

第 22 章 猪流行性腹泻

Maurice B. Pensaert 和 Sang-Geon Yeo 著

1971 年，在英格兰地区的架子猪和育肥猪群中暴发了以前未发生过的急性腹泻 (Oldham, 1972)。该病的临床表现除了乳猪不发病外，其它都与猪传染性胃肠炎病毒感染(TGEV)相似。排除该病由 TGEV 和其它已知致肠病病原体所引起。该病蔓延至其他欧洲国家，被称为“流行性病毒腹泻(EVD)”。

1976 年，在各年龄段的猪群(包括乳猪)中暴发了类似 TGE 的急性腹泻 (Wood, 1977)，但同样排除了是 TGEV 和其它已知的致肠病病原体所引起的。此病被称为“2 型 EVD”，以区别于 1971 年暴发的 1 型腹泻，**两者的区别是 2 型暴发时可侵害哺乳仔猪。**

1978 年，发现一种类冠状病毒与 2 型腹泻暴发有关(Chasey 和 Cartwright, 1978; Pensaert 和 DeBouck, 1978)并以一种命名为 CV777 的分离物进行实验接种，发现对乳猪和育肥猪(DeBouck 和 Pensaert, 1980)均有致病性。由于发现 1 型和 2 型腹泻的暴发均是由此冠状病毒引起的，故统称为“猪流行性腹泻(PED)” (Pensaert 等, 1982) 并沿用至今。目前关于 1 型和 2 型腹泻暴发的临床差异仍然未知。

病原学

根据遗传和抗原特征，PED 病毒(PEDV)与 TGEV，猫冠状病毒，犬胃肠炎病毒和人冠状病毒 229E 同属冠状病毒科冠状病毒属的 1 组 (Gonzales 等, 2003; Utiger 等, 1995a)。免疫印迹和免疫沉淀试验显示 PEDV 与猫冠状病毒具有相同的抗原决定簇，这些决定簇位于 N 蛋白上(Yaling 等, 1988)。CV777 整个基因组已完成测序，包含 28,033 个核苷酸。基于复制酶的氨基酸序列，认为 PEDV 与人冠状病毒 229E 和 TGEV 关系最近 (Kocherhans 等, 2001)。N 蛋白基因序列测定证实 PEDV 在人冠状病毒 229E 和 TGEV 之间 (Bridgen 等, 1993)。

PEDV 结构蛋白与其它冠状病毒形态相似。该病毒有分子量为 180,000-200,000 道尔顿的糖基化纤突蛋白、27,000~32,000 道尔顿的糖基化膜蛋白和 57,000~58,000 道尔顿的未糖基化 RNA 结合核衣壳蛋白 (Duarte 和 Laude, 1994; Egberink 等, 1988; Knuchel 等, 1992; Utiger 等, 1995a, 1995b)。

PEDA 粒子显示了冠状病毒科的特征 (Chasey 和 Cartwright., 1978; Pensaert 和 DeBouck, 1978)。PEDV 在肠上皮细胞的形态特征与其它冠状病毒相同。病毒通过胞浆内膜以出芽方式进行装配(Ducatelle 等, 1981b; Sueyoshi 等, 1995)。在粪样中检测到的该粒子具有多形性, 并趋于球形。平均直径(包括纤突在内)约为 130nm, 范围在 95-190nm。许多粒子有一个电子不透明的中央区域。棒状纤突长 18~23nm, 从核心向四周呈放射状分布。

物理化学特性显示该病毒对乙醚和氯仿敏感, 在蔗糖中的浮密度为 1.18g/ml。适应细胞培养的 PEDV 经 60°C 或以上处理 30min, 失去感染力, 但在 50°C 条件下相对稳定。病毒在 4°C pH5.0~9.0 以及 37°C pH 6.5~7.5 条件下稳定 (Callebaut 和 DeBouck., 1981; Lee 和 Yeo., 2003a)。该病毒没有凝血活性 (Callebaut 和 Debouck1981)。

