



# 肉鸡新城疫病毒的实验室分离与血清学鉴定

孙高贵, 王生雷, 李 萍

(山东省青岛市城阳区农业局城阳动物防疫监督站, 青岛 266011)

**摘要:**新城疫病毒的实验室分离与血清鉴定是临床诊断新城疫的重要依据,是检测新城疫发生、发展的主要手段。新城疫病毒的传统分离方式是鸡胚分离法,将疑似新城疫的病鸡组织,如脑、肝、肾等组织。按既定的方法研磨后,经-20℃低温冻融3次,经高速离心,菌检无菌接种 SPF 鸡胚,同时按鸡胚死亡时间,断定强弱毒。同时结合新城疫阳性血清,用血凝素,可与细胞的表面受体结合,使红细胞凝集,而这种凝聚红细胞的特性又被特定的免疫血清所抑制。在禽病的临床诊断过程中,由于不同的疾病所引起的病症十分相同,单靠表面现象诊断疾病具有很大的局限性,所以实验室诊断具有很大的说服力和客观性,为养禽业的健康发展起了一定的作用。

**关键词:**新城疫病毒; 实验室分离; 血清学鉴定; SPF 鸡胚; 血凝试验(HA)血凝抑制试验(HI)

随着人们生活质量的改善,养鸡业的集约化程度越来越高,许多疾病也随之而来,疾病控制就显得十分重要,控制疾病的发生与发展,实验室诊断就显得越来越重要。新城疫病毒也称亚洲鸡瘟,伪鸡瘟或非典型鸡瘟,是由新城疫病毒引起的一种急性热性,高度接触性传染病。在 OIE 标准中被列为 A 类传染病,此病 1926 年首次在印度尼西亚爪哇发现,同年在英国新城发现该病,一次而得名。现在几乎世界上绝大部分国家都有本病流行的报告,是危害鸡和火鸡饲养业最严重的疾病之一。本论文主要从实验室诊断的角度出发,主要研究新城疫病毒的鸡胚接种技术,以及血清鉴定技术。

## 1 病毒分离材料来源与分离前的准备

**1.1 发病情况** 3月初,某肉鸡养殖集团养殖户所饲养的3周龄肉鸡,出现采食量减少,饮水增加,排泄绿色稀粪,次夜零星死亡,第2d取死体和ator不佳活体来我实验室做检验。

**1.2 剖检变化** 空肠和回肠之间有枣核样出血斑,盲肠扁桃体有出血斑,直肠有针尖大小的出血点,肠内容物稀薄,分散发臭,其它解剖部位未见异常。

## 1.3 分离材料的分类与研磨

**1.3.1** 把脑、肝、肺病空回肠,每只解剖肉鸡无菌采集一部分,脑全部采集于无菌的培养器中。

**1.3.2** 把采集的组织材料与含双抗的生理盐水按1:3的比例混合放入组织匀浆机中高速2~3min,观察组织成糊状后,按照编号分装于100mL灭菌的生理盐水瓶中,放入-20℃的冰箱中反复冻3次。

## 1.4 分离材料的高速离心与细菌检查

**1.4.1** 分离材料冻3次后,在超净工作台内按相应的编号无菌取组织液个1mL放入无菌试管内,编上相应的编号,在离心机上8000~9000r/min离心20min。离心后在超净工作台内无菌取样检查其污染情况,24h后观察。

## 1.4.2 结果观察与污染样品的处理

合格的被检样品应为在指定的培养基上无细菌生长。若

发现污染样品可用20mm的微孔滤膜过滤后再菌检,合格后方可接种,

## 2 鸡胚的选择、接种及观察

**2.1 鸡胚的选择** 选择10日龄的健康SPF鸡胚,每组3~5枚。

**2.2 鸡胚的接种** 首先在超净工作台内,把鸡胚先用碘酊消毒,再用75%酒精消毒,待酒精干后,用灭菌针打孔。同时把所接种的样品编号在每一个鸡胚上,每个鸡胚尿囊腔接种量为0.2mL。鸡胚封蜡,接种好的鸡胚用融化的蜡封好,放入37.8℃孵化室中继续孵化。

## 2.3 接种后的鸡胚观察

**2.3.1** 接种后8h照胚,接种后若在8h内出现个别死亡,可丢弃。

## 2.3.2 接种后每组鸡胚的变化对照:

组号	SPF 鸡胚接种个数	鸡胚死亡时间	鸡死亡时间	剩余个数
①脑	5枚	42h0枚	45h0枚	5
②肝	5枚	40h2枚	43h3枚	0
③肺	5枚	41h3枚	45h时2枚	0
④肠	5枚	42h4枚	43h1枚	0
对照				5

