1 例猪圆环病毒与巴氏杆菌混合感染的诊断

于学祥[1,2]　库旭钢[1,2]　何东贤[1,2]　谭　鑫[1,2]　范盛先[1]　李彬彬[1]　何启盖[1,2*]
1.华中农业大学动物医学院,武汉 430070;2.生猪健康养殖协同创新中心,武汉 430070

摘要　2016 年 8 月湖北省武汉市某规模化猪场出现保育猪生长不良、咳喘、消瘦、呼吸困难等症状,偶有猪只急性死亡,为明确发病原因,笔者现场了解发病情况,剖检发病猪,采集样品实验室检测,结合临床症状综合分析,诊断为猪圆环病毒与多杀性巴氏杆菌混合感染。猪群紧急免疫高抗原含量和基因型相符的圆环病毒灭活疫苗,调整猪场免疫程序,结合巴氏杆菌药敏试验选用敏感抗生素阿莫西林和氨苄西林钠进行全群保健和个体治疗,快速控制了疫情,降低猪群的死亡率,为猪场挽回损失,同时也为开展猪圆环病毒和多杀性巴氏杆菌混合感染的防控提供参考。

关键词　猪圆环病毒;多杀性巴氏杆菌;混合感染;诊断

猪圆环病毒病是由猪圆环病毒引起的一种传染病,目前圆环病毒分圆环病毒 1 型(PCV1)与圆环病毒 2 型(PCV2)2 个血清型,其中 PCV2 感染猪群后临床表现为仔猪断奶后多系统衰弱综合征(PMWS)、皮炎和肾病综合征(PDNS)、猪呼吸道疾病综合征(PRDC)或繁殖障碍等,PCV2 感染可导致猪群产生免疫抑制,继发或并发其他疾病[1-2]。

猪巴氏杆菌病俗名“锁喉风”,又称猪肺疫,是由多杀性巴氏杆菌(Pm)引起的一种急性、热性和败血性传染病。Pm 具有多种血清型,其中 A 型和 D 型多杀性巴氏杆菌(Pm)为猪萎缩性鼻炎的主要致病菌,并且 Pm 感染后可损害呼吸道正常结构和功能,引起猪呼吸道疾病综合征[3]。

笔者将自己处理的 1 例猪圆环病毒与多杀性巴氏杆菌混合感染的案例分析如下。

1　临床信息收集及样品采集

1)猪场背景。湖北省武汉市某存栏 1 200 头母猪的自繁自养猪场,2016 年 8 月保育猪饲养出现问题,主要表现为 70 日龄仔猪精神沉郁、生长不良、消瘦、被毛粗乱无光泽、呼吸困难、咳喘,偶有猪急性死亡。饲养员将发病猪隔离进行药物治疗,效果不明显。

2)临床剖检采样。发病猪群主要表现为精神沉郁、消瘦(如图 1-a)。选取 3 头病猪剖检,均可见肺脏黏连(如图 1-b、c、d)、淋巴结肿胀且有大理石样病变。采集剖检猪口腔液、鼻拭子、血清、肺脏、淋巴结等组织放入冰盒,带回实验室检测。

收稿日期:2017-04-19
基金项目:国家生猪产业技术体系(CARS-36)
* 通讯作者
于学祥,男,1991 年生,硕士,执业兽医师。

[2] 牛志玲.论仔猪白痢的病因及预防措施[J].畜牧兽医杂志,2015(3):149.
[3] 闫中一,张海龙.仔猪白痢的诊断与防制措施[J].畜牧与饲料科学,2009(7):81-83.
[4] 杲双,李炳华,杨景晁,等.做好母猪保健,减少仔猪黄白痢[J].山东畜牧兽医,2012(12):97-98.
[5] 曹乾大, 韦剑锋. 一起仔猪黄白痢并发母猪少乳的诊治与体会[J].猪业科学,2011(12):132-133.
[6] 李宗波,邢兰君,撷锡良,等.仔猪黄痢白痢的诊治[J].中国兽医杂志,2010,46(2):78-79.
[7] 唐光武,吴玉臣,郭爽,等.仔猪黄痢病原分离株药敏试验和不同给药方法疗效比较研究[J].中国畜牧兽医,2010,37(2):159-161.

