

毕志香,朱亚露,赵 阳,等. 山东省某地区肉鸡 H9 亚型禽流感与大肠杆菌混合感染的诊治[J]. 江苏农业科学,2018,46(3):163-165.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.03.042

山东省某地区肉鸡 H9 亚型禽流感与 大肠杆菌混合感染的诊治

毕志香,朱亚露,赵 阳,张元鹏,于晓明,揭鸿英,何家惠,于 漾

(江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏南京 210014)

摘要:对山东某地连片家禽专业养殖户送检的病死鸡进行流行病学调查;通过实验室病理解剖、细菌分离和药敏试验、鸡胚接种、血凝价测定、特异性检测、分子生物学鉴定等诊断手段,确诊临床主要表现呼吸道症状、拉稀、减食、精神萎靡的病死鸡为 H9 亚型禽流感与大肠杆菌混合感染。后建议对发病养鸡场进行彻底消毒,加强饲养管理;并在以后批次的肉鸡饲养中改变免疫程序,增加 7 日龄鸡群新城疫、H9 亚型禽流感、传染性法氏囊三联灭活疫苗免疫,饲养鸡群没有再发生禽流感与其他疾病的混合感染,取得了良好的防控效果。

关键词:H9 亚型禽流感;大肠杆菌;混合感染;实验室检测;诊治

中图分类号:S852.65⁺7 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)03-0163-03

2015 年 3 月中旬,山东省某地区连片家禽专业养殖户饲养的 817 肉鸡及青脚麻鸡先后发病并陆续死亡,主要表现呼吸道症状,有的拉黄、绿稀粪,减食,精神萎靡,发病率达 60%~70%,病死率达 15%~30%,使用多种抗生素治疗效果不明显。5 家专业户送检病死鸡共 60 余只。对所有发病鸡均解剖,观察病理变化,并采集病变脏器,肝、肺、肾、法氏囊及气管等,通过流行病学调查及实验室检测等方法进行诊断,现将确诊为 H9 亚型禽流感与大肠杆菌混合感染诊断结果报告如下。

1 发病情况

本次发病鸡为山东省某乡镇多个个体养殖户饲养的 817 肉鸡和青脚麻鸡,5 个养殖场饲养规模均为 8 500 只左右,24~38 日龄鸡发病严重。临床表现为精神沉郁、打堆、羽毛蓬松、缩颈垂翅、打盹、食量减少、咳嗽、张口呼吸、排粪异常,发病率 60%~70%,病死率达 15%~30%。经常规抗生素和抗病毒药治疗均无明显效果。

2 免疫程序

本乡镇的养鸡合作社使用统一的免疫程序为 7 日龄:ND-IB 点眼滴鼻;14 日龄:IBDV 活苗免疫;21 日龄:ND 弱毒疫苗点眼滴鼻。

3 解剖病理变化

共解剖病死鸡 60 只,剖检病变为纤维索性心包炎、肝周

炎(38/60);气囊浑浊、增厚(12/60);气管内有较多黏液(40/60),气管和支气管交汇处有白色干酪样栓塞物(40/60);肌胃和腺胃交界处有出血(20/60),腺胃粘膜溃疡、脱落(20/60);脾脏坏死(10/60);法氏囊萎缩(45/60);肾脏肿大(40/60)。

4 实验室诊断

4.1 细菌分离和药敏试验

4.1.1 细菌分离和培养特性观察 无菌采取病死鸡的肝脏组织,划线接种到普通营养琼脂和麦康凯琼脂上,37℃培养 24 h,可见在普通营养琼脂培养基上生长成突起、湿润、乳白色圆形菌落,麦康凯琼脂上形成光滑、湿润、圆形、红色菌落;挑取红色菌落经革兰氏染色镜检,可见两端钝圆的红色短小杆菌。对菌落进行纯化培养后进一步做生化试验,结果显示分离菌能迅速发酵乳糖、葡萄糖、甘露醇,产酸产气,产生靛基质等,符合大肠杆菌的生化特征。

4.1.2 药敏试验 选取麦康凯琼脂上长出的红色菌落,均匀划线于麦康凯平板,再放置相应的药敏试纸,37℃培养,24 h 后观察测量抑菌圈的大小并记录结果。判定标准采用美国临床检验标准委员会(NCCLS)标准。结果对头孢唑肟钠高度敏感;对头孢噻吩钠、丁胺卡那霉素轻度敏感;对阿莫西林、氟苯尼考、恩诺沙星、强力霉素、氨苄青霉素不敏感(表 1)。

