos palielina cūku cirkovīrusa-2 ietekmi uz organizma atbildes reakcijas aktivitāti, zināmā mērā pastiprinot to.

Analizējot limfocītu zudumu limfmezglos, sivēniem ar PMWS konstatējām, ka tieši B limfocītu daudzums ir tas, kurš samazinās sākumā, tikai pēc tam novēro T limfocītu zudumu. Turklāt pieradījām, ka B limfocītu samazināšanās ir tieši saistīta ar šo šūnu vairošanās spēju samazināšanos.

Kopumā jautājums par limfocītu zudumu limfmezglos, slimiem ar PMWS sivēniem, paliek aktuāls pētījumiem kā Latvijā, tā arī pasaulei.

SECINĀJUMI

1. Latvijā PCV2 ir visai plaši izplatīts. PCV2 seropozitīvo cūku daudzums Kurzemes reģionā sasniedza 75,3%, Zemgales – 76,1% un Vidzemes reģionā 83,4%. PCV2 seropozitīvo cūku daudzums ļoti lielās (79,7%), lielās (76,1%), vidējās (76,9%), mazās (77,3%) un ļoti mazās (70,0%) cūku saimniecībās ir līdzīgi augsts ($p>0,05$).
2. Jo lielāks PCV2 antigēna daudzums konstatēts limfmezglā, jo stiprāk izmainās tā folikulu struktūra. Līdz ar limfocītu daudzuma samazināšanos limfmezglos, tajos vienlaicīgi paaugstinās histiocītu daudzums.
3. Sivēniem, slimiem ar PMWS, viens no specifiskiem izmaiļu parametriem ir multinukleāro gigantisko šūnu (MGŠ) parādīšanās limfmezglos.
4. Ar PMWS slimiem dzīvniekiem sekundāri var pievienoties arī nepatogēnie bakteriālie ierosinātāji, turklāt, šādiem dzīvniekiem limfmezglos statistiski biežāk konstatē vairāk nekā vienu bakteriālo ierosinātāju.
5. Multinukleārās gigantiskās šūnas, ar PMWS slimiem sivēniem, parādās tikai limfmezglos, kuros ir viens vai vairāki bakteriālie ierosinātāji. Pieaugot PCV2 antigēna daudzumam limfmezglos, samazinās MGŠ parādīšanās biežums tajos.
6. PCV2 citoplazmatisko ieslēguma ķermel' u parādīšanās histiocītos ir cieši saistīta ar PCV2 antigēna daudzuma pieaugumu limfmezglā. Samazinoties PCV2 antigēna daudzumam limfmezglos, samazinās citoplazmatisko ieslēguma ķermel' u parādīšanās biežums tajos, un otrādi.
7. Sivēniem ar PMWS sākumā samazinās B limfocītu daudzums, pēc tam novēro T limfocītu zudumu. B limfocītu samazināšanās saistīta ar šo šūnu vairošanās spēju pazemināšanos.
8. Līdz ar PCV2 klātbūtni limfmezglos, būtiski samazinās šūnu proliferācijas aktivitāte folikulos, kas ir B limfocītu atkarīgā zona. PCV2 aizkavē B limfocītu dalīšanās procesu.

AIZSTĀVĒŠANAI IZVIRZĀMĀS TĒZES

1. Mājas cūku populācijā PCV2 ir plaši izplatīts visā Latvijas teritorijā.
2. PCV2 izraisa limfocītu zudumu limfmezglos, ietekmējot to proliferācijas aktivitāti.
3. PCV2 daudzums un sekundārā bakteriālā infekcija ietekmē limfmezglu morfoloģisko stāvokli.
4. Sivēniem, slimiem ar PCV2 infekciju, bieži pievienojas vairāki bakteriālie, arī nepatogēnie saslimšanas ierosinātāji.

IETEIKUMI PRAKSEI

1. Lēmot vērā, ka PCV2 izplatība Latvijas reģionos ir visai plaša ar augstu tās seroprevalenci, ieteicams cūku ganāmpulkus vakcinēt, jo pēcatšķiršanas novājēšanas sindroma ārstēšana ir neefektīva un rada lielus ekonomiskos zaudējumus.
2. Tā kā pēcatšķiršanas novājēšanas sindroma klīniskās pazīmes un patologanatomiskās izmaiļas ir nespecifiskas, ieteicams kritušiem sivēniem vienmēr nolemt limfmezglu paraugus, lai tos paralēli izmeklētu uz PCV2 klātbūtni.
3. Vērtējot MGŠ parādīšanos limfmezglos, dzīvniekam noteiki jāizmeklē vairākas limfmezglu grupas – vismaz *Inn. inguinales superficiales*, *Inn. jejuna*les un *Inn. tracheobronchales*.

INTRODUCTION

Topicality of the research

An outbreak of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) was first detected in Canada in 1991. The cause of this disease was found much later, only in 1998, when the porcine circovirus-2 (PCV2) was isolated from piglets affected by PMWS (Mankertz et al., 1998; Meehan et al., 1998). First cases of PMWS in pigs in Europe appeared in the middle of the 1990s; France and Spain in 1997. The first report about PCV2 infection in Lithuania and Latvia was published in 2007 (Stankevicius et al., 2007).

The virus mainly affects piglets which are 5-15 weeks of age, it causes mortality of piglets or chronic wasting and slimming. Consequently, post-weaning multisystemic wasting syndrome causes significant economic losses in pig farming (Segales, Domingo, 2002; Karuppannan, Opiressnig, 2017), therefore the study was launched around the world for the PCV2 prevalence, the pathogenesis of the disease, the morphological changes in the tissues, and control of the disease.

The confirmation of PMWS is complicated, because clinical manifestation and gross lesions associated with PMWS are non-specific. Only lymph nodes microscopic lesions show specific changes of PCV2, therefore this virus replicates in monocyte/macrophage lineage cells, which during the disease proliferated directly in the lymph nodes in large quantities (Rosell et al., 1999; Sanchez et al., 2003; Rodriguez-Carriño et al., 2011; Ellis, 2014). Following lymphocytes are „replaced” by histiocytes in lymph nodes. Thereby piglets affected with PMWS have cellular and humoral immunity disorders. Consequently, the post-weaning multisystemic wasting syndrome in piglets is considered by a general immune deficiency disease (Segales et al., 2004a; Ferrari et al., 2014).

It is still unknown why piglets with PMWS have severe loss of lymphocytes in lymphoid tissues and in blood.

Some human and animal viruses can cause lymphoid tissue apoptosis (Benedict, Banks, Ware, 2003; Irusta et al., 2003; Neumann et al., 2015). Apoptosis is a programmed cell death and is developed by activation of specific enzyme caspases (Hengartner, 2000; Lockshin, Zakeri, 2002; Neumann et al., 2015). However, the latest results reveal that apoptosis has no significant impact on lymphocyte depletion in lymph nodes of pigs infected by PCV2 (Resendes et al., 2004; Kiupel et al., 2005; Resendes et al., 2011).

Hypothesis of the research

The hypothesis of the study was: lymphocyte depletion occurs due to lymphocyte life-cycle delay in pigs infected by PCV2. The activity of cell life-cycle is attributed to nuclear protein Ki67, which is found in all active phases of the cell, like interphase G1, S, G2 and mitoses. However, protein Ki67 is not observed, at all, in the cell's "quiet" phase G0.

Aim of the research

The aim of our work was to investigate the lymph node reactivity of pigs infected by PCV2.

Objective of the research

1. To investigate the distribution of PCV2 in domestic pigs of Latvia.
2. To investigate impact to the PCV2 number in lymph node on the morphological changes in lymph nodes.
3. To investigate bacterial co-infection in the piglets lymph nodes infected with PCV2.
4. To investigate the effect of the bacterial infection on the morphological changes of lymph nodes in pigs with and without PCV2.
5. To investigate the effect of the PCV2 on appearance of the multinucleate giant cell and viral cytoplasmic inclusions bodies in lymph nodes.
6. To detect number of the mature T and B lymphocytes in lymph nodes with different number of PCV2.
7. To detect number of Ki67 positive cells in lymph nodes with different number of PCV2.
8. To investigate the connection between changes of Ki67 positive cells and lymphocytes number in lymph nodes with different number of PCV2 antigen.

