

猪 PRRSV、PCV2、大肠杆菌与沙门氏菌 四重混合感染的报道

王旭荣,田小艳,杨增岐,祝卫国,王建华,杨泽晓,谢俊良

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 应用 RT-PCR、PCR 和细菌分离等方法,对陕西某规模化养猪场发生的仔猪渐进性消瘦、呼吸困难和母猪繁殖障碍为主要特征的疾病进行了流行病学调查和病原分离鉴定。结果表明,该猪场猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 和 2 型猪圆环病毒 (PCV2) 感染相当严重,从出现胸肺粘连的病猪实质脏器中可分离到致病性大肠杆菌和沙门氏菌,未分离到胸膜肺炎放线杆菌。该猪场此次疫情主要是由于猪 PRRSV、PCV2、大肠杆菌和沙门氏菌四重混合感染而引起。

[关键词] 猪繁殖与呼吸综合征病毒;2 型猪圆环病毒;大肠杆菌;沙门氏菌;混合感染

[中图分类号] S858.28

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)10-0011-04

Mixed-infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus Type 2, *E. coli* and *S. gallinarum* in porcine

WANG Xu-rong, TIAN Xiao-yan, YANG Zeng-qi, ZHU Wei-guo, WANG Jian-hua,
YANG Ze-xiao, XIE Jun-liang

(College of Animal Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract : A new zootic disease characterized by respiratory disease in young swine, postweaning multi-systemic wasting syndrome and reproductive failure of sows occurred at a pig farm in Shaanxi Province. The pathogens were detected and isolated by RT-PCR, PCR and bacteria isolation. The results indicated that the disease was infected seriously with mixinfection of PCV2 and PRRSV; pathogenic *E. coli* and *S. gallinarum* were isolated in the substance viscera pigs of conglutination between thorax and lung; *A. pleuropneumoniae* was not found; the disease was diagnosed as mixinfection of PCV2, PRRSV, *E. coli* and *S. gallinarum* by the study of epidemiology, clinical signs, typical lesions, and laboratory tests.

Key words : PRRSV; PCV2; *E. coli*; *S. gallinarum*; mixinfection

2005 年底,陕西省某规模化养猪场发生了一种以仔猪渐进性消瘦、呼吸困难和母猪繁殖障碍为主要特征的疾病,剖解病猪可见严重的肺脏病变和淋巴结病变,有的病例出现严重的胸肺粘连。场主用各种治疗病毒性和细菌性疾病的药物治疗,结果均

收效甚微。笔者怀疑为猪繁殖与呼吸综合征、断奶仔猪多系统衰竭征和猪传染性胸膜肺炎 3 种病的混合感染。为了搞清该规模化养猪场此次发病的真正原因,笔者结合流行病学调查、临床症状、病理变化等情况,对该病病原进行了检测,现报告如下。

收稿日期] 2006-09-08

[基金项目] 陕西省农业攻关项目(2003 K02-G10)

[作者简介] 王旭荣(1980-),女,山西文水人,在读博士,主要从事动物疫病防治研究。

[通讯作者] 杨增岐(1963-),男,陕西岐山人,教授,博士生导师,主要从事动物传染病研究。E-mail: yzq1106@nwsuaf.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 猪病料的采集与处理 采集患病猪的血清或脾、肺、淋巴结等组织样品,取 1.0~2.0 g 组织病料,用无菌研磨器研磨,并用 PBS 溶液稀释成 1:3 (体积比) 乳剂, -80℃ 保存备用。样品依次编号为 1~10。

1.1.2 主要试剂 RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司; *Taq* 酶,200 bp DNA 标样购自东盛生物科技有限公司;Proteinase K 购自德国 Merck KgaA 公司。