4.2 病毒分离

4.2.1 鸡胚接种 分别将 5 个养殖户的病死鸡的肺脏、气管用剪刀剪成 1 cm³ 左右大小,按 1:5(体积比)比例加入无菌 PBS 溶液,用研钵磨成糊状后,再加入终浓度为 2 000 U/mL 双抗溶液,混匀后置于 4℃ 冰箱作用 2 h 后,反复冻融 3 次,12 000 r/min 离心 10 min,取上清再用 0.22 μm 的一次性滤器过滤,取滤液尿囊腔和尿囊膜接种 10 日龄 SPF 鸡胚,0.2 mL/胚,每个样品接种 5 枚。鸡胚接种后弃去 24 h 非特异性死亡胚,大部分鸡胚在 72~96 h 死亡,收获死亡胚,收集其尿囊液,取出死胚发现胚体全身弥漫性出血,而尿囊膜没有

收稿日期:2016-09-14

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(编号:201303046)。

作者简介:毕志香(1979—),女,山东诸城人,硕士,助理研究员,主要从事禽用疫苗研究。E-mail:zhixiangbi@163.com。

通信作者:于 漾,硕士,助理研究员,主要从事禽用疫苗研究。

E-mail:yangyu1719223@163.com。

表1 药敏试验结果

抗生素种类	敏感性
头孢唑肟钠	+++
头孢噻吩钠	+
丁胺卡那霉素	+
阿莫西林	-
氟苯尼考	-
恩诺沙星	-
强力霉素	-
氨基青霉素	-

注:高度敏感标记为“+++”;中度敏感标记为“++”;轻度敏感标记为“+”;不敏感标记为“-”。

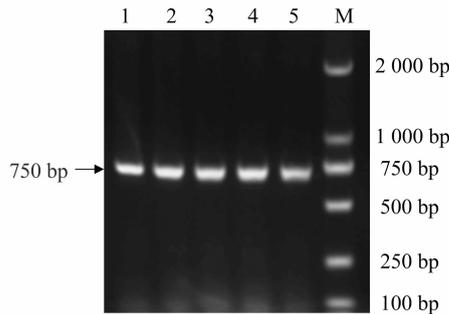
增厚等病理变化。

4.2.2 尿囊液的血凝价测定 按现行兽药典中的方法进行微量血凝试验。取上述各组死亡鸡胚的尿囊液,逐组检测其血凝价,结果血凝价均为 $7\log_2 \sim 9\log_2$ 。

4.2.3 尿囊液的特异性检测 按现行兽药典中的方法进行微量血凝抑制试验。将5家养殖户病死鸡病料接种鸡胚后收获的尿囊液,分别与H5、H7和H9亚型禽流感、鸡新城疫、鸡减蛋综合症标准阳性血清进行红细胞凝集抑制试验。结果显示,所有样品均与H5和H7亚型禽流感、鸡新城疫、鸡减蛋综合症标准阳性血清呈阴性反应,仅与H9亚型禽流感血清呈

阳性反应,HI抑制效价为 $8\log_2 \sim 9\log_2$ 。

4.2.4 分子生物学鉴定 用RT-PCR法,分别对5个养殖户病死鸡病料接种鸡胚收获的尿囊液进行H5N1、H9N2、新城疫、传染性支气管炎4种病原核酸检测,结果显示,H5N1、新城疫、传染性支气管炎病原为阴性,H9亚型禽流感病原为阳性,均扩增出700 bp的目的片段(图1)。将扩增的5株H9亚型禽流感病毒的HA基因进行测序,结果5株病毒的核酸序列完全相同,与国内2014年、2015年公布的H9N2流行毒株同源性高于98.8%且处于进化树的同一分支上(图1、图2、图3)。