Scientific novelty of the research

1. Original data of PCV2 prevalence of domestic pigs was obtained in different region in Latvia in different-scale farms.
2. New data was obtained on effect of bacterial co-infection to the severity of morphological changes in lymph nodes of pigs with PMWS.
3. Original data of the effect of secondary bacterial infections on multinucleate giant cells and viral cytoplasmic inclusion body appearances in lymph nodes of piglets with PMWS were obtained.
4. New data was obtained on frequency occurrence of multinucleate giant cells and viral cytoplasmic inclusions bodies in lymph nodes of pigs naturally infected by PCV2.
5. New data was obtained on PCV2 impact on the lymphocytes proliferation activity.

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Research design.
2. Visiting the pig farm, evaluation of the epidemiological situation according to clinical manifestation of pigs.
3. Selection of dead piglets for necropsy according to PMWS specific gross pathology.
4. Necropsy of dead piglets and sampling for histological, immunohistochemical, bacteriological and serological testing.
5. Histological and immunohistochemical samples preparation and microscopy.
6. Collection and analysis of anamnesis data for live pigs, which were serologically investigated to the PCV2 antibody.
7. Analysis and statistical processing of histological, immunohistochemical, bacteriological and serological investigations data.

STRUCTURE AND VOLUME OF THE DOCTORAL THESIS

The doctoral thesis consist of: 128 pages, 62 figures, 33 tables, an introduction, personal contribution, approbation of the study results, review of literature, materials and methods, research results, discussion, conclusions, thesis defense, recommendations for practice and literature references with 229 literature sources.

MATERIALS AND METHODS

Carry out of study, source and characteristic of samples

Sampling and investigation are carried out in two phases. In the **first research phase**, from 2008 to 2011, samples were obtained from five pig farms in Latvia - Latgale, Vidzeme and Kurzeme regions. During this period we obtained samples from three relatively large pig farms (a total number of animals above 7000 in farm) and from two relatively medium-size farms (a total number of animals between 1000 and 7000 in farms). The clinical manifestation of PMWS and mortality of piglets was reported in all investigated farms at different mortality ranges. Such PMWS clinical manifestations as weight loss, diarrhoea or respiratory disorder, pale or icteric mucuses were observed before the death of piglets (Clark, 1997; Rosell et al., 1999; Segales et al., 2004a; Ellis, 2014). The age of investigated pigs being that of 5-15 weeks.

Testing of samples were carried out at the Animal Disease Diagnostic Laboratory of Institute of Food Safety, Animal Health and Environment BIOR. Data analysis and interpretation of results were in the Laboratory of Parasitology and Histology Department of Ecology Daugavpils University Institute of Life sciences and technology and in the Preclinical Institute of the Faculty of Veterinary Medicine the Latvia University of Agriculture.

In total, 42 pig carcasses were collected. All dead piglets had been vaccinated from respiratory reproductive syndrome. Pig necropsy was performed in 12 hours after pigs' death. Samples of blood were taken for the serological investigation. Samples of lymph nodes – *lnn. inguinales superficiales*, *lnn. jejunales* and *lnn. tracheobronchiales* were taken for histological, immunohistochemical (IHC), and bacteriological investigation.

Lnn. inguinales superficiales consists of two lymph nodes, which are located in subcutaneous of the right and leftgroin region (*lnn. inguinales superficiales sinister et dexter*). *Lnn. inguinales superficiales* are relatively large and in adult pigs reached length of 5-8 cm (Brūveris, 2007), therefore, three cross-sections were selected from each lymph node with a distance of 0.5 to 1.0 cm.

Lnn. jejunales is located in mesentery, along the small intestine. The number of *lnn. jejunales* could reach up to 40 lymph nodes. Samples were taken from cranial, middle and caudal part of *lnn. jejunales*. One cross-section was selected from each of three *lnn. jejunales*.

Lnn. tracheobronchiales are the lymph nodes, locate near the trachea and the bronchi. There are *lnn. tracheobronchiales dextri*, *sinistri* and *medii*. Additionally pig has *lnn. tracheobronchiales craniales*, which is located near

Inn. tracheobronchales dextri and have difficult visualization, therefore only three lymph nodes are selected for the study—*Inn. tracheobronchales dextri*, *sinistri* and *medii*. The length of these lymph nodes is relatively small, for adult pigs it is about 0.3-3.5 cm (Brüveris, 2007), so from each *Inn. tracheobronchales* only one cross-section was selected.

Totally 42 pigs and 336 lymph nodes were investigated; two *Inn. inguinales superficiales*, three *Inn. tracheobronchales* and three *Inn. jejunales* of each animal and 504 cross-sections of lymph nodes.

In accordance with the tasks of study, histological and immunohistochemical investigations of lymph node samples were used to determine the number of PCV2-antigen in the lymph node, to determine the location of the virus in the lymph node, and to determine the morphological changes of the lymph node.

In the **second research phase**, from 2006 to 2016, we've investigated PCV2 prevalence in Latvia. Blood samples were sent for surveillance to the Institute BIOR. In general, 963 blood samples of domestic living pigs were serologically tested. Samples were obtained from 58 farms of different regions of Latvia. Out of the 58 farms included in the study, there were nine huge-scale farms with more than 5001 animals, nine large farms with 1001 to 5000 animals, eight medium-scale farms with 101 to 1000 pigs, 14 small farms with 11 to 100 pigs and 18 very small-scale farms with 1 to 10 pigs (Table 1). The blood samples had been collected from clinically sick animals of different sexes and ages. Data of routine investigations from Institute of Food Safety, Animal Health and Environment BIOR were used for the results of study.

Methods used the research

Histological investigation and immunohistochemistry of lymph node

At first, paraffin blocks were prepared from each lymph node (n=336) for histological and immunohistochemical investigations. Tissue samples were prepared and stained by immunohistochemistry for PCV2 antigen detection and classical histology methods, which were adapted and validated in the Animal disease diagnostic laboratory of Institute BIOR. PCV2 antigen positive and negative reference tissue samples of paraffin blocks and stained slides were used for the validation of the method. The reference tissue samples were received from Poland, Pulava National Institute of Veterinary Research in 2007.

Preparation of samples carried out by conventional method. It includes fixation of the tissues, dehydration and degreasing, embedding in paraffin wax and cutting of samples.

Lymph node samples were fixed by neutral-buffered 10% formalin. This solution is one of the most widely used fixing solutions (Bancroft, Gamble, 2007), which have approximately 6.8 pH. One little fixation solution contains 100 ml of 36-38% formaldehyde, 900 ml of distilled water, 4 g of monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) and 6.5 g of dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4). 24-30 hours at room temperature is necessary for complete fixation of the tissues in the fixation solution, furthermore the lymph node sample thickness not more than 5 mm (Boensch, 2001; Singh, 2003; Bancroft, Gamble 2007). The time of fixation of samples was strictly observed, because prolonged (several day) tissue fixation causes protein denaturation, which significantly changes results of the immunohistochemical investigation (Boensch, 2001; Bancroft, Gamble, 2007).

Next, the lymph node samples were dehydrated and degreased using a Leica TP1020 automated tissue processor (made in Germany), where the tissue samples were processed in tap water, "alcohol row", xylene and liquid paraffin at 1-2 hours in each solution. As known, water rinses formalin solution from the sample. After that, the lymph node tissue is transferred to the "alcohol row", sequentially from 70%, 80%, 96% ethanol and three 100% denatured alcohol stages. It is proved that the sample dehydration and degreasing by alcohol liquids using from lower to higher concentrations is necessary to exclude tissue post-mortem autolysis. Then followed sample is "cleansed" in xylene, which removes alcohol and provides better paraffin absorption in the tissues (Singh, 2003; Bancroft, Gamble, 2007). In our work, we used two xylene for the tissue sample and then sample was moved in two containers with paraffin.