1.1.3 试验动物 1 月龄小白鼠购自第四军医大学实验动物中心。

1.1.4 引物 根据 GeneBank 中猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)标准株 ATCC VR-2332 的基因序列(Genebank 登录号为 U87392)设计 1 对针对 *ORF5* 基因的引物:P5S:5'-CCT GAG ACC ATG AGG TGG GG-3';P5R:5'-TTT AGG GCA TAT ATC ATC ACT GG-3',预期扩增片段长度为 750 bp 左右。猪圆环病毒 2 型(PCV2)检测的引物参照王贵平等^[1]发表的套式 PCR 方法设计,外部引物为 P1:5'-CAA CTG TCC CAG CTG TAG-3',P2:5'-AGG AGG CGT TAC CGC AGA AG-3';内部引物为 P3:5'-TAG GTT AGG GCT GTG GCC TT-3',P4:5'-CCG CAC CTT CGG ATA TAC TG-3',预期扩增片段长度约为 300 bp。引物由上海腾峻生物技术有限公司合成。

1.2 流行病学调查

对发病猪场进行流行病学调查,着重调查呼吸情况、母猪繁殖情况以及肺脏、淋巴结变化等。

1.3 PRRSV 的 RT-PCR 检测

1.3.1 PRRSV RNA 的提取 取待检血清或处理好的病料 100 μ L,加入适量的 RNAiso Reagent 后剧烈震荡,室温静置 5 min;向上述匀浆裂解液中加入氯仿(用量为 RNAiso Reagent 体积的 1/5),盖紧离心管盖,用力震荡使其充分乳化,溶液呈乳液状(无分相现象),再室温静置 5 min。12 000 r/min 4

离心 15 min,吸取上清液转移至另一新的离心管中,加入等体积的异丙醇,上下颠倒离心管充分混匀后,在 15~30℃ 下静置 10 min。12 000 r/min 4 离心 10 min,小心弃去上清,沿离心管壁缓慢加入体积分数 75% 的乙醇(用 1 g/L DEPC 水配制) 1 mL,轻轻上下颠倒洗涤离心管管壁,12 000 r/min

4 离心 5 min 后小心弃去乙醇。室温干燥沉淀 2~5 min,加入适量的 RNase-free 水溶解沉淀,待 RNA 沉淀完全溶解后 -80℃ 保存备用。

1.3.2 PRRSV 的 RT-PCR 扩增 按一步法 RNA PCR 试剂盒(AMV)说明进行。反应体系为 25 μ L: AMV-反转录酶 XL (5U/ μ L) 0.5 μ L, RNasin (40 U/ μ L) 0.5 μ L, AMV-优化 *Taq* 酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 10 $\times$ RNA PCR 缓冲液 2.5 μ L, dNTP 混合物 (10 mmol/L) 2.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 5 μ L, 无 RNA 酶 H₂O 7.5 μ L, 上、下游 P5S/ P5R 引物各 0.5 μ L, 模板 5 μ L。反应程序为:50℃ 30 min;94℃ 2 min,94℃ 50 s,57℃ 1 min,72℃ 1.5 min,循环 32 次;72℃ 延伸 10 min。产物用 1 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 PCV2 的 PCR 检测

1.4.1 PCV2 DNA 的提取 取待检的血清或处理好的病料 400 μ L,加 100 μ L TE 缓冲液,25 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL),75 μ L 10 g/L SDS,混匀后 55℃ 水浴 2 h;依次用 Tris 饱和酚、Tris 酚-氯仿(V(Tris 酚):V(氯仿)=1:1)、氯仿各抽提 1 次。吸取水相加入 1/10 体积 3 mol/L 的 NaAC 及 2.5 倍体积的无水乙醇,混匀后在 -20℃ 沉淀 30 min 以上,12 000 r/min 4 离心 15 min,弃上清。沉淀加入体积分数 75% 的乙醇 400 μ L,轻轻上下颠倒洗涤离心管管壁,12 000 r/min 4 离心 5 min,小心弃去乙醇,晾干残液。加入 20 μ L 灭菌 ddH₂O, -80℃ 保存备用。

