

规模化养鸡场常用兽医检测技术

郭云雷(北京康牧兽医器械中心,北京 100085)

近年来,我国家禽规模化、集约化和标准化饲养发展迅速,而传统的农村散养模式所占比例越来越少,这是我国养禽业向现代化健康稳定发展的大趋势。在集约化养鸡企业的兽医卫生和疾病防控工作中,实验室检测的作用日益突出。

1 环境监测

对鸡场和孵化场的环境样品定期监测,是了解和及时改善环境条件的重要技术措施。现在,越来越多的规模化养鸡企业,特别是重视动物福利问题的出口型公司,逐渐认识到了环境监测的必

要性和重要性。

1.1 检测项目、采样种类及数量

对采集的环境监测样品需要检测总菌数、大肠杆菌数、葡萄球菌、沙门菌和霉菌。一般种鸡场和孵化场每月检测一次,肉鸡场每批检测一次。采样种类及数量(见表 1)。

1.2 检测标准

环境监测样品的检测标准一般采用企业内控指标或遵循国标,见表 2。

表 1 常用采样项目及采样数量

采样项目	水样	表面棉拭子	空气	垫料*	终止胚**	弱雏**	绒毛**
采样数量	500 mL/舍	6 支/舍	5 套/舍	50 g/舍	30 个	30 只/场	50 g/出雏器

注: * 代表种鸡场或肉鸡场的采样项目, ** 代表孵化场的采样项目,其余采样项目鸡场和孵化场均要采集。

表 2 环境监测样品的检测标准

常用指标	水样	空气	表面棉拭子	垫料	绒毛	弱雏、中止胚
总菌数	$\leq 10^5$ 个/L	≤ 30 个/平皿	≤ 10 个/cm ²	$\leq 10^5$ 个/g	$\leq 10^4$ 个/g	—
大肠杆菌	≤ 10 /L	不得检出	不得检出	$\leq 10^2$ 个/g	不得检出	—
沙门菌	—	不得检出	不得检出	不得检出	不得检出	不得检出
葡萄球菌	—	不得检出	不得检出	$\leq 10^2$ 个/g	不得检出	不得检出
霉菌	—	≤ 5 个/平皿	≤ 5 个/cm ²	$\leq 10^2$ 个/g	400 个/g	不得检出

注: “—” 表示无检测标准。

1.3 常见问题

1.3.1 水样微生物超标

提示水源卫生状况较差或饮水有污染,应加强对水源水(生产中多为水井水)和饮水系统的清洁消毒工作。

1.3.2 不重视空舍期的消毒工作

鸡场空舍期的消毒工作很重要,对于上批发

生过烈性传染病的鸡场/舍,更应将做好消毒工作放在首位。在冲洗良好的情况下,垫料消毒是关键,最好是先将垫料消毒好之后再投放入鸡舍。

1.3.3 孵化场检测结果超标

孵化场的环境监测中,种蛋往往在消毒前细菌污染严重,绒毛、软化水和加湿器用水的细菌总数常常超标,这是导致生产中商品雏鸡早期死淘较高的一个重要原因,这提示我们应严格控制孵化场的环境卫生。终止胚或弱雏检出细菌后

收稿日期:2009-07-09

修回日期:2009-09-10

可进行药敏试验, 以此作为种鸡和商品鸡用药的参考。

2 细菌分离培养及药敏试验

主要用于对剖检后的病死鸡、孵化场终止胚或弱雏分离培养细菌, 然后做药敏试验以指导临床用药。

2.1 细菌分离培养

临床上常见的致病性细菌主要有大肠杆菌、沙门菌、葡萄球菌和绿脓杆菌等。常用的培养基主要有营养琼脂、血液琼脂、麦康凯培养基、伊红美蓝培养基、三糖铁培养基、DHL 培养基和 SS 培养基等。应在了解疾病临床表现和剖检主要病变后, 根据对疾病的初步判断, 选择适宜的培养基以及培养条件培养, 例如培养温度、培养时间、是否需要厌氧环境等。通常使用营养琼脂或血液琼脂加一种选择性培养基进行培养。