Embedded paraffin sample sectioned at 4 μm by microtome *Leica RM 2255* (made in Germany). Of each lymph node sample was prepared at least five slides:

1. One slide was applied for histological staining, it was dried at +58 °C, 20 minutes in a Binder 140KB 53 thermostat (made in Germany). Next, the slide of sample is treated with xylene and alcohol (starting with 100% denatured alcohol, then 96% ethanol, 90% and 70% ethanol) for degrease and remove the paraffin. After that, slide was stained by hematoxylin and eosin. Then, slide was clarified with 96% alcohol and xylene. In the end, we put a glue with a coverslip and evaluated the general morphological condition of the lymph node.
2. Four slides were applied for immunohistochemistry staining. Tissue sample was floated onto specific permanent positive charge slide *SuperfrostPlus* (Menzel-Glasser, Germany) and it was dried at +37 °C, 15 hours in a Binder 140KB 53 thermostat. Four slides from each lymph node were stained by immunohistochemistry for PCV2 antigen, CD3,

CD79 α and Ki67 protein detection. CD3 protein is T lymphocyte co-receptor. B lymphocyte contains CD79 α protein. Ki67 protein describes cell proliferation activity.

Immunohistochemistry staining for PCV2 antigen detection. In order to detect PCV2 antigen, an immunohistochemical technique (IHC) was carried out on the lymph nodes' tissue sections by using an avidine-biotin-peroxidase method described previously (Szczotka, Stadejek, Pejsak, 2011). IHC for PCV2 antigen detecting is one of the best investigation method, because its sensitivity is equivalent to the polymerase chain reaction (PCR) and *in situ hybridization* (McNeilly et al., 1999; Ha, Jung, Chae, 2005; Szczotka, Stadejek, Pejsak, 2011). Although some authors believe that this method may show a false negative result with very low PCV2 concentration in the tissues (Kim, Chae, 2003; Khaiseb et al., 2011). Immunohistochemistry staining to detect location of PCV2 antigen in lymph node, is not possible by PCR (Ha, Jung, Chae, 2005; Khaiseb et al., 2011). Moreover, compared with other methods, IHC is cheaper and faster method of PCV2 antigendetection (Szczotka, Stadejek, Pejsak, 2011). Therefore, we chose avidine-biotin-peroxidase immunohistochemical method for PCV2 antigen detection.

Reference control positive and negative samples of PCV2 antigen were stained simultaneously with the study included samples.

PCV2 detection protocol included tissue blocking with 3% hydrogen peroxide for 30 min, after which proteinase K was used for epitope demasking for 3 min. Proteinase K was diluted 1:50 with Tris-buffered saline (TBS, pH=7.55). Primary antibody (Ingenasa 36A9) was diluted 1:250 with TBS and albumin; primary antibody was incubated for 45 min at +4 °C, for 15 hours. Secondary antibody Polyclonal Goat-Anti Mouse Immunoglobulin Biotinylated was diluted 1:200 with TBS and applied at room temperature for one hour. Then avidin peroxidase conjugated kit was applied to the tissue slide and incubated for two hours at room temperature. After that the chromogen-substrate (AEC) was added, stained by hematoxylin, and covered by mounting media with coverslip.

Immunohistochemistry (IHC) staining for T and B lymphocyte detection and visualization of cell proliferation activity protein. Other three slides of each lymph node were stained by IHC for specific protein visualization. This IHC have one common investigation procedure (protocol), where changes only primary antibody. CD3 protein is T lymphocyte co-receptor. B lymphocyte contains CD79 α protein. Ki67 protein describes cell proliferation activity.

Dako EnVision®+ System-HRP kit K4007 (Denmark) was used for investigation. Enzymes horseradish peroxidase (HRP) was used as labels for protein detection. At first, sample was deparaffinized and dehydrated with

xylene and decreasing concentrations of ethanol. After that the slide was rinsed with buffer solution Dako EnVision™ FLEX Wash Buffer (K8007). Microwave was used for epitope demasking (incubation for 15 minutes by 350 watts and 7 minutes by 750 watts). After, endogene peroxidase of tissues was blocked with 3% hydrogen peroxide for 10 min. Each slide from one lymph node was applied to by three different primary antibodies (Dako):

1. one slide was applied to by primary antibody Monoclonal Mouse Anti-Rat Ki-67Antigen, Clone MIB-5 for Ki67 protein detection, which is a specific protein of cell life activity (Polaček et al., 2007; Debeer et al., 2013);
2. to the second slide a primary antibody Monoclonal Mouse Anti-Human CD3, Clone F7.2.38 was added for CD3 positive cell visualization, which is a T lymphocyte (Polaček et al., 2007; García-Nicolás et al., 2015);
3. third slide was applied to by primary antibody Monoclonal Mouse Anti-Human CD79α, Clone JCB117 for CD79α protein, which is B lymphocyte specific protein (Polaček et al., 2007; Debeer et al., 2013; García-Nicolás et al., 2015).

It should be noted that all primary antibodies were produced for the visualization of human proteins. Other studies show that the primary antibody for human proteins, especially T and B lymphocytes, have a cross-reactivity with pig proteins (Polaček et al., 2007; Cino-Ozuna et al., 2012; García-Nicolás et al. 2015). Therefore, human primary antibodies often used for visualization of pig protein (Rekiel et al., 2010; Debeer et al., 2013).

Primary antibodies were rinsed by Dako EnVision™ FLEX Wash Buffer (K8007). After that all slides were incubated in DakoEnVision polymer-HRP at room temperature for 45 minutes. DakoEnVision polymer-HRP conjugated to Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins and it was used undiluted form. At the end, they were washed by TBS, added chromogen-substrate (DAB), stained by hematoxylin and covered by mounting media with coverslip. CD3 and CD79α positive cells had brown cell membrane. Ki67 positive cells had brown nucleus.

Serological investigation of blood samples for the detection of PCV2 antibodies

All blood samples of domestic pigs (963 blood samples from live pigs and 42 samples from dead piglets) were investigated for the PCV2 antibodies detection with blocking ELISA Synbiotics, Serelisa PCV2 Ab Mono Blocking kit (France). For each test, positive and negative, control included in the

commercial kit was used. Samples were tested according to the manufacturer's instructions. Each serum sample was diluted 1:100, using commercial diluent, and added in the wells of a microplate, coated with anti-PCV2 antibodies bound specifically to purified PCV2 antigen. The plate was incubated at +37°C for one hour in the incubator *Labsystems iEMS Incubator/Shaker* (Finland). Following incubation the plate was washed in the specific washing equipment *Bio-Rad PW41* (France). We used this washer system after each application of the reagent. After that 100 µl of conjugate (anti-PCV2 Mab with peroxidase) were added to each well. Plate was incubated again for one hour at +37°C. After that, plate was washed again. Then 100 µl of peroxidase buffered substrate was added to each well and plate was incubated at +20°C for 20 minutes shielded from light. The reaction was stopped with Stop solution. The optical density (OD) of the investigated samples was determined using a monochromatic ELISA reader (Thermo Labsystems Multiskan Ascent) with 450 nm filter. The presence of PCV2 antibodies was expressed by optical density (S/N value) and calculated according to the following formula: OD sample / OD negative control. The *cut-off* determination by the commercial kit was applied for the interpretation of the S/N value, results were divided into positive, negative or suspicious, respectively.

If S/N value was less than *cut-off*, this sample was PCV2-seropositive. If S/N value was higher than *cut-off*, this sample was PCV2-seronegative. During of the research, *cut-off* value was changed several times. There was two *cut-off* value from 2006 to 2008: low *cut-off* was 0.15 and high – 0.2. Samples with S/N value ≤ 0.15 were PCV2 seropositive, samples with S/N value ≥ 0.2 were PCV2 seronegative, but samples with S/N value from 0.15 to 0.2 were PCV2 serosuspicious. From 2008 there was only one *cut-off*, which divided results into positive or negative. From 2008 *cut-off* was 0.5, but from 2010 – 0.4.

