

鸡传染性支气管炎的实验室诊断技术

任伯适¹, 张乃军², 韩海山³

(1. 内蒙古科尔沁左翼中旗舍伯吐动物防疫站, 内蒙古 科尔沁左翼中旗 029322; 2. 内蒙古科尔沁左翼中旗珠日河动物防疫站, 内蒙古 科尔沁左翼中旗 029327; 3. 内蒙古科尔沁左翼中旗宝龙山动物防疫站, 内蒙古 科尔沁左翼中旗 029327)

摘要:鸡传染性支气管炎是危害世界养鸡业的主要疫病之一, 临床上无典型的病变特征, 诊断较为困难, 故对该病的实验室诊断技术进行了介绍。从病料采集和处理、病毒分离、病毒鉴定, 包括传统的琼脂扩散试验、中和试验和血凝抑制试验, 到目前发展很快的酶联免疫吸附试验(ELISA)和荧光抗体技术, 其各具特点, 互有利弊。为了更好地控制该病, 有必要根据临床特点对目前各种检测鸡传染性支气管炎的方法及其优缺点进行分析, 为临床寻找一种适合的快速和准确的诊断方法、制定合理的免疫程序以及发展新型的诊断方法提供参考。

关键词:鸡传染性支气管炎; 传染性支气管炎病毒; 实验室诊断

中图分类号: S858.315.3

文献标识码: A

文章顺序编号: 1672-5190(2010)02-0171-02

鸡传染性支气管炎(IB)是由传染性支气管炎病毒(IBV)引起的鸡的一种急性、高度接触性传染病。可引起鸡呼吸道、输卵管、肾脏、肠道及腺胃等多部位病变。近年来, 由于新的IBV变异毒株的不断出现, 从而导致鸡传染性支气管炎病的频繁暴发, 给养鸡业造成严重的经济损失。目前对该病病原的研究已深入到分子生物学领域, 对IBV的遗传变异和分子流行病学研究已取得较高水平的研究成果。如何快速准确地作出诊断, 是防治该病首要解决的问题。

1 病料采集和处理

病毒可从感染传染性支气管炎病鸡的许多组织中分离出来, 较理想的病料样品是气管、肺和肾。从产蛋母鸡和种鸡中分离病毒时, 可自盲肠扁桃体、泄殖腔和生殖器官中分离。自然感染或疫苗接种后, 病毒可在这些器官中持续存在28 d, 但在感染的早期进行病毒分离较易成功。

1.1 气管的处理 将气管样品横向剪成1~2 mm宽的小块, 放进无菌的离心管中, 约加3 mL含有抗生素的缓冲盐水, 振荡3 min, 在室温静置10 min, 取上清液用于病毒分离。

1.2 气管黏液的处理 剪下整个气管, 平放于无菌的平皿表面, 用剪刀纵向剪开气管, 用刮刀刮下气管内的黏液。将黏液放进含有0.5 mL抗生素缓冲盐水中, 振荡30 s, 即可用于病毒分离。

1.3 组织的处理 将肺、肾、输卵管或盲肠扁桃体等组织经玻璃研磨器或乳钵磨成匀浆, 用含有抗生素的缓冲盐水制成10%乳剂。经2 000 g离心10 min, 其上清液可用于病毒分离。

1.4 泄殖腔棉拭子的处理 将泄殖腔棉拭子剪下一块, 放入无菌试管内, 加适量含抗生素的缓冲盐水, 反复摇动, 静置后可取液体用于病毒分离。

2 病毒分离

传染性支气管炎病毒可在鸡胚、气管组织和鸡肾细胞培养中生长, 初次分离最好在鸡胚中进行。

2.1 鸡胚培养 用9~11日龄的SPF鸡胚, 经尿囊腔内接种0.2 mL前述的上清液。每日照蛋1次, 24 h前死亡者废

弃, 2~7 d死亡的鸡胚可能为病毒致死。接种48 h后, 从孵化器取出5个胚, 置4℃恒温箱中, 18~24 h后收获尿囊液(作为盲传代第1代)。尿囊液应无菌并不凝集鸡红细胞, 孵化到第7天, 取出全部鸡胚进行传染性支气管炎病毒的特异性病灶检查。孵化48 h后的鸡胚不能有病灶, 第1代盲传代的鸡胚尿囊液在缓冲盐水中做2倍稀释, 按前述方法再接种鸡胚, 48 h后收获尿囊液, 代表盲传代第2代。

