

# Clinical Diagnosis and Pathogen Isolation of Avian Infectious Bronchitis with Both Severe Respiratory Signal and Nephrosis

Yu Xuping et al

(Veterinary Medicine Department, Zhejiang Agricultural University)

A severe respiratory infectious disease outbreaked in a broiler flock in suburb of Hangzhou. Necropsy of dead birds showed severe nephrosis as oedema, haemorrhage and urolithiasis, etc. It was clinically diagnosed as avian infectious bronchitis. Primarily, The pathogen was isolated and characterized for propagation, hemagglutination, pathogenicity and morphorism, etc. The results suggested that the flock was infected by respiratory and nephrotropic avian infectious bronchitis.

14-17 鸭病 传染病 肝炎病毒变异株 流行 诊断  
一种新的鸭传染病研究 (上)  
1. 流行情况与初步诊断

林世堂 黄 瑜  
(福建省农科院畜牧兽医研究所)

黄纪铨  
(福建省农业厅畜牧局)

刘利华  
(福建省农科院电镜室)

5858.325.3

## 摘 要

近几年来,在福建的福州、福清和莆田等地的各日龄番鸭、斗番鸭、樱桃谷鸭和麻鸭发生一种以脏器和肠道出血为主要特征的传染病,严重威胁我省养鸭业。经病原分离、电镜观察、中和试验及人工复制试验等实验室检查初步证明是由 1 型鸭肝炎病毒变异株引起的一种新的鸭传染病。

近几年来,在我省福州、长乐、福清和莆田等地的鸭群发生一种临床症状以角弓反张、喙端紫钳、毛囊管出血和剖检病变以皮下、胰、肝、脾以及肠道出血为主要特征的传染性疾病。7 日龄以上的鸭均可感染发病,但发病率、病死率高低不一,小鸭高于中、大鸭,有时高达 80%,尤以番鸭发病和死亡最为严重。由于多种抗菌药物治疗无效和各品种大、小鸭均可发病,因此严重威胁我省养鸭业的发展,鉴于国内尚未见报道类似鸭病,因而对

该病立题进行了研究。现将其流行情况及实验室诊断结果报道如下。

## 1 发病及流行情况

1990 年秋,在福州市郊某鸭场饲养的一群育成肉用番鸭首次暴发一种罕见的疾病,发病后一周内共死亡 800 余只,病死率近 80%。后其邻近的几家养鸭场、中、大番鸭也先后发病,病死率为 30~50%。1991 年于福州古山一家肉用樱桃谷鸭场,连续饲养 2 批共 2200 只,均于 35~40 日龄发病,病死率高达 80%。1992 年从福清市养鸭专业户多次送检的病鸭中,又发现此病,其中两家专业户饲养的麻鸭 3000 余只,共死亡 40% 以上。同年在长乐市一家番鸭场及其他几家专业户饲养的中、大番鸭也流行此病,病死率在 30% 左右。

近两年来,该病流行范围不断扩大,莆田和闽南地区某市县的大、小番鸭、樱桃谷鸭和

本研究系福建省自然科学基金资助项目

麻鸭均相继发生本病。据现场调查,小鸭多在 7 日龄开始发病,15~20 日龄为发病高峰,病死率为 30~40%。青年鸭多发生在 35~45 日龄,病死率 40~50%。由于此日龄发病鸭已长翅羽,则可见病鸭大、小羽毛囊管出血呈紫黑色,当地有“黑羽病”之称。多种抗菌素治疗无效,使用番鸭细小病毒疫苗、高免蛋黄、鸭病毒肝炎疫苗和高免蛋黄以及鸭瘟疫苗、禽霍乱亚单位疫苗均未能控制该病。该病的流行无明显的季节性,除鸭外目前尚未见其他禽类发生该病。