Bacteriological investigation of the lymph node samples

PMWS is considered as a general immune deficiency disease in piglets (Segales et al., 2004a; Ferrari et al., 2014), moreover one or more secondary bacterial infection join to the pig with PMWS (Chae, 2004; Gu et al., 2014; Opriessnig et al., 2017). Clinical manifestation of PMWS for naturally infected pigs usually associated with combination of PCV2 and other viruses or/and bacterial infection (Albina et al., 2001; Bolin et al., 2001; Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2002; Okuda et al., 2003; Hasslung et al., 2005; Ellis, 2014). Only 15% of pigs with PMWS did not observe secondary infection (Kim et al., 2002), therefore according with task of research, bacteriological investigation was carried out for all lymph nodes of piglets.

During necropsy of each piglet carcasses (n=42) sample of two *Inn.*

inguinales superficiales, three *Inn. tracheobronchales* and three *Inn. jejunales* were taken. Each sample was tested by three diagnostic methods: microorganisms growing of media, native microscopy and mouse inoculation test.

Native microscopy. At first the surface of lymph node was cauterised with a spatula; a tissue piece from the cauterised surface was cut out by sterile scissors or a sterile scalpel. Then immediately after tissue cutting, the tissue piece with cut surface was imprinted to the sterile slide. After that we kept the slide with a smear on top and pulled out the slide through the flame 3-4 times for the smear fixation. Then the slide was stained with methylene blue and microscoped.

Microorganisms growing of media. Each sample of the lymph nodes from 42 piglets was carried out culture on the six media (made in Italy, *Biolife*): Blood agar, Nutrient agar, EMB agar, XLD agar MacConkey agar and Brain Heart Infusion agar with blood. These media were selected for cultivating the widest range of bacteria, which are most commonly caused the disease of pigs (Markey et al., 2013). Each lymph node was cut with sterile scissors and this cut lymph node surface was applied to the media. This media was incubated at temperature of +37 C° from 24 to 72 hours. Anaerobic environment was used for Brain Heart Infusion agars incubation. The pure cultures of isolated bacteria were stained by the Gram method and microscopy. In order to identify type of bacteria, we cultured pure bacteria in the additional biochemical tests (*API testi*, *BioMerieux* (France) and *BBL crystal testi*, *Becton Dickinson* (USA)).

Mouse inoculation test. Lymph nodes of each animal were cut to small pieces, physiological fluid 1:10 was added, and put in the mixing equipment *Stomacher* for emulsion preparing. This emulsion (0.5 ml) injected to subcutaneous of two white laboratory mice. If the mouse died within 10 days after the injection, the samples from the mouse's internal organs were examined by culture medium and by native microscopy. Mouse inoculation test carried out by the accredited method DC-RI-M-323 of BIOR.

Sample microscopic evaluation

Samples microscopy carried out by *Nikon* light microscope in Preclinical Institute of the Faculty of Veterinary Medicine the Latvia University of Agriculture and by *Zeissa* light microscope in Animal Disease Diagnostic Laboratory of Institute of Food Safety, Animal Health and Environment BIOR.

First of all, we evaluated hematoxylin and eosin slides to the morphological changes of the lymph node.

For each histological slide, three structural parameters of lymph nodes were detected. These parameters were evaluated by score ranges from 0 to 3 (Opriessing et al., 2004):

- visualization of the follicle structure (0 – normal, no changes, 1 – visualization of the follicle structure a little deplete, 2 – the follicle structure poorly visualized, 3 – loss of the lymphoid follicle structure);
- number of lymphocyte depletion for full lymph nodes (0 – normal, no changes, 1 – a mild number of lymphocyte depletion, 2 – a moderate number of lymphocyte depletion, 3 – a severe number of lymphocyte depletion);
- number of histiocytic cells (0 – histiocytic cells not detected in tissues, 1 – a mild number of histiocytic cells, 2 – a moderate number of histiocytic cells, 3 – a severe number of histiocytic cells).

In each histological slide the multinucleate giant cell and viral cytoplasmic inclusions bodies were evaluated. It is additional specific histological structures, which show presence of PCV2 in tissue. It was detected in different structure of lymph node – in cortex, in paracortex, in medulla, as well in sub-capsular and trabecular sinuses. We investigated 10 fields with magnification x200 in each region of lymph node.

Furthermore, we evaluated PCV2 antigen in IHC slides. PCV2 antigen was recognised as brown, homogeneous and different sizes granules, which located in cell cytoplasm or intercellular space. The tissue evaluation was done according to the common system, quantity of PCV2 antigen was expressed by plus system:

- mild quantity of PCV2 antigen (+) was observed in less than 10% of the follicles (Opriessnig, Meng, Halbur, 2007) or lymph node parenchyma;
- moderate quantity of PCV2 antigen (++) was observed in 10% to 50% of the follicles (Opriessnig, Meng, Halbur, 2007) or lymph node parenchyma;
- severe quantity of PCV2 antigen (+++) was observed in more than 50% of the follicles (Opriessnig, Meng, Halbur, 2007) or lymph node parenchyma.

In addition, PCV2 antigen was evaluated in percentages, where measured immunohistochemical positive and negative stained lymph nodes tissues in the field of microscope were observed. Measurements were done with the computer program Pannoramic DensitoQuant (3DHISTECH). We made the analysis in Daugavpils University Institute of Life Sciences and Technologies, Department of Ecology, Laboratory of Parasitology and Histology. In each

immunohistochemical slide was estimated number of PCV2 antigen in different regions of lymph node – in follicle, paracortex near follicle area, paracortex near sinus area and medulla. Five fields (200 µm on 200 µm) were detected from each region of lymph node. Today, it widely uses computer programs for immunohistochemically slide estimation, it accelerate and facilitate sample analysis (Tuominen et al., 2010; Schuffler et al., 2013).

At last, we evaluated IHC slides for presence of CD3 protein (which is specific T lymphocyte protein), CD79 α protein (which is specific B cell protein), and Ki67 protein (which is present in all active phases of cell life cycle). CD3 and CD79 α positive cells had brown cell membrane. Ki67 positive cells had brown nucleus.

According to data of the literature, IHC positive cell counting and analysis is one of the most Complicated and debatable topics (Fedchenko, Reifenrath, 2014). There is a not one permanent counting and analysis system. Each pathologist chooses the most appropriate cell analysis and counting technique, based on their individual experience. Generally researchers recommend using simpler and easier understandable counting systems (Fedchenko, Reifenrath, 2014). Therefore in our study, we used one of the most frequently described methods for CD3, CD79 α and Ki67 positive cells analysis. It is the quantitative calculation of immunohistochemically positive cells to the total number of cells per sample (Louis et al., 1991; Muskhelishvili et al., 2003; Bologna-Molina et al., 2011; Fedchenko, Reifenrath, 2014). In each immunohistochemical slide was estimated number of CD3, CD79 α and Ki67 positive cells in different regions of lymph node – in follicle, paracortex near follicle area, paracortex near sinus area and medulla. Five randomly selected fields were investigated from each region of lymph node. We counted 100 cells in the each field. Microscope Zeiss Axiolab with counting program Zeiss version 4.10 was used for cells analysis. We used a "grid system" for easier cell counting. We put a grid by computer program Zeiss version 4.10 on each field and counted 100 cells in the appropriate direction (Bologna-Molina et al., 2011).

Statistical processing of data

Data of PCV2 seropositive pigs was calculated using 95% confidence interval for binomial populations (Wilson, 1927; Newcombe, 1998). This confidence interval, with probability of 95%, determined the number of PCV2 seropositive pigs in different farms, regions of Latvia and in different years of testing. The interpretation of serological test results was performed using a Collection of JavaScript E-labs Learning Objects (open source calculator).

