

四川某规模化猪场仔猪腹泻病的诊疗体会

张曼丽¹, 徐博文², 舒 蕾³, 刘 杰³, 颜其贵^{1,3*}

(1. 四川农业大学 动物医学院, 四川 雅安 625014; 2. 珠海出入境检验检疫局, 中国 珠海 519015;

3. 四川农业大学 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 雅安 625014)

摘要: 采用 RT-PCR 方法, 从四川某规模化猪场仔猪腹泻死亡病例病料中检测猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、猪轮状病毒, 并分离细菌, 最终鉴定为猪传染性胃肠炎继发大肠杆菌感染。药敏试验结果显示, 分离的致病性大肠杆菌对林可霉素和氧氟沙星高度敏感。根据结果制定相应防治措施, 经治疗处理后, 病情得到有效控制。

关键词: 产房仔猪; 猪传染性胃肠炎病毒; 大肠杆菌; 仔猪黄痢; 腹泻病; 继发感染

中图分类号: S858.28 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)06-0155-03

Diagnosis and Treatment of Piglet Diarrhea in Intensive Pig Farms in Sichuan Province

ZHANG Man-li¹, XU Bo-wen², SHU Lei³, LIU Jie³, YAN Qi-gui^{1,3}

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuhai 519015, China; 3. Key laboratory of Animal

Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: In this study, a diarrheal disease from Sichuan intensive pig farms was diagnosed by RT-PCR. The results showed that the infection of porcine epidemic diarrhea, transmissible gastroenteritis, rotavirus and *Escherichia coli* were positive. The conclusion is that the primary infection was caused by transmissible gastroenteritis and then secondary infected by *Escherichia coli*. Drug sensitivity tests show that this bacteria is sensitive to lincomycin and ofloxacin. Based on these results, some suitable measures were carried out and eventually the symptom is alleviated.

Key words: delivery room piglets; TGEV; *Escherichia coli*; piglet dysentery; diarrhea; secondary infection

猪传染性胃肠炎是由冠状病毒科冠状病毒属的猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)引起的一种急性、高度接触性传染的病毒性传染病, 以呕吐、严重腹泻、脱水、2 周龄内仔猪高死亡率为主要特征^[1], 且常继发细菌感染^[2]。该病于 1945 年在美国由 Doyle 等^[3]首次报道, 之后许多国家和地区也报道了该病的发生。我国于 1956 年在台湾地区首次对该病进行了报道, 此后全国大部分省份也相继有该病的发生^[4]。

2011 年 3 月, 四川某规模化猪场发生严重疫情, 全场妊娠母猪、泌乳母猪、育肥猪及小猪发生腹泻。其中仔猪发病率为 90%, 死亡率达 65%, 已导致该场近千头仔猪死亡。临床症状主要为 2 d 仔猪呕吐、腹泻、排凝乳状粪便, 3~5 d 精神委顿、严重脱水、排黄色稀便, 四肢乏力, 1 周左右死亡, 给猪场造成了严重的经济损失。根据流行病学调查、临床症状观察、病畜剖检和实验室诊断, 诊断为猪传染性胃肠炎继发感染溶血性大肠杆菌。为了给类似病

收稿日期: 2011-09-16

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0848)

作者简介: 张曼丽(1989-), 女, 河南商丘人, 在读本科生, 研究方向: 动物传染病病原微生物。E-mail: tyzml@139.com

* 通讯作者: 颜其贵(1967-), 男, 重庆梁平人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物传染病病原分子生物学研究。

E-mail: yanqigui@126.com

例的诊治提供参考,特将诊治结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 病料的采集

采集病猪的肝、肺、腹股沟淋巴结、小肠等病料组织,采集及保存方法参考文献[5]进行。

1.2 主要试剂

LB 培养基、麦康凯培养基、伊红美蓝培养基购于北京奥博星生物技术有限公司;细菌生化鉴定管和药敏纸片购于杭州微生物试剂有限公司;RT-PCR 试剂盒、 $2\times Taq$ PCR Master Mix、DNA 分子量标准等购自北京天根生化科技有限公司;RNAiso Plus 购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 引物的设计与合成

猪流行性腹泻病毒(PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)及猪轮状病毒(PRV)的引物和检测方法由四川农业大学动物生物技术中心设计建立,引物由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.4 病原检测

提取病料总 RNA,方法依照 RNAiso Plus 说明书。根据 RT-PCR 试剂盒说明书,采用 $10\ \mu\text{L}$ 反应体系进行病毒 cDNA 合成反应,采用 $20\ \mu\text{L}$ 反应体系按照下列扩增条件进行 PCR,检测猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒及猪轮状病毒: $95\ ^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $95\ ^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $55\ ^\circ\text{C}$ 退火复性 30 s, $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 30 个循环; $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 10 min, 最后在 $4\ ^\circ\text{C}$ 条件下保存,反应结束后产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.5 细菌分离鉴定

