doi:10.11751/ISSN.1002 - 1280.2020.04.02

河南省南阳市某猪场一例猪流行性腹泻的实验室诊断

金喜新[1],王宏亮[2],刘　凡[1],孟　伟[1],贾广敏[1],吕婧玉[1],李杰如[1]

(1.河南省动物卫生监督所,郑州 450008;2.河南省科学技术协会,郑州 450008)

[收稿日期] 2019 - 12 - 03　[文献标识码]A　[文章编号]1002 - 1280 (2020) 04 - 0011 - 06　[中图分类号]S858.2

[摘　要]　为对南阳市某猪场发生腹泻的病原进行鉴定,结合猪场发病情况、临床症状、剖检病理变化进行分析,并运用 HE 染色、RT - PCR 等实验室技术综合判定。结果显示,某场新生仔猪发病率 100%,临床表现为严重呕吐、腹泻且病死率较高,肠道组织切片发现空肠绒毛脱落、回肠细胞碱性粒子变多,RT - PCR 结果显示猪流行性腹泻病毒(PEDV)阳性,提示本次某猪场腹泻主要是由猪流行性腹泻病毒感染造成的。

[关键词]　猪流行性腹泻病毒;诊断;HE 染色

Laboratory Diagnosis of a Case of Porcine Epidemic Diarrhea in a Swine Farm in Nanyang, Henan Province

JIN Xi - xin[1], WANG Hong - liang[2], LIU Fan[1], MENG Wei[1], JIA Guang - min[1], LV Jing - yu[1], LI Jie - ru[1]

(1. *Henan Animal Health Inspection Institute*, *Zhengzhou* 450008, *China*; 2. *Henan Association for Science and Technology*, *Zhengzhou* 450008, *China*)

Abstract: In order to identify the pathogen of diarrhea in a pig farm in Nanyang City, we analyzed the pathological changes of diarrhea in a pig farm according to the incidence, clinical symptoms and pathological changes, and determined it comprehensively by HE staining, RT - PCR and other laboratory techniques. The results showed that the incidence of neonatal piglets was 100%, the clinical manifestations were severe vomiting, diarrhea and high mortality. Intestinal tissue sections showed that the villi of Jejunum were exfoliated and the alkaline particles of colon cells became more. RT - PCR results showed that porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) was positive. According to the comprehensive judgment, diarrhea in a pig farm is caused by porcine epidemic diarrhea virus infection.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus; diagnose; HE

猪流行性腹泻(Porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的猪的一种急性、高度传染性肠道疾病,临床上以呕吐、水样腹泻、脱水死

作者简介:金喜新,硕士研究生,高级兽医师,从事动物防疫监督及其相关工作。E - mail:190524900@qq.com

亡和哺乳仔猪高致死率为主要特征[1]。各种年龄段的猪只均易感染。1978 年,比利时首次分离鉴定出该病毒,命名为 CV777[2]。随后,匈牙利、德国、泰国、韩国、日本、中国、美国等国家都陆续报道了本病。PEDV 造成的危害非常严重,2010 – 2011 年,我国有 100 多万头猪死于 PEDV[3],2013 年美国暴发 PED 疫情,当年美国损失了 700 万头仔猪[4]。现在 PED 已经成为影响养猪产业的主要疫病之一。目前,在我国猪病毒性腹泻病例中,感染 PEDV 的病例最多且最为严重[5],没有得到有效的控制,是威胁养猪业的重要疾病之一。猪流行性腹泻最主要的传染源是患病猪和带毒猪,体内的病毒会随着粪便、唾液等排泄物、分泌物大量排出从而污染环境以及生产用具,被污染的饮水以及饲料等被易感猪摄入到体内会引起机体发病[6-8]。PEDV 经常与猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、猪轮状病毒(PoRV)、猪德尔塔冠状病毒(PDCoV)、猪嵴病毒(PKV)等病毒混合感染[9-11]。PEDV 为冠状病毒属的成员,为单股正链 RNA 病毒,PEDV 的基因组全部长度约为 28 kb,主要的结构蛋白为 S 蛋白、E 蛋白、M 蛋白和 N 蛋白。在 PEDV 基因遗传进化分析和多样性分析中,特别以 S 蛋白、N 蛋白、M 蛋白研究的最多,M 基因具有较强的稳定性,所以 M 基因也常用来对 PEDV 进行鉴定[12-13]。河南省南阳市某规模化养猪场有能繁母猪 500 头,2019 年 1 月,猪只开始发生腹泻病,发病母猪 50 头,哺乳仔猪约 150 头,且发病猪只集中在同一或者临近产房,哺乳仔猪致死率非常高,给猪场造成了严重的经济损失。为查明病因,现场检查后并采集样品进行实验室检验。