We also used the t-test, which is the most commonly used method, which determine statistically significant differences between the two arithmetic means of the samples (Paura, Arhipova, 2002). *Microsoft Excel* t-test was applied to determine statistically significant differences number of PCV2-seropositive pigs from different scale of farms, from different Latvian regions and between different years of investigation.

The data were statistically calculated by *Microsoft Excel* t-test Two-Sample Assuming Unequal Variance for comparing the mean index of structural parameters in lymph node with different number of PCV2 antigen in lymph nodes ($p<0.05$). The result of this test allowed to conclude significant effect of different levels of PCV2 antigen on structural changes in the lymph nodes.

T-test was used to determine the statistical differences in the structural changes of the lymph nodes with and without bacterial infection in pig with PMWS. This analysis show, how bacteria impact on the structural changes of the lymph node in pig with PMWS. Additionally, was determined the correlation between structural changes of the lymph node and quantity of bacteria in lymph node.

The average quantity and standard deviation was used for CD3, CD79 α and Ki67 positive cells. *T*-test was used to detect significant differences for CD3, CD79 α and Ki67 positive cell quantity in different layers of the lymph node with and without PCV2.

To determine the correlation between number of CD3, CD79 α and Ki67 positive cells in different layers of the lymph node and quantity of PCV2 antigen, Spearman's rank correlation coefficient of SPSS Statistics version 22 (IBM Corporation, Chicago, Illinois) was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Seroprevalence of porcine circovirus-2 in Latvia (ELISA analysis)

In first phase of the study, seroprevalence was carried of porcine circovirus-2 in Latvia and in different regions of Latvia. During of period 2006-2016, blood samples of 963 domestic pigs from 58 farms were examined for the PCV2 antibodies by serological test ELISA. In totally, PCV2-seroprevalence was 75.9% in all tested pigs (Table 2).

Our results are comparable to those of other studies that have performed in many countries of the world like Canada, France, Germany, New Zealand, UK and USA, revealing that seroprevalence of PCV2 in the domestic pig population reaches almost 100% (Tischer et al., 1982; Tischer et al., 1986; Dulac, Afshar, 1989; Horner, 1991; Allan et al, 1994; Tischer et al., 1995a; Tischer et al., 1995b; Edwards, Sands, 1994; Hines, Lukert, 1995; Magar et al., 2000; Walker et al., 2000; Reiner, Hofmeister, Willems, 2015; Xiao et al., 2016; Karuppannan, Opiressnig, 2017).

The highest numbers of PCV2-seropositive pigs were found in 2009 (94.8%) and 2010 (89.9%). Interestingly, also the numbers of investigated samples were the highest during these two years. This could be associated with an outbreak of PMWS. In turn, in 2011 the lowest number of pigs with PCV2-specific antibodies were detected (38.1%), and during this year, also the lowest number of samples was tested (Table 2). This probably shows a decreasing orders interest in PCV2 investigation, therefore improved biosafety, herd management and start of vaccination program to the PCV2.

Our test results revealed that seroprevalence of PCV2 in pigs was relatively high in all regions of Latvia (Fig. 3).

It should be noted that large numbers of PCV2 seropositive pigs can be found not only in farms with PMWS manifestation, but also in farms without PMWS (Allan, Ellis, 2000; Sibila et al., 2004; Segales et al., 2005; Karuppannan, Opiressnig, 2017). However, the highest seroprevalence of PCV2 in pigs was observed in farms with PMWS manifestation (Sibila et al., 2004; Dvorak et al., 2016). Therefore, it cannot be excluded that the high PCV2-seroprevalence of 75.3%, 76.1% and 83.4% that we have found in the regions of Kurzeme, Zemgale and Vidzeme present outbreaks of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in the pig population (Fig. 3).

In conclusion, PCV2-specific antibodies in pigs are widespread within the territory of Latvia. This is evidenced large number of seropositive pigs in the regions of Latvia (69.0% - 83.4%).

Our study has shown no significant difference in the number of PCV2-seropositive animals ($p>0.05$) from different size of farms (79.7% and 70%), (Table 3).

The widespread of PCV2 seropositive pigs in Latvia and world can depend on PCV2 presence in the different body excretions, and easily transmitted by aerogene, alimentary and horizontal way (Madson et al., 2009; Eddicks et al., 2016). Previous studies showed that PCV2 can be detected by polymerase chain reaction in faeces, urine and saliva samples as well as in mucosal samples of the eyes, nose and tonsils from pigs with and without clinical PMWS manifestation (Hamel et al., 2000; Krakowka et al., 2000; Larochelle et al., 2000; Magar et al., 2000; Kim et al., 2001; Celer, Carasova, 2002; Segales et al., 2005; Kim, Chae, 2003; Shibata et al., 2003; Yang et al., 2003; Caprioli et al., 2006). PCV2 was also found in the semen (Larochelle et al., 2000; Kim et al., 2003), amniotic fluid (Rodriguez-Arrioja et al., 2002), oocysts (Bielanski et al., 2004a; Bielanski, Larochelle, Magar, 2004b), foetal and aborted foetal tissue (Pensaert et al., 2004) of experimentally and naturally infected pigs. Horizontal transmission of PCV2 has been proven experimentally (Albina et al., 2001; Bolin et al., 2001; Shibata et al., 2003), and it has been shown that PCV2 is able to pass the placental barrier and infiltrate the foetus (Park et al., 2005; Eddicks et al., 2016).

However, there might be other transmission routes. Recently, extensive PCV2 DNA was detected from water samples in Brazil, farm air in Canada, house flies in UK, and even in *Culex* (a kind of mosquito) (6.78%, 4/59 sampling) collected in China (Verreault et al., 2010; Blunt et al., 2011; Garcia et al., 2012; Yang et al., 2012; Zhai et al., 2014). In addition, PCV2 is quite stable following exposure to a wide range of temperatures (O'Dea et al., 2008) and various pH conditions (Kim, Lyoo, Joo, 2009). This could explain the high prevalence of PCV2 in the pig population worldwide.

Good management practice and vaccination decrease PCV2 outbreak in farm, but it cannot fully eliminate the presence of the virus in the farm pigs (Madec et al., 2000; Lopez-Soria et al., 2005). It should be noted that even the herd vaccination does not fully protect the pigs from PCV2 infection (Karuppannan, Opriessnig, 2017). Circovirus-2 can also proliferate in organism of the vaccinated pigs (Reiner, Hofmeister, Willems, 2015; Xiao et al., 2016). This means that the PCV2 outbreak may recur if preventive action in farms is not used.

Morphological characteristics of piglets lymph nodes with and without circovirus-2 antigen in lymph nodes

In second phase of the study, we investigated dead piglets with suspicion of PMWS disease. In total, 42 pig carcasses were tested and only 38% of them had PCV2 antigen in lymph nodes (Table 4). It could be due to non-specific clinical manifestation and gross lesions associated with PMWS (Harding, 2004; Opriessnig et al, 2017).

PMWS diagnosis is confirmed, if the piglet has wasting, deplete of the follicle structure, loss lymphocytes and increase hystiocytes in lymph node, as well PCV2 antigen detected in lymph node tissue (Sorden, 2000; Quintana et al., 2001; Segales, 2012). All piglets with PCV2 (38%) had wasting and specific microscopical changes in lymph nodes, therefore 38% cases from 42 investigated pigs had PMWS.

We observed lymphadenopathy of animals with PCV2, and cutting surface of lymph nodes they were homogeneous and grey. There were changes detected by other authors too (Segales, 2012; Ellis, 2014). Some authors reported that 9.9% pigs with PMWS had multifocal and coalescing necrosis of lymph nodes (Segales et al, 2004b; Kim, Chae, 2005; Opriessnig, Janke, Halbur, 2006b). In piglets with PMWS, the formation of necrosis in the lymph nodes is associated with small blood vessels thrombosis, however the pathogenesis of thrombosis is still unclear (Opriessnig, Janke, Halbur, 2006b; Segales, 2012). In our research, we did not find necrotic lesions in the lymph nodes in piglets with PCV2. Apparently, necrosis of lymph nodes in piglets with PMWS is an atypical symptom.