将无菌采集的肝、肺及小肠组织分别接种于普通 LB 琼脂平板、血清 LB 琼脂平板、麦康凯琼脂平板和 10% 兔鲜血琼脂平板, $37\ ^\circ\text{C}$ 下培养,观察菌落形态及是否具有溶血性,并挑取单个菌落进行革兰氏染色镜检、生化鉴定,方法及判定结果参考文献[5]进行。

1.6 细菌致病性试验

用无菌生理盐水将典型菌落新鲜纯培养物稀释到 0.5 麦氏比浊管(1×10^8 cfu/mL),吸取稀释菌液 $0.2\ \text{mL}$ 分别腹腔注射健康小鼠;设空白对照鼠,腹腔注射无菌生理盐水 $0.2\ \text{mL}$,隔离饲养,观察发病及存活情况。及时解剖死亡小鼠,对肝脏进行细菌的分离、染色、镜检。方法及结果判定参考文献[5]进行。

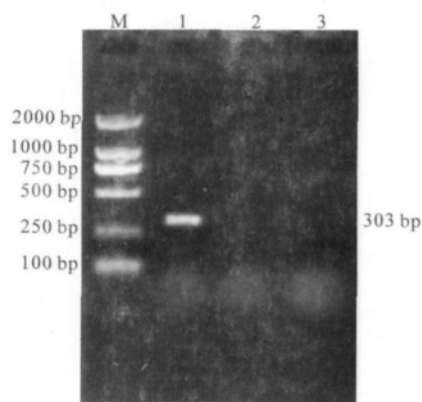
1.7 耐药性监测

试验采用美国临床实验室标准委员会 CLSI 推荐的 K-B 法进行,对鉴定的致病性大肠杆菌进行药敏试验,结果判定依据杭州微生物试剂有限公司药敏试验纸片法的抑菌范围解释标准进行。

2 结果与分析

2.1 病原检测结果

将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果见图 1。由图 1 可见,采用设计的引物对患猪病料进行 PCR 扩增,扩增出猪传染性胃肠炎病毒条带,没有扩增出猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒条带,表明患猪有猪传染性胃肠炎病毒感染。



M. DNA 标准分子量 DL2000 Marker; 1. TGEV; 2. PEDV; 3. PRV

图 1 病毒 RTP-PCR 扩增结果

2.2 分离细菌的鉴定结果

$37\ ^\circ\text{C}$ 培养 12 h 后,血清 LB 平板、普通 LB 平板均长出表面隆起、圆滑、半透明的菌落;在兔鲜血琼脂平板上呈 β 溶血;麦康凯琼脂平板上的菌落呈红色;伊红美蓝琼脂平板上形成紫黑色、具金属光泽菌落。挑取单个菌落经革兰氏染色呈阴性、杆菌,生化鉴定结果符合大肠杆菌特性,综合判定优势致病菌为大肠杆菌。

2.3 细菌致病性试验及药敏试验结果

对分离出的典型大肠杆菌进行致病性试验,接种试验小鼠 24 h 内死亡,对照组正常。取死亡小鼠肝脏及小肠,均分离到了原接种菌,由此证明所分离大肠杆菌具有致病性。

由表 1 可见,分离的大肠杆菌对林可霉素、氧氟沙星高度敏感,对磺胺间甲氧苄啶、氟苯尼考、环丙沙星、痢特灵、头孢噻唑钠、复方新诺明等低敏或不敏感。

表 1 分离细菌对 14 种常见药物的敏感性

药物	抑菌圈 直径/mm	结果 判定	药物	抑菌圈 直径/mm	结果 判定
卡那霉素	6	耐药	庆大霉素	15	中度敏感
头孢噻吩钠	6	耐药	痢特灵	9	耐药
林可霉素	24	高度敏感	复方新诺明	13	耐药
氨苄青霉素	13	耐药	氟苯尼考	7	耐药
红霉素	11	耐药	强力霉素	14	中度敏感
环丙沙星	11	耐药	氧氟沙星	27	高度敏感
磺胺间甲 氧苄啶	6	耐药	阿莫西林	6	耐药