48 h的盲传代最少应连续传3代(少数传染性支气管炎毒株需6~7代才可适用于鸡胚), 最后一次传代后, 在第7天时打开鸡胚进行检查, 与同日龄的鸡胚作比较检查, 如果鸡胚有下述的一部分或全部病灶, 则可认为已分离出传染性支气管炎病毒。

A: 胚蜷缩, 脚压在头部以上。

B: 矮小——胚可能只有正常胚的1/3大小。

C: 羊膜增厚。

D: 羽毛发育不正常或杆状羽毛。

E: 肾脏肿大且有尿酸盐沉着。

蜷缩被认为是最具特征的病灶, 虽然有些传染性支气管炎毒株并不产生该病灶, 只是引起胚矮小。

如果鸡胚在第1代即发现鸡胚有上述病灶, 那么该毒株可能已适应于鸡胚, 表明它可能是一个疫苗株。然而Fabricant发现第1代鸡胚有上述病灶者占46%, 第2代为33%, 第3代为20%, 第4代为1%。所以在第1代即有上述病灶时, 尚不能确实断定它是疫苗毒株, 需要根据病史、临床症状和病理变化来对毒株进行综合判定。

2.2 气管组织培养 鸡气管组织培养也可用于传染性支气管炎病毒的分离, 它的优点是那些不适应鸡胚的传染性支气管炎野毒, 在气管组织培养第1代即可产生纤毛止动效应, 而不需要多次传代。它的缺点有二: 一是制备和维持气管组织培养需要细胞培养和设备; 另外对分离出的野毒尚需进行鉴别和检测, 因为在接种3 d后, 新城疫和传染性支气管炎病毒均可产生纤毛止动效应, 为此需作出二者的鉴别。

2.3 细胞培养 一般不用鸡肾细胞培养作传染性支气管炎病毒的初次分离, 因传染性支气管炎病毒在做细胞培养之前, 需要先适应鸡胚。

3 病毒鉴定

3.1 理化特性 传染性支气管炎病毒有囊膜, 螺旋对称, 单

收稿日期: 2010-02-07

作者简介: 任伯适(1958—), 男, 助理兽医师, 主要从事动物疫病防疫检疫工作。

股 RNA 病毒,病毒子呈多形态性,直径 80~120 nm,囊膜由大的棒状纤突蛋白组成,因此,病毒粒子呈现特性冠状,能在细胞浆中复制,多数毒株在 56℃ 经 15 min 可被灭活。传染性支气管炎病毒可被脂溶剂如乙醚或氯仿灭活。

3.2 生物学特性 某些传染性支气管炎病毒经磷脂酶 C 处理后,可以凝集鸡的红细胞。用传染性支气管炎病毒接种鸡胚,收获尿囊液,再超速离心浓缩 100 倍,每毫升浓缩病毒中加入磷脂酶 C 1~2 U,37℃ 处理 2 h,即制成血凝抗原。可在 96 孔 U 型微量反应板上测定其血凝价,传染性支气管炎病毒特异性的抗血清可抑制同型的血凝抗原。

3.3 传染性支气管炎病毒的鉴别 鸡胚的典型传染性支气管炎病灶分离出的病毒接种鸡胚后,如能产生前述的传染性支气管炎典型病灶,则可认为分离的病毒可能属于传染性支气管炎病毒。

4 血清学诊断

中和试验和血凝抑制试验是目前用于传染性支气管炎病毒血清学分型的方法,荧光抗体技术、琼脂扩散试验和酶联免疫吸附试验可用于鉴定传染性支气管炎病毒,但不能用作传染性支气管炎病毒的血清学分型。