Next task was to detect structural changes of lymph nodes with different number of PCV2. At first, we investigated number of PCV2 in lymph nodes. The tissue evaluation was done according to the common system, quantity of PCV2 antigen (Opriessnig, Meng, Halbur, 2007) with small correction. Usually number of PCV2 antigen determine only in follicles of lymph node.

After that, structural changes in lymph node with different number of PCV2 were observed. Average structural changes with different number of PCV2 were compared (Table 4).

Out results show, that increasing amount of PCV2 antigen in pig lymph nodes, mostly changes the follicles structure in lymph node, significantly decreases the number of lymphocytes and increases the number of hystiocytes in them. A similar tendency is observed in other authors (Darwich et al., 2004; Segales et al, 2004b; Ostanello et al., 2005; Opriessnig, Meng, Halbur, 2007; Ellis, 2014).

We believe that in lymph nodes with a mild quantity of PCV2 antigen (+) and all structural changes were generally mild (1 point of changes), the PCV2 infection was more acute, but there was already a severe structural changes (3 points of changes) in lymph nodes, then the disease was more chronic.

Other specific morphological changes in lymph nodes were also observed in lymph nodes with PCV2 antigen, it was multinucleate giant cells and PCV2 cytoplasmic inclusions body. The inclusions body were spherical, eosinophils, homogeneous and it can present large numbers in the cell cytoplasm. Multinucleate giant cells are large macrophages, which occur by join of macrophages (Möst et al., 1997; Cheville, 1999; Zachary, McGavin, 2012; Milde et al., 2015). Lymph Lymph nodes with PCV2 antigen was observed at macrophages or histocytes proliferation, which also become a source of multinucleate giant cells (MGC).

Besides multinucleate giant cells and PCV2 cytoplasmic inclusions, no lymph nodes without PCV2 antigen were determined in body. The same frequency, at 18.6%, multinucleate giant cells and PCV2 cytoplasmic inclusions were found in lymph nodes with PCV2 antigen (Fig. 5).

Similar results were also described by other authors; they found MGC in 21.2% causes (Krakowka et al., 2005). But there are also studies that describe the appearance of MGC of lymph nodes in 28.8% (Segales et al, 2002) and in 27.1% (Segales et al, 2004b) cases.

It should be noted that MGC was not found in all lymph nodes of pigs with PMWS. MGC was detected in 45.45% pigs.

In general, we conclude that MGC is one specific change, which associated with PCV2 infection in piglets. However, it should examined several lymph nodes - at least *Inn. inguinales superficiales*, *Inn. jejunales* and *Inn. tracheobronchales* for MGC evaluation.

The appearance of MGC in our research was a similar to other authors' reports. MGC had more 10 nucleuses, which were located in the periphery of the cell. One author showed, that MGC was observed in periphery of the lymph node and has from 5 to 20 nucleuses (Chae, 2004; Ellis, 2014).

MGC located in the follicles, paracortex and sinus of the lymph node (Clark, 1997; Rosell et al, 1999; Segales et al, 2004b; Ellis, 2014). We believe that MGS localization is closely related with the PCV2 antigen location in the lymph node. At first, porcine circovirus-2 appears in follicles of the lymph node, then follicles loss, and then PCV2 antigen moved into the paracortex and also in the sinus.

It is unknown, how PCV2 ceased MGC formation. If PCV2 directly impacts the MGC appearances, then MGC formation could associate with virus pathogenesis. But, if MGC formation is depended on indirect PCV2 impact (for example, through secondary mediators of inflammation), then MGC formation could associate with reactivity of animal organism. One, *in vitro* study of cell culture show that porcine circovirus-2 stimulate the release of cytokines and macrophage proliferation (Tsai et al., 2010; Li et al., 2013).

In our study, there was correlation, then number of PCV2 antigen was higher in the lymph nodes, then MGC was reduced (Fig. 6). This could indicate as the indirect effect of porcine circovirus-2 on the MGC formation in tissues. As we mentioned, severe quantity of PCV2 antigen (++) in the lymph nodes was associated with more chronic disease and severe tissue damage. Chronic lesion to change the qualitative and quantitative composition of secondary inflammatory mediators, which may also affect the MGC formation in the lymph nodes (Fig. 7).

It is unknown, which factors impact the PCV2 cytoplasmic inclusions body formation. Although, lymphoid tissues response on different pig breeds of to circovirus-2 can be variable (Opriessnig et al., 2009). It could explain our low result of PCV2 cytoplasmic inclusions body occurrence in the lymph nodes – only 18.6% cases (Fig. 5). Previous studies showed that PCV2 cytoplasmic inclusions body was detected in 27.8% (Kim et al., 2002), 33.3% (Krakowka et al., 2005) and 34.6% cases (Segales et al, 2004b) of PCV2 infected pigs.

It should be noted that PCV2 viral cytoplasmic inclusion bodies and multinucleate giant cells in the lymph nodes were not detected simultaneously.

Pig lymph node and blood samples investigation to the bacterial infection, PCV2 antibodies and antigen detection

The next task of our study was to investigate blood and lymph node samples of 5-15 weeks old piglets, which are in suspicion of PMWS disease. There 42 dead pigs were investigated (Table 5).

A largest number of pigs (33.3%) has PCV2 antibody without PCV2 antigen in lymph nodes. It was also expected because PCV2 seroprevalence of pig population is widespread.

It should be noted that not all of piglets with the PCV2 antigen were detected with virus antibodies in the blood. This result was surprised by us. We did not find reason of this phenomenon, because it is known, that PCV2 is chronic infection and if the animal is dead from PMWS, then PCV2 antibody could be present in pig blood. Blood samples were obtained no more than

12 hours after pigs' death; it minimized the risk of antibody post-mortem decomposition.

One of study tasks was to investigate bacterial infection in lymph nodes. Totally from all investigated animals, bacterial infection in the lymph nodes was detected in 73.8% cases - 31 pigs (Table 5). However, not all of piglets with PCV2 antigen were found with bacteria in the lymph nodes (Table 6).

Our result showed that one pig lymph nodes could contain from one to four bacterial infections (Table 7). In the lymph nodes with PCV2 antigen often was observed two, three and four bacterial infections (54,5% cases), but instead in the lymph nodes without PCV2 antigen more often was detected only one bacterial infection (in 90% cases). Consequently, more than one bacterial infection significant frequently were detected in lymph nodes with PCV2 antigens, but only one bacterial infections significant frequently were detected in lymph nodes without PCV2 antigen ($p>0.05$). Reason for that could be the general immunodeficiency from PCV2, therefore more bacterial infections can infect sick pigs. It should be noted that other research of bacterial infections number in lymph nodes in piglets with PMWS was not found.

Generally, more frequently we detected four infections of bacteria in lymph nodes with and without PCV2 antigen – those are *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*. The bacteria are widespread in environment, which also explain their presence in piglets lymph nodes. Other authors observed *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Arcanobacterium pyogenes* and *Bordetella bronchiseptica* bacterial co-infection in pigs with PCV2 (Halbur, 1997; Brogden, Guthmiller, 2002; Savic et al., 2015). Besides, in few pigs lymph nodes with PCV2 non pathogenic bacteria *Citrobacter freundii* and *Corynebacterium* spp were detected. Only in rare cases *Corynebacterium* species could be conditionally pathogenic bacteria. We believe that the appearance of a non-pathogenic bacteria in the lymph nodes of piglets with PCV2 associated with general immunodeficiency, which is caused by PCV2.

The effects of bacterial infections on the lymph node structure in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected piglets

The one task of our study was to determine impact of bacteria to the lymph nodes morphological changes. First of all, in the lymph nodes of pigs with PMWS and bacterial co-infection was observed multinucleate giant cells MGC (Fig. 7). Apparently, PCV2 indirectly affected the MGC formation,

because the bacteria presence in the tissue stimulated production of secondary mediators of inflammation. It should be noted that we did not find similar study about the bacterial infections on multinucleate giant cells appearances in lymph nodes of piglets with PMWS.