## 2 临床症状

本病在小鸭和青年鸭多呈急性经过,出现临床症状后多在 2~3 天内死亡,而成年或种鸭病程稍长。病鸭食欲减退或正常、精神沉郁、低头或扭颈、排白绿色稀粪,喙端、爪尖及蹼淤血呈暗紫色,在中、大鸭可见两翅羽毛囊管出血呈紫黑色。死亡鸭呈典型的角弓反张。

## 3 剖检病变

主要肉眼病变为皮下、羽毛囊管、肝脏、胰脏、肠道(十二指肠和直肠)明显出血;脾脏肿大、淤血或出血,多数病鸭脾呈花斑样;肾脏肿大、充血或出血、肌囊膨大;在产蛋麻鸭还可见舌根部、喉部或气管轻度出血。鉴于该病病变以出血为主要特征,则暂定名为鸭出血症(Duck Hemorrhagic disease, DHD)。

## 4 实验室检查

### 4.1 病原分离

无菌采集病死鸭胰、肝、脾和心血等,每种病料分成两份,一份供细菌学检查,另一份用于病毒分离,供病毒分离的病料按常规处理后置低冰冻保存备用。

4.1.1 细菌学检查:将无菌采集的肝、胰等病料直接涂片、染色、镜检,未见可疑细菌。分别取病料接种普通肉汤及其琼脂平板、含血清马丁肉汤及其琼脂平板和血琼脂平板等培养基,除个别培养基见少数菌落生长外,其余未培养出细菌。对可疑菌株经增菌培养、革兰氏染色、镜检似大肠杆菌,后经人工感染番鸭

试验表明所分离菌为非致病菌。

### 4.1.2 病毒学检查

4.1.2.1 鸭胚分离传代:将经处理的样品接种 11~12 日龄番鸭胚尿囊腔(0.2ml/胚),置 37℃ 孵化,在 2~5 天出现死亡,死胚率 80%。以番鸭胚连传数代后均在 2~3 天死亡,死胚率为 100%。首次接种半番鸭胚和麻鸭胚,于接种后 2~6 天出现死亡,死胚率分别为 44% 和 40%,以后连传数代均在 2~3 天内全部死亡。将收获的鸭胚分离传代毒接种 9~10 日龄鸡胚和 14~15 日龄鹅胚,在 2~3 天内均可 100% 致死胚体。

以上所有致死胚体病变为水肿、出血、聚集多量胶冻样物,大多胚上喙上翻或侧翻、下喙变短,肝脏、肾脏肿大、出血,心肌呈瓷白色。

### 4.1.2.2 电镜检查

负染镜检:取分离传代毒样(下称 DHD 毒)经高速离心、蔗糖密度梯度离心后,取区带样品经磷钨酸负染、电镜观察,发现球形、直径为 30~40nm 的无囊膜病毒粒子。

超薄切片镜检:将 DHD 毒接种 10 日龄 SPF 鸡胚,取 24 小时后致死的鸡胚肝和正常 SPF 鸡胚肝脏,按常规方法制作超薄切片、染色、电镜观察见死亡鸡胚肝细胞浆中有一种球形、直径为 30~40nm、呈典型蜂巢样品格排列的病毒粒子。

### 4.2 血清中和试验

4.2.1 定性中和试验:以  $10^5$ ELD<sub>50</sub> 的 DHD 毒(ELD<sub>50</sub> 已预先测定)分别与鸭瘟阳性血清(中监所)、雏番鸭细小病毒阳性血清(本所单抗室)、I 型鸭病毒性肝炎阳性血清(北京农大动物医学院传染病室)、小鹅瘟阳性血清(本室)等量混合,置 37℃ 作用 1 小时后接种 11~12 日龄半番鸭胚,接种后连续观察 10 天。另设病毒组、各种阳性血清组和空白对照组。两次中和试验结果表明,在四种阳性血清中只有 I 型鸭病毒性肝炎阳性血清有部分中和作用。

