

鸡传染性支气管炎·H9 亚型禽流感病毒与鸡毒支原体混合感染的诊治

江晓阳, 王艳, 刘俊镛, 刘旭, 高亚东, 孙景煜, 张越, 尹建华* (青岛汇丰动物保健品有限公司, 山东青岛 266109)

摘要 通过病理学解剖、细菌分离与培养、病毒分离鉴定、动物回归试验和分子生物学检测, 对山东省日照市某发病鸡场 5 只病死鸡进行诊断。病理学剖检显示, 病鸡支气管堵塞, 气管喉头出血, 肺出血水肿、颜色发黑, 输尿管有尿酸盐沉积, 气囊增厚、有干酪物渗出; 从发病鸡组织中未分离出细菌; 分子生物学检测结果发现, 鸡传染性支气管炎病毒、鸡毒支原体和 H9 亚型禽流感病毒检测结果均呈阳性。经初步推断, 发病鸡群存在鸡毒支原体隐性感染, 又继发感染鸡传染性支气管炎和 H9 亚型禽流感病毒, 多种病原混合感染造成鸡只死亡。建议该鸡场加强鸡传染性支气管炎和 H9 亚型禽流感防控措施, 投喂抗病毒类药物。

关键词 鸡传染性支气管炎; H9 亚型禽流感; 鸡毒支原体

中图分类号 S858.31 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2023)04-0073-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.04.017

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Diagnosis and Treatment of Mixed Infection of Avian Infectious Bronchitis Virus, Avian Influenza H9 Subtype Virus, *Mycoplasma gallisepticum*

JIANG Xiao-yang, WANG Yan, LIU Jun-yong et al (Qingdao Hui Feng Animal Health Products Co., Ltd., Qingdao, Shandong 266109)

Abstract Through the methods of pathological anatomy, bacterial isolation and culture, virus isolation and identification, animal regression test and molecular biological detection, the etiology of 5 dead chickens in a chicken farm in Rizhao City, Shandong Province was diagnosed. Pathological autopsy showed bronchial embolism, tracheo laryngeal hemorrhage, pulmonary hemorrhage, edema, dark color, urate deposition in ureter, thickening of air bag and exudation of cheese; no bacteria were isolated from the diseased chicken tissues; molecular biological tests showed that the avian infectious bronchitis virus, *Mycoplasma gallisepticum* and avian influenza H9 subtype were positive. It was preliminarily inferred that the cause of the chicken herd was the secondary infection of chicken infectious bronchitis and avian influenza H9 subtype on the basis of the invisible infection of *Mycoplasma gallisepticum*, and the casualties caused by the mixed infection of multiple pathogens. It is suggested that the chicken farm strengthen the immune prevention and control measures of chicken infectious bronchitis and avian influenza H9 subtype, and use antiviral drugs.

Key words Chicken infectious bronchitis; Avian influenza H9 subtype; *Mycoplasma gallisepticum*

鸡传染性支气管炎是由鸡传染性支气管炎病毒引起鸡的一种急性、高度接触性的呼吸道传染病, 其临床症状为呼吸困难、发出啰音、张口呼吸、咳嗽, 夜间关灯后症状尤为明显^[1-2]。如果病原不是肾病变型毒株或不发生并发症, 死亡率较低; 若是肾病变型毒株, 可能在肝脏等器官看到白色尿酸盐沉积, 死亡率在 20% 左右^[3]。

禽流感是禽流感病毒引起的一种对养鸡业危害较大的一种疾病, 根据不同致病性分为高致病性毒株、低致病性中弱毒株和非致病性无毒株^[4]。高致病性毒株导致的病死率可达 100%; 有些低致病性毒株导致的鸡死亡率为 0~15%, 另外饲养管理不当、鸡群营养状况不良以及环境应激因素都可能加重病情, 当发生并发感染时可使鸡群死亡率升高^[5]。

鸡毒支原体感染是鸡的一种慢性呼吸道病, 流行于全世界鸡场中, 在国内也普遍发生。根据血清学调查可知, 鸡毒支原体平均感染率为 70%~80%^[6]。感染鸡通常表现为气管啰音、咳嗽、流鼻涕、流眼泪, 一侧或两侧眼睑肿胀或黏合^[7]。一般来说, 鸡死亡率较低, 发生环境应激或者并发感染时鸡死亡率升高, 鸡毒支原体常与呼吸道有关的疾病伴发^[8]。