After we determined impact of bacteria on the PCV2 cytoplasmic inclusions body formation in cells of the lymph nodes. PCV2 cytoplasmic inclusions body were found equally ($p > 0.05$) in lymph nodes with and without bacteria (Fig. 7). In addition, the increasing number of PCV2 antigen caused the increase of PCV2 cytoplasmic inclusions body in lymph nodes (Fig. 6). In conclusion, the appearance of PCV2 cytoplasmic inclusions in histiocytes is not related to bacterial infection in the lymph nodes, but is closely related to the increasing of PCV2 antigen number in the lymph node.

The next, average score of structural parameters in lymph nodes with and without bacterial infection in pigs with PMWS was compared (Table 8). Structural parameters of lymph nodes with bacterial infection have significant difference than without bacteria ($p < 0.05$) (Table 8). Other authors also indicate that PCV2 causes more severe structural changes in the lymph nodes, when it is combined with other infections (Segales et al., 2004b; Gu et al., 2014; Niederwerder et al., 2016). It should be noted that bacteria usually causes suppurative inflammation with neutrophil infiltration into tissues (Zachary, McGavin, 2012). We believe that the presence of bacteria in the lymph nodes increases the effect of porcine circovirus-2 on the body's response activity, intensifying its effect to certain extent.

Localization of circovirus-2 antigen in the lymph node

Generally, the PCV2 antigen was detected in macrophage cytoplasm of lymph node, although a small amount of PCV2 antigen was also observed in the interstitial space. We detected circovirus-2 antigens in all lymph node areas – follicles, paracortex and medulla.

During the study, we noticed that the amount of PCV2 antigens is highly variable in the lymph nodes with severe structural changes, when lymph nodes loss of the lymphoid follicle structure. Percentage of PCV2 antigen was evaluated in follicles and parenchyma. Measurements were done with the computer program Pannoramic DensitoQuant (3DHISTECH).

The study showed that PCV2 antigen attained the largest amount in the lymph nodes (+++) and caused severe structural changes (changes in 3 points), the process does not stop. After that number of PCV2 antigen in the lymph nodes slightly decreased (Table 8).

The percentage of PCV2 antigen in lymph nodes one animal can reach up to 75% (pig No.3), but in other animal up to 15% (pig No.15), (Table 8).

Thus, it demonstrates that circovirus-2 at first was located in lymph nodes follicles, after that 'goes outside' the follicle into the paracortex near follicle area and near sinus area, and finally – into medulla. In lymph nodes PCV2 starts from cortical layer to medulla, from where it could enter into the organism lymphatic system. It should be noted that we did not find similar study about the percentage number of PCV2 antigen in the different lymph node layers.

Changes of T and B lymphocyte number in the lymph nodes with and without circovirus-2 antigen

The next task was to determine number of CD79 α positive cells – **B lymphocyte** in the lymph nodes with different number of porcine circovirus-2. Reminding that the mature B lymphocyte has CD79 α surface protein, which was visualized by immunohistochemical investigation (IHC positive cells).

It should be noted that the number of B lymphocytes were significantly reduced in all layers lymph node with PCV2 antigen (Fig. 9 and 10). Critical low number of B lymphocytes were appeared in the lymph node follicles.

We found an average 32.8 of B lymphocytes in the lymph nodes with little depleted of the follicle structure (1 point of changes) and mild quantity (+) of PCV2 antigen (Fig. 9). Though the number of B lymphocytes decreased to 3.4 cells then number of PCV2 antigen increased in lymph nodes (Fig. 10). Besides the severe quantity of PCV2 antigen (+++) in the lymph nodes was associated with full loss of the lymphoid follicle structure (Fig. 10). It should be noted that some authors have not detected CD79 α positive cells in the lymph node with moderate and severe quantity of PCV2 antigen (Chianini et al., 2003). Other authors investigated 10 fields with x200 magnification and detected mean 25 CD79 α positive cells (approximately from 1000 cells) in the lymph node with severe quantity of PCV2 antigen (Shibahara et al., 2000). One study shown that B lymphocytes can completely disappear or critical decrease in lymph nodes with PCV2 antigen (Segales et al., 2004a; Ellis, 2014). Furthermore, some authors used the three cross-system for B and T lymphocyte analysis in the lymph nodes, but others used quantitative cell counting. It should be noted that analysis of lymphocytes number in each lymph node layer separately was not done yet. Our study was focused to the changes of lymphocyte number in the different lymph node layers, this was assist better to describe changes of the lymphocytes number. Considering that the beginning

PCV2 antigen appeared exactly in the follicles of lymph node, then lesion in the follicles was detected at first. Therefore we can conclude that at the beginning PCV2 effect directly on the reduction of B lymphocyte population in the lymph nodes, which is coincide with other authors research (Lin et al., 2008). In addition, B lymphocytes are decreased in the blood of piglets with PMWS (Darwich et al., 2002; Ferrari et al., 2014).

It is known that B lymphocytes are associated with a humoral immune response on parasitic, bacterial, viral infections, inflammations and autoimmune lesions (Kitamura et al., 1991, Jakobovits et al., 1993; Maxie, 2016). Thereby, PCV2 effect on the antibody reduction in the organism and piglet become more susceptible to infections.

Next, **T lymphocytes** were analyzed in different layers of lymph node, with and without PCV2 antigen (Fig. 11 and 12). We remind that T lymphocytes were recognized by CD3 surface protein staining in them.

T lymphocytes were significantly decreased in the paracortex and medulla in the lymph nodes with moderate and severe quantity of PCV2 antigen (Fig. 12) as well in the lymph nodes with mild quantity of PCV2 antigen then the follicle structure poorly visualized or lost of the lymphoid follicle structure (Fig. 11). For example, decreasing an average to 32.7 CD3 positive cells in the paracortex near the sinus were detected. Some other researchers also found a similar trend (Segales et al., 2004a; Segales, 2012; Kekarainen, Segales, 2015). However, it should be noted that one study showed a relatively similar ($p > 0.05$) number of CD3 positive cells (T lymphocytes) in lymph nodes with and without PCV2 antigen (Shibahara et al., 2000). Presumably this is associated with randomly selected fields for T lymphocytes counting, but it was not counted in each layers of lymph node separately, as we done it.

It should be mentioned that T lymphocytes has begun to move in the B cells-dependent area (in the follicle), then increased number of PCV2 antigen in the lymph node. This, possibly, depends on irreversible structural changes in the follicles of lymph node.

Another studies shown that T lymphocytes were decreased also in the blood and this lymphopenia is associated with helper and cytotoxic T cells reduction (Darwich et al., 2002; Ferrari et al., 2014). Klausmann et al. (2015) study observed that PCV2 affects to the T lymphocyte selection process in the thymus.

It is proven that T lymphocytes are the main component of cellular immunity, which provides the anti-infective and anti-tumor immune response (Kitamura et al., 1991, Jakobovits et al., 1993, Maxie, 2016). It is concluded that piglets with clinical PMWS has cellular and humoral immunity disorders.

Consequently, the post-weaning multi-systemic wasting syndrome caused the general immune deficiency disease in piglets (Segales et al., 2004a; Ellis, 2014; Karuppannan, Opiressnig, 2017).

It is still unknown why piglets with PMWS have severe loss of lymphocytes in lymphoid tissues and in the blood. The cause of lymphocytes decrease could explain the pathogenesis of this disease and PCV2 effect on the piglet organism. It is possible there are two reasons of lymphocytes loss. These are increased lymphocyte apoptosis, and reduced cell proliferation activity. Li et al. (2013) *in vitro* evaluating the cytokine synthesis for the presence of PCV2, take the view that theoretically PCV2 can have an effect on the cell apoptosis. Several authors shown that apoptosis has not significant effect on the lymphocytes reduction of lymph nodes in pigs with PCV2 (Kiupel et al., 2005; Resendes et al., 2004; Resendes et al., 2011; Zhou et al., 2015). Only one team of researchers found a positive correlation between the number of PCV2 in tissue and cells apoptosis in the lymph nodes (Lin et al., 2011). On the contrary, there are very few studies related with PCV2 effect on the cells proliferation activity. Therefore, one of the tasks in our study was to investigate lymphocytes proliferative activity in lymph nodes with different number of porcine circovirus-2 in them. As already mentioned, cell lifecycle activity was recognized by visualization of Ki67 protein (Scholzen, Gerdes, 2000; Booth et al., 2014).