## 3 尿囊液的收集及新城疫血凝试验及血凝抑制试验

**3.1 尿囊液的收集** 无菌收取鸡胚尿囊液,按组编号,每组不少于6个包装瓶,同时每组作细菌学检查。合格后作(HA)和(HI)试验。

## 3.2 血凝试验

编号	检测结果	判定
①脑	8 (log 2)	合格
②肝	12 (log 2)	抑制血凝
③肺	13 (log 2)	抑制血凝
④肠	12 (log 2)	抑制血凝



# 绵羊链球菌的分离鉴定

杨 师<sup>1</sup>, 邓 英<sup>2</sup>

(1. 辽宁省新民市法哈牛动物防疫监督所, 新民 110325;

2. 辽宁省新民市动物疫病预防控制中心, 新民 110300)

**摘 要:**2008年2月新民市某镇几个养羊户的绵羊相继发生了以高热、败血症和咽喉肿胀为主要特征的传染病。送检5份病料到实验室检验,经细菌学检验、动物实验、生化和血清学鉴定,结果分离到3株链球菌,C群1株,D群2株。并进行了药敏试验,结果表明分离到的绵羊链球菌对氟苯尼考、头孢噻肟敏感。

**关键词:**链球菌;血清群鉴定;药敏试验;羊

羊链球菌病主要是危害绵羊的严重疫病,它是由溶血性链球菌引起的一种急性、热性、败血症传染病。其临床特征是下颌淋巴结与咽喉肿胀、肺炎、关节炎等。多发生于冬春季,该病主要通过消化道和呼吸道传播。该病在我国西北地区存在已久,20世纪50年代初在青海流行,50年代后期传至四川,随后在新疆、甘肃、内蒙古、河北、辽宁等地流行。近年来,随着我省养羊业的快速发展和集约化程度的提高,绵羊链球菌病呈明显上升的趋势,其主要症状以败血症、肺炎为主,少数为脑炎和关节炎,且常和其他病原菌混合感染,一旦在羊群发生,造成很大的经济损失。由于链球菌存在广泛的耐药性,而且血清型多,抗原极为复杂,给防治带来了困难。我们在检疫过程中发现疑似病例,对所采集的病料进行了血清群鉴定和药敏试验。

## 1 材料与与方法

**1.1 病料** 2008年2月新民市法哈牛镇几个养羊户的绵羊相继发生了以高热、败血和咽喉肿胀为主要特征的传染病。分别采取肝、脾、淋巴结、血液等到新民市动物疫病预防控制中心实验室检验。

**1.2 培养基** 葡萄糖等微量糖发酵管,由杭州天和微生物试剂有限公司生产。5%绵羊鲜血平板、血清肉汤培养基、明胶、6.5%NaCl肉汤、pH9.6肉汤、0.1%美蓝牛乳、马尿酸钠等生化培养基按参考文献配置。

**1.3 参考菌株** C55938株,为C兽疫群链球菌,购自中国兽医药品监察所。

**1.4 器材与试剂** 链球菌乳胶标准诊断试剂盒,兰氏分群A—G乳胶诊断试剂(OXIOD公司产品)。其他生化试剂均为市售产品。

**1.5 实验动物** 小鼠、家兔购自中国医科大学实验动物中心。

**1.6 药敏纸片** 15种药敏纸片购自中国兽医药品监察所。

**1.7 细菌分离** 无菌采取送检病料中的肝、脾、淋巴结、血液接种于鲜血琼脂平板,37℃培养24h,挑取平板上单个菌落作纯培养。将24h鲜血平板、血清肉汤的培养物,分别作革兰氏染色。

**1.8 生化试验** 对上述菌株做常规生化试验和鉴别生化试验。重复全部试验3次,其中有些项目重复5次。列出重复性

取准备好的0.5%鸡红细胞血球,96孔V型板,加样器,微量移液器,稀释液,检测结果如下:

## 3.3 血凝抑制试验

取新城疫病毒的标准阳性血清,新城疫病毒标准抗原,0.5%鸡细胞悬液,96孔V型板,50μL的微量移液器,稀释液(PBS),②③④能被新城疫标准阳性血清抑制其血凝性,可

初步断定为分离到的病毒为新城疫病毒。

## 4 鸡胚平均致死时间(MDT)

鸡新城疫病毒(NDV)的分离工作较为复杂,在有些情况下由于多种因素的制约分离不到病毒,这给以后的工作带来一定的难度,但是分离到病毒最有说服力的。该论主要通过传统方式来分离病毒,在细节上有所改进,结果检测上较为全面,若有机会在PCR检测,电子显微镜的观察,细胞分离病毒有所探索更具有科学性。

(参考文献从略)

编号	鸡胚平均死亡时间	毒力判断
②肝	55h	强毒
③肺	58h	强毒
④肠	57.5h	强毒