

某种鸡场暴发鸡新城疫诊断及紧急疫苗接种试验

姜兆军¹, 张京茂¹, 刘晓明²

(1. 山东省临沂市新程金锣肉制品有限公司 276036; 2. 山东省平度市古岬动物防疫监督站)

中图分类号: S858.315.3

文献标识码: B

文章编号: 1673-1085(2009)12-0032-03

某种鸡场共有 4 栋鸡舍, 每栋鸡舍平均饲养 4000 只鸡, 30 日龄。有两栋鸡舍鸡群突然发病, 发病初期出现倦怠, 呼吸急促, 虚弱, 精神委顿, 食欲减少或丧失, 羽毛松乱, 不愿走动, 垂头缩颈, 翅膀下垂, 鸡冠和肉髯呈紫色, 眼半闭或全闭, 状似昏睡, 主要以甩鼻和呼吸道症状为主。两天后波及全群, 每天死亡 60 多只。部分病例出现神经症状, 如翅、腿麻痹, 站立不稳, 最后体温下降, 不久在昏迷中死去, 死亡率达 70% 以上。

病理剖检见腺胃乳头肿胀、出血或溃疡, 尤以腺胃与食管或肌胃交界处最明显。十二指肠粘膜及小肠粘膜出血或溃疡。盲肠扁桃体肿大、出血和坏死。呼吸道以卡他性炎症和气管充血、出血为主。鼻道、喉、气管中有浆液性或卡他性渗出物。

根据临床症状和病理剖检变化初步诊断该鸡场暴发了鸡新城疫。采取紧急预防措施, 用 IV 系疫苗倍量对全场鸡群同时进行点眼和滴鼻, 两天后病情得到控制。

为了得到准确的诊断结果及制定最佳的紧急疫苗接种途径, 进行了一系列试验, 具体方法如下。

1 材料

1.1 病料来源 该种鸡场疑似患有鸡新城疫鸡只的血液。

1.2 试剂

1.2.1 血清及毒株 鸡新城疫标准抗原及标准阳性血清均购自中国农科院哈尔滨兽医研究所; 新城疫病毒 La-Sota 株购自中国兽药监察所。

1.2.2 1% 鸡红细胞悬液制备 枸橼酸钠抗凝鸡血用 5~10 倍的生理盐水洗涤 3 次, 1000~2000r/min 离

心 5min, 弃上清液, 取一定体积的红细胞泥, 加生理盐水配置成 1% 的红细胞悬液。

1.2.3 培养基 马丁肉汤培养基、厌氧肉肝汤培养基和马丁琼脂斜面培养基均由青岛正大动保中心制备。

2 方法

2.1 样品采集与处理 采集病死鸡的脑组织, 剪碎, 按 1:5 的比例加入生理盐水, 在组织捣碎机内处理后, 反复冻融 3 次, 4000r/min 离心 20min, 静置, 过滤, 在培养基上进行细菌学检测后置 4℃ 冰箱冷藏备用。

2.2 病毒的分离 将收集好的病料置于已消毒的匀浆器内, 研磨成乳剂, 加入灭菌生理盐水作 10 倍稀释, 离心后取上清液, 按每毫升加入青霉素和氯霉素各 500 单位, 置 37℃ 温箱中保温 30~60min。以上清液 0.1ml 接种于 9~10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔内。接种后的鸡胚放到 37℃ 温箱内继续孵化。每天观察接种的鸡胚有无变化。若为强毒株, 鸡胚在接种后 48~72h 即可致死; 若为弱毒株, 鸡胚 3~6d 致死。收集死亡鸡胚的尿囊液作细菌检查, 以供病毒鉴定。

2.3 病毒的鉴定

2.3.1 血凝试验(HA) 收集 24h 以后死亡的鸡胚和 96h 内活鸡胚的尿囊液用微量法进行血凝(HA)试验。具体方法为: 先用微量移液器在 96 孔 V 型反应板的横排 12 个孔中各加入 50μl 生理盐水, 然后取 50μl 尿囊液以常规方法在 96 孔 V 型反应板上作 2 倍倍比稀释, 一直稀释到第 11 孔, 第 12 孔为生理盐水对照孔。然后向每孔加 1% 鸡的红细胞 50μl 振荡 30s, 37℃ 作用 25~30min 后以常规方法

