

肉鸡 H9 亚型禽流感继发 细菌感染的诊断

李 晔 康佳楠 郭文洁*

沈阳工学院, 沈阳 113122

摘要 某肉鸡饲养小区的肉仔鸡死淘率一直偏高, 达到 5%~6%, 死淘高峰通常出现在 20~30 日龄, 死淘原因主要为不断散发的呼吸道病与腹泻病导致的肉仔鸡零星死亡不断或生长停滞, 投喂抗生素有一定的治疗效果, 但停药后易出现反复。经实验室检测发现该肉鸡群存在 H9 亚型禽流感病毒(H9AIV)感染, 导致鸡群细菌病不断发生。

关键词 肉鸡; H9 亚型禽流感; 继发细菌感染; 诊断

1 病理剖检

死淘肉仔鸡 20 多日龄, 个体大小及重量差异较大, 死淘鸡肛门处羽毛污秽黄染。剖检病死鸡气囊增厚, 表面有纤维素渗出物, 有心包炎和肝周炎, 喉头、气管黏液增多, 泄殖腔黏膜有出血条带, 有部分病死鸡肺脏淤血, 有灰白色坏死灶。

2 实验室检测

2.1 样品采集与运送

无菌采集 10 只死淘鸡喉气管、心、肺、肝、脾、肾和泄殖腔等组织, 每份组织样品单独盛放, 每只鸡采集的所有组织样品形成一个包装和编号, 包装好的样品 4 h 内冷藏运输到兽医实验室。

2.2 细菌学检验

心、肝、脾、肺等实质脏器涂片, 革兰氏染色镜检均发现 G⁻杆菌, 将麦康凯琼脂和 TSA 琼脂用直径 15 mm 的平皿制成 3 mm 厚的平板, 分成心、肝、脾、肺 4 个区。烧烙心、肝、脾、肺组织的表面, 用灭菌剪剪开, 心脏要剪至露出心内膜, 用接种环勺取少量各种组织, 按组织类别分别在麦康凯琼脂和

TSA 琼脂平板上分好的区内划线, 接种好的培养基置于生化培养箱中 37 °C 培养 24 h, 结果 9 份实质脏器样品在麦康凯琼脂培养基上分离到了粉红色不透明、圆整、隆起的中等大小菌落, 采用肠杆菌科微量生化管鉴定为大肠埃希氏菌; 2 份肺脏样品在 TSA 琼脂上分离到圆形、湿润、大而扁平的菌落, 细菌产绿色素, 48 h 后整个培养基变成暗绿色, 用非发酵菌微量生化管鉴定为铜绿假单胞菌。分离到的大肠埃希氏菌与铜绿假单胞菌纯化菌株如图 1、图 2 所示。

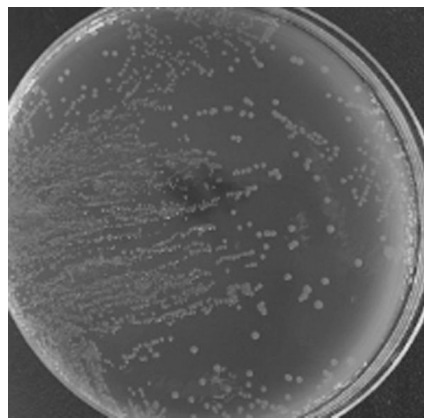


图 1 大肠埃希氏菌在麦康凯培养基上的粉红色菌落

收稿日期: 2020-03-28

* 通讯作者

李 晔, 男, 1997 年生, 本科在读。

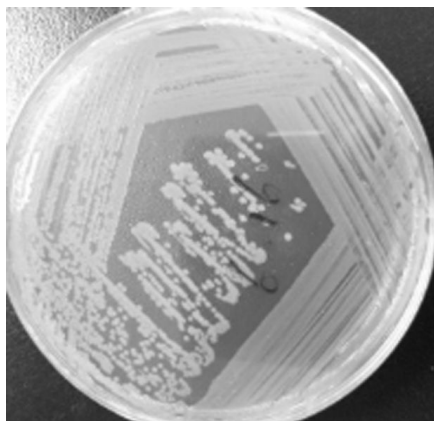


图 2 铜绿假单胞菌在 TSA 琼脂上产绿色素

2.3 分子生物学检验

核酸提取与纯化试剂、H9AIV 核酸检测试剂 (RT-PCR 荧光探针法) 均为中山大学达安基因股份有限公司提供。将喉气管和泄殖腔组织剪碎、研磨, 按 1:5 加入 PBS 制成匀浆, 将匀浆转入离心管中 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液转入 Eppendoff 管中准备进行病毒核酸提取和检测。Total RNA 提

