

鸡禽流感病原分离鉴定及高免卵黄抗体研制

张晓根¹, 何雷堂², 蒋士传³

(1. 郑州牧业工程高等专科学校, 河南 郑州 450008; 2. 鹤壁市畜牧局, 河南 鹤壁 456600; 3. 河南亚卫实业总公司, 河南 郑州 450008)

摘要: 从出现呼吸道症状和产蛋量下降的产蛋鸡群的气管分泌物中分离病毒, 经 HA 活性测定、分离尿囊液中新城疫病毒排除试验、禽流感 A 型特异性血清的琼脂扩散实验、A 型流感病毒的亚型鉴定试验, 分离到的病毒为 H₉N₂ 禽流感病毒, 用禽流感 H₉N₂ 亚型油乳剂灭活苗多次免疫产蛋鸡, 获得高免蛋, 并制成禽流感高免卵黄液, 在发病初期给禽流感病鸡肌注高免卵黄液, 获得了满意的效果。

关键词: 禽流感; 分离; 鉴定; 高免卵黄抗体

中图分类号: S858.31 文献标识码: A
文章编号: 1003-482X(2001)02-0035-03

禽流行性感 冒 (简称禽流感, Avian Influenza, AI) 是由 A 型流感病毒引起的禽类烈性传染病, 疾病的严重程度取决于病毒的毒株以及被感染的禽种、性别、有无并发症等因素, 高致病力禽流感常以突然死亡和高死亡率为主要特征, 常导致感染鸡群的全军覆灭, 中等毒力以下禽流感常引起呼吸道症状, 产蛋率、受精率及孵化率下降等^[1]。

1999 年 3 月, 河南北部地区某蛋鸡场产蛋鸡群, 出现体温升高, 精神沉郁, 产蛋量下降, 咳嗽, 部分鸡头和颜面水肿。剖检病鸡可见气管粘膜轻度水肿, 并伴有干酪样渗出物, 气囊增厚并有干酪样渗出物附着, 腺胃乳头溃疡出血, 粘膜上有脓性分泌物, 卵泡变形充血, 输卵管内有白色粘稠分泌物, 怀疑鸡群患禽流感, 于是进行了病原的分离鉴定, 并进行了禽流感高免卵黄抗体的研制, 经临床

应用取得了满意效果^[1,3]。

1 材料及方法

1.1 病料

采自豫北某蛋鸡发病鸡。

1.2 鸡胚

购自郑州陈寨孵化场。

1.3 琼扩禽流感 A 型阳性血清和标准抗原

购自中国农业科学哈尔滨兽医研究所。

1.4 H₉N₂ 型禽流感油乳剂灭活苗

由郑州牧业工程高等专科学校微生物实验室自制。

1.5 试验鸡

选择健康蛋用鸡 50 只, 经检查没有白痢等垂直传播的疾病, 由郑州牧业工程高等专科学校微生物教研室饲养。

1.6 病料的采取和处理

用棉拭子取气管内容物作为被检材料, 将蘸有病料的棉拭子放入含有青、链霉素 1000IU/ml 的灭菌肉汤中, 充分振荡, 置 4℃ 冰箱作用 2h, 2500rpm 离心, 取上清备用。

1.7 病原分离

取离心的病料上清液, 经尿囊腔途径接种 10 日龄的健康鸡胚 10 枚, 0.1ml/胚, 接种后置 37℃ 的孵化器内继续孵化, 弃去 24h 内死亡胚, 收集 24h 之后死亡胚及 96h 仍存活胚的尿囊液, 以同样方法把尿囊液盲传 2 代, 无菌收集尿囊液。

1.8 病原鉴定

1.8.1 HA 活性测定 取初代分离尿囊液和传

① 收稿日期: 2001-03-25。

作者简介: 张晓根 (1963-), 男, 河南武陟人, 副教授。

代尿囊液各 1 滴,分别加载玻板上,再加 1 滴 5% 鸡红细胞悬液,10min 后,看能否出现红细胞凝集现象。

1.8.2 分离尿囊液中新城疫病毒排除试验 取 1 滴 1:10 稀释的正常鸡血清和 1 滴鸡新城疫病毒抗血清,分别置于一块玻璃板上,再各滴加 1 滴有 HA 活性的鸡胚液,混匀后各滴加 1 滴 5% 鸡红细胞悬液,10min 后观察两份血清能否出现 HA 活性。