Changes of Ki67 positive cells number in the lymph nodes with and without circovirus-2 antigen

It was analyzed the mean number of Ki67 positive cells in the piglets lymph nodes with different PCV2 antigen amount in nodes (Fig. 13 and 14).

It turned out that quantity of PCV2 antigens was increasing in the lymph nodes, but cell proliferation activity in the follicles was greatly reduced, but it was increased in paracortex and in the sinus area of the lymph node (Fig. 13 and 14). Similar trend, but not statistically significant, was noted by other authors (Lin et al., 2011). Our research showed that PCV2 has significant effect on the reduction of cell proliferation activity in the follicles ($p<0.05$). The follicle of lymph node is B cells-dependent area, it means that B lymphocytes decreasing associated with reduction of cell proliferation activity.

We also evidenced that quantity of PCV2 antigens was increasing in the lymph nodes, but cell proliferation activity in the paracortex and especially near sinus area was increased (Fig. 14). It should be reminded that Ki67 protein can contain any cell, so it is not possible to precisely determine which cells are directly involved in the division process. Known, that paracortex is T cells-

dependent area. As previously shown, PCV2 affects histiocytes proliferation in the lymph node, thereof Ki67 positive cells detected in the paracortex could be T lymphocytes as well as histiocytes. Besides, quantity of PCV2 antigens was increasing in the lymph nodes, affect to the lymphocytes decreased and histiocytes number increased. Therefore, it is possible that Ki67 positive cells in paracortex were precisely histiocytes.

Ki67 protein is present in all active phases of cell life cycle: interphase G1, S, G2 and mitosis. However, protein Ki67 is not observed at all in the cell's "quiet" phase G0 (Scholzen, Gerdes, 2000; Booth et al., 2014). Thereby, our study showed that PCV2 did not stop cell life cycle, but PCV2 stimulated these cells to come directly to inactive form (G0 phase). A cell in G0 phase can stay for a long time, but if it is necessary, the cell is able to return again in the active phases. However, cells in G0 phase may also become old and never renew their life cycle (Scholzen, Gerdes, 2000; Booth et al., 2014). Quan et al. (2016) *in vitro* study shows that G0/G1 cell cycle arrest induced by PCV2 may provide favourable conditions for viral protein expression and virus replication.

Currently, the question remains: does PCV2 delay cell cycle in G0 phase, or does PCV2 cause DNA damage, thereby, accelerating ageing process of cells? Therefore, investigations *in vitro* by cell culture are necessary to understand PCV2 impact on the cell life cycle.

In vitro study shows, that PCV2 impacts the increase of cytosolic Ca⁺² in cells (Gu et al., 2016). This means that PCV2 possibly causes cell necrosis because of Ca⁺² ion increase in the cytoplasm to activate several enzymes (endonuclease, protease, ATPase), which leads to cell death (Zachary, McGavin, 2012). If PCV2 simultaneously impacts the ability of cell proliferation and cell necrosis, this can explain such a severe immunodeficiency and lymphopenia.

The pathogenesis of the virus still remains unresolved. For example, why one of pigs remains healthy in the presence of PCV2 and others go on to develop clinical disease that typically results in death.

Evaluating all results of the study, it is concluded that PCV2 is widespread in Latvia and the seroprevalence is high in all regions. Therefore it increases the risk of PMWS outbreak in pig farms in Latvia. In our study suspicions of PMWS in piglets was confirmed in 38% of the cases. We observed several regularities in these piglet lymph nodes. It turned out that the higher the quantity of PCV2 antigen was observed in the lymph node, as the severer changes in the follicles structure. In addition, as the higher the quantity of PCV2 antigen was observed in the lymph node, as severer the reduction of lymphocytes in the lymph nodes and simultaneously increase histiocytes number. PCV2 distribution in lymph nodes is from cortical layer to medulla, it is corresponds to the lymph flow.

PCV2 antigen affects to the multinucleate giant cells and PCV2 cytoplasmic inclusions body appearance in the lymph nodes, which is PMWS specific changes in tissues. It should be noted, that both of these changes were not observed in the lymph nodes simultaneously. It turned out that the structural changes of the lymph nodes are significantly affected not only PCV2, but also presence of bacteria in the lymph nodes. Bacterial infection in the lymph nodes increases porcine circovirus-2 effect to the activity of organism response in piglets with PMWS.

Analyzing the loss of lymphocytes in the lymph nodes in piglets with PMWS, we concluded that B lymphocyte population had been reduced at first in the lymph node with PCV2, but the number of T lymphocytes decreased later. In addition, the evidence that reduction of B lymphocyte depends on cell proliferation activity.

In general, the lymphocytes loss of lymph nodes in piglets with PMWS still now is the actual question of research in Latvian and in the world.

CONCLUSIONS

1. PCV2 is widespread in Latvia. PCV2 seropositive pigs in the Kurzeme region reached 75.3%, in Zemgale - 76.1%, and in the Vidzeme region - 83.4%. There was no statistically significant difference regarding PCV2-seroprevalence in pigs from different size farms ($p>0.05$). PCV2-seroprevalence was similarly high in very large (79.7%), large (76.1%), medium (76.9%), small (77.3%) and very small (70.0%) pig farms.
2. Higher the quantity of PCV2 antigen was observed in the lymph node, as the severer changes are in the follicles structure. In addition, as the higher the quantity of PCV2 antigen was observed in the lymph node, severer the reduction of lymphocytes in the lymph nodes and simultaneously increase histiocytes number.
3. Appearance of multinucleate giant cells (MGC) in the lymph nodes is one of specific changes in piglets with PMWS.
4. Non-pathogenic bacterial infections can also added to pigs with PMWS, and more than one bacterial infection was statistically more frequently observed in these lymph nodes.
5. Multinucleate giant cells appear only in lymph nodes, which have one or more bacterial infections of piglets with PMWS. If the quantity of PCV2 in the lymph node increases, then decrease frequency of MGC appearance in the lymph node.
6. The appearance of PCV2 cytoplasmic inclusions body in histiocytes is closely related to the increase of PCV2 antigens quantity in the lymph node. Then the reduced quantity of PCV2 antigen in the lymph node, decreases appearance of cytoplasmic inclusions body and conversely.
7. B lymphocyte population had been reduced at first in the lymph node with PCV2, but the number of T lymphocytes decreased later. Reduction of B lymphocyte depends on cell proliferation activity.
8. The presence of PCV2 in the lymph nodes significantly effects the reduction of cell proliferation activity in the follicles, which is B lymphocyte-dependent area. PCV2 delays B-lymphocyte division process.

THESIS DEFENSE

1. PCV2 in domestic pig population is widespread all over in Latvia territory.
2. PCV2 causes lymphocyte loss in lymph nodes, affecting their proliferation activity.
3. The amount of PCV2 and secondary bacterial infection affect the lymph nodes morphology.
4. Piglets, infected with PCV2 infection, are often affected with several bacterial and non-pathogenic agents.

RECOMMENDATIONS FOR PRACTICE

1. Considering the high seroprevalence of PCV2 in pigs are widespread within the territory of Latvia, it is recommended to vaccinate pigs, therefore PMWS treatment is not effective and causes significant economic losses.
2. Since the clinical manifestation and pathological lesion of PMWS is non-specific, we recommend that lymph nodes of dead piglets samples always investigate to the presence of PCV2 antigen.
3. It should investigate several lymph nodes for MGC observation, at least *Inn. inguinales superficiales*, *Inn. jejunales* and *Inn. tracheobronchales*.