2.2 药敏试验

常用的药敏试验方法有纸片法和试管法等, 其中纸片法简便易行, 应用广泛。

2.2.1 药物敏感性与抑菌圈的关系

药物敏感性与抑菌圈的关系见表 3。

表 3 药物敏感性与抑菌圈的关系

敏感性	不敏	低敏	中敏	高敏	极敏
抑菌圈(mm)	0	<10	10~14	15~20	>20

2.2.2 注意事项

进行药敏试验的培养基厚度以 5~6 mm 为宜, 培养基内应尽量避免有钙、镁离子等抗菌药物的拮抗物质; 根据细菌生长的多少选择挑取菌落, 一般要两次取菌密集划线, 如取菌太多, 抑菌圈将变小; 切勿将杂菌当做分离菌, 这将造成所选择药物无效; 培养基接种细菌后以 37℃ 培养 8~18 h 为宜。

药物的浓度和总量直接影响抑菌试验的结果, 需精确配制。商品药应严格按照其推荐治疗量配制。

应用药敏试验的结果时要综合考虑敏感药物的投药途径、作用方式、经饮水后在肠道内的吸收率、药物的副作用和价格等诸多因素。

对于出口企业而言, 药残控制是首要任务, 应严格遵循“兽医处方制”。在应用药敏试验的结果时除了考虑药物的敏感性和吸收率外, 还要考虑

到药物休药期的问题, 同时, 种鸡用药后经卵传递给商品代的可能性也不可忽视。

3 免疫监测

免疫监测是指通过有计划的测定血清抗体水平, 明确及评价人工免疫的实际效果, 以确定再次免疫的时间和措施。有一定规模的现代化养鸡企业都应该强化自己的防疫体系, 在科学的免疫监控指导下开展鸡场的生产和疾病控制, 这是鸡场生产成功的重要保障。

3.1 免疫监测的意义

我们可以在免疫监测结果的指导下开展对当地流行病学的调查工作, 可以评价鸡群经免疫接种后的免疫效果, 同时抗体的阴阳性或高低变化还是疫病诊断的重要依据。

3.2 常用检测项目及方法

常用检测项目及方法见表 4。

表 4 常用检测项目及方法

检测项目	常用方法
ND、AI(H5、H9)、EDS、IC	血凝抑制试验(HI)
IBD、MD、Reo、ILT	琼脂扩散试验(AGP)
IBD、IB、CIA、AL、MG、RE、Reo	酶联免疫试验(ELISA)
MG、MS、P/T	平板凝集试验(SPA)

3.3 检测频率及采样数量

一般认为, 活苗免疫后 2 周到达抗体高峰, 油苗免疫后 3~4 周到达抗体高峰, 免疫时采血以及免疫后 3~4 周采血可正确评价免疫的效果。对于健康鸡群可每 4 周检测一次, 对于发病的鸡群, 可采集发病后 7~10 d 的样品进行检测。可以按每个舍 0.6% 的比例采样, 但每舍不得少于 15 份, 常规采样 20~30 份即可。

3.4 影响检测结果的因素

3.4.1 试剂因素

所用抗原应与疫苗毒株相符, 而且不同批次的抗原间存在差异, 即使同一批次的抗原, 随着时间延长, 其降解速率也会加快。当抗原的批次或生产厂家发生改变时, 应首先与原来用的抗原做检测抗体对比试验后才能正式使用。

HI 试验用红细胞最好由 SPF 鸡或无/低抗体鸡采血制备; 若红细胞浓度偏低, 其 HI 结果将偏高, 若红细胞浓度偏高, 其 HI 结果将偏低。一般以 1% 的红细胞浓度为宜。

冬季采血后尽量将采血管先置鸡舍内 30~60 min,

以利血清析出,然后可再置冰箱内保鲜存放。待送至化验室后应离心后再取血清检测,不宜直接使用自然析出的血清进行检测。

HI 试验中的稀释液最好选用高压灭菌后 pH 值在 7.0~7.2 的 0.01 mol/L PBS 等渗透缓冲液,以消除 pH 值变化对检测结果的影响。

3.4.2 实验时的温度

一定条件下,随温度的升高,HI 结果也会相应升高。一般以室温为宜。

3.4.3 实验器具的因素

HI 实验时,“U”形反应板与“V”形反应板相比,更易观察病毒凝集红细胞的情况,从而更能反映鸡群的真实抗体水平。

3.4.4 人为误差

不同人员的实验操作即使步骤完全一样也会导致试验结果出现误差,在条件充足的情况下,最好由同一人员完成同一项目的检测,以利于对鸡群抗体水平的纵向比较。

3.5 注意的问题

免疫监测在保证样品质量和采样数量的前提下,还要有时间连续性和阶段连续性,这有利于开展同一批次间的纵向比较以及不同批次间的横向比较。

任何一个血清试验的开展都应设立对照组,这是试验开展的前提。不设定对照的试验,测定的结果不具备说明意义。

常规血清学检测的结果仅代表鸡群的体液抗体(循环抗体 IgG)水平,而对 ND 和 IB 等疾病来说,其活苗免疫后产生局部免疫力的分泌型抗体 IgA 和 IgM 不能被常规方法检测出来。因此用 HI 结果来评价其抗体水平的高低有一定的局限性。