目前尚无迹象表明存在不同的 PEDV 血清型。韩国分离株的多肽带与标准株 CV777 的分子量相近(Kweon 等,1993)。遗传比较显示韩国株 (Chinju99) 和比利时株(CV777)的 N 开放阅读框的同源性为 96.5%, N 蛋白氨基酸相似性为 96.8% (Lee 和 Yeo., 2003b)。韩国株的整个 S 基因在核苷酸水平上的同源性为 94.5%, 在氨基酸水平上的同源性为 92.8% (Yeo 等, 2003)。同样地, 韩国分离株与两株日本分离株的 N 基因核苷酸序列几乎相同 (Kubota 等, 1999)。

最早, 病毒的繁殖是经口腔接种仔猪完成 (DeBouck 和 Pensaert.,1980)。在实验室条件下, PEDV 难以人工培养增殖。试验了许多种的细胞, 但没有成功。后来发现 Vero 细胞(非洲绿猴肾细胞)有利于 PEDV 的持续增殖。病毒生长依赖于细胞培养液中的胰蛋白酶。细胞病变(CPE)包括空泡化和形成合胞体(最多可达到 100 个核)。在接毒后 15h 病毒滴度达到高峰, 为 $10^{5.5}$, PFU/ml(Hofmann 和 Wyler., 1988, 1989; Lee 和 Yeo., 2003a)。在日本, PEDV 成功的在猪膀胱和肾细胞上繁殖 (Shibata 等, 2000)。作为疫苗株的日本分离株 (P-5V) 是在猪细胞系 KSEK6 和 IB-RS2 上培养的 (Kadoi 等, 2002)。

流行病学

从 1982 年到 1990 年, 在比利时、英国、德国、法国、荷兰、瑞士、保加利亚和中国台湾地区的猪群中检测到 PEDV 的抗体 (DeBouck 等, 1982; Hofmann 和 Wyler., 1987; Möstl., 1990)。在印度东北部, 528 份 2-6 个月的猪血清中的 21.2%

为 PEDV 抗体阳性 (Barman 等, 2003)。在欧洲大多数养猪国家以及中国 (Qinghua 等, 1992)、韩国 (Kweon 等, 1993) 和日本 (Takahashi 等, 1983) 都分离到该病毒。至今在北美或南美地区还未见 PEDV 的报导。

在欧洲, PED 的暴发日渐减少, 很少见关于血清学监测或诊断研究报导。

在比利时, 一份研究表明 1991 年 9 月进场的 10 组不同来源的架子猪未出现血清阳性, 相反 1992 年 2 月进场的另外 7 组架子猪却于进场 4 周后发生腹泻, 并且血清转为 PEDV 阳性 (VanReeth 和 Pensaert., 1994)。同样在比利时, 同样在比利时, 对于架子猪农场的血清学研究显示在 1990 年 50% 为阳性, 而在 1997 年没有阳性, 表明病毒流行在近几年显著减少 (Pensaert 和 Van Reeth., 1998)。

在西班牙, 15 个猪场中 7 个猪场发生的急性水泻由 PED 引起, 其中一个猪场的少部分母猪持续腹泻 (Carvajal., 1995a)。在 1992~1993 年西班牙进行了血清学监测, 发现 5052 头母猪中有 1513 头存在 PEDV 特异性抗体, 803 个母猪场存在 55.0% 的阳性猪。 (Carvajal, 1995c)。

在荷兰, 对暴发于母猪和育肥猪的急性 PED 进行了临床和病毒学研究 (Pijpers 等, 1993), 育肥猪和怀孕母猪腹泻最为严重, 哺乳仔猪和断奶仔猪却很轻微或根本不出现腹泻。在首次发病后至少 1.5 年内在 6~10 周龄猪只中和新引进的后备母猪中疾病呈地方性流行持续流行。

在英国, 1998 年超过两个月的时间内 3 个连续批次的 8-15 周龄的育肥猪群暴发临床 PED (Pritchard 等, 1999)。在匈牙利, 1995 年检测了 19 个农场断奶仔猪的 92 份腹泻样品, 其中 5.5% 呈 PEDV 阳性, 并且认为 PED 是造成断奶后腹泻的重要原因 (Nagy 等, 1996)。在捷克共和国, 来自 21 日龄以下腹泻猪的 219 份粪样品中 27 份为 PEDV 阳性, 经常伴随着其它肠内病毒 (Rodák 等, 2004)。