春秋季节肉鸡多发呼吸道疾病, 引起心衰、肺出血、水肿、发黑, 甚至死亡, 俗称“心肺病”或“黑肺病”, 引起这种疾病的病因尚不清楚。有人认为, 这是因为鸡场暴发过支原体

感染, 当时根除不彻底, 后期又感染了其他呼吸道疾病或细菌感染; 也有报道认为, 引起该病的主要病原为低致病性禽流感病毒, 又混合感染了其他细菌或病毒。大多数人认为, 该病为混合感染, 增加了该病的诊断难度^[9]。笔者通过病理学解剖、细菌分离培养、病毒分离鉴定、动物回归试验和分子生物学检测对山东省日照市某发病鸡场 5 只病死鸡进行病因诊断, 旨在为该病的防治与诊断提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验对象 山东省日照市某肉鸡场病死鸡 5 只、同一种鸡场 1 日龄雏鸡 20 只、10 日龄 SPF 鸡胚 15 枚。

1.2 试验仪器 电热恒温培养箱(型号 300, 购自龙口市先科仪器公司); PCR 扩增仪(型号 A300, 购自杭州朗基科学仪器有限公司); 电泳仪(型号 DYY-6C 型, 购自北京六一仪器厂); 凝胶成像系统(Bio-Rad GelDoc XR, 购自南京贝登医疗股份有限公司); 孵化器(购自山东德州旭升孵化设备研制中心)。

1.3 试验试剂 营养琼脂、麦康凯培养基、SS 琼脂, 均购自青岛海博生物技术有限公司; 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒、2× Accurate Taq 预混液, 均购自湖南艾科瑞生物工程有限公司。

1.4 试验方法

1.4.1 临床诊断和剖检。 询问并记录鸡群状态, 检查病死鸡体表并进行剖检, 无菌采集相关病变组织(留下部分肝脏), 将病变组织与生理盐水按 1:2 的质量比匀浆, 反复冻融 3 次

作者简介 江晓阳(1994—), 男, 山东烟台人, 从事动物传染病的防控和诊治研究。* 通信作者, 工程师, 硕士, 从事动物保健品的开发及应用研究。

收稿日期 2022-02-09

后离心取上清,备用(编号 01)。

1.4.2 细菌分离与培养。将无菌采集的肝脏按照细菌分离培养的方法接种到营养琼脂、麦康凯培养基、SS 培养基上,置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h。

1.4.3 病毒分离鉴定。实验组取 01 号取组织液,经 0.22 μm 滤器过滤后,接种于 10 枚 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔中。连续观察 72 h,每次间隔 8 h,记录死亡数。收取尿囊液以及胚体,供血凝试验以及分子生物学检测(编号 02)。

对照组取无菌生理盐水,经 0.22 μm 滤器过滤后,接种于 5 枚 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔中。连续观察 72 h,每次间隔 8 h,记录死亡数;收取尿囊液以及胚体,供血凝试验以及分子生物学检测(编号 03)。

1.4.4 动物回归试验。将 20 只雏鸡分成 3 组:一组 12 只,进行攻毒试验(试验组),另一组 5 只注射生理盐水(对照组),剩余 3 只(空白组)按相关病变组织无菌采集相应的组织,将组织与生理盐水按 1:2 的质量比匀浆后,反复冻融 3 次、离心,取上清备用(编号 04)。

取编号 01 组织液,对试验组 7 日龄肉鸡进行攻毒,攻毒方式为腿部肌肉注射和口服各 0.2 mL。取无菌生理盐水,对对照组 7 日龄肉鸡进行攻毒,攻毒方式为腿部肌肉注射和口服各 0.2 mL。攻毒后观察试验组和对照组鸡群的发育状态,连续观察 14 d,每天观察 3~4 次,于 15 日龄分别采集口、鼻以及泄殖腔棉拭子,试验组编号 05,对照组编号 06。

在观察过程中记录鸡群状态,及时处理死亡鸡只,无菌采集病料,将病料与生理盐水按 1:2 的质量比匀浆,反复冻融 3 次,离心后取上清,备用。第 15 天,对所有鸡只进行处理,无菌采集相关病料,试验组死亡鸡只编号 07、存活鸡只编号 08,对照组死亡鸡只编号 09、存活鸡只编号 10。



注:A.支气管栓塞;B.气管喉头出血;C.肺出血水肿发黑。

Note: A. Bronchial embolism; B. Trachea laryngeal hemorrhage; C. Pulmonary edema, bleeding and blackening.