4.1 鸡胚中和试验 用已知的传染性支气管炎特异性抗血清同野外分离的传染性支气管炎病毒做中和试验,可以确定野外分离传染性支气管炎病毒的血清型。中和试验可以在鸡胚、鸡肾细胞或气管组织上进行培养。试验方法有 2 种,一是固定血清稀释病毒的方法,未稀释的已知传染性支气管炎病毒型的抗血清与正常血清,同稀释的野外分离的病毒液混合,37℃ 作用 60 min。每一混合液尿囊接种 0.1 mL 至 8 个 9~10 日龄的鸡胚,37℃ 孵育 7 d,24 h 内死亡者废弃。孵育之后检查鸡胚,如已知抗血清型能中和该野外传染性支气管炎毒株,则该分离传染性支气管炎病毒可以定型。另一种是固定病毒稀释血清的方法,试验方法基本与前者相同,只是固定与稀释样品相互置换。此外,Cowen 和 Hitchner 提出一种既固定病毒又固定血清的方法,对野外分离传染性支气管炎病毒的血清定型很实用。该实验室在鸡胚上进行,用 32~320 EID₅₀ 的传染性支气管炎野毒株与含 10~20 U 已知毒株型的抗血清相作用。血清的抗体效价是用同型传染性支气管炎病毒来滴定,一个抗体单位是指能保护 50% 接种鸡胚的抗血清的最高稀释度。由于常发生 2 个或 2 个以上血清型的传染性支气管炎毒株并发感染。因此,有时需要做交叉中和试验来鉴定野外分离的毒株。分离毒株的抗血清与已知血清型的传染性支气管炎病毒反应,即可以确定野外分离毒株的血清型。

4.2 血凝抑制试验 用磷脂酶 C 处理传染性支气管炎病毒后,即可制备血凝抗原。血凝抑制时,先将 4~8 个血凝单位抗原与倍比稀释已知血清型的血清相混合,室温下经 1 h 后,加入 0.5%~1% 鸡红细胞,30~60 min 后观察结果。若已知型的血清能抑制血凝作用,就可以确定该传染性支气管炎病毒的血清型。由于并非所有传染性支气管炎病毒经磷脂酶 C 处理后都可以产生血凝作用,Faragher 在澳大利亚检查了野外分离的 9 株传染性支气管炎病毒,仅有 2 株传染性支气管炎病毒有该作用,所以该法的应用有一定的局限

性。

传染性支气管炎型特异抗血清的制备:在中和试验与血凝抑制试验中都需要用有型特异的抗血清,该种血清需用 3~8 周龄鸡制备,每只鸡传染性支气管炎病毒的滴鼻量为 10⁵ EID₅₀,2 周后再静脉注射 10⁵ EID₅₀,静脉注射 2 周后,采血并分离血清。在血清型鉴定前要在 56℃ 经 30 min 灭活。制备的血清对同型的传染性支气管炎病毒应有高度的特异性;而对异种血清型的传染性支气管炎病毒没有交叉反应。制备抗血清时增多注射次数(3 次以上)或加佐剂制备都是没有必要的。因那样制备的抗血清易与异种血清型的传染性支气管炎病毒发生交叉反应。

4.3 琼脂扩散试验 琼脂扩散试验对传染性支气管炎早期感染的诊断是很有用的,可用于检测病死鸡体内的抗原。取鸡的气管,刮取气管中黏液,以原液或加等量盐水稀释后即可用作抗原。中间孔放入抗原,周边 4 个孔放入 4 份不同型的传染性支气管炎阳性血清,另外的 2 个孔,分别放入传染性支气管炎阴性血清和盐水。如果 4 份血清中有 2 份同抗原之间出现沉淀线,即可认为该黏液中含有传染性支气管炎病毒,可以诊断为传染性支气管炎。

将传染性支气管炎病毒接种鸡胚,收获尿囊膜与尿囊液经浓缩提纯后,即可作为琼扩抗原,用该抗原可以检测鸡血清中的抗体。中央孔放抗原,周边孔放被检血清,抗原与血清之间出现沉淀线时即为阳性反应。