3 防治措施

根据流行病学调查、临床症状观察、病畜剖检和实验室诊断,得出结果为猪传染性胃肠炎继发感染溶血性大肠杆菌。对该场采取控制措施如下:①对全场猪舍、周围环境进行消毒,特别是产房及母猪进行卫生清洁和护理,消毒药物可采用 0.3%~0.5%的过氧乙酸等;②对怀孕母猪产前 20 d 注射猪传染性胃肠炎和流行性腹泻二联苗,对未发病仔猪预防接种 0.5 mL/头;③对仔猪按 1 mL 0.5%樟脑磺胺酸、2 mL 5%碳酸氢钠和 2 mL 维生素 C 及 100 mL 5%葡萄糖生理盐水体系进行静脉输液,2 次/d,连续 3 d,饮水中加入补液盐及黄芪多糖;④对患病母猪饲喂黄芪多糖等提高免疫力使其自然康复,对脱水严重的病猪,静脉注射 5%葡萄糖生理盐水和 5%碳酸氢钠水溶液等;⑤选取在药敏试验结果中敏感性高的林可霉素和氧氟沙星,对病猪按说明书剂量及方法给药治疗。

4 讨论

在生产中,猪的传染性胃肠炎和流行性腹泻是引起仔猪发生呕吐、腹泻和脱水的常见传染病,两者均是由冠状病毒引起、临床症状、流行病学、病理变化极其相似的疾病^[6-7],常继发细菌性混合感染,加重病情,难于鉴别诊断。

国内目前对这 2 种病的鉴别诊断方法主要有病毒中和试验、免疫荧光法、免疫电镜法、ELISA 法和 RT-PCR 法等^[4,8]。ELISA 法和 RT-PCR 法以其敏感性高、特异性强等优点被广泛认同。本次诊断中,正是利用 RT-PCR 法对病料进行了高效、快速、准确地诊断,为养殖场准确掌控病情,及早采取防治措施赢得了先机,减少了经济损失。

由于病毒感染后常引起免疫抑制病,饲养管理不良,使猪群抵抗力普遍下降,继发细菌感染。在实际生产中,由于大量药物的乱用和滥用加剧了细菌耐药性的产生。本次药敏试验结果表明,该场致病

性大肠杆菌对氟苯尼考、强力霉素、环丙沙星等 12 种抗生素不同程度耐药。这与猪场大量使用抗生素,导致细菌的耐药性通过染色体或质粒在细菌间传播和扩散有关^[9]。

目前,针对猪传染性胃肠炎的治疗尚无特异性疗法^[1-3,10]。在生产中应加强饲养管理及合理预防控制,定期对猪舍、环境做好卫生及消毒工作,特别是产房及母猪的卫生清洁和护理;预防接种疫苗,对群体接种猪传染性胃肠炎和流行性腹泻二联苗进行预防,减少发病;加强猪群抗体动态监测,定期采集血清,进行群体抗体水平进行评估,指导和调整免疫程序;积极坚持自繁自养模式,严格执行全进全出饲养方式,减少仔猪感染几率;发病后,立即隔离病猪,全场消毒;恢复发病仔猪自身机体免疫力,防寒保温^[10],及时补充水分、电解质、调节酸中毒和补充营养;加强猪场耐药性监测,定期进行药物筛选,利用敏感性药物进行交替、脉冲式给药,防止细菌耐药性的产生并有效控制细菌性继发感染疾病。

在本次病例诊断过程中,积极采取上述防治措施,有效地控制了发病猪场疫情,达到了挽回经济损失的目的,也为四川地区集约化猪场应对猪传染性胃肠炎继发感染细菌性传染病提供治疗方面的参考,对控制此类疫病及合理用药具有指导意义。

参考文献:

- [1] 陈健雄,杨玉坚.猪传染性胃肠炎的临床诊断和防控[J].养猪,2008(1):65-67.
- [2] 任玉鹏,王利娜,颜其贵,等.猪流行性腹泻的预防与控制[J].猪业科学,2010(12):36-39.
- [3] 斯特劳,阿莱尔,蒙加林,等.猪病学[M].北京:中国农业出版社,2000:316-319.
- [4] 王文振,姜顺传,彭懿德.仔猪腹泻类型及防治措施[J].现代农业科技,2007(19):196.
- [5] 郭积燕.微生物检验技术[M].北京:人民卫生出版社:2008.
- [6] 张坤,何启盖.猪流行性腹泻病毒,猪传染性胃肠炎病毒和猪 A 群轮状病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立及临床应用[J].畜牧兽医学报,2010,41(8):1001-1005.
- [7] 李志亚.猪传染性胃肠炎与猪流行性腹泻的区别[J].现代农业科技,2010(15):371.
- [8] 王萃瑜.猪流行性腹泻病毒部分 S 基因的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立[D].长春:吉林农业大学,2008.
- [9] 张越男,张彦明,鄢明华,等.天津地区猪源大肠杆菌对抗菌药物敏感性测定[J].天津农业科学,2002,8(4):18-20.
- [10] 魏天锁,罗香彦,海兴正,等.仔猪传染性胃肠炎的综合防控[J].动物医学进展,2007,28(B08):106-107.