4.2.2 交叉中和试验:根据 DHD 毒能被 I 型鸭病毒性肝炎阳性血清(DHVPS)所中和,进行了交叉中和试验,即将  $10^4$ ELD<sub>50</sub>的 I 型 DHV、DHD 毒分别与 10 倍连续稀释的 I 型 DHVPS、4 倍连续稀释的 DHD 毒阳性血清(DHDPS)按各稀释度等量混合,置 37℃作用 1 小时,每稀释度接种 5 枚半番鸭胚。另设病毒组、血清组和空白对照组。从表 1 可见, I 型 DHV 与 DHD 毒之间的抗原相关值(R)为 0.3(<0.8),表明两者为不同亚型,即所分离的 DHD 毒株系 I 型 DHV 变异株。

表 1 DHD 毒与 DHV(I 型)交叉中和试验结果

组 别	中和效价	R 值
$10^4$ ELD <sub>50</sub> DHD 毒+DHDPS	1:64	0.3
$10^4$ ELD <sub>50</sub> I 型 DHV+DHDPS	1:15	
$10^4$ ELD <sub>50</sub> I 型 DHV+I 型 DHVPS	1:47	
$10^4$ ELD <sub>50</sub> DHD 毒+I 型 DHVPS	1:13	

#### 4.3 人工感染试验

4.3.1 雏番鸭人工感染试验:选取 25 羽未

注射任何疫苗和蛋黄的 1 日龄健康番鸭,分两个试验组(T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>,10 羽/组)和一个对照组(C<sub>1</sub>,5 羽),其中 T<sub>1</sub> 组鸭于 3 日龄肌注 I 型 DHV 弱毒疫苗(0.2ml/羽),两试验组鸭于 10 日龄腹腔注射  $10^4$ ELD<sub>50</sub>的 DHD 毒 1ml/羽。对照组鸭注射灭菌生理盐水 1ml/羽。三组鸭均连续观察 15 天,结果两试验组鸭先后发病死亡 80%和 87.5%,而对照鸭均健活(表 2)。

4.3.2 半番鸭人工感染试验:选取 15 羽 2 日龄健康半番鸭,分两个组,试验组(T<sub>3</sub>,10 羽)鸭肌注  $10^4$ ELD<sub>50</sub>的 DHD 毒 1ml/羽,另一组(C<sub>2</sub>,5 羽)鸭肌注等量灭菌盐水作对照。两组鸭连续观察 15 天,结果试验组死亡 80%,而对照组鸭健存(表 2)。

以上两种雏鸭人工感染后其临床症状及死后肉眼病变与自然病例相同。

#### 4.4 病毒的回归和定性鉴定

表 2 DHD 毒人工感染试验结果

组 别	攻毒鸭数	攻毒途径	感染结果			对照组 死亡鸭/试验鸭
			潜伏期(天)	死亡鸭数	死亡率	
T <sub>1</sub> *	8	腹腔	9	7	87.5	0/10
T <sub>2</sub>	10	腹腔	4	8	80	
T <sub>3</sub>	10	肌肉	4	8	80	

\* 于 3 日龄时免疫接种 I 型 DHV 弱毒疫苗。

4.4.1 病毒回归试验:无菌采集人工感染死亡小鸭的肝、胰和肾,按常规方法处理后接种 11~12 日龄半番鸭胚,接种后 2~3 天全部死亡。而对照鸭胚存活。两次试验结果一致,死亡鸭胚病变与原 DHD 毒致死的鸭胚病变相同。收集死亡半番鸭胚尿囊液备用。

4.4.2 再分离毒的定性鉴定:对上述收集的尿囊液毒 100 倍稀释后与 DHDPS 等量混合,37℃作用 1 小时接种半番鸭胚 15 枚,另取 10 枚接种 DHD 稀释毒,5 枚胚作空白对照。结果于接种后 2 天,接种 DHD 毒的 10 枚鸭胚全死,而 DHDPS 中和组胚死 1 枚,空白对照胚均存活。证明回收毒为原 DHD 分