收稿日期: 2009-11-06

判定结果。

2.3.2 血凝抑制试验(HI) 将收获保存的具有凝集鸡红细胞能力的鸡胚尿囊液按其 HA 效价配成 4 单位分离毒。先用微量移液器在 96 孔 V 型反应板的横排前 11 个孔病毒中各加入 50 μ l 盐水,最后一孔中加入 100 μ l 生理盐水,然后取 50 μ l 新城疫病毒标准阳性血清,常规方法在 96 孔 V 型反应板上作 2 倍倍比稀释,一直稀释到第 10 孔,第 11 孔为病毒对照孔,第 12 孔为生理盐水对照组;然后在 96 孔 V 型反应板的横排的前 11 个孔各加入 4 单位分离毒,第 12 孔为生理盐水对照孔。振荡 30s,置 37 $^{\circ}$ C 恒温箱作用 5~10min。然后向每孔加 50 μ l 1%鸡红细胞,振荡 15~30s,37 $^{\circ}$ C 作用 2min 后以常规方法判定结果。

2.3.3 动物回归试验 用分离到并通过鉴定的新城疫病毒尿囊液,对 30 日龄非免疫雏鸡 100 只,进行动物回归试验。试验分为两组,第 1 组用分离到的病毒接种,第 2 组做对照试验。试验雏鸡接种前采血作 H_i 试验,结果均为阴性。

2.4 不同途径疫苗接种试验

2.4.1 试验设计 从发病鸡群中随机挑选 300 只鸡,分为三组,每组 100 只,在每组鸡饮水中都加入强力霉素,三组试验鸡采用不同的紧急预防接种措施:第一组进行点眼滴鼻免疫;第二组进行饮水免疫;第三组为不免疫组。

2.4.2 疫苗免疫方法 第一组点眼滴鼻接种时,可把 1000 羽份的 IV 系疫苗用 50 μ l 生理盐水稀释。充分摇匀,装入 50ml 的滴瓶中,然后在每只鸡的眼结膜或鼻孔上滴 1 滴(约 0.05ml);第二组饮水免疫时,给鸡停水 2~3h,饮疫苗前将饮水器具清洗干净,先加水稀释 1/2 疫苗量,加水量以 1h 内饮完为度;第一次饮完后约间隔 1h 左右,再同法稀释剩余 1/2 疫苗,饮水 1h;在稀释的疫苗中加入 0.5%脱脂奶粉做免疫保护剂。剂量为点眼滴鼻时的两倍,为保证鸡群饮水疫苗的有效剂量,一般以 4~5 倍量为宜。对于精神沉郁、无力仰头饮水的病鸡,应酌情增加方便病鸡饮水的器具。次日用相同方法重复饮水一次;第三组为对照组,除不进行免疫外,其它条件与一、二组相同。

3 结果与分析

3.1 实验室诊断

3.1.1 样品细菌学检测 鲜血琼脂培养基、厌氧培养基上培养均无细菌生长。

3.1.2 病毒的分离(SPF 鸡胚接种) SPF 鸡胚接种后 72h 内几乎全部死亡,胚体很小,体表严重出血,以头部、颈部最为严重,尿囊液浑浊,绒毛尿囊膜增厚,收集尿囊液。

3.1.3 SPF 鸡胚尿囊液的鉴定 HA 试验结果见表 1,HI 试验结果见表 2。

表1 血细胞凝集(HA)结果判定

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
病毒稀释度	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	血细胞对照
判定	#	#	#	#	#	#	#	+++	++	+	-	-

注: #: 全部凝集;+++、++、+为部分凝集;-为不凝集。下表同。

表2 血细胞凝集抑制试验(HI)结果判定

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
病毒稀释度	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	病毒对照	血细胞对照
判定结果	-	-	-	-	+	++	#	#	#	#	#	-

从表 1 看出,分离病毒的血凝价为 1:128,则 1:128 的 0.1ml 中有 1 个凝集单位,1:64、1:32 分别为 2、4 个凝集单位。第 12 孔为血细胞对照组,不凝集。说明病毒具有凝集鸡红细胞的能力。

从表 2 看出,该血清的 HI 效价为 1:128,其 HI 的效价恰与板上出现的 100%抑制凝集血清最大稀释孔数——第 7 孔完全抑制,则其 HI 效价为 7,即

1:128。

病毒对照组出现全部凝集,说明该病毒能被已知的新城疫阳性血清中和,另外,本次测定 HI 效价比第一次发病前测定的明显升高。

3.1.4 动物回归试验结果 动物回归试验表明,部分鸡接种 48h 后出现羽毛逆立、闭目站立、精神沉郁、食欲不振、排黄绿色稀粪、有呼吸道症状等,接

种后 6d 开始死亡。对照鸡未见异常。剖检病死鸡, 主要表现喉头充血、出血, 气管充血、出血, 有粘液; 腺胃乳头充血、出血; 十二指肠、空肠、回肠淋巴滤泡处粘膜肿胀、充血、出血或坏死、溃疡, 盲肠扁桃体充血、出血、水肿、坏死; 其它器官亦有不同程度的出血现象。试验组鸡发病率为 100%, 病死率为 70%~100%, 而且均能从病鸡体内回收新城疫病毒。对照组未发病, 全部健活。