图 1 病死鸡剖检结果

Fig.1 Autopsy results of dead chickens

2.2 细菌分离培养 在营养琼脂、麦康凯培养基、SS 培养基上,37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h 后,经观察未发现细菌菌落生长(图 2)。

2.3 病毒分离鉴定 试验组:接种鸡胚后,前 48 h 鸡胚发育正常,48 h 后鸡胚血管轻微脱落,64 h 鸡胚全部死亡。收取尿囊液,经血凝试验发现有血凝现象发生,血凝效价为 2⁶。

对照组:接种鸡胚后,鸡胚发育正常,无死亡;64 h 终止孵化,收取尿囊液后经血凝试验未发现血凝现象发生。

1.4.5 分子生物学检测。对上述所有编号的组织液以及尿囊液,根据核酸提取试剂盒说明书步骤提取核酸,并对提取的 RNA 进行反转录,得到 cDNA;用家禽常患呼吸道疾病病毒的引物进行扩增后,取 6~7 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,最后通过凝胶成像系统观察是否存在目的条带。

反转录体系:dNTP Mixture 2.0 μL、5×Buffer 4.0 μL、M-MLV 0.5 μL、Random Primer(nonadeoxyribonucleotide mixture; pd(N)₉) 1.0 μL、Recombinant RNase Inhibitor 0.5 μL、RNA 12.0 μL,总体积为 20.0 μL。反转录程序:30 ℃ 10 min,42 ℃ 1 h,4 ℃ 下保存。

PCR 扩增体系:ddH₂O 8.5 μL、2× Accurate Taq Mix 12.5 μL、上游引物 1.0 μL、下游引物 1.0 μL、DNA/cDNA 2.0 μL,总体积 25.0 μL。PCR 扩增程序:预变性 95 ℃ 5 min;95 ℃ 42 s,48~60 ℃ 42 s,72 ℃ 1 min,共 35 个循环;延伸 72 ℃ 10 min,4 ℃ 下保存。

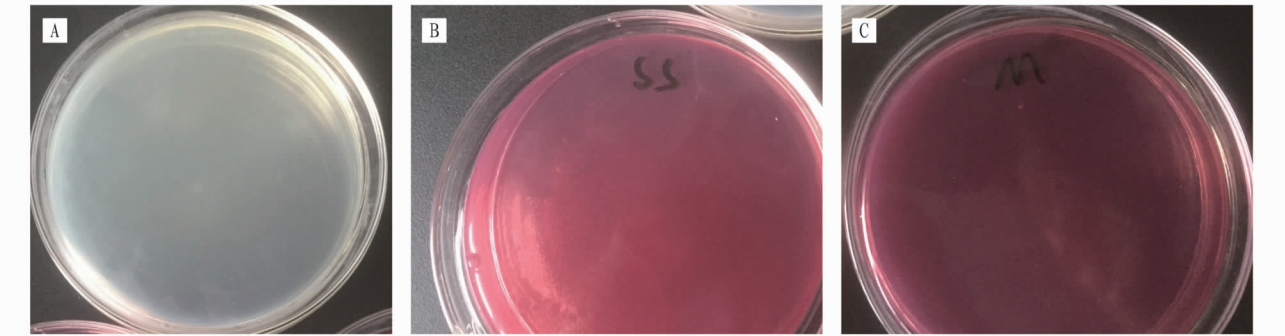
2 结果与分析

2.1 临床诊断和剖检 山东省日照市某鸡场突然发病,以呼吸道症状为主,经询问养殖场老板了解到该养殖场曾暴发过鸡毒支原体感染,经过一段时间净化后鸡群比较稳定,该批鸡苗进场前鸡场已彻底清洗消毒,鸡苗进场前免疫新城疫禽流感二联苗,7 日龄免疫鸡传染性支气管炎 4/91 QX 型二联减毒疫苗,前期鸡群发育正常,15 日龄个别鸡出现气喘,18 日龄鸡群出现咳嗽,关灯后尤为明显,并出现鸡只死亡,严重时死亡率高达 18%。对死亡鸡只进行病理学剖检,发现支气管栓塞、气管喉头出血、肺出血水肿发黑、气囊增厚且有干酪物、肝脏肿大、肾脏肿大、输尿管有尿酸盐沉淀、法氏囊肿大^[10](图 1)。