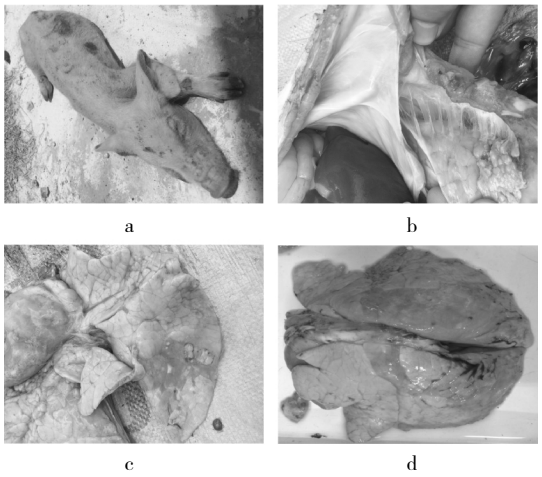

图 1 病猪病变部位

2 实验室检测

2.1 细菌学检测

1)病原菌的分离纯化。肺脏使用含血清和 NAD 的 TSA 平皿分离细菌,置 37 ℃温箱中培养,观察菌落形态,找出疑似致病菌,在含血清和 NAD 的 TSA 平板上划线纯化,37 ℃培养 24 h 后观察,见圆形、隆起、边缘整齐、表面湿润、灰白色、不透明、有较强荧光的菌落,革兰氏染色为阴性球杆菌,疑似为巴氏杆菌。

2)疑似病原菌的 PCR 鉴定。挑取单菌落在含血清、NAD 的 TSB 液体培养基中培养至浑浊,取 200 μL 菌液制模板,提取肺脏及鼻拭子 DNA,采用以多杀性巴氏杆菌 KMTI 基因为目的片段的引物(上游引物 F:ATCCGCTATTTACCCAGTGG,下游引物 R:GCTGTAAACGAACTCGCCAC)[3]扩增,有多杀性巴氏杆菌存在时可扩增出约 457 bp 的目的条带(如图 2)。结果显示,在剖检的 3 头猪中分离的细菌及肺脏、鼻拭子 DNA 中均检测到多杀性巴氏杆菌的核酸。

3)细菌的药敏试验。将分离纯化的细菌涂布平板,将药敏纸片贴在涂有菌液的平板上,37 ℃培养 24 h,观察到部分药敏纸片周围形成十分明显的抑菌圈。测量抑菌圈大小,依据 CLSI 判定标准,发现分离的 Pm 对阿莫西林、氧氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、大观霉素、强力霉素、阿奇霉素、链霉素、氨苄西林、头孢曲松、多粘菌素 B、头孢拉啶均为敏感状况,庆大霉素也有一定的抑菌效果。

2.2 病原学检测

提取剖检猪淋巴结、肺脏、血清和口腔液中 DNA 及 RNA,检测猪圆环病毒 2 型、猪伪狂犬病、猪蓝耳病等常见病原,在所有检测项目中仅检测到猪圆环病毒 2 型。

以本实验室设计的 PCV2 ORF2 基因为目的基因的引物(上游引物 F1:CACGGATATTGTCCTGGT,下游引物 R1:CGCACCTTCGGATATACTGTC)进行扩增,如有圆环病毒 2 型存在则可扩增出约 494 bp 的目的片段,结果显示,剖检的 3 头猪肺脏、血清及口腔液中均检出 PCV2 核酸(如图 3)。同时扩增 PCV2 Cap 蛋白全基因测序,结果显示,该场感染的圆环病毒为 2b 基因型。