与欧洲的当前形势不同, 亚洲报导暴发严重的高死亡率腹泻。这些暴发是急性的, 是如此的严重以至于在临床上很难与典型的急性 TGEV 暴发区别。

在日本, 1993 年 9 月到 1994 年 6 月的暴发造成 14,000 头猪死亡, 哺乳仔猪的死亡率为 30-100%。在流行期间, 成年猪只表现为短暂的食欲不振和母猪奶量的减少 (Sueyoshi 等, 1995)。1996 年冬, 日本的 108 个哺乳仔猪和育肥猪场出现 PED 流行病。腹泻造成 56,256 头仔猪中死亡 39,509 头。

在韩国, PED 导致所有日龄猪腹泻。1992 年 1 月到 1993 年 12 月, 兽医研究所诊断的 71 个病毒性肠炎病例中, 56.3% 确诊为 PED。10 日龄以内的仔猪在

90%的暴发中受到牵连 (Hwang 等, 1994)。1997 年 8 月和 1999 年 7 月期间, 5 个省的 1,258 个肠炎病例中 50.4%诊断为 PED (Chae 等, 2000)。韩国 1994 屠宰场血清学调查, 7 个省的 469 份猪血清的血清阳性率为 17.6-79% (平均 45%), 说明病毒在一些区域呈地方性流行 (Kweon 等, 1994)。

有迹象表明亚洲的 PED 情况在局部免疫母猪群中表现一种地方病。

粪-口是 PEDV 主要的但并不是惟一的传播途径。易感猪场常于销售或购进猪只后 4~5 天内暴发急性 PED, 病毒的进入可能是通过感染的病猪或污染物(运输车、靴子等)。PEDV 的传播方式 TGEV 差别不大, 但是在一个农场急性暴发后更容易持续存在。种猪场该病暴发后, 可能自然消失, 也可能呈地方性流行。分娩和断奶仔猪数量大的猪场, PEDV 通过感染断奶时丧失初乳免疫的仔猪而存活, 因而呈现地方流行性, PEDV 可能是导致这种种猪场持续发生断奶性腹泻的一个原因。

临床症状

PED 最主要的明显症状是水样腹泻。易感种猪群暴发本病时其发病率和病死率差异很大, 在有的种猪场, 所有日龄的猪只均可感染发病, 发病率高达 100%。该病与 TGE 极为相似, 只是传播速度较慢和哺乳仔猪病死率稍低而已。1 周龄以内仔猪常常持续腹泻 3~4 天后因脱水而死, 病死率平均为 50%, 但有时高达 100%。日龄较大的仔猪约 1 周后可康复。暴发过急性腹泻的猪场, 在断奶后 2~3 周可能出现持续性腹泻, 新引进的猪只也可能相继发病。近几年来, 欧洲地区很少有新生仔猪急性暴发 PED 并出现高病死率, 但在日本和韩国均有报导(Chae 等, 2000; Sueyoshi 等, 1995)。

多渠道来源的混养的架子猪或育肥期间猪只暴发的急性 PED, 所有的猪只在 1 周内均表现腹泻, 食欲稍减退, 精神沉郁, 粪便水样。在育肥后期, PEDV 感染引起的疾病比 TGEV 引起的更为严重, 但通常大多数在 7~10 天后康复, 病死率仅 1%~3%, 这种急性死亡常见于育肥猪腹泻早期或发生腹泻之前, 剖检病死猪只常可见背部肌肉坏死。对应激敏感的猪只发生该病时死亡率更高。

与 TGEV 相比, PEDV 在封闭的种猪场内以及同一育肥猪群内或不同育肥猪群间的传播较慢。病毒通常需要 4~6 周才能感染不同猪舍的猪群, 甚至有的猪舍的猪群仍未感染。

发病机理

PED 发病机理研究是在经剖腹产、未吮初奶的仔猪中进行的，仔猪于 3 日龄时经口接种 CV777 分离株(DeBouck 等, 1981a)，接毒后 22~36h 仔猪发病。免疫荧光技术和透射电镜观察证明，病毒在整段小肠和结肠的绒毛上皮细胞浆中复制。最早于接毒后 12-18h 可见受感染的上皮细胞，于 24-36h 时达到高峰。病毒在小肠内复制导致细胞变性，绒毛变短，腺窝深度比由正常的 7:1 缩小为 3:1。结肠上皮细胞中未见细胞变性。