2.4 动物回归试验 攻毒前对试验雏鸡进行病理学剖检,未发现明显的病理变化。试验组试验前期雏鸡生长发育正常,14 日龄出现鸡只羽毛蓬松、精神萎靡,有呼吸症状;16 日龄死亡 3 只;17 日龄死亡 4 只;18 日龄死亡 2 只,剩余 3 只鸡未死亡,但发育迟缓,采食量及饮水量下降。

对试验组死亡鸡只进行剖检,发现脾脏肿大出血,胰腺出血,腺胃黏膜易脱落,胃壁增厚、法氏囊肿大、有黏液,肺水肿出血,气管喉头出血,胸腺出血,肾肿大出血,气囊增厚、个

别有干酪物。



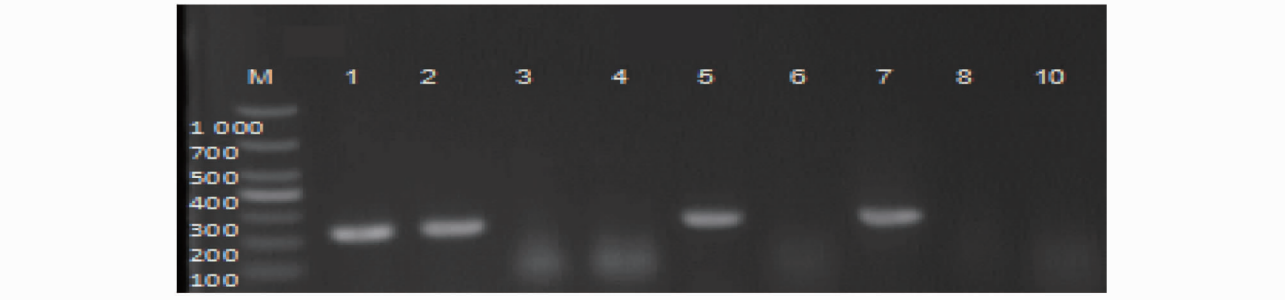
注:A.营养琼脂;B.SS 培养基;C.麦康凯培养基。
Note: A.Nutrient Agar;B.Salmonella Shigella Agar;C.Maconkey Agar.

图 2 细菌分离培养结果
Fig.2 Results of bacteria isolation and culture

对试验组未死亡鸡只进行剖检,其中 2 只鸡法氏囊肿大,另 1 只鸡组织器官正常;1 只鸡气囊有干酪物,肺出血,肝脏正常,肾脏出血,法氏囊肿大、有黏液,气管出血,肠道血管充血。

对照组鸡只未死亡,发育正常,病理学剖检未发现明显的病理变化。

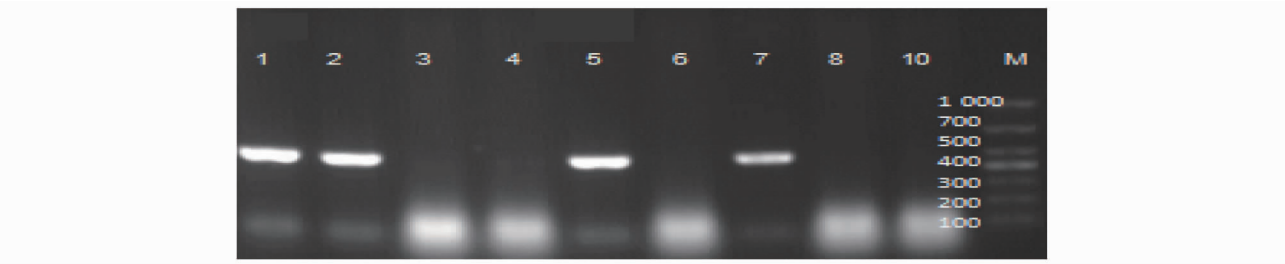
2.5 分子生物学检测 对试验中所有编号样品进行 PCR 检测,检测结果如图 3~6 所示。