高母源抗体不仅对 ND 野毒的保护力有限,还对 ND 活苗或灭活苗都有很明显的干扰作用,但若把免疫提前到 1 日龄,则可大大提高鸡只对野毒的抵抗力,这说明对鸡群做 1 日龄免疫是很有必要的。同时,如果鸡群免疫 ND 后两周左右,其 ND-HI 升高 2 个滴度以上,说明免疫成功;如果 ND 抗体无明显提升,就表示免疫失败,此时应尽快从鸡群的健康状况、疫苗质量和免疫操作等方面寻找原因,设法补救。

一般常用的 ND 和 AI 参考抗体水平为:

ND-HI 临界保护值 $2^6 \sim 2^7$, 产蛋鸡至少在 2^9 以上;AI-H9 临界保护值 $2^6 \sim 2^7$, 产蛋鸡至少在 2^8 以上;AI-H5 临界保护值 2^7 , 产蛋鸡的抗体水平应更高。一旦鸡群的抗体低于临界值就应及时加强免疫。

肉鸡或育雏的种鸡/蛋鸡感染 ND 野毒后 10 d, ND-HI 可异常升高 5 个滴度到 2^{10} 。产蛋鸡群感染 ND 野毒后,一般 7~10 d ND-HI 抗体可异常升高 2 个滴度,感染 3 周时可升高 3 个滴度,感染 6 周时可升高 5~6 个滴度至 2^{16} 或以上。在采用全进全出制、生物安全良好的饲养场,往往存在 NDV 的滚动感染,即一个或两个鸡舍先发病,然后逐渐蔓延感染其它舍,因此整个鸡场常常要待 1~3 个月后才全群感染。生产中,鸡群一旦发生 ND,便不宜再进行紧急免疫接种,因为此时再做紧急免疫不仅无效,免疫应激还会加重疫情。这种情况下应首先对(假定)健康鸡群实施紧急免疫,再对发病鸡群采取治疗措施。在操作良好的情况下,3 倍量的 ND 活苗紧急饮水免疫也能取得很好的效果。

IBD 的免疫受其母源抗体的影响很大。对高母抗鸡群而言,即使用中等偏强毒力疫苗比常规免疫程序推迟 3~4 d 免疫,仍可发生免疫失败。规模化鸡场可使用 ELISA 法检测 1 日龄雏鸡的母源抗体衰减情况,在 ELISA 抗体值 500 时可以用中等偏强毒力疫苗免疫,在 ELISA 抗体值 300 时可以用中等毒力疫苗免疫,以此来确定适当的免疫时机可以大大降低免疫失败的几率。

一般在种鸡 12~16 周龄时检测 CIA 抗体的转阳率,可以用 ELISA 法。若经检测鸡群已被野毒感染,则不用再进行免疫;若经检测,同一鸡场内有的鸡舍抗体阳性,有的鸡舍抗体阴性,则可从阳性舍取一部分鸡只或垫料放入阴性舍使阴性舍的鸡群自然感染;若经检测,整个鸡场的鸡群 CIA 抗体均为阴性,则须在开产前至少 6 周对鸡群免疫 CIA 疫苗。

MG 和 P/T 的平板凝集试验结果容易出现假阳性,这通常与抗原质量、血清存放时间的长短、血清是否被反复冻融或是否被污染、鸡群是否接种过相关的灭活苗及鸡群是否存在大肠杆菌感染等因素有关,因此对检测结果的判读更应结合鸡群的临床表现来综合判断。需要注意的是:一般而

言, MG 的血清学阳性反应首次出现于 5~6 周龄, 而用 ELISA 法检测的 MG 灭活苗抗体与其对鸡只本身的保护力没有直接的相关性, 但可以大大降低 MG 的蛋传率; 对 P/T 而言, 血清学阳性反应首次出现于 6 周龄左右, 随着性成熟的发展, 细菌活化, 阳性率不断增高, 35~40 周龄普遍出现一次阳性率高峰, 大龄种鸡的阳性率高于幼龄鸡, 强制换羽鸡高于一般周龄鸡, 而当 P/T 阳性比例过高 (超过 10%) 或出现强阳性时应投抗菌药物控制。