1.4.2 PCV2 的 PCR 扩增 外部引物扩增反应体系 25 μ L: Premix *Taq* (DNA Polymerase, Buffer, dNTP mixture) 12.5 μ L, 外部引物 P1/ P2 (10 pmol/L) 各 0.5 μ L, 模板 DNA 4 μ L, 加去离子水至 25 μ L, 混合均匀。PCR 反应程序:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 1 min,62℃ 退火 1.0 min,72℃ 延伸 1.5 min,30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。内部引物扩增反应体系: Premix *Taq* (DNA Polymerase, Buffer, dNTP mixture) 12.5 μ L, 内部引物 P3/ P4 (10 pmol/L) 各 0.5 μ L, 模板(外部引物 P1/ P2 扩增产物) 1 μ L, 加去离子水至 25 μ L, 混合均匀。反应程序同上。反应结束后取 5 μ L PCR 产物,用 1.5 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.5 细菌的分离鉴定与致病力试验

1.5.1 细菌的分离鉴定 将无菌采集的肺、脾等病变组织均分别直接划线接种于鲜血琼脂、麦康凯琼脂平板上进行需氧培养,同时采用碱性焦性没食子

酸法进行厌氧培养,37℃ 培养 18~24 h,检查生长情况。挑取单个菌落涂片、染色、镜检并进行纯化培养。将纯化菌接种葡萄糖、乳糖、山梨醇、甘露醇等多种生化培养基进行生化鉴定。

1.5.2 细菌致病力试验 将在肉汤培养基上生长的菌液作 1:10(体积比)稀释,并将 12 只健康小白鼠分成 4 组,每组 3 只。1 组腹腔注射大肠杆菌普通肉汤培养物 0.2 mL/只;2 组腹腔注射沙门氏菌普通肉汤培养物 0.2 mL/只;3 组同时腹腔注射沙门氏菌和大肠杆菌普通肉汤培养物,剂量均为菌 0.1 mL/只;4 组为对照组,腹腔注射灭菌普通肉汤 0.2 mL/只。注射后的小白鼠隔离饲养。

2 结果与分析

2.1 流行病学调查结果

2.1.1 发病特点与临床症状 该种猪场为自繁自养猪场,主要品种为杜洛克、长白,母猪曾出现流产、死胎、木乃伊胎或产弱仔等繁殖障碍,但母猪基本没有死亡现象。仔猪转入育成舍时猪群呼吸道症状比较严重,用药后症状稍有缓解,停药后很快又加重。断奶前后仔猪主要表现为体温升高 41~42℃,呼吸困难,咳嗽,有的耳朵发绀。部分仔猪严重消瘦,步态不稳,皮肤苍白,被毛粗乱,生长缓慢,严重者腹式

呼吸。哺乳仔猪发病率为 37%,死亡率为 15%。用抗菌和抗病毒的药物治疗,疗效均不明显。此养猪场未接种 PRRSV 和 PCV2 疫苗。

2.1.2 病理变化 新生仔猪的肺脏没有十分明显的病变,有的出现肺脏代偿性增生;心、肝、脾、腹股沟淋巴结、颌下淋巴结也没有明显变化。断奶仔猪的病变非常明显:肺脏呈广泛性肉变,失去弹性,有的出血,气管分泌物较多;有的病猪胸肺粘连特别严重,有的心包积液(乳白色,浑浊),出现严重的纤维素性心包炎;颌下淋巴结、腹股沟淋巴结、肺门淋巴结、肠系膜淋巴结肿大,有的切面呈苍白色。

2.2 PRRSV 的 RT-PCR 检测结果

结果显示,该猪场送检的 10 份病料中,有 4 份病料(样品编号为:4、8~10)扩增出长度为 750 bp 左右的目的基因片段(见图 1),与预期结果一致,且与阳性对照所扩增的片段长度相符,表明所检测的部分病料中含有 PRRSV。

2.3 PCV2 的 PCR 检测结果

PCV2 PCR 检测结果(图 2)表明,此规模化猪场送检的 10 份病料中有 9 份病料(样品编号为:1~7,9,10)扩增出目的基因片段,且与阳性对照所扩增的片段长度相符。表明所检测的部分病料中含有 PCV2。