1.8.3 禽流感 A 型特异性血清的琼脂扩散试验

1.8.3.1 禽流感待检抗原的制备 采集有血凝性的鸡胚绒毛尿囊膜,用 pH7.2 的 PBS 冲洗绒毛尿囊膜后,磨碎,反复冻融 3 次,再 3000rpm 离心 30min,取上清液加入甲醛至终浓度为 0.1%,37℃ 灭活 36h 即可应用。

1.8.3.2 待检禽流感抗原的琼脂扩散试验 取 0.6g 精制的琼脂,8gNaCl,加入 pH7.2 的 PBS 液至 100ml,待自然凝固后放 4℃ 冰箱过滤,取出凝固好的琼脂平板,按常规法打成 7 个孔为一组的梅花状孔眼,中间孔滴加 A 型禽流感特异性血清,周围孔滴加标准抗原和待检抗原,室温下作用 24h 后,观察结果。

1.9 所分离的 A 型禽流感病毒的亚型鉴定

委托中国农业科学院哈尔滨兽医研究所进行。

1.10 禽流感高免卵黄抗体的研制

1.10.1 试验鸡免疫 一免每只鸡肌肉注射禽流感油乳剂灭活苗 1.0ml,隔 10d 二免,每只鸡肌注禽流感油乳剂灭活苗 1.5ml,再隔 10d 后三免,每只鸡肌注禽流感油乳剂灭活苗 2.0ml,三免后 15d,收集免疫鸡所产蛋,用 HI 试验检测卵黄抗体效价,若效价达 $101g_2$ 以上,可作为合格的高免蛋备用^[2,4]。

1.10.2 禽流感高免卵黄抗体制备 将高免蛋浸入新洁尔灭消毒液中,浸泡 1min,取出让其自然干燥,分别卵黄,在组织匀浆机中高速搅拌后,加入等体积灭菌盐水庆大霉素(庆大霉素 2000IU/ml),搅拌混匀后分装,冻结保存备用。

1.10.3 禽流感高免卵黄抗体的检验

1.10.3.1 灭菌检验 将制备好的禽流感高免卵黄抗体液接种于普通琼脂、血液琼脂斜面和厌氧肉汤中,37℃ 培养 48h,观察有无细菌生长。

1.10.3.2 安全检验 取 180 日龄左右的产蛋鸡

10 只,肌肉注射禽流感高免卵黄液 3ml/只,观察 7~10d。

1.10.4 发病鸡治疗试验 1999 年底,郑州某鸡场所饲养的 25 周龄 2000 羽蛋鸡出现产蛋下降 20% 左右,伴有轻度的呼吸道症状的疫情,并有少量鸡只死亡。剖检病死鸡可见:气管充血,内有粘性分泌物,腺胃乳头溃疡出血,腹腔内有破裂的卵黄,卵泡变形充血,输卵管内有白色粘稠分泌物。根据临床症状,剖检变化和实验室诊断,确诊该鸡群患有禽流感,随机取 1500 只,每组 500 只分成 3 组,第 1 组,用 0.02% 葱诺杀星饮水,饲料中添加 $100\mu g/gV_E$ 、 $300\mu g/gV_C$ 和 0.5% 盐酸金刚烷胺,连用 7d,同时每只鸡肌肉注射禽流感高免卵黄抗体液 2ml,每日 1 次,连用 2d;第 2 组,用 0.02% 葱诺杀星饮水,饲料中添加 $100\mu g/mV_E$ 、 $300\mu g/mV_C$ 和 0.5% 病毒灵,连用 1 周;第 3 组,不用任何药物作为对照。14d 后统计各组的死亡鸡数、产蛋率,观察治疗效果。

2 结果

2.1 HA 活性测定

观察 10min,初代分离尿囊液和传代尿囊液均能出现明显的红细胞凝集现象,鸡胚尿囊液具有 HA 活性。

2.2 分离尿囊液中新城疫病毒排除试验

滴加 1 滴 1:10 稀释的正常鸡血清和 1 滴鸡新城疫阳性血清,再分别滴加有 HA 活性的鸡胚液 1 滴,混匀后各滴加 1 滴 5% 鸡红细胞悬液,10min 后,两份血清都出现 HA 活性,表明鸡胚液中不含新城疫病毒。

2.3 禽流感 A 型特异性血清的琼脂扩散试验

室温下作用 24~48h 后观察,标准抗原和阳性血清之间出现明显的沉淀线,待检抗原和阳性血清间出现沉淀线,并且其沉淀线与邻近的阳性抗原和阳性血清的沉淀线相连,为阳性反应,待检抗原为 A 型禽流感病毒。

