

Diagnosis and Treatment of a Co-Infection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome and Porcine Salmonellosis

Xuehuai Shen^{1,2}, Xiaocheng Pan^{1,2*}, Danjun Zhang^{1,2}, Xuel Zhou^{1,2}, Ruihong Zhao^{1,2}, Congjie Rui³, Qinghe Zhang³, Xiaomiao Hu¹, Yin Dai^{1,2}, Hongyan Hou^{1,2}

¹Institute of Animal and Veterinary Science, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei Anhui

²Livestock and Poultry Epidemic Diseases Research Center of Anhui Province, Hefei Anhui

³Anhui Agricultural University, Hefei Anhui

Email: xuehuaishen1986@163.com, *pxcpyq@sina.com

Received: Jul. 9th, 2019; accepted: Jul. 24th, 2019; published: Jul. 31st, 2019

Abstract

In December 2018, an epidemic broke out in a self-supporting pig farm in Changfeng County, Anhui Province. Clinical symptoms are sow abortion and respiratory symptoms and diarrhea in piglets. A co-infection of porcine reproductive and respiratory syndrome and Porcine Salmonellosis was confirmed through clinical symptoms observation and necropsy, and laboratory bacteriological detection, viral antigen screening and serological testing. Based on accurate diagnosis, effective prevention measures were taken in time, and the epidemic situation was controlled effectively.

Keywords

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, Porcine Salmonellosis, Co-Infection, Diagnosis, Treatment

一例猪蓝耳病与猪沙门氏菌氏菌病混合感染的诊治

沈学怀¹, 潘孝成^{1*}, 张丹俊¹, 周学利¹, 赵瑞宏¹, 芮聪杰², 张庆贺², 胡晓苗¹, 戴银¹, 侯宏艳

¹安徽省农业科学院畜牧兽医研究所, 安徽 合肥

²安徽省畜禽疫病研究中心, 安徽 合肥

*通讯作者。

文章引用: 沈学怀, 潘孝成, 张丹俊, 周学利, 赵瑞宏, 芮聪杰, 张庆贺, 胡晓苗, 戴银, 侯宏艳. 一例猪蓝耳病与猪沙门氏菌氏菌病混合感染的诊治[J]. 亚洲兽医病例研究, 2019, 8(3): 39-46. DOI: 10.12677/acrpvm.2019.83006

³安徽农业大学, 安徽 合肥

Email: xuehuaishen1986@163.com, *pxcpyq@sina.com

收稿日期: 2019年7月9日; 录用日期: 2019年7月24日; 发布日期: 2019年7月31日

摘要

2018年12月, 安徽省长丰县某自繁自养猪场发生疫情。母猪出现流产, 仔猪出现以呼吸道和腹泻为主要临床症状的疫病, 通过临床症状观察及剖检病变, 结合实验室细菌学检测、病毒抗原筛查和血清学检测的基础上, 判定为猪蓝耳病与猪沙门氏菌混合感染。在准确诊断的基础上及时采取了有效的防治措施, 使该场疫情得到了有效的控制。

关键词

猪蓝耳病, 猪沙门氏菌病, 混合感染, 诊断, 治疗

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

猪蓝耳病是猪繁殖与呼吸障碍综合征和简称, 是由猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒(PRRSV)感染引起的一种高度接触性传染病, 各品种、各年龄阶段的猪均易感, 其中以母猪和小猪最易感, 可造成母猪繁殖障碍和小猪出现呼吸道症状, 同时是一种会引起感染猪的免疫抑制[1]。猪群感染猪蓝耳病时会造成免疫力低下, 很容易诱发或继发感染其他病毒性或细菌性疫病, 使病情复杂化[2]。猪沙门氏菌病又称猪的副伤寒, 由沙门氏菌属细菌引起的疾病总称, 主要表现为严重的败血症和肠炎症状, 有时可见脑炎、肺炎和母猪的流产[3]。