1　材料与方法

1.1　样品收集　无菌采集发病哺乳仔猪粪便、唾液以及心脏、脾脏、空肠等。

1.2　常规检查

1.2.1　流行病学　通过现场检查并询问场主以了解本次腹泻流行情况。

1.2.2　临床观察　按常规方法对仔猪和母猪临床症状进行观察,并记录其精神状态、饮食、体温变化、排泄情况等临床表现。

1.2.3　病理解剖观察　用 75% 酒精擦拭仔猪体表,在超净工作台中打开猪胸腔和腹腔,观察并拍照记录心、肝、脾、肺、肾、肠道组织、肠系膜淋巴结和其他一些器官组织的病理学和形态学变化。采集各器官部分组织至 4% 甲醛溶液中保存,以备后续研究。

1.2.4　组织病理学观察　首先将保存于 4% 甲醛中空肠组织、盲肠组织、结肠组织、十二指肠、回肠组织、直肠组织取出,切成 1.0x1.0x0.2 cm 组织块,置于包埋盒中,自来水清洗,然后依次进行梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、切片、展片、贴片、烤片等,最后进行 HE 染色。染色后将组织切片置普通光学显微镜下观察。

1.3　RT – PCR 检测

1.3.1　样品处理　在采集的粪便和唾液的棉拭子试管中加入适量 DMEM 混合后,转移到高压灭菌后的 EP 管中,然后经过离心处理,取其上清液分装到其他管中然后 –40 ℃低温保存。肠道组织和器官组织要取其一小部分剪碎然后在加入液氮的研钵中反复研磨,研磨结束后加入适量 DMEM 混合制成匀浆,然后将组织匀浆转移到灭菌后的 EP 管中,经离心操作后取上清分装到其他 EP 管中并 –40 ℃低温保存。

1.3.2　引物的设计与合成　参照美国国家生物技术信息中心(NCBI)中登录的 PEDV 的 M 基因保守序列(基因序列号:KM048291.1)、TGEV 的 N 基因保守序列(基因序列号:KX499468.1)、PDCoV 的 S 基因保守序列(基因序列号:MK478383.1)、使用 Primer premier 6.0 软件设计出针对以上基因的特异性检测引物,引物由武汉奥科鼎盛生物科技有限公司合成。引物相关信息见表 1。

1.3.3　提取 RNA 与反转录合成 cDNA　使用Trizol 法提取 RNA,按照普通提 RNA 的步骤进行操作,提取 RNA 时注意防止污染。提取的 RNA 可以直接用于反转录或者 –40 ℃低温保存。反转录时按照购买的 Vazyme 反转录试剂盒的使用说明书步骤进行反转录操作,使用体积为 20 μL 的反应体系。最

终得到 cDNA 产物,产物可以直接用于 PCR 反应也可以 -40 ℃低温保存。

1.3.4　PCR 扩增　把已经反转录好的 cDNA 进行 PCR 扩增,分三组进行目的片段的扩增,分别为 PEDV、TGEV、PDCoV 目的片段扩增。这三组 RT - PCR 反应体系总体积都为 25 μL,各组按照严格用量加入特定的酶、水和上下游引物,同时每组设两个对照,阴性对照都为 2 μL 灭菌水,阳性对照分别为已知的 PEDV 的 M 基因、TGEV 的 N 基因、PDCoV 的 S 基因各 cDNA 2 μL,充分保证了试验结果准确性。程序设定见表 2。然后结果使用凝胶电泳检测,在凝胶成像系统处理下观察并判定结果。