4 病理组织学方法

对于养鸡业而言, 病理组织学方法常用于肿瘤性疾病和可产生包涵体的病毒性疾病的初步诊断。

当前, 养鸡生产中常见的肿瘤性疾病主要有 MD、AL、AL-J 和 RE 四种, 而仅仅根据其临床症状和病理剖检变化很难区分病原种类, 此时往往要辅以病理组织学方法来帮助诊断, 其中石蜡切片的应用比较广泛。下面是这四种肿瘤组织在肝组织中的病理学区别见表 5。

表 5 四种肿瘤组织在肝组织中的病理学区别

类别	生长方式	致密度	瘤细胞分类	细胞均匀度与大小	H.E.染色特性
MD	浸润性生长	稀松	中、小淋巴细胞	大、小不一, 总体较小	胞核呈深紫色, 胞浆很少, 呈紫色
AL	结节性生长	致密	大淋巴细胞	均匀一致, 个体较大	胞核紫色, 胞浆呈淡紫色或暗红色。
J-AL	结节性生长	致密	骨髓细胞	均匀一致, 个体较小	胞核着色淡, 核仁呈紫色, 胞浆丰富呈淡红色
RE	结节性生长	较致密	网状内皮细胞	均匀一致, 个体最大	胞核着色淡, 核仁呈紫色, 胞浆较丰富呈暗红色

需要注意的是, 一些研究鸡肿瘤病的学者已用病原学和血清学方法证明一个鸡群甚至一只鸡可同时存在两到三种肿瘤性疾病病原感染的问题, 只有将病理学、病原学与血清学诊断相结合, 才能做出较准确的诊断。

综上所述, 对规模化养鸡生产而言, 兽医实验室检测技术是一种重要手段, 如果实验室检测结

果与临床诊断紧密结合, 将可以帮助我们及时发现生产中的问题并寻找到相应解决方案。相信随着实验室检测方法更广泛地应用, 以及对其不断地研究, 它在现代化的养鸡业中将发挥越来越大的作用。

致谢: 青岛正大动保中心孙荣华先生对本文提出了许多宝贵意见, 在此表示感谢!

(上接第 54 页)地使用, 否则使机体产生耐药性与药物残留等一系列问题。鉴于在防治鸽毛滴虫病中出现的实际问题, 中国传统中兽药为解决以上问题带来了新的希望。中药有诸多优点: 不易引起耐药性、毒副作用极小、目前还未发现残留。在兽医临床中, 有见文献报道运用杀虫、清热、消炎、解毒之功效的中药组方来防治鸽毛滴虫病, 从多方面发挥中药的功效, 并增强机体免疫功能, 防治鸽毛滴虫病, 提高鸽的生产性能与养鸽的经济效益。

本报道中使用的“滴虫净”中药散剂是由具有杀虫、清热、消炎、解毒等功能的十多味中药组成。闹洋花、青蒿、使君子、蛇床子并用燥湿杀虫, 为治疗滴虫之要药; 马钱子、黄芩、苦参消除湿热祛风杀虫, 白藓皮、防风、五倍子三药合用, 具有杀虫、收敛之功^[2]。诸药合用, 共奏驱虫、止血、除湿、导滞

之功效。根据“滴虫净”中药散剂在近 10 年超过 100 万对鸽毛滴虫病例临床防治试验资料统计显示, 其有效率达到 95% 以上, 其治愈率超过 80%。另外, 在平时种鸽饲养过程中, 每月给种鸽饲喂 2 次“滴虫净”, 每次按 0.6 g/对种鸽的剂量使用, 这样不仅能大大降低鸽毛滴虫病的发病率, 降低西药甲硝唑的使用量, 对于稳定种鸽产蛋率, 提高受精率有很大好处, 并提高乳鸽出栏率, 大大降低乳鸽感染鸽毛滴虫病机率, 避免了由于长时间多次使用甲硝唑, 造成在鸽体内残留而带来其它各种潜在的危害。

参考文献:

- 1 罗锋, 陈泽苏, 遂琴华, 等. 鸽毛滴虫病的研究进展 [J]. 中国兽医寄生虫病, 2007, 15(3): 51-54.
- 2 请青梅, 罗锋. 鸽毛滴虫病的综合防治 [J]. 养禽与禽病防治, 2006, 9: 41.