2018年12月中旬, 安徽省长丰县某猪场存栏153头, 其中生产母猪47头, 后备母猪36头, 仔猪70头。近期出现过2胎次母猪出现流产和产死胎情况, 母猪和后备母猪整体稳定, 断奶仔猪的发病较为严重, 主要症状为呼吸道症状, 喘气、咳嗽, 体温升高, 严重腹泻, 体质弱、被毛粗乱, 耳尖皮肤发绀。发病率为20%左右, 死亡率在7.14%。该猪场的免疫程序为母猪和后备猪猪瘟弱毒疫苗、伪狂犬病灭活疫苗、圆环2型病毒灭活疫苗和口蹄疫疫苗一年免疫2次, 每种疫苗间隔1周左右; 仔猪疫苗免疫方法是: 25日龄猪瘟一免, 60日龄二免; 35日龄免疫伪狂犬病疫苗1次; 30日龄和70日龄各免疫一次口蹄疫疫苗; 蓝耳病疫苗未免疫。经对送检病猪流行病学调查和解剖病理诊断, 对病变组织进行和实验室检测诊断为猪蓝耳病与沙门氏菌混合感染, 现将病例报告如下。

2. 材料与方法

2.1. 病料

发病仔猪2头, 发病猪群血样15份, 由安徽省长丰县某猪场送往到本实验室进行解剖检查和实验室

检测,发病猪为病重活猪,发病猪群血样冷藏保存。

2.2. 主要试剂

2×PCR premix、DL2000 DNA Marker、细菌 DNA 提取试剂盒为天根生化科技有限公司产品;SS 琼脂、血琼脂平板为北京陆桥公司产品;猪蓝耳病 RT-PCR 检测试剂盒、猪圆环病毒 2 型 PCR 检测试剂盒、猪伪狂犬病毒 PCR 检测试剂盒均为深圳康百得生物科技有限公司产品。猪蓝耳病抗体检测试剂盒、猪瘟抗体检测试剂盒和猪圆环 2 型抗体检测试剂盒均为深圳康百得生物科技有限公司产品,猪伪狂犬 gE 抗体检测试剂盒为 IDEXX 公司产品。药敏纸片为杭州微生物公司产品。

2.3. 病猪流行病学调查、剖检与采样

询问养殖人员猪群基础情况,包括品种、日龄、养殖方式、饲养管理、免疫情况。对发病情况进行询问,包括临床表现、流行特征、既往病史、发病率、死亡率、用药情况等。对送检病猪进行剖检,观察病猪体表变化,观察肺脏是否有坏死、肉变或渗出物,淋巴结是否肿大、出血;脾脏、肾脏、肝脏、心脏等器官是否有出血等病变,观察肠道是否有坏死、出血或渗出物,记录剖检组织器官的病变情况,并无菌采取肝脏、肺脏、脾脏和淋巴结等组织供进一步检测。

2.4. 细菌学检测

无菌采取患猪的肝脏、脾脏、淋巴结和腹腔积液进行涂片,将涂片经革兰氏染色,后油镜下观察。进一步将组织和积液接种于麦康凯和 XLD4 琼脂鉴别培养基置 37℃ 恒温箱中需氧培养 24 h,观察菌落形态。

2.5. 引物设计与扩增

根据沙门氏菌特异性基因 *fimY* 设计 1 对特异性引物,上游 *fimY*-F: 5'-TATCACTTCCAACGCCGC-AGATA-3',下游 *fimY*-R: 5'-TGCGCTAAAGTTTCAATCATCAAC-3',由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,扩增的沙门氏菌目标特异性条带为 497 bp,沙门氏菌 PCR 扩增反应总体积为 25 μL,反应体系:PCR premix 12.5 μL,上下游引物各 1 μL,DNA 模板 0.5 μL,补水至 25 μL;PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,65℃ 退火 25 s,72℃ 延伸 30 s,共 30 个循环;72℃ 延伸 10 min。