表 1　RT - PCR 扩增引物信息

Tab 1　The information of primers used for RT - PCR amplification

引物名称 Primer name	序列(5' -3') Sequence (5' -3')	扩增长度/bp AmpliconLength (bp)	退火温度/℃ TM
PEDV - M - 298 - F	TGGTGGTCTTTCAATCCTG	298	58
PEDV - M - 298 - R	CTGAGTAGTCGCCGTGTTT	298	
TGEV - N - 324 - F	CGCTATCGCATGGTGAAG	324	58
TGEV - N - 324 - R	GGATTGTTGCCTGCCTCT	324	
PDCoV - RTS - F	CAACCGTCTTGAGGAAGTAGAG	609	56
PDCoV - RTS - R	TCAACGGTGAGGTTGAGAATAG	609	

表 2　PCR 扩增程序

Tab 2　PCR Amplification Program Setting

反应过程 The reaction process	反应温度/℃ The reaction temperature (℃)	反应时间/sec The reaction time (sec)	
预变性	95	300	
变性	95	30	40 个循环
退火温度	55	30	
延伸 1	72	30	
延伸 2	72	300	
终止	4	600	

2　结果与分析

2.1　发病情况　河南南阳市某猪场母猪发病 50 头、仔猪发病 150 头,母猪发病无死亡现象,仔猪发病死亡 135 头,并且发病相对集中。经与猪场场主交谈,得知该猪场已经注射猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、猪轮状病毒三联疫苗。

2.2　临床观察结果　临床上出现母猪腹泻、精神沉郁、营养不良,猪舍内部脏乱、粪便横流,仔猪严重腹泻、呕吐、体温升高、发育不良、食欲下降、毛发凌乱且沾满粪便和呕吐液、消瘦、站立不稳、病死率高、发病较为集中。临床观察如图 1。

A:严重腹泻导致肛门红肿　B:仔猪腹泻

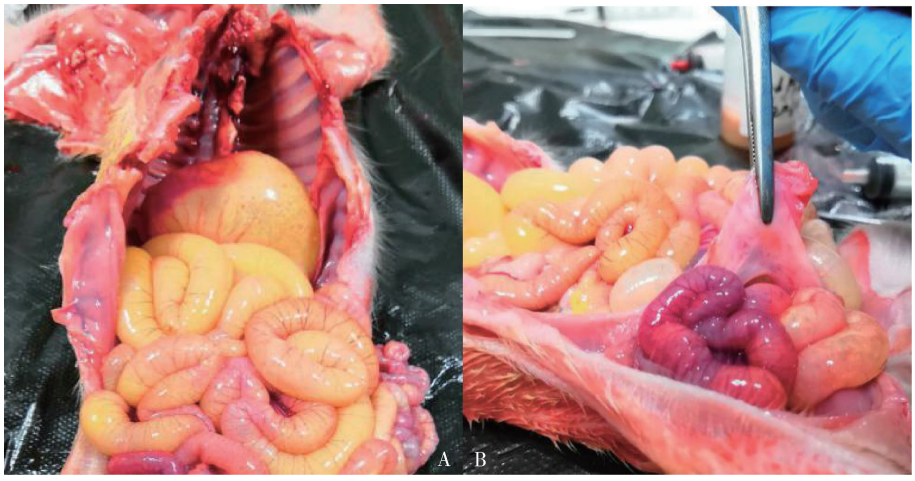
A:Anal redness caused by severe diarrhea in piglets B:Piglet diarrhea

图 1　仔猪临床症状

Fig 1　Clinical symptoms of piglets

2.3　剖检结果　对仔猪进行剖检观察,发现胃内充满大量气体,导致胃胀气,且胃内有黄色粘稠物,肠道普遍出现胀气,肠道内出现黄色液体,空肠胀气尤为严重,肠壁变薄变透明,缺乏弹性,肠壁和肠系膜有出血情况(图 2)。

2.4　组织病理观察结果　取剖检仔猪空肠、盲肠、回肠、结肠、十二指肠组织做病理切片,在显微镜下观察结果并与正常肠道切片镜检图对照(对照组来自河南省动物性食品重点实验室),发现各肠道出现不同程度病变,空肠出现明显病变,表现为肠绒毛萎缩、脱落。回肠肠道细胞碱性粒子增多。切片观察及对照如图 3。