1—1号养殖户样品; 2—2号养殖户样品; 3—3号养殖户样品; 4—4号养殖户样品; 5—5号养殖户样品; M—Marker DL2000

图1 H9亚型禽流感分离毒株PCR产物电泳结果

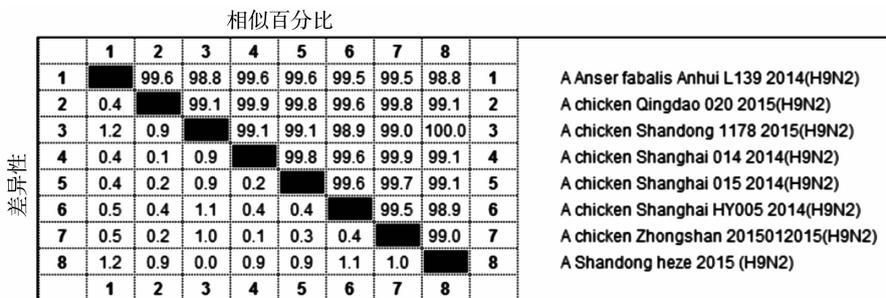


图2 H9亚型禽流感分离毒株同源性比较

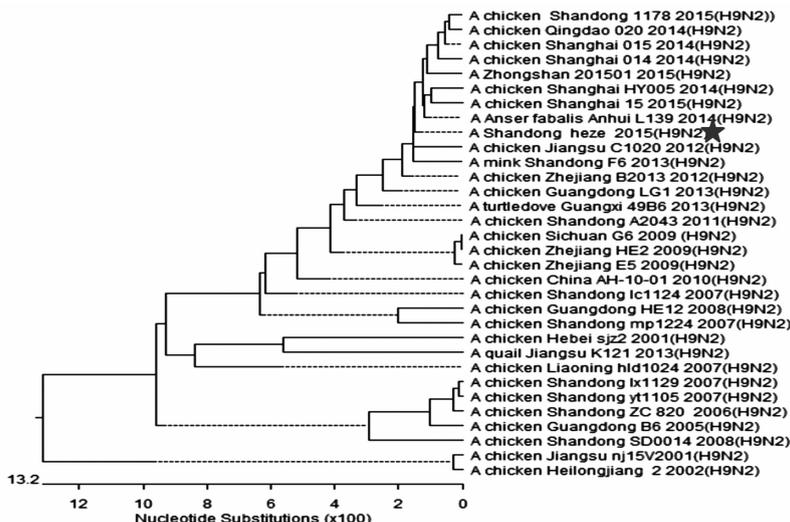


图3 H9亚型禽流感分离毒株进化树分析

4.2.5 IBD琼脂扩散试验 将发病鸡萎缩的法氏囊组织按1:3(体积比)的比例加入无菌PBS溶液研磨成糊状、冻融3

次,8 000 r/min离心10 min。取上清,用琼脂扩散试验检测法氏囊组织中是否含有法氏囊病毒,结果琼脂扩散试验均为

阴性。

5 结论

根据流行病学情况调查、临床症状和病理变化观察以及实验室诊断,分析判定该养殖户鸡群为 H9 亚型禽流感和大肠杆菌混合感染。

6 防治措施

6.1 防疫

及时调整免疫程序,在 7 日龄新城疫、传染性支气管炎二联弱疫苗点眼滴鼻免疫的同时,增加新城疫、H9 亚型禽流感、传染性法氏囊三联灭活疫苗皮下注射免疫。免疫程序调整后 28 d,对鸡群采血,检测 ND、H9 和 IBD 抗体水平。由表 2 可知,在调整免疫程序后,ND、H9 疫苗的抗体水平明显上升,所有鸡的 H9 抗体效价平均为 $7.6\log_2$,ND 抗体效价平均为 $6.6\log_2$ 。而 IBD 琼扩抗体效价平均为 $2.7\log_2$ 。

表 2 ND、H9 HI 抗体水平及 IBD 琼扩抗体水平

组别	H9 抗体效价 (\log_2)	ND 抗体效价 (\log_2)	IBD 抗体效价 (\log_2)
1	8	6	2
2	7	6	2
3	7	6	2
4	9	7	2
5	8	6	4
6	7	6	2
7	8	7	2
8	7	7	4
9	7	8	2
10	8	6	2
11	9	7	4
12	7	6	4
13	8	7	2
14	7	7	2
15	7	7	4
平均值	7.6	6.6	2.7

6.2 治疗

整个鸡群在饲料中添加高度敏感药物头孢喹肟钠,按每吨饲料 500 g 拌料,并在饲料中添加高质量的电解多维。

6.3 清场与消毒

对已发病的鸡场适时全部清场,对鸡场内的主干道及鸡舍内的过道用 20% 的石灰乳进行全覆盖消毒。在饲养过程中应注意饲养环境的改善,寒冷季节保温的同时还应注意通风,饲养密度不能太大,10~11 只/ m^2 ,以免鸡舍的有害气体浓度过大刺激肉鸡呼吸道,使呼吸道疾病加剧。