2.6. 病毒抗原 PCR 检测

采取患猪的肝脏、脾脏、淋巴结采用混样方式混合成 2 份样品,分别根据猪蓝耳病 RT-PCR 检测试剂盒、猪圆环病毒 2 型 PCR 检测试剂盒和猪伪狂犬病毒 PCR 检测试剂盒进行病毒核酸提取和 PCR 扩增。

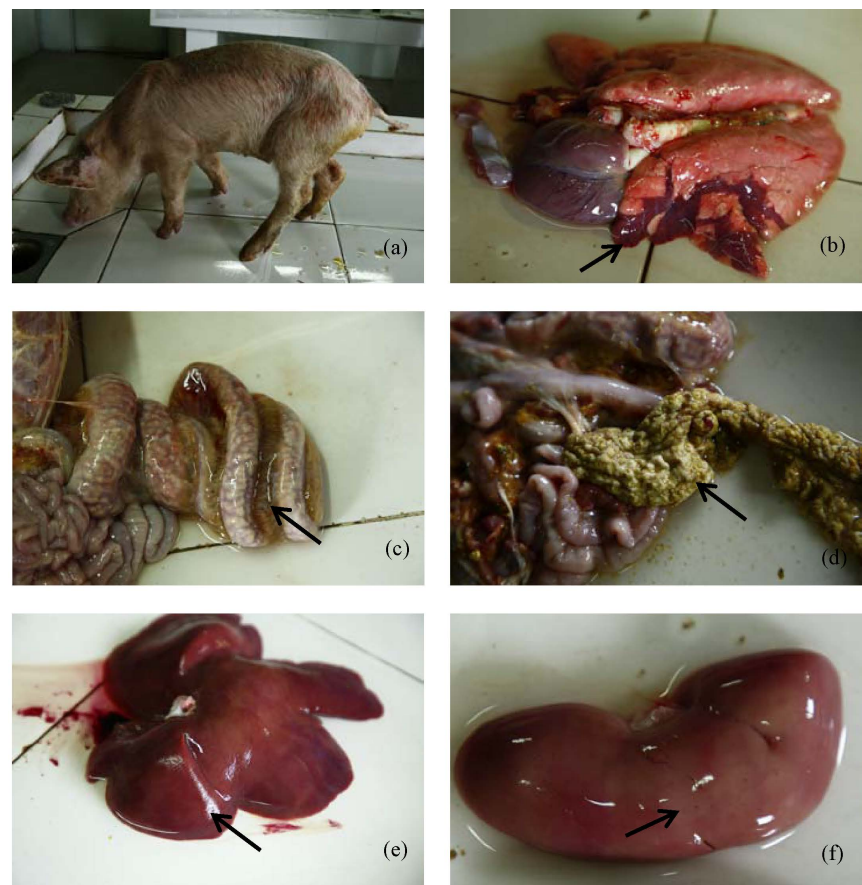
2.7. 血清抗体检测

血样 3000 r/min 离心 5 min 收集血清,进行抗体检测,具体检测方法和操作步骤和结果判定参考各检测试剂盒说明书。

3. 结果

3.1. 送检仔猪剖检病理变化

病猪剖检病理见图 1,肺脏呈暗红色的肉变区,腹腔有淡黄色腹水,肠系膜淋巴结出血、肿大,肝脏出血,脾脏边缘出血呈锯齿状,肾脏有针尖状出血点,肠道严重肿胀,肠壁外附有胶冻样渗出物,肠管内呈现糠麸样坏死。



(a) 病猪消瘦、被毛粗乱、耳尖皮肤发绀; (b) 肺脏有暗红色的肉变区;
(c) 肠壁外附有胶冻样渗出物; (d) 肠管内呈现糠麸样坏死;
(e) 肝脏出血; (f) 肾脏有针尖状出血点