取采用离心柱法: 取组织匀浆上清液 100 μ L, 加入裂解液 600 μ L, 充分颠倒混匀, 室温静置 5 min, 将液体转移至吸附柱中 (吸附柱要套上收集管), 13 000 r/min 离心 30 s, 弃去收集管中液体, 加入 600 μ L 洗液, 13 000 r/min 离心 30 s, 如此重复洗涤 1 次, 洗涤完成后离心去除残留的洗涤液。将吸附柱移入新的离心管中, 向柱中央加入洗脱液 50 μ L, 室温静置 1 min, 13 000 r/min 离心 30 s, 则离心管中收集的液体为洗脱的 RNA 溶液。H9AIV 核酸检测采用荧光 RT-PCR 方法, 一步法 RT-PCR 反应条件为: 50 $^{\circ}$ C 15 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 min, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 15 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s (在该点收集荧光, 荧光探针检测模式为 FAM), 40 个循环。结果判定: 检测样品的扩增曲线无对数增长长期或 C_t 值 > 37, 判为 H9AIV 阴性; 检测样品 C_t 值 \leq 37, 扩增曲线有明显的对数增长长期, 判为 H9AIV 阳性。经检测有 7 份样品 H9AIV 核酸阳性, H9AIV 核酸扩增曲线见图 3。

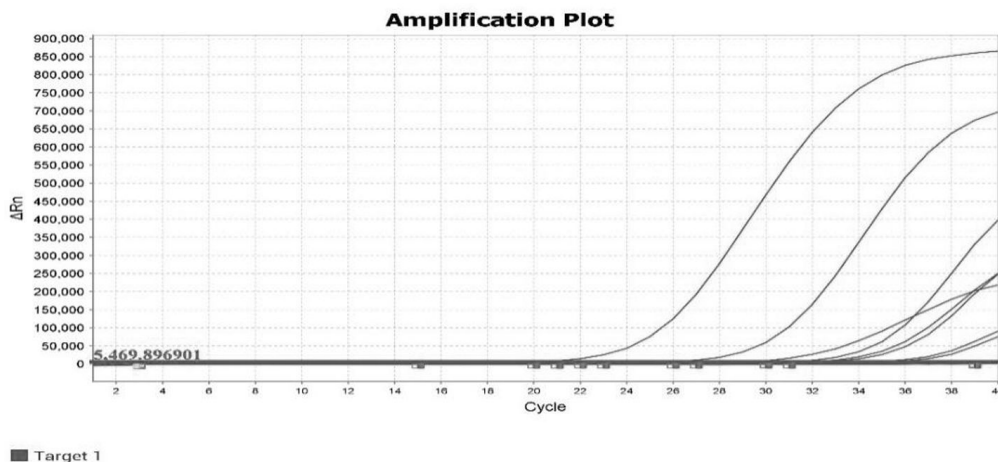


图 3 H9AIV 核酸荧光 RT-PCR 曲线

3 小 结

本肉鸡群死淘率偏高、投喂抗生素时好时坏的根本原因是存在 H9AIV 感染, 导致细菌病继发不断。本病例同时分离到了大肠杆菌和铜绿假单胞菌, 均为条件致病菌。单独感染 H9AIV 的鸡群通常发病率高, 但一般呈温和经过, H9AIV 往往在其他病原的协同作用下造成禽类大批死亡和产蛋严重下降。一般种鸡通过接种 H9AIV 灭活疫苗预防该病, 所产的商品鸡可获得较高水平的母源抗体, 10 日龄前获得保护, 商品蛋鸡可在 10 日龄、40 日龄、

23 周龄进行 3 次 H9 亚型禽流感 (H9AI) 免疫, 使蛋鸡在育雏、育成、产蛋期都保持良好的抗体水平。但是白羽商品肉鸡由于饲养周期短、饲养量大、鸡肉品质要求等原因无法进行 H9AI 免疫, 一旦感染 H9AIV 会导致鸡群免疫力低下、呼吸系统屏障损伤, 进而细菌病多发。投喂抗生素不能从根本上解决问题, 还会导致鸡肉制品抗生素残留以及耐药菌株的产生, 因此白羽肉仔鸡场对 H9AIV 关键是“防”, 尤其是肉仔鸡 11 日龄后, 母源抗体趋于消失时要密切落实隔离消毒工作, 在 H9AI 易发的冬春季加强饲养管理, 禽舍温度要保持在 18~22 $^{\circ}$ C,