PEDV 在仔猪小肠中的致病特点与 TGEV 极为相似。由于 PEDV 在小肠中复制和感染过程较慢，故其潜伏期较长。

哺乳仔猪肠道外细胞中未检测到 PEDV 的复制。Shibata 等 (2000) 报导，2 日龄到 12 周龄接种 PED 野毒的 SPF 猪具有日龄依赖的抗性，只有 2-7 日龄的猪只出现死亡。

关于 PEDV 在较大猪的致病机理尚不十分清楚，但不论在自然感染还是实验感染的普通育肥猪小肠和结肠绒毛上皮细胞中，均可发现荧光 (DeBouck 和 Pensaert., 1980)。关于结肠感染对临床症状的严重程度有多大影响，目前仍知之甚少；对临床上常见的育成猪和成年猪发生猝死并伴有背部肌肉急性坏死，也未能从致病机理的角度上做出解释。

韩国和日本对 PEDV 致病性的描述与欧洲的相同，除了亚洲株没有结肠病毒复制的证据(Hwang 等, 1994; Kim 和 Chae., 2003; Sueyoshi 等, 1995)，以及没有报导过育肥猪的突然死亡。

病理变化

在自然感染和实验感染的仔猪均有肉眼可见病变(Ducatelle 等, 1982a; Hwang 等, 1994; Pospischil 等, 1981; Sueyoshi 等, 1995)。

损伤区域局限在小肠，内充满大量黄色液体并膨胀。通过镜检，病毒接种后 24h 小肠绒毛上的肠细胞开始空泡化并脱落 (这恰与腹泻发生的时间相吻合)，然后绒毛迅速变短，酶活性显著降低，这些发现在扫描电镜观察研究中得到证实 (Ducatelle 等, 1981a)。这些病理变化与 TGEV 描述的极为相似。在结肠，未能观察到组织病理学变化。

超微结构变化主要发生于小肠细胞胞浆中，可见细胞器减少，出现电子半透

明区，接着微绒毛和末端网状结构消失，部分胞浆突入肠腔，肠细胞变平、紧密连接消失，脱落进入肠腔内，可见肠细胞内的病毒是通过内质网膜以出芽方式形成的(Ducatelle 等, 1982b; Horvath 和 Moscardi., 1981; Pospischil 等, 1981)。在结肠，含病毒的肠细胞出现一些细胞病变，但未见细胞脱落。

诊 断

关于 PED，仅凭临床症状难以做出诊断，涉及所有日龄猪(包括哺乳仔猪)的急性 PED 在临诊上不能与 PGE 相区分。在欧洲，种猪场的断奶猪和较大猪会暴发水样腹泻，且传播迅速，但哺乳仔猪不出现临床症状。

实验室内通过直接显示 PEDV 或其抗原或抗体的检测可以做出病原学诊断。直接 IF 和免疫组化技术已用于哺乳仔猪小肠切片的检测，是目前最为敏感、快速、可靠的方法，但仅适用于急性腹泻期内，尤其是发病后 2 天内捕杀的患病仔猪小肠切片的检查。由于自然感染死亡的仔猪绒毛严重萎缩，因而对其检测的结果不可靠(Bernasconi 等, 1995; DeBouck 等, 1981a; Guscetti 等, 1988; Sueyoshi 等, 1995;)。

对腹泻仔猪粪样进行直接电镜观察可见 PEDV 粒子，但若病毒的纤突丧失或不清晰，直接电镜检查较为困难。在人工感染的仔猪中，于腹泻发生后 1 天收集的粪样中 PEDV 的阳性检出率最高，为 73%。此外，由于 PEDV 和 TGEV 的形态相同，已建立了免疫电镜法用于区分这两种病毒。

从粪中用细胞培养分离野毒株需要在细胞病理出现在 Vero 细胞或其它细胞系之前更替继代接种，但可用 IF 做早期诊断。(Hofmann 和 Wyler., 1988; Shibata 等, 2000)。