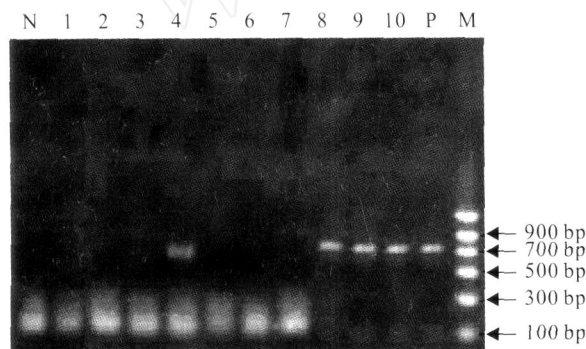


图 1 PRRSV RT-PCR 扩增产物的电泳结果

N. 阴性对照;1~10. 所检样品 RT-PCR 的扩增结果;

P. 阳性对照;M. 核酸分子量标准(Marker 2)

Fig. 1 RT-PCR products of PRRSV

N. Negative control;1~10. PCR products of detected samples;

P. Positive control;M. DNA marker(Marker 2)

2.4 细菌的分离与鉴定

从胸肺粘连严重的 5 号和 9 号病猪的实质脏器中,均分离到 2 种需氧兼性厌氧菌,分别命名为 S1 和 S2。S1 在鲜血平板上为圆形、边缘整齐、隆起、光滑、湿润半透明的灰白色菌落,不溶血,在麦康凯平

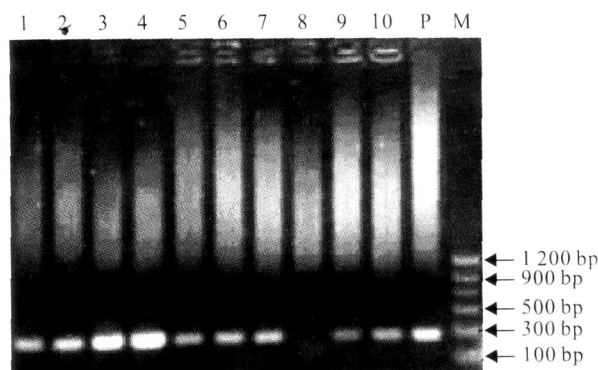


图 2 PCV2 PCR 扩增产物的电泳结果

1~10. 所检样品 PCR 的扩增结果;P. 阳性对照;

M. 核酸分子量标准(Marker 2)

Fig. 2 PCR product of PCV2

1~10. PCR products of detected samples;

P. Positive control;M. DNA Marker (Marker 2)

板上为红色菌落;S2 菌为圆形、表面光滑、边缘整齐、无色半透明中等大小的菌落,不溶血,在麦康凯平板上为无色菌落。革兰氏染色均为阴性。根据生理生化特性(见表 1),可鉴定 S1 菌为大肠杆菌,S2 菌为沙门氏菌。未分离到胸膜肺炎放线杆菌。

表 1 分离的 2 种细菌 S1 和 S2 的生化反应结果
Table 1 Results of biochemical reaction of two bacteria

项目 Content	分离株 Isolated strains		项目 Content	分离株 Isolated strains	
	S1	S2		S1	S2
葡萄糖 Glucose			山梨醇 Sorbitol	+	+
乳糖 Lactose		-	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+
麦芽糖 Maltose		+	柠檬酸盐利用 Citrate use	-	-
蔗糖 Sucrose		-	M-R	+	+
阿拉伯糖 Arabinose			V-P	-	-
棉子糖 Raffinose		-	吲哚 Indole	+	-
鼠李糖 Rhamnose	+	+	运动性 Movement	+	+
甘露醇 Mannitol			H2S	-	+

注：+ 表示阳性反应；- 表示阴性反应； 表示阳性并产生气体。
Note: + shows positive reaction; - shows negative reaction; shows positive reaction and producing gas.