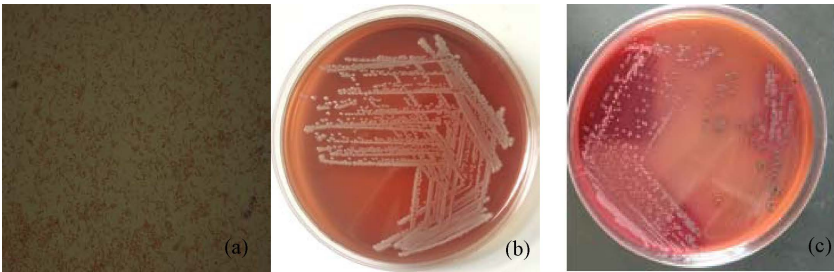
Figure 1. Clinical symptoms and necropsy changes in sick pigs
图 1. 病猪临床症状与剖检病例变化

3.2. 细菌分离与鉴定

病料涂片经革兰氏染色后油镜下观察结果见图 2，存在大量色两端钝圆浓染的革兰氏阴性小杆菌。病料接种于麦康凯和 XLD4 鉴别琼脂培养 24 h 后，在麦康凯培养基上生长出单一、无色小菌落，在 XLD4 琼脂培养基上为中心呈黑色的灰白色小菌落，初步诊断为沙门氏菌。对分离到的细菌，经 PCR 检测沙门氏菌特异性基因 *fimY*，扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳，结果出现单一的，大小为 497 bp 的目标条带，确定所分离细菌为沙门氏菌(见图 3)。

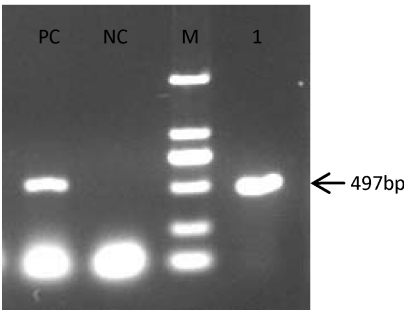
3.3. 药敏检测

将细菌分离株用无菌棉签涂布于 MH 琼脂培养基表面。用无菌镊子夹取药敏纸片，选取氨苄西林、氟苯尼考、头孢噻肟、多西环素、左氧氟沙星、复合磺胺、阿米卡星、庆大霉素、链霉素、阿奇霉素、环丙沙星、头孢曲松、大观霉素等 13 种药物的敏感性检测。将平皿培养基置于 37℃ 温箱中培养 24 h 后，观察结果。药敏结果如表 1 所示，该分离沙门氏菌菌株对氟苯尼考、左氧氟沙星和环丙沙星高敏，对头孢噻肟、头孢曲松和多西环素中度敏感，对复方新诺敏、阿米卡星、庆大霉素和大观霉素表现出一定程度的耐药，对氨苄西林、链霉素和阿奇霉素则完全耐药。



(a)为细菌革兰氏染色镜检 (1000 倍); (b)为细菌在麦康凯培养基上的生长状态;
(c)为细菌在 XLD4 培养基上的生长状态

Figure 2. Staining microscopy and growth on identification medium of isolated bacteria
图 2. 分离细菌在染色镜检以及在鉴别培养基上的生长状态



M 为 Marker DL2000; PC 为阳性对照;
NC 为阴性对照; 1 为检测菌样

Figure 3. Amplification result of specific gene *fimY* of Salmonella

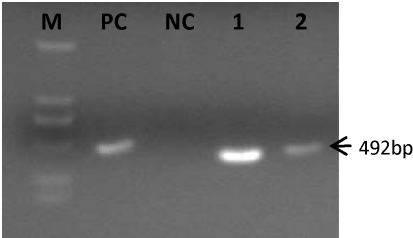
图 3. 沙门氏菌特异性基因 *fimY* PCR 扩增结果

Table 1. Results of drug susceptibility test for Salmonella isolation strain
表 1. 分离沙门氏菌菌株的药敏试验结果