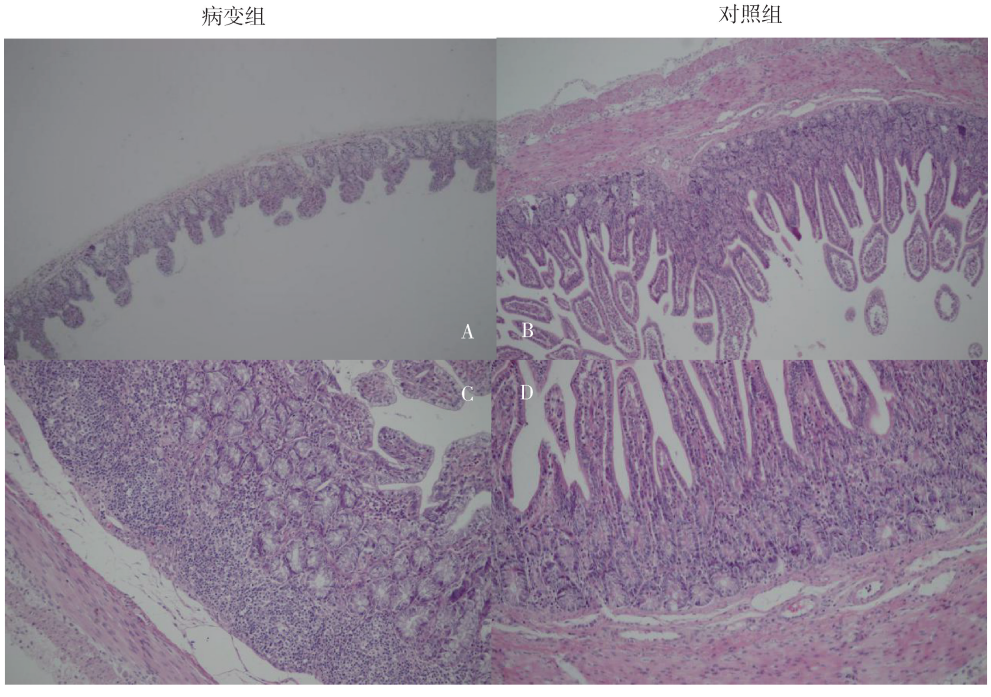


A:肠内充满黄色液体 B:肠道出血

A:The intestines are filled with yellow liquid B:Intestinal bleeding

图 2　剖检病变

Fig 2　Anatomical examination of pathological changes



A:空肠出现肠绒毛萎缩(100 ×)B:健康仔猪空肠对照(100 ×)C:回肠细胞碱性染色颗粒增多(200 ×)D:健康仔猪回肠对照(200 ×)

A:Intestinal villi atrophy in the Jejunum(100 ×)B:Negtive control of A(100 ×)

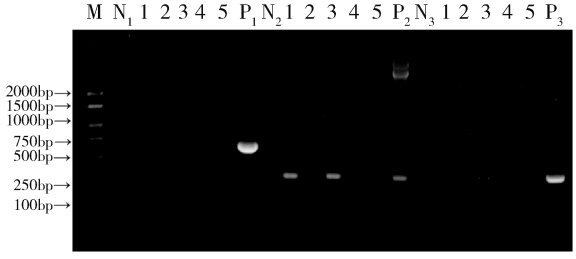
C:Increase of alkaline particles in colon(200 ×)D:Negtive control of C(200 ×)

图 3　肠道病理变化

Fig 3　Intestinal pathological changes

2.5　RT - PCR 鉴定结果　采集猪的粪便、唾液、空肠、脾脏、心脏样品,运用 RT - PCR 方法同时进行 PEDV、PDCoV、TGEV 三种病原检测,结果显示仅有脾脏和空肠 PEDV 检出阳性,而其他组织既没

检出 PEDV,也没有检出 PDCoV 和 TGEV。结果如图 4 所示。



M:DL2000 DNA marker;N1:PDCoV 阴性对照;
1:空肠组织;2:唾液;3:脾脏;4:粪液;5:心脏;
P1:PDCoV 阳性对照;N2:PEDV 阴性对照;
P2:PEDV 阳性对照;N3:TGEV 阴性对照;P3:TGEV 阳性对照
M:DL2000 DNA marker;N1:PDCoVnegative control;
1: Jejunum tissue;2: saliva;3: spleen;
4:fecal liquid;5: heart;P1:PDCoVpositive control;
N2:PEDVnegative control;P2:PEDVpositive control;
N3:TGEVnegative control;P3:TGEVpositive control