2.5 细菌的致病力试验

接种大肠杆菌和沙门氏菌分离菌的小白鼠于 36~48 h 先后死亡,对照鼠正常。从死亡小白鼠的肝、脾、心等实质脏器,均可分离出大肠杆菌和沙门氏菌。

3 讨 论

本试验结果显示,所检病料中 90 % 为 PCV2 阳性,40 % 为 PRRSV 阳性,30 % 同时感染 PCV2 与 PRRSV,说明 PRRSV、PCV2 的感染较为严重,这与通过临床症状和剖检所作的初步诊断结果相符;从出现胸肺粘连的病猪实质脏器中分离到致病性大肠杆菌和沙门氏菌,而无胸膜肺炎放线杆菌,4 种病原混合感染的阳性率为 20 %。由此可确认,此次疫情为 PRRSV、PCV2、大肠杆菌和沙门氏菌 4 重混合感染造成的。4 种病原中 PCV2 阳性率最高,PRRSV 阳性率次之,而四重混合感染所占比例最低,可以推定此次发病是由于 PCV2 和 PRRSV 感染造成猪群抵抗力下降,部分猪继发感染致病性大肠杆菌和沙门氏菌而造成的。该场猪群发病后,由于诊断快速、准确,及时采取有效的防控措施,很快控制了疫情。

目前 PRRSV 在我国的流行已很普遍,临床上 PRRSV 和 PCV2 混合感染的现象较为严重。对 PRRSV 与附红细胞体、巴氏杆菌、沙门氏菌等其他病原体的二重、三重混合感染现象已有报道^[2-4],但四重混合感染国内报道较少^[5],在陕西猪场发生四重混和感染尚属首次报道。PCV2 和 PRRSV 感染可引起猪的免疫抑制,其传染性强,很难控制,且无特效药物^[6-8]和效果确实的疫苗,因此引起兽医工作者的高度重视。此次四重感染的疫情提示人们,规

模化养猪场在重视一些“新病”的预防的同时,不能忽视“老病”的防治。本试验分离到致病性大肠杆菌和沙门氏菌,此结果与刘芳宁等^[9]分离到的能引发布尔山羊羔羊纤维素性胸膜肺炎的大肠杆菌有相似之处,推测可能与大肠杆菌等病原菌在自然界的不断演化有关。另外,多种病原混合感染引起的病理变化越来越复杂,而且也会表现其他继发疾病的临床症状,易引起临床剖检的误诊,贻误病情,应给予足够重视。

[参考文献]

[1] 王贵平,蒋智勇,宋长绪,等.猪圆环病毒 2 型套式 PCR 检测方法的建立及应用[J].中国兽医科技,2004,34(10):26-28.
[2] 林进秋,李沐华.猪圆环病毒 2 型和致病性沙门氏菌的混合感染[J].广东畜牧兽医科技,2005,3(6):33-34.
[3] 陈义祥,胡丽萍,磨龙春,等.广西出现猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪圆环病毒 2 型混合感染[J].畜牧与兽医,2005,37(4):11-13.
[4] 刘片通,金喜新,崔保安.猪繁殖与呼吸综合征并发猪巴氏杆菌感染的诊治[J].中国兽医杂志,2005,41(7):46-47.
[5] 薛 峰,杨健美,李文杰,等.猪圆环病毒猪繁殖与呼吸综合征病毒猪链球菌猪附红细胞体混合感染[J].中国兽医杂志,2005,41(11):23-24.
[6] 强彩琳,杜秀颖,黄振亚.猪繁殖与呼吸综合征的流行特点及防控措施[J].宁夏农林科技,2004,4:33.
[7] Dea S, Gagnon H, Mardassi H, et al. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: comparison of the North American and European isolates [J]. Arch Viral, 2000, 145: 659-688.
[8] 胡建华,高 骏,孙凤萍,等.猪繁殖与呼吸综合征诊断技术研究进展[J].上海农业学报,2004,20(2):106-108.
[9] 刘芳宁,杨增岐,张淑霞,等.布尔山羊羔羊大肠杆菌病的诊治[J].中国兽医科技,2003,33(4):69-70.