抗生素种类	药物敏感性判定(mm)			分离菌株	
	耐药 R	中介 I	敏感 S	抑菌圈(mm)	敏感性
氨苄西林	≤13	14~16	≥17	0	R
氟苯尼考	≤12	13~17	≥18	20.5	S
头孢噻肟	≤14	15~22	≥23	15.8	I
头孢曲松	≤13	14~20	≥21	14.3	I
多西环素	≤12	13~15	≥16	14.4	I
左氧氟沙星	≤13	14~16	≥17	18.1	S
环丙沙星	≤15	16~20	≥21	20.8	S
复方新诺敏	≤12	13~16	≥17	10.5	R
阿米卡星	≤14	15~16	≥17	13.8	R
庆大霉素	≤12	13~14	≥15	11.5	R
链霉素	≤11	12~14	≥15	0	R
阿奇霉素	≤13	14~17	≥18	0	R
大观霉素	≤14	15~17	≥18	11.2	R

3.4. 病毒抗原 PCR 检测

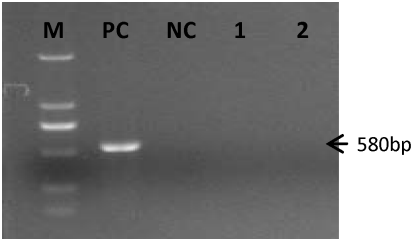
采取患猪的肝脏、脾脏、淋巴结采用混样方式提取 DNA 和 RNA 用于病毒抗原的 PCR 检测，样品做 2 个重复，分别对猪蓝耳病病毒、猪圆环病毒、猪伪狂犬病毒进行检测，结果如图 4~图 6 所示，猪蓝耳病病毒抗原检测为阳性，出现 492 bp 特性条带；猪圆环病毒和猪伪狂犬病毒检测均为阴性，由于该猪场并未免疫猪蓝耳病疫苗，说明猪群中存在传入性猪蓝耳病病毒的感染。



M 为 Marker DL2000；PC 为阳性对照；
NC 为阴性对照；1、2 为检测样品

Figure 4. Detection results of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen

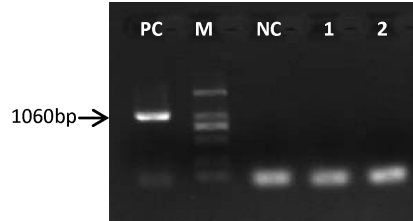
图 4. 猪蓝耳病病毒抗原检测结果



M 为 Marker DL2000；PC 为阳性对照；
NC 为阴性对照；1、2 为检测样品

Figure 5. Detection results of pig pseudorabies virus antigen

图 5. 猪伪狂犬病毒抗原检测结果



M 为 Marker DL2000；PC 为阳性对照；
NC 为阴性对照；1、2 为检测样品

Figure 6. Detection results of pig circovirus antigen

图 6. 猪圆环病毒抗原检测结果

3.5. 血清抗体检测

对送检 15 份发病猪群的血清样品进行猪蓝耳病病毒抗体、猪瘟病毒抗体、圆环病毒抗体和猪伪狂犬病毒 gE 抗体检测，计算数据的变异系数。检测结果如表 2 所示，猪蓝耳病抗体的阳性为 66.67%，变异系数达到 75.18%，说明抗体的均匀度很差，由于该猪场并未免疫猪蓝耳病病毒疫苗，考虑存在传入性猪

蓝耳病病毒的感染。猪瘟病毒和猪圆环病毒的血清抗体阳性率均为 100%，两种血清抗体效价的变异系数分别为 18.61%和 20.97%，抗体的均匀度较好。猪伪狂犬病毒 gE 抗体检测全部为阴性，排除野毒感染的可能。

Table 2. Detection results of pig serum antibody
表 2. 猪群血清抗体检测结果

检测项目	检测阳性率	数据变异系数(CV%)	均匀度
猪蓝耳病病毒抗体	66.67% (10/15)	75.18%	差
猪瘟病毒抗体	100% (15/15)	18.61%	优
圆环病毒抗体	100% (15/15)	20.97%	优
猪伪狂犬病毒 gE 抗体	0% (0/15)	21.05%	优