目前已建立了许多 ELISA 方法用于检测粪中的 PEDV 抗原和血样中的特异性抗体，这些方法既敏感、又可靠，特别是检测大量样本。在检测抗原的 ELISA 方法中，有应用猪产生的多克隆抗体和单克隆抗体(Callebaut 等, 1982; Carvajal 等, 1995a; VanNieuwstadt 和 Zetstra., 1991)。在检测抗体的 ELISA 方法中，所用的抗原为半纯化的病毒抗原—猪或细胞培养(Callebaut 等, 1982; Carvajal 等, 1995b; Kweon 等, 1994)，或自然感染的 Vero 细胞中抽提的病毒 S 蛋白和 N 蛋白(Knuchel 等, 1992)，这种抗体试验也适于母猪奶中免疫球蛋白的检测(de Arriba 等, 1995)。

在实验感染猪粪拭子中于感染后 3~11 天内均可检出 PEDV 抗原, 其中接种后 4~5 天为排毒高峰 (Carvajal 等, 1995a)。收集粪样时, 应选择腹泻期, 并应从多头病猪收集。ELISA 抗原检测方法高度敏感, 如果收集的粪样合适、充分, 可以检出种猪场中流行断奶腹泻的病毒。

其它粪中 PEDV 检测诊断方法包括反转录聚合酶链式扩增反应 (RT-PCR) (Ishikawa 等, 1997; Kubota 等, 1999)、原位杂交 (Kim 和 Chae., 2000)。建立的 RT-PCR 用于病猪小肠和粪便样品 TGEV 和 PEDV 的差异检测 (Kim 等, 2001)。

使用 ELISA、阻断 ELISA、间接 IF、阻断 IF 和 Vero 细胞培养的血清中和试验可以检测自然或者人工感染猪血清中的特异性抗体 (Callebaut 等, 1982; Hofmann 和 Wyler., 1989, 1990; Prager 和 Witte., 1981; Shibata 等, 2000; Witte 和 Prager., 1987)。对 PEDV 阳性猪小肠冷冻切片或细胞培养物进行间接 IF 和阻断 IF 试验可指示 PEDV 抗体。在接种 7 天后, 用阻断 ELISA 可检测到抗体 (Carvajal 等, 1995b)。所有检测抗体的方法, 都应检查双份血清样本。康复期血清样品的采集不早于腹泻开始后 2 周。

防 治

感染 PED 的哺乳仔猪应让其自由饮水, 以减少脱水的发生, 对于育肥猪建议停止喂料。由于 PEDV 传播相对较慢, 可采取一些预防措施暂时防止病毒进入分娩舍而侵害新生仔猪, 这种方法有利于推迟仔猪的感染而减少死亡损失。当前, 妊娠母猪暴露在病毒污染的粪便或者肠内容物下, 可激发母猪乳汁中迅速产生免疫力, 因而可缩短本病的流行时间。

若连续数窝的断奶仔猪中均存在病毒, 则可将仔猪断奶后立即移至别处至少饲养 4 周。同时暂停从外引进新猪。

新生猪口服鸡蛋黄或者含有 PEDV 免疫球蛋白的牛初乳具有预防作用, 可预防疾病或者降低死亡率 (Kweon 等, 2000; Shibata 等, 2001)

在欧洲, 没有足够的经济意义去研发该病一种疫苗。然而, 该病在亚洲暴发如此严重, 所以正在研制弱毒疫苗。

Bernasconi 等 (1995) 报导适应细胞的 CV777 病毒株, 其基因序列明显改变。此外, 这种适应细胞培养的病毒对剖腹产新生仔猪毒力很低, 并且组织病理变化

显著减少。韩国 KPEDV-9 毒株在 Vero 细胞上传 93 代后对新生仔猪的致病率降低，对妊娠母猪安全，因而建议用该细胞适应毒株作为疫苗（Kweon 等, 1999），尽管其实际效率还需要测定。在日本，从 1997 年开始使用一种经济的、减毒的、适应细胞培养的 PEDV（P-5V）活疫苗对母猪进行预防。该疫苗被认为是有效的，但不是在所有母猪中都可产生可靠的乳汁免疫力（Usami 等, 1998）。

（沈张奇 译 沈建忠 校）