注:M 为 DNA Marker 1 000;1.病死鸡组织液;2.试验组鸡胚尿囊液;3.对照组鸡胚尿囊液;4.空白组鸡只组织液;5.试验组口、鼻以及泄殖腔棉拭子;6.对照组口、鼻以及泄殖腔棉拭子;7.试验组死亡鸡组织液;8.试验组未死亡鸡组织液;10.对照组未死亡鸡组织液。

Note:M.DNA Marker 100 0;1.Tissue fluid from dead chickens;2.Experimental group chicken embryo allantoic liquid;3.Control group chicken embryo allantoic fluid;4.Blank group chicken tissue fluid;5.Cotton swabs from mouth,nose and cloaca of the experimental group;6.Control group cotton swabs from mouth,nose and cloaca;7.Tissue fluid of dead chickens in the experimental group;8.Undead chicken tissue fluid in the experimental group;10.Undead chicken tissue fluid in the control group.

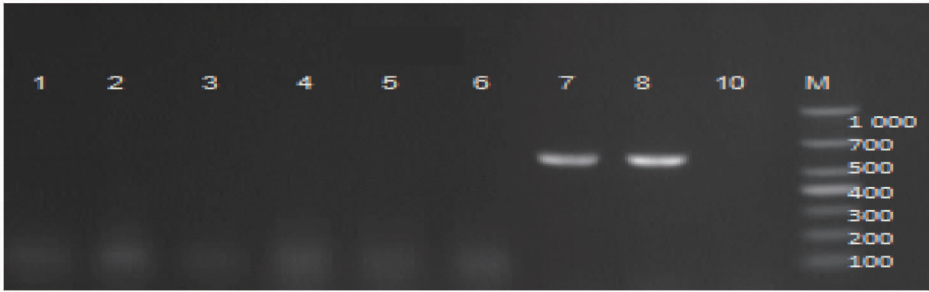
图 3 禽流感病毒 PCR 检测结果
Fig.3 PCR results of avian influenza virus



注:M 为 DNA Marker 1 000;1.病死鸡组织液;2.试验组鸡胚尿囊液;3.对照组鸡胚尿囊液;4.空白组鸡组织液;5.试验组口、鼻以及泄殖腔棉拭子;6.对照组口、鼻以及泄殖腔棉拭子;7.试验组死亡鸡组织液;8.试验组未死亡鸡组织液;10.对照组未死亡鸡组织液。

Note:M.DNA Marker 1 000;1.Tissue fluid from dead chickens;2.Experimental group chicken embryo allantoic liquid;3.Control group chicken embryo allantoic fluid;4.Blank group chicken tissue fluid;5.Cotton swabs from mouth,nose and cloaca of the experimental group;6.Control group cotton swabs from mouth,nose and cloaca;7.Tissue fluid of dead chickens in the experimental group;8.Undead chicken tissue fluid in the experimental group;10.Undead chicken tissue fluid in the control group.

图 4 H9 亚型禽流感病毒 PCR 检测结果
Fig.4 PCR results of avian influenza H9 subtype virus

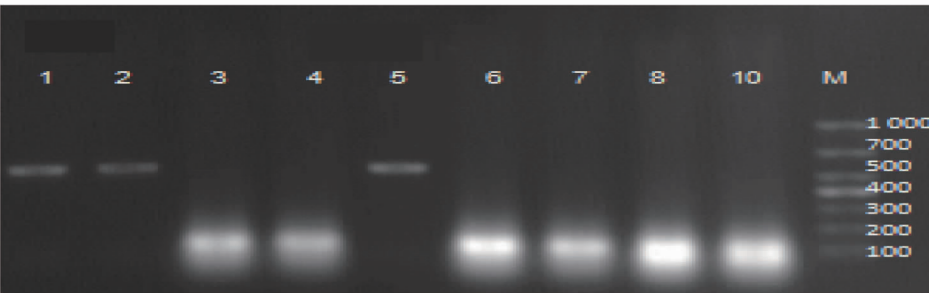


注:M 为 DNA Marker 1 000;1.病死鸡组织液;2.试验组鸡胚尿囊液;3.对照组鸡胚尿囊液;4.空白组鸡组织液;5.试验组口、鼻以及泄殖腔棉拭子;6.对照组口、鼻以及泄殖腔棉拭子;7.试验组死亡鸡组织液;8.试验组未死亡鸡组织液;10.对照组未死亡鸡组织液。

Note;M.DNA Marker 1 000;1.Tissue fluid from dead chickens;2.Experimental group chicken embryo allantoic liquid;3.Control group chicken embryo allantoic fluid;4.Blank group chicken tissue fluid;5.Cotton swabs from mouth,nose and cloaca of the experimental group;6.Control group cotton swabs from mouth,nose and cloaca;7.Tissue fluid of dead chickens in the experimental group;8.Undead chicken tissue fluid in the experimental group;10.Undead chicken tissue fluid in the control group.