发病养鸡场通过饲喂敏感药物头孢喹肟钠,发病及死亡鸡有所下降;新进雏鸡前全场进行严格消毒并调整免疫程序,相关疫苗抗体水平明显提高。新发病例逐步减少,整个区域的养鸡场状况逐渐平稳。

7 小结与讨论

7.1 H9 亚型禽流感疫苗免疫的重要性

H9 亚型禽流感病毒属于低致病性禽流感病毒,主要侵害

鸡的呼吸系统,是当前危害肉鸡的主要疫病之一^[1]。H9 亚型禽流感病毒隐性感染存在一定的普遍性,单独感染 H9 亚型禽流感,没有明显的临床表现,当存在某些致病因子或发生重大应激时,H9 亚型禽流感就表现出巨大的危害,例如,H9 与新城疫、传染性支气管炎、传染性法氏囊病毒、大肠杆菌以及霉菌毒素等的混合感染^[2]。H9 亚型禽流感与大肠杆菌混合感染多年来就有不断的报导^[3-5],特别是在肉鸡饲养过程中,养殖户存在侥幸心理,担心注射油苗影响出栏时鸡肉的品质而不免疫禽流感疫苗,若饲养环境较差,H9 与大肠杆菌的混合感染就比较常见,势必引起很大的经济损失,因此应该重视并严格认真做好 H9 亚型禽流感疫苗的免疫,特别是在禽流感的高发季节(冬春、秋冬交替季节)更要加强 H9 亚型禽流感疫苗的免疫接种。

7.2 传染性法氏囊疫苗的免疫

传染性法氏囊活疫苗多在肉鸡 14 日龄进行免疫,由于现在采用的疫苗多是中等毒力的活苗,免疫后 4 d 法氏囊开始萎缩,引起鸡的免疫抑制^[6],因此在活苗免疫后而抗体未产生前要增强鸡体的抵抗力,可以选用增强免疫的中药方剂进行保健^[7]以防免疫抑制引起其他病原的感染。另外,为了防止法氏囊活苗对机体免疫力的影响,可以选用法氏囊灭活疫苗。在本次案例中,建议养殖户改用法氏囊灭活疫苗,收到很好的效果。

7.3 加强饲养管理

大肠杆菌是一种条件致病菌,在冬春季节,鸡舍因过于要求保温而忽视了通风,造成鸡舍内病原微生物及氨气浓度过高,会诱发该病,因此应加强饲养管理,注意环境通风。

7.4 抗菌药物的正确使用

当前,由于抗菌药物在肉鸡养殖中的大量使用,很多细菌已经对大部分常规抗生素产生广泛耐药性和多重耐药性^[8],因此,应定期对致病性细菌进行抗生素敏感性检测,以选取有效的抗菌药物。

参考文献:

- [1]王泽霖,刘岩,李建丽,等. H9N2 亚型禽流感病毒抗原性变异的研究[J]. 中国兽医学报,2007,27(3):351-354.
- [2]徐京生. 商品肉鸡禽流感与其他疾病混合感染的分析[J]. 兽医导刊,2016(6):33-35.
- [3]谭红,张汝,常志顺,等. 蛋鸡大肠杆菌和 H9 亚型禽流感病毒混合感染的诊治[J]. 云南畜牧兽医,2014(4):8-9.
- [4]刘香敏,纪鸿翔,王建琳,等. 山东省部分地区鸡源大肠杆菌与低致病性 H9 亚型禽流感病毒混合感染的调查[J]. 黑龙江畜牧兽医,2016(2):88-90.
- [5]覃军,卢斌. 肉鸡 H9N2 禽流感并发大肠杆菌病的诊治[J]. 兽医导刊,2013(2):63.
- [6]杨恒东,刘学贤,高崧. 鸡传染性法氏囊病中等毒力活疫苗对 H9 亚型禽流感灭活疫苗体液免疫应答影响的研究[J]. 中国畜牧兽医,2009,36(9):144-146.
- [7]史秋梅. 中草药免疫增强剂对鸡 T-淋巴细胞数量的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2005,33(7):21-24.
- [8]郑蓓,常维山. 2011 年我国部分地区鸡源大肠杆菌耐药性分析[J]. 山东畜牧兽医,2012(5):80-82.