2.4 所分离的 A 型禽流感病毒亚型鉴定

经中国农业科学院哈尔滨兽医研究所鉴定,所分离的禽流感病毒为 H_9N_2 亚型。

2.5 H_9N_2 亚型禽流感卵黄液的无菌检验

将制备好的禽流感卵黄抗体液,接于普通琼脂斜面、血液琼脂斜面和厌氧肉汤中,37℃ 培养 48h,均无细菌生长。

2.6 禽流感卵黄液的安全试验

180 日龄左右的产蛋鸡 10 只,肌肉注射卵黄抗体液 3ml/羽,观察 10d,均健康存活。

2.7 禽流感卵黄液对发病鸡的治疗试验

由表 1 可见:鸡群发生禽流感后,第 I 组,使用卵黄抗体、维生素和抗菌素治疗时,鸡群的产蛋率提高 14.3%,鸡群的死亡率为 6.4%;第 II 组,使用维生素、抗菌素和抗病毒药治疗时,鸡群的产蛋率提高 8%,鸡群的死亡率为 9.2%;第 III 组,不用任何药物治疗时鸡群的产蛋率下降 4%,鸡群的死亡率为 14.2%。

表 1 发病鸡治疗试验结果

组别	用药前		用药 14d 后		
	试验只数	产蛋率 (%)	所剩鸡数	产蛋率 (%)	死亡率 (%)
I	500	72	468	86.3	6.4
II	500	72	455	80	9.2
III	500	72	429	68	14.2

治疗结果表明:当鸡群发生禽流感后,肌注禽流感卵黄抗体,在饮水中加入抗菌素,在料中加入维生素和病毒灵是治疗禽流感的有效方法。

3 讨论与分析

3.1 近两年来,河南一些产蛋鸡出现呼吸道症状和产蛋量下降,往往误诊为鸡新城疫,通过本次试验证明一些产蛋鸡群出现的呼吸道症状和产蛋量下降是由于患有温和型禽流感,其病原为 H₉N₂ 禽流感病毒。

3.2 以产蛋下降和出现呼吸道症状为特征的温和型禽流感,目前用常规的治疗方法难以控制,我们用禽流感 H₉N₂ 亚型油乳剂灭活苗所研制的禽流感高免卵黄抗体,同时配合使用病毒灵、维生素和抗菌素对发病鸡具有很好的治疗作用。肌注卵黄抗体,同时使用病毒灵拌料,可以有效地阻断病毒在鸡群的进一步感染,维生素的使用可增加鸡体的抵抗力,改善症状,抗菌素的使用可以防止鸡群的继发感染。

3.3 根据实践,用禽流感高免卵黄抗体治疗温和型流感,发病早期进行紧急注射,有良好的疗效,

在发病中后期使用效果较差。

参考文献:

[1] 甘孟侯,王永坤,王红宁,等. 中国禽病学[M]. 北京: 中国农业出版社,1999. 66-81.

[2] 王明俊,冀锡霖,陈 永,等. 兽医生物制品学[M]. 北京:中国农业出版社,1999. 659-661.

[3] 杜文钊,朱万光,张国祥,等. 鸡病诊断与防治图谱 [M]. 济南:济南出版社,199. 12-17.

[4] 杜平,李仲锋,范中善,等. 医用实验病毒学[M]. 北京:人民军医出版社,1985,117-122.

Isolation and Identification of Avian Influenza Antigens and Preparation of Highly Tmmunized Egg Yolk Antibodies

ZHANG Xiao-gen *et al.*

(Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering,Zhengzhou,Henan,450008,China)

Abstract: Viruses were isolated from the tracheal secreta of the laying flocks with respiratory symptoms and egg production drop. The Newcastle disease virus exclusion test for HA activity determination and allantoic fluid isolation,agar diffusion test for avian influenza type A specific serum, and subtype indentification test for type A influenza virus showed that the isolated virus was the H₉Y₂ avian influenza virus. Highly immunized eggs were obtained and made into highly immunized egg yolk fluid against avian influenza by vaccinating laying hens several times with H₉Y₂ subtype oil emulsion killed vaccine against avian influenza. Intramuscular injection of highly immunized egg yolk fluid into avian influenza infected chickens at the onset of disease resulted in satisfactory therapeutical effects.

Key words: avian influenza; isolation; identification; highly immunized egg yolk antibody