离毒。

#### 5 小结和讨论

5.1 根据流行病学调查,该病除能使小鸭感染发病死亡外,还可侵害中、大鸭,以 35~40 日龄青年鸭发病率最高,病死率高达 80%。由于许多品种鸭均可感染发病,且采用多种抗菌素和已有的高免蛋黄治疗无效,该病已是严重威胁我省养鸭业的又一新的传染病。目前,在国内尚未见报道这一新的鸭传染病。

5.2 以自然病死鸭病料分离毒进行实验复制试验,表明其临床症状和肉眼病变与自然病例相同。据电镜检查,定性中和试验及其交叉中和试验结果,初步认为该病病原系直径

为 30~40nm、能被 I 型 DHVPS 部分中和的 I 型 DHV 变异株。对该变异株的病原特性的研究有待深入进行。

5.3 关于 I 型 DHV 变异株,国内尚未见报道,而印度(1967)和埃及(1978)曾报道过与 I 型 DHV 不同或有明显血清学差异的病

毒,1988 年美国 Sandhu 也发现一个与 DHV 有明显血清学差异的变异株,且认为该变异株与 I 型 DHVPS 有部分交叉中和作用,但免疫了 I 型 DHV 弱毒疫苗的雏鸭不能有效抵抗变异株的攻毒,这与我们的试验结果相一致。

## A New Infectious Disease in Duck

### I. Epidemiology and Preliminary Diagnosis

Lin Shitong et al

(Animal Husbandry and Veterinary Medicine Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences)

During the last few years, a new epidemic disease of duck characterized by dark purple end of bill and follicle, opisthotonos or torticollis in clinical signs and disseminated hemorrhagic foci of pancreas, Liver, spleen, kidney, duodenum and rectum in gross lesions occurred in Fuzhou, Fuqing and Putian cities of Fujian province. The results of etiological isolation, electromic roscopic seanning, neutralization test, and artificial infection test indicated that the disease was a new duck infectious disease caused by a variant of duck hepatitis type I Virus.

17-20 Dot-ELISA 兔病 支气管肺炎 波氏杆菌 抗体

### 用 Dot-ELISA 检测兔支气管败血波氏杆菌抗体的研究 (6)

韦 强 佟承刚<sup>✓</sup> 鲍国连 季权安  
(浙江农科院牧医所)

5858.292  
5854.63

支气管败血波氏杆菌是家兔鼻炎和支气管肺炎的主要病原之一,感染率可达 20~70%,严重影响养兔业的发展。该病的诊断通常采用病原分离鉴定,虽具有准确可靠的优点,但费时又费力。对抗体的检测目前报道的有微量凝集试验(MAT)及琼脂免疫扩散试验,但其敏感性不高。斑点酶联免疫吸附试验(Dot-ELISA)是 80 年代初建立后种新的血清学方法,因其敏感、准确、特异等优点而被广泛应用于免疫检测、准确、特异等优点而被广泛应用于免疫检测。为此,本文试图建立 Dot-ELISA,用于检测抗体,为本病劈出快速、敏感的免疫学诊断新方法。

#### 1 材料和方法

1.1 抗原:用普通琼脂培养基培养波氏杆菌 24 小时,用适量灭菌 PBS 洗下菌苔,测定其含菌量,2000rpm 离心 5 分钟,去沉渣,然后 8000rpm 离心洗涤 3 次,每次 10 分钟。沉淀加洗涤前同量 PBS,制成菌悬液,100℃水浴 1 小时,加万分之一硫柳汞,4℃保存备用。

1.2 血清:阳性血清为高免血清、MAT 凝集价为 1:256 阴性血清为健康兔血清,凝集试验阴性。血清样品为不同试验条件下所获得的血清。

1.3 酶标记物:辣根过氧化酶标记的葡萄球菌 A 蛋白(PPA),上海产,工作浓度 1:40。