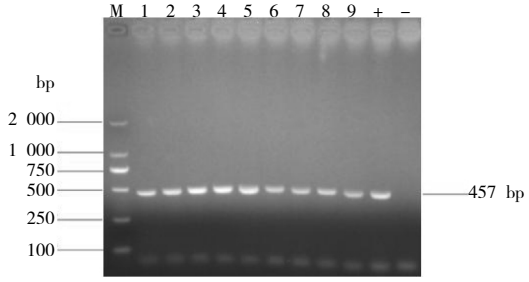

图 2 Pm MTI 基因 PCR 产物

注:1 ~ 3:样品 1 ~ 3 肺脏分离纯化细菌培养液;4 ~ 6:样品 1 ~ 3 肺脏 DNA;7 ~ 9:样品 1 ~ 3 鼻拭子 DNA。

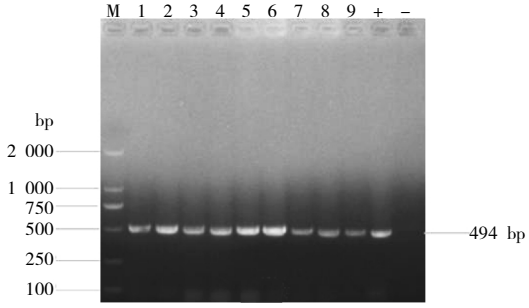

图 3 PCV3 ORF2 基因 PCR 产物

注:1 ~ 3:样品 1 ~ 3 淋巴结 DNA;4 ~ 6:样品 1 ~ 3 血清 DNA;7 ~ 9:样品 1 ~ 3 口腔液 DNA。

3 疾病诊断

根据临床症状、剖检病变和实验室检测结果,综合判定该场为猪圆环病毒 2 型与多杀性巴氏杆菌混合感染。

4 防控方案

根据猪场情况及防控程序,制定针对该场发病情况的有效合理的防控方法,降低猪群死亡率,挽回猪场经济损失,控制疫情。

1)隔离免疫。

①将发病猪进行隔离,避免疫情扩散。针对发

病猪，建议使用氨苄西林钠或头孢曲松钠等高度敏感类药物进行肌肉注射，连续治疗 3～5 d，观察病猪恢复情况。

②饮水给药，在饮水中添加阿莫西林，给药前猪群停水 2 h，再让猪群自由饮用。

③猪场原使用某进口圆环病毒亚单位疫苗，基因型与猪场病毒基因型不符，建议更换基因型相符的高抗原含量的猪圆环病毒 2 型疫苗紧急免疫。

2）加强环境消毒和饲养管理。

①在发病期间保持圈舍通风，降低饲养密度，减少应激。猪转栏后需消毒、空栏 7 d 后转入下一批次猪，并保证转入猪时猪舍的干燥整洁。

②加强对饲养人员的管理，避免串栏，在进入猪舍前一定要消毒。

5　防控效果跟踪

使用上述方案后，该猪场病情明显好转，1 个月后跟踪观察，猪场保育猪发病率、死淘率明显下降。结合实验室前期验证及前一次检测结果，说明鼻拭子 DNA 和分菌结果相接近，且口腔液、血清与淋巴结圆环病毒检测结果有一定相关性，所以本次仅采集15 头保育猪血清、口腔液及鼻拭子，检测猪圆环病毒 2 型及多杀性巴氏杆菌，所有样品均为阴性。

6　总　结

目前我国许多养猪场疾病复杂，多以混合感染和继发感染为主，猪场抗生素滥用导致许多细菌产生耐药性，致使发病后使用药物治疗效果不理想[4]。

巴氏杆菌病多为混合感染或者继发感染，这大大增加了对巴氏杆菌的预防难度。猪场中圆环病毒等免疫抑制性疾病不能得到很好地控制，也使巴氏杆菌感染的可能性增加[5]。

对疾病的诊断要结合流行病学、临床症状、剖检情况及实验室检测综合判定，否则会误诊，延误治疗时机而增加损失[6]。该案例的确诊是借助实验室检测技术，判断发病原因为猪圆环病毒 2 型引起的免疫抑制，继发巴氏杆菌感染。

圆环病毒感染猪应加强饲养管理，可从以下几个方面进行：分区饲养，全进全出；加强疫苗的免疫，选择针对该场现有毒株的疫苗，合理的疫苗免疫程序；加强生物安全措施，避免交叉感染。

猪群携带病原是圆环病毒感染的必要条件，饲养管理不善、通风不良、温湿度不适、免疫接种应激、不同来源和日龄的猪混养等一些其他条件可综合导致猪群出现明显的临床症状及产生较大的损失。本病的发病率和死亡率变化很大，依据猪群健康状况、饲养管理水平、环境条件及其他致病原的感染情况等而定。为降低该病的损失，做好平时的防控是最有效的手段[7-8]。

参　考　文　献

[1] 刘淑清. 猪圆环病毒 2 型和副猪嗜血杆菌 4 型混合感染致病性研究[D].武汉：华中农业大学，2011.

[2] 潘荞. 猪圆环病毒 2 型与副猪嗜血杆菌混合感染昆明小鼠的病理学研究[D].长沙：湖南农业大学，2010.

[3] 汤细彪.猪源多杀性巴氏杆菌的分子流行病学与致病性研究[D].武汉：华中农业大学，2010.

[4] 刘涛，王瑞，温新杰.猪圆环病毒与猪丹毒，猪巴氏杆菌病混合感染的诊治[J].中国动物保健，2015，17(3)：91-94.

[5] 曹鹏飞，彭野渡，朱方成.猪圆环病毒，巴氏杆菌及副猪嗜血杆菌混合感染的诊治[J].湖北畜牧兽医，2009(5)：25-26.

[6] 许英民.猪圆环病毒(Ⅱ)，猪巴氏杆菌与猪丹毒混合感染的诊治[J].今日畜牧兽医，2015(11)：11-12.

[7] 杨汉春.猪断奶后多系统衰竭综合征的控制策略[J].中国兽医杂志，2002，38(11)：46-47.

[8] 海洋，赵玉军，金苗苗，等.引起猪呼吸道疾病综合征的几种常见混合感染及综合防制[J].上海畜牧兽医通讯，2007(3)：56-57.