3.1.5 诊断结论 通过血凝和血凝抑制试验结果以及动物回归试验, 可确定分离到的病毒为鸡新城疫病毒, 该种鸡场确实发生了新城疫。

3.2 不同途径紧急预防免疫结果 见表 3。

表3 点眼滴鼻与饮水免疫治疗效果

组别	试验鸡数	死亡数	死亡率
第一组	100	13	13%
第二组	100	20	20%
第三组	100	50	50%

试验数据表明, 免疫组死亡率明显低于单独药物治疗组, 点眼滴鼻免疫组死亡率低于饮水免疫组, 即第一组点眼滴鼻并用强力霉素饮水死亡率最低。试验结果表明, 在发生新城疫时紧急疫苗接种效果要优于单独使用药物治疗, 点眼滴鼻效果好于饮水免疫。

当鸡群发生新城疫疫情时, 采取紧急点眼滴鼻局部免疫的方式, 并同时添加防止继发感染的抗生素是一种控制疫情的有效方法。

4 讨论与小结

4.1 发病原因分析

4.1.1 免疫方法不当 在第一次新城疫免疫时, 该鸡场采用饮水免疫。饮水免疫具有省时省力的优点, 但也存在一定的缺陷, 由于鸡群数量过大, 不同日龄的鸡群在不同的季节饮水量不同, 无法控制单只鸡的剂量。喝水少的鸡只喝到的疫苗量就少, 免疫力较差, 当有病毒入侵时容易感染; 喝水过多的鸡, 由于摄入的疫苗量过高, 引起免疫麻痹或超过机体的免疫耐受力而使鸡发病。

4.1.2 免疫间隔时间过长 该鸡场新城疫第一次免疫和第二次免疫之间的间隔长达一个月。人为推迟二免时间, 结果造成鸡群健康状况不佳, 抵抗力下降, 遇到野毒侵袭, 立即暴发新城疫。另外, 由于雏鸡受母源抗体的影响和免疫器官发育不完善, 首

次免疫后的抗体效价往往不高, 下降较快, 因此使用弱毒苗在首次免疫后 3 周之内应进行二免, 时间间隔过长, 造成免疫断档而染病。

4.1.3 缺乏综合性的防治措施 该鸡场为了降低养鸡的成本, 保温和通风设备多数闲置未用。造成鸡舍内温度较低, 通风不畅, 舍内环境较为恶劣, 致使鸡群抵抗力下降。防疫和消毒措施不力也是造成本次新城疫的发生和流行的主要原因。尽管养殖场参照了免疫程序及要求进行了紧急免疫, 但忽视了对病鸡的隔离及消毒等防疫措施, 病死鸡随便乱扔, 造成疫病在全场范围内的传播流行。

4.2 合理预防和控制 做好疫苗接种工作是控制新城疫暴发的有效手段。种鸡场应根据雏鸡母源抗体的消长规律确定首免时间, 一般在 7~10 日龄时进行首免, 免疫方式最好是采用点眼滴鼻方式。在新城疫污染严重的鸡场可采用 1~3 日龄时用弱毒疫苗进行首免, 间隔 7~15d 进行二次免疫。第一次免疫尽管母源抗体高的雏鸡不能产生良好的免疫应答, 但母源抗体低或者完全没有母源抗体的雏鸡会产生一定的免疫应答。第二次免疫可使抗体高的雏鸡产生免疫应答, 从而使雏鸡获得比较一致的抗体水平。

活毒疫苗免疫鸡群后能较快产生抗体, 约 2 周可达高峰, 通过滴鼻、点眼、喷雾等方法接种时, 能刺激哈氏腺、器官粘膜而产生局部抗体; 而灭活疫苗接种产生免疫的速度慢, 但能刺激机体产生更高水平的均匀的循环抗体。如果用油乳剂灭活苗皮下或肌肉注射 0.3~0.5ml, 同时用新城疫 IV 系或克隆-30 滴鼻点眼, 可使雏鸡获得较长的免疫期。

试验证明, 当暴发新城疫时, 在饮水中添加抗生素, 然后采用倍量 IV 系疫苗以点眼滴鼻方式紧急免疫接种, 可获得较好的治疗效果。可以控制发病鸡群, 降低死亡率, 减少经济损失。必要时可以用高免血清或者卵黄抗体进行注射, 待病情稳定后再用疫苗接种, 也能有效的控制病情的发展。



□