本表规定 CV%≤30%时均匀度为“优”；30%< CV%≤50%时均匀度为“良”；CV%≥50%时均匀度为“差”。

4. 分析与小结

通过细菌学检测和鉴定该猪场存在猪沙门氏菌的感染，通过流行病学情况分析、临床剖检及病毒抗原和血清抗体的检测，确认存在猪蓝耳病病毒感染。由于猪瘟疫苗为该场常规免疫的活疫苗，因此不能简单的通过抗原的检测进行判断，本病例实验室诊断通过测定猪瘟血清抗体效价的均匀度判断该猪场猪瘟总体平稳，排除了猪瘟病毒的感染。由于该猪场进行了猪圆环灭活疫苗的免疫，并且在病毒抗原检测为阴性，血清抗体的均匀度较好，因此排除猪圆环病毒感染。通过病毒抗原和血清猪伪狂犬 gE 抗体检测，排除猪伪狂犬病毒感染的可能性。通过细菌的分离鉴定和病毒感染的筛查，最终确诊该养猪场存在猪蓝耳病病毒和猪沙门氏菌的混合感染。针对诊断结果提出防治措施：1) 对没有治疗价值的猪进行及时淘汰处理，加强加强仔猪和母猪的饲养管理，猪舍每天消毒，在保证温度的同时加强通风，做好猪场生物安全管理。2) 对病情较轻的猪只进行隔离治疗，采用环丙沙星配合柴胡进行肌肉注射，饮水中加入氟苯尼考、强力霉素和黄芪多糖，连用 5~7 天。3) 对未发病猪群进行猪蓝耳病疫苗紧急接种。4) 对全群在饲料中拌入氟苯尼考、强力霉素和黄芪多糖，并加入适量多维葡萄糖，连用 10 天。1 个月回访，猪场基本恢复正常。

自 1996 年猪蓝耳病猪在我国发生后，多年来猪蓝耳病仍是危害当前养猪业的重大疾病之一，各种年龄的猪均可感染，主要引起母猪流产、产死胎、繁殖障碍，仔猪和生长猪表现为呼吸系统症状[4] [5]。对于猪蓝耳病的防控以疫苗预防免疫为主，但是目前蓝耳病病毒毒株多样，并且非常容易变异和重组，给猪蓝耳病的防控带来困难[6] [7]。我国将猪蓝耳病的感染状态分为六类，分别为：暴发场、不稳定场、阳性大体稳定场、阳性稳定/病毒循环场、阳性稳定/无病毒循环场、阴性场六类，应根据每个场的不同情况采取科学的防控措施[8]。本病例中该猪场为未免疫场，一旦有传入性病毒感染就可能引起较为严重的发病，由阴性场变为阳性不稳定场，此时采取疫苗的接种，诱导猪群产生保护性抗体，可逐渐由阳性不稳定场转变为阳性稳定场，从而控制疫情蔓延。在疫苗的选择上推荐使用主流毒株的疫苗进行免疫，且不要随意更换不同毒株的疫苗，防止不同的疫苗株或疫苗株与野毒之间发生重组变异。猪沙门氏菌病主要是由沙门氏菌属细菌引起仔猪的一种传染病，可造成仔猪急性肠炎或急性败血症，成年猪单独感染时很少表现出临床症状，可成隐形感染经过[9]。本病例中沙门氏菌感染可能是由于蓝耳病病毒感染后造成的继发感染，加重了猪群的发病，使病情更加复杂。研究发现，猪蓝耳病病毒与猪沙门氏菌之间可能存在协同作用，可加重感染猪的死亡[10]。近年来，出现很多病毒与细菌混合感染的病例报告，有的甚至是多种病毒或细菌的同时感染[11] [12] [13]。这种混合感染仅仅依靠临床症状和剖检病理变化很难进行确诊，

给一线兽医工作者对猪病的诊疗带来了很大的困扰[14],因此必须借助于实验室的检测,通过对细菌学检测、病毒抗原筛查和血清学的检测,对病情进行综合分析和准确判断,为采取针对性的防治提供科学依据。