图 4　猪 RT－PCR 检测结果

Fig 4　Pig RT－PCR sample test results

3　讨论与结论

有研究显示,自 2010 年以来,全球范围内爆发的大面积仔猪腹泻给养猪行业带来了巨大的经济损失,给养猪行业带来重创[14－16],然而其发病机制至今尚未完全了解。许多研究表明,目前引起仔猪腹泻的病毒主要是 PEDV、TGEV、PDCoV、PoRV 这四种[17－19],而且猪流行性腹泻是引起大多数猪腹泻的主要疾病。赵胜杰等研究表明,PEDV 在河南省内具有一定的流行性。

经过前期的流行病学调查,得知该猪场已经注射过 PEDV 的疫苗,但是,经过综合诊断,本次发病仍是由于 PEDV 感染造成的,这可能是 PEDV 已经发生了变异导致之前注射的传统 CV777 疫苗不能产生保护作用,推测本场本次感染 PEDV 毒株与经典疫苗毒株有差异,提示我们要针对新变异的毒株研制出新的疫苗。但是在当下,建议猪场制定综合治疗和特异性治疗措施,标本兼治,及时控制疾病,减少经济损失。

目前,感染 PEDV、TGEV、PDCoV 的猪在临床上所表现症状极为相似,都表现为呕吐、腹泻、食欲不振、精神萎靡等症状,临床症状很难将其区分开来。而且这几种病对肠道的感染造成的病变也极为相似,在组织病理学方面也很难将其区分。故只能采取的是其他更有效的诊断方法进行诊断,比如血清学方法、PCR 等特异性实验室诊断方法。本次采用的是 RT－PCR 技术进行检测。该技术是比较快捷和方便的,也有相当高的准确性。通过 RT－PCR 技术方法我们最终确定本次猪场腹泻病是由于感染 PEDV 造成。

通过本次试验研究,建议 PED 预防免疫的主要工作是加大 PEDV 疫苗的研发力度,研制出新型的疫苗用来防控 PEDV 变异毒株的感染。

参考文献:

[1]　斯特劳. 猪病学:第 9 版[M]. 北京:中国农业大学出版社,2008:399－403.
Barbara E. Straw. Diseases of Swine 9th Editon[M]. Beijing: China Agriculture University Press. 2008:399－403.

[2]　Bi J, Zeng S, Xiao S, *et al*. Complete Genome Sequence of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strain AJ1102 Isolated from a Suckling Piglet with Acute Diarrhea in China[J]. Journal of Virology, 2012, 86(19):10910－10911.

[3]　Sun R Q, Cai R J, Chen Y Q, *et al*. Outbreak of Porcine Epidemic Diarrhea in Suckling Piglets, China[J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18(1):161－163.

[4]　Ma Y, Zhang Y, Liang X, *et al*. Origin, evolution, and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States. [J]. Mbio, 2014, 6(2):e00064.

[5]　朱海侠. 猪流行性腹泻病毒 JS2017 株的分离鉴定及基因序列分析[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(2):582－589.
Haixia Zhu. Isolation and Identification of Porcine Diarrhea Virus Strain JS2017 and Its gene Sequence Analysis[J]. China Animal Husbandry &Vetetinary Medicine,2019, 46(2):582－589.

[6]　Zhang H, Xia M, Ju D, *et al*. Isolation, molecular characterization and an artificial infection model for a variant porcine epidemic diarrhea virus strain from Jiangsu Province, China[J]. Archives of Virology, 2017, 162(1):1－8.

[7]　孙宏伟, 王泽岩, 任少敏,等. 猪主要腹泻病的发病机制综述[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(3):63－66.
Hongwei Sun,Zeyan Wang,Shaomin Ren,*et al*. Summary on the

Pathogenesis of Porcine Primary Diarrhea Diseases[J]. China Animal Health Inspection,2016, 33(3):63 – 66.