图 5 鸡毒支原体 PCR 检测结果

Fig.5 PCR results of *Mycoplasma gallisepticum*



注:M 为 DNA Marker 1 000;1.病死鸡组织液;2.试验组鸡胚尿囊液;3.对照组鸡胚尿囊液;4.空白组鸡组织液;5.试验组口、鼻以及泄殖腔棉拭子;6.对照组口、鼻以及泄殖腔棉拭子;7.试验组死亡鸡组织液;8.试验组未死亡鸡组织液;10.对照组未死亡鸡组织液。

Note;M.DNA Marker 1 000;1.Tissue fluid from dead chickens;2.Experimental group chicken embryo allantoic liquid;3.Control group chicken embryo allantoic fluid;4.Blank group chicken tissue fluid;5.Cotton swabs from mouth,nose and cloaca of the experimental group;6.Control group cotton swabs from mouth,nose and cloaca;7.Tissue fluid of dead chickens in the experimental group;8.Undead chicken tissue fluid in the experimental group;10.Undead chicken tissue fluid in the control group.

图 6 鸡传染性支气管炎病毒 PCR 检测结果

Fig.6 PCR results of avian infectious bronchitis virus

3 讨论与结论

通过将病死鸡病料组织液接种在鸡胚上,可使鸡胚致死,并且有血凝现象发生,说明病料含有毒力较强的血凝性病原;动物回归试验发现,鸡死亡率达 75%,说明病毒致死性强;通过分子生物学检测确定鸡群发生了鸡传染性支气管炎病毒和 H9 亚型禽流感病毒混合感染。动物回归试验结果表明,试验组 H9 亚型禽流感病毒和鸡传染性支气管炎病毒检测结果呈阳性,说明试验组前期发生了鸡传染性支气管炎和 H9 亚型禽流感病毒排毒,后期死亡鸡未检出鸡传染性支气管炎病毒,H9 亚型禽流感病毒和鸡毒支原体检测结果呈阳性;未死亡鸡检测出鸡毒支原体;对照组未检出阳性病原。综上所述,该鸡场前期可能发生鸡毒支原体隐性感染,机体免疫力低下。使用鸡传染性支气管炎 4/91 QX 型二联减毒疫苗免疫后,随着时间的推移,疫苗毒力累计量增加,进一步损害机体免疫器官,导致继发感染 H9 亚型禽流感病毒,出现

大量鸡只死亡。

参考文献

[1] 包雪红.鸡传染性支气管炎和大肠杆菌混合感染的诊治[J].家禽科学,2020(10):61.

[2] 王正东,余弟和,张建军,等.鸡传染性支气管炎病毒的分离与鉴定[J].安徽农业科学,2012,40(8):4572-4574.

[3] 李俊花.一例鸡传染性支气管炎与大肠杆菌病混合感染诊治[J].畜牧兽医学:电子版,2020(13):133-134.

[4] 郭升伟.一例白羽肉鸡共感染 H9 亚型禽流感、滑液支原体病及细菌性疫病的诊治[J].福建畜牧兽医,2020,42(2):64-66.

[5] 苏振.一例蛋鸡 H9 亚型禽流感和大肠杆菌病混合感染的诊治[J].北方牧业,2017(21):27-28.

[6] 谢昊晋.鸡毒支原体流行病学调查及病例分析[D].扬州:扬州大学,2021.

[7] 王承宇,宣华.鸡毒支原体病研究进展[J].中国预防兽医学报,2000,22(S1):208-211.

[8] 史爱梅,张明富,李莲瑞.鸡毒支原体流行现状及防控方案[J].河南农业,2022(10):47-49.

[9] 郭可峰.肉鸡黑肺病的病理变化及治疗思路[J].北方牧业,2021(6):17.

[10] 杨崑,舒相华,王余磊,等.一例大肠杆菌和鸡传染性支气管炎混合感染诊治[J].现代畜牧兽医,2020(7):37-40.