目前,对于病原的检测多以病原核酸的 PCR 检测为主,但是否能够简单采用 PCR 结果对病情进行判断是值得商榷的,比如本病例中猪场采用猪瘟弱毒疫苗进行免疫,如果采用 PCR 方法进行检测是会显示为阳性,但实际该猪场猪瘟免疫情况一直较好,血清抗体检测结果可以反映,因此在采用 PCR 技术进行疫病的诊断时应该全面综合分析,防止误诊误判。非典型性和混合感染病例的出现对实验室诊断提出更高的要求,单独疫病的 PCR 或血清学检测无法满足疫病快速筛查的需要,因此,在保证灵敏性和特异性的基础上,发展多重、多联、快速的高通量检测技术可能会成为未来疫病诊断技术研究的主要方向。

参考文献

- [1] Han, J., Zhou, L., Ge, X. and Yang, H. (2017) Pathogenesis and Control of the Chinese Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Veterinary Microbiology*, **209**, 30-47.
- [2] 郭升伟. 一例猪蓝耳病与猪链球菌病混合感染的诊断与防控[J]. 福建畜牧兽医, 2019, 41(3): 45-46.
- [3] 王杨. 猪沙门氏菌病的流行病学、鉴别诊断与防控措施[J]. 现代畜牧科技, 2019(5): 94-95.
- [4] Li, C., Zhuang, J., Wang, J., et al. (2016) Outbreak Investigation of NADC30-Like PRRSV in South-East China. *Transboundary and Emerging Diseases*, **63**, 474-479. <https://doi.org/10.1111/tbed.12530>
- [5] Gao, J.C., Xiong, J.Y., Ye, C., et al. (2017) Genotypic and Geographical Distribution of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses in Mainland China in 1996-2016. *Veterinary Microbiology*, **208**, 164-172.
- [6] Kappes, M.A. and Faaborg, K.S. (2015) PRRSV Structure, Replication and Recombination: Origin of Phenotype and Genotype Diversity. *Virology*, **479-480**, 475-486. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.012>
- [7] Liu, J.K., Zhou, X., Zhai, J.Q., et al. (2017) Emergence of a Novel Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, **64**, 2059-2074. <https://doi.org/10.1111/tbed.12617>
- [8] 陈鹏强. 母猪群猪蓝耳病感染状态的评估[J]. 兽医导刊, 2019(9): 23-24.
- [9] 李娟. 猪沙门氏菌病的流行病学、临床症状、诊断及其防控[J]. 现代畜牧科技, 2018(12): 53.
- [10] Wills, R.W., Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J., et al. (2000) Synergism between Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) and *Salmonella choleraesuis* in Swine. *Veterinary Microbiology*, **71**, 177-192. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00175-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00175-3)
- [11] 刘兵, 杨健, 黄光奎. 一例猪蓝耳病与猪传染性胸膜肺炎混合感染的诊治[J]. 湖北畜牧兽医, 2012(8): 40-41.
- [12] 高琦, 王琦, 倪宏波. 猪蓝耳病病毒、圆环病毒和沙门氏菌混合感染的实验室诊断[J]. 现代畜牧兽医, 2016(2): 36-40.
- [13] 刘霞, 李永彬. 一例猪棘头虫与猪圆环病毒混合感染的诊治[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019(10): 109-110.
- [14] 赵秀荣. 兽医临床诊断的基本方法及诊断步骤[J]. 中兽医学杂志, 2019(3): 90.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网首页: <http://cnki.net/>, 点击页面中“外文资源总库 CNKI SCHOLAR”, 跳转至: <http://scholar.cnki.net/new>, 搜索框内直接输入文章标题, 即可查询;
或点击“高级检索”, 下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2169-8880, 即可查询。
2. 通过知网首页 <http://cnki.net/> 顶部“旧版入口”进入知网旧版: <http://www.cnki.net/old/>, 左侧选择“国际文献总库”进入, 搜索框直接输入文章标题, 即可查询。

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: acrpvm@hanspub.org