4.4 酶联免疫吸附试验(ELISA) 酶联免疫吸附试验可用于诊断鸡群的感染或免疫状态。方法是用 96 孔微量反应板和固定病毒稀释血清的方法,采集急性发病期(或免疫前)和恢复期(或免疫后)的血清,先将急性期采集的血清样品保存于-20℃,在采集到恢复期的血清后再进行试验。为了减少试验中的误差,应同时检测不同期采集的血清,若恢复期血清的抗体滴度高于急性期的抗体滴度,则表明鸡群感染了传染性支气管炎。

4.5 荧光抗体技术 用传染性支气管炎病毒接种鸡胚,收获的尿囊液经特殊的荧光染色后,可用它来检测血清中的抗体。或用荧光染色的抗体来检测病料中的抗原,该项技术快速和经济,只是需要一定的设备和有经验的人员。

4.6 交叉保护试验 先用已知传染性支气管炎型的抗血清免疫 19 只 3~6 周龄的 SPF 鸡,4 周后再用未知血清型野外毒株点眼攻毒,同时设对照组。如野外毒株与抗血清型相同,则免疫鸡应受到保护,对照组鸡则表现易感和不受保护。

参考文献:

- [1] 徐雪,孙彦婷,王宏魁,等.免疫鸡群肾型传染性支气管炎病毒的分离和鉴定[J].安徽农业科学,2009(19):8881~8882,8887.
- [2] 王宪文,王岩,刘兴友,等.鸡传染性支气管炎病毒豫北株的分离与鉴定[J].安徽农业科学,2008,36(35):15500~15502.
- [3] 李翠蓉.鸡肾型传染性支气管炎的诊断及防治[J].山东畜牧兽医,2009,30(11):32~33.
- [4] 王红宁.鸡传染性支气管炎诊断方法研究进展[J].兽医导刊,2009(11):31~32.
- [5] 杨帆,孙翔,邓保国,等.禽传染性支气管炎病毒分离株理化特性的研究[J].安徽农业科学,2008,36(23):9976,10018.

规模养殖场的防疫管理措施探讨

叶桂宏

(江苏省靖江市畜牧兽医技术服务中心, 江苏 靖江 214500)

摘要:随着人们生活质量的提高,人们的食品安全意识越来越强,一些相应的市场准入制度逐步建立,而畜产品频繁的流通又加速了动物疫病的传播,促使动物防疫工作的重点必须转向产品量大、商品率高的集约化养殖公司和规模化养殖场,因此研究和完善这一重点环节的动物防疫监管成为当务之急。规模养殖场防疫应当从改进动物养殖环境布局 and 设施设备、提高管理人员科技水平、制定合理科学的免疫计划、严格检疫并把好引种关、规范保健药品使用、建立规范消毒制度、做好疫情监测等方面加强管理。

关键词:规模养殖场;防疫;管理措施

中图分类号:S851.33

文献标识码:A

文章顺序编号:1672-5190(2010)02-0173-01

集约化、规模化养殖是当今全球养殖业发展的趋势。近年来,在国家政策的大力扶持下,规模养殖特别是养殖小区发展迅猛,在畜牧业中所占的比重越来越大。由于规模养殖特别是养殖小区是国家政策扶持,很多地方在监督管理上存在顾虑,怕破坏经济环境,不敢管,管不严,造成规模养殖特别是养殖小区发展中出现一些问题。如选址不合理、环境污染、防疫条件差等问题,影响了畜牧业的健康发展。为此,应加强规模养殖场管理,使畜牧业发展做到科学化规划、区域化布局、标准化生产、产业化经营。笔者特将规模畜禽养殖场防疫中管理措施加以总结,希望能给大家提供帮助。

1 改进畜禽养殖环境布局和设施设备

规模养殖场无论其规模大小,其畜禽养殖的环境布局必须科学合理、符合动物防疫要求。养殖生产区和人的生活区、外宾接待区等应严格分离,闲杂人员一律不允许进入畜禽养殖生产区,特别是畜禽养殖同行人员更不得随意进入。养殖场和圈舍进出处应设立消毒池、袋、室等消毒设施。养殖生产区内应设疫(疾)病隔离观察治疗区,并设于生产区的下风向处。排粪沟应设于畜禽饲养圈舍之外,且落差应大于5‰,确保不积留粪尿。应供给畜禽清洁卫生的饮水,条件较好的业主应安装自动供、饮水系统,既达到清洁卫生的要求,又满足畜禽自由饮水需要。