[8] 王楷宬, 王玉梅, 李知新,等. 宁夏某猪场猪流行性腹泻紧急流行病学调查[J]. 中国动物检疫, 2018,35(4):17 – 20.
Kaicheng Wang,Yumei Wang,Zhixin Li,*et al*. Emergency Epidemiological Investigation on Porcine Epidemic Diarrhea in a Swine Farm of Ningxia[J]. China Animal Health Inspection, 2018,35(4):17 – 20.

[9] Zhang Qiaoling, Liu Xinsheng, Fang Yuzhen, *et al*. Detectionand phylogenetic analyses of spike genes in porcine epidemicdiarrhea virus strains circulating in China in 2016 – 2017 [J]. Virology Journal, 2017, 14: 194 – 199.

[10] 牟 迪,夏 伟. 2015 – 2017 年猪流行性腹泻病毒病原检测数据统计分析与预防对策[J]. 养猪,2017,(6):89 – 92.
Di Mou,Wei Xia. Statistical analysis and preventive measures of pathogenic detection data of porcine epidemic diarrhea virus in 2015 – 2017[J]. Swine Production,2017,(6):89 – 92.

[11] 张 志,董雅琴,刘 爽,等. 我国部分省份猪流行性腹泻的流行病学监测[J]. 中国动物检疫,2014,31(10):47 – 51.
Zhi Zhang,Yaqin Dong,Shuang Liu,*et al*. Survey and surveillance of porcine epidemic diarrhea in some provinces in China[J]. China Animal Health Inspection,2014,31(10):47 – 51.

[12] 刘云波,赵洪翠,王志成,等. 猪病毒性腹泻分子流行病学调查[J]. 中国畜牧兽医,2013,40(2):204 – 207.
Yunbo Liu, Hongcui Zhao, Zhicheng Wang, *et al*. Serological Investigation on Infection against Canine Influenza Virus[J]. China Animal Husbandry &Vetetinary Medicine,2013,40(2):204 – 207.

[13] 韩庆彦,兰 喜,周 峰,等. 2011 – 2012 年猪腹泻疫情中 6 种病毒在乳猪肠道的感染检测[J]. 国外畜牧学(猪与禽),2012,2(9):62 – 63.
Qingyan Han,Xi Lan,Feng Zhou,*et al*. Detection of six kinds of viruses in piglet's intestinal tract in diarrhea epidemic in 2011 – 2012[J]. Animal Science Abroad(Pigs and Poultry),2012,2(9):62 – 63.

[14] 施 标, 董世娟, 朱于敏,等. 中国猪流行性腹泻病毒分子流行病学研究进展[J]. 中国农业科学, 2013, 46(20):4362 – 4369.
Biao Shi,Shijuan Dong,Yumin Zhu,*et al*. Advances in Study of Molecular Epidemiology of PorcineEpidemic Diarrhea Virus in China[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013,46(20):4362 – 4369.

[15] Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines [J]. Virus Genes, 2012, 44(2):167 – 175.

[16] Sun R Q, Cai R J, Chen Y Q, *et al*. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China[J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18(1):161 – 163.

[17] 许梦怡. 猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒多重荧光 RT – PCR 检测方法的建立[D]. 扬州:扬州大学,2016.
Mengyi Xu. Establishment of triplex fluorescence quantitative RT – PCR for identification of TGEV, PEDV and PRoVA[D]. Yangzhou:Yangzhou University,2016.

[18] 吴 洋,杜彩虹,张 博,等. 猪腹泻相关病毒多重 RT – PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报,2014,36(5):376 – 378.
Yang Wu,Caihong Du,Bo Zhang, *et al*. Establishment of a multiplex RT – PCR for porcine diarrhea virus detections[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine,2014,36(5):376 – 378.

[19] 吴 白, 苏玮玮, 鞠德财, 等. 猪流行性腹泻病毒 SD201604 株的分离鉴定及致病性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(11):259 – 266.
Bai Wu,Weiwei Su,Decai Ju, *et al*. Isolation. Identification and Pathogenicity Evaluation of Porcine Epidemic Diarrhea Virus SD201604 Strain [J]. China Animal Husbandry &Vetetinary Medicine, 2018, 45(11):259 – 266.

(编 辑:侯向辉)