2 提高管理人员科技水平

目前,提高规模饲养场管理人员的科技水平很有必要,也显得非常迫切。一是畜牧业现代化需要从业人员掌握系统的理论知识;二是当今的国际化商品市场需要无公害的畜禽产品,而只有掌握了系统理论知识的人才能切实做好畜禽防疫工作,才能生产出无公害的畜产品。饲养管理人员畜禽养殖科技水平的提高,只有通过培训学习的方式才能

得以实现。可以采取集中培训的办法,也可以聘请有资质的科技人员担任技术顾问,培训饲养管理人员,指导饲养管理工作。所聘请的技术顾问不能只挂虚名,必须切切实实地履行职责。

3 制定合理的科学的免疫计划

要制定科学的免疫接种计划,按程序给畜禽进行接种免疫。疫苗接种可以诱导不同年龄阶段的畜禽产生主动免疫。养殖场应根据本场的疫病史、场周围的疫情、免疫抗体水平及畜禽的不同饲养阶段等情况,有针对性地制定免疫计划。同时要选择购买由国家畜牧兽医行政管理部门定点生产的疫苗,加强疫苗保管储存,并由兽医按防疫注射操作规程实行免疫,同时建立畜禽免疫档案。有条件的养殖场应及时开展免疫效果监测,并根据监测情况调整免疫程序。

4 严格检疫,把好引种关

引进种畜禽时,要做好产地疫情调查,对种畜禽进行检疫和挑选,可委托当地兽医卫生机构对种畜禽进行口蹄疫等传染性疫病进行检疫。这些疾病检验为阴性后方能引入。引入后应在隔离舍观察30d,确认健康后,方能进入生产区。同时定期对场内畜禽进行传染病和粪便寄生虫卵的检查。对检验出的病畜禽或阳性畜禽,应按不同情况及时妥善处理。凡患有传染病或疑为患有传染病的畜禽应予以扑杀或淘汰。

5 规范保健药品使用

无论是化学药品制剂、中成药制剂还是生化制剂类动物保健药品,无论是消毒类药还是抗生素类药,虽能防病治病对畜禽起保健作用,但均能在动物体内残留,直接影响畜禽的防疫效果和产品质量。因此,必须规范规模养殖场畜禽保健药品的使用,必须按使用剂量、休药期规定规范使用,坚决不用淘汰、禁用药品。这不仅是宣传、说教性的规范使用,还应转化为畜禽养殖者和饲养管理人员的自觉行动。

收稿日期:2010-02-09

作者简介:叶桂宏(1972—),男,助理兽医师,主要研究方向为动物检疫与防疫。

- [6] 徐晓静,乌日罕,王立声,等.鸡传染性支气管炎分子生物学研究进展[J].畜牧与饲料科学,2005,26(2):28-30.
- [7] 杨帆,李淑梅,汤波,等.鸡传染性支气管炎病毒的分离鉴定[J].安徽农业科学,2008,36(8):3226-3227,3249.
- [8] 周相华,马清霞,孙小力,等.一起鸡传染性支气管炎病的诊断[J].山东畜牧兽医,2009,30(10):65.
- [9] 钱晓佳,周欣,薛邦玉,等.鸡传染性支气管炎病毒(M41)HI

抗原的制备与初步应用[J].安徽农业科学,2007,35(30):9545-9546,9548.

- [10] 贾荣玲,舒常永.鸡传染性支气管炎诊断方法的研究进展[J].郑州牧业工程高等专科学校学报,2009,29(2):19-20,31.
- [11] 陈俊杰,陈萍.鸡传染性支气管炎分子生物学诊断研究[J].安徽农业科学,2007,35(16):4858-4859,4862. □