

鸡传染性支气管炎的研究*

I. 广州地区鸡传染性支气管炎病毒的分离与鉴定

辛朝安**

陈天杰

(牧医系)

(广东农科院兽医所)

提 要

本文概述了广州地区某鸡场传染性支气管炎病的发生及流行情况并说明了该场的鸡传染性支气管炎病毒的分离与鉴定过程。

被分离出来的病毒自第二代鸡胚继代起,引起鸡胚产生萎缩等病变,在雏鸡气管内接种,经18~36小时,被接种的雏鸡出现气管罗音等IB病的临床症状。病毒对1%的鸡红细胞无凝集作用,并在鸡胚内干扰了B₁系新城疫病毒的血凝素的形成;病毒也可被人工诱发病的康复鸡免疫血清所中和。从临床观察及实验室检验的结果来看,可以证明,被分离出来的病毒为IBV。某鸡场的呼吸道病中,除CRD外,还有IB的存在。

前 言

鸡传染性支气管炎是由冠状病毒属的鸡传染性支气管炎病毒引起的,它是一种高度接触传染性的呼吸道疾病,仅发生于鸡^[1]。其特征是潜伏期短(18~36小时),传播迅速、病鸡咳嗽、喷嚏和气管发生罗音,产蛋鸡则可引起产蛋数量及质量的下降,雏鸡死亡率可高达25%,6周龄以上的鸡死亡率不高,但却可激发其它上呼吸道的疾病,造成不同程度的损失。

自Schalk与Hawn(1931)首次报道了他们在North Dakota发现本病之后,该病已先后报道发生于加拿大、英国、意大利、比利时、日本、印度等国家和地区,使养鸡业遭受很大的损失。

1972年我院邝荣禄教授在广东湛江国营湖光农场养鸡场进行禽病调查时,通过对病鸡群的临床观察,病理剖检、人工发病等方面的研究之后,首先提出该病在我国的存在。此后,自1978年以来,上海市农业科学研究所畜牧兽医研究所吴志达及北京市农业科学研究所畜牧兽医研究所艾国光等相继在国内一些鸡场中分离到传染性支气管炎病毒,从而进一步确定该病的存在。

* 本研究是在邝荣禄教授指导下完成的。又承刘镇明等老师、白云山机械化鸡场余金铭等同志的协助;上海市农科院畜牧兽医研究所吴志达同志、广州市畜牧兽医站钟镇光同志分别惠赠IBV-SF5, IBV-PMF, IBV-H52。本院电教室黄美青同志帮助拍摄照片,均深表谢意。

** 牧医系研究生

为了解该病在广东省的流行情况,我们从1981年4月份起,开始在广州市和佛山市进行调查,并在三个鸡场中分离到IBV。同时,对其中一分离病毒株进行了初步鉴定,现将研究情况分述如下:

病的发生

广州市某鸡场是广东省内办场较早、规模较大的机械化养鸡场,存栏量保持六万只左右,其中种鸡4000余只,一月龄内雏鸡为25000多只,肉用鸡及后备鸡约3万只。饲养管理水平较高,防疫措施较严格,因而至今尚未发生过鸡新城疫,鸡白血病及马立克氏病也极少见。但是,自建场以来,呼吸道病则从未间断过,虽然经常使用多种抗菌素进行预防和治疗,但一直未能将呼吸道病较好地控制下来。

该场的鸡呼吸道病一年四季均有发生,但以冬季为最严重,尤其一月龄内的雏鸡,损失更大。按全年育成率计算,1月龄雏鸡平均成活率为92%。1月份平均成活率79.7%,最低44%;2月份平均成活率85.7%,最低64.5%;3月份平均成活率79.6%,最低76.5%。在此期间,肉用鸡的成活率也低于全年的平均成活率。

该场雏鸡呼吸道病的发病情况大致是:1周龄左右少数雏鸡陆续出现呼吸道症状,9天龄用新城疫B₁系疫苗滴鼻后,12~14天龄可见明显呼吸道症状的雏鸡爆发性发病。发病率因群而异,按群随机抽样,其发病率最低20%,最高90%;至25天龄左右开始逐渐平息。12~20天龄,每天死亡率约1%,1月龄累计死亡率约8~10%。

病雏临床表现,猛力摇头、咳嗽、打喷嚏、呼吸道罗音,食欲减少,精神不振和羽毛松乱。病的早期一般少见流鼻涕及流眼泪。肉眼观察病变,上呼吸道内有卡他性、粘液性渗出物,支气管内有时出现干酪样分泌物等。

肉用鸡及种鸡群的临床症状及病变则比较复杂,这可能与合并或继发感染有关。种鸡有的产软壳蛋和畸形蛋(图1);蛋白呈水样,蛋黄与蛋白分离的现象也有发现(图2)。

多年来对出壳雏鸡,该场连续用0.1%土霉素拌料连喂3天,0.04%金霉素喂3~4天,0.04%四环素喂3~4天,对较大日龄(15天龄以上)病雏群以链霉素、庆大霉素等肌肉注射,但只能减少部分的死亡,呼吸道症状在用药期间及停药后均未完全消失。今年1981第一季度,我们在每吨饲料中加入金霉素600克、硫酸钠20至30磅,从一天龄起连续喂给一个月。试验群与对照群比较,成活率无明显的提高,呼吸道症状仍然出现。

我们认为:该场发生的呼吸道病病因之一是鸡败血霉形体感染鸡群,这已被我们通过血清平板凝集试验和试管凝集试验所证实。但雏鸡经过反复使用抗菌素防治,特别是用口服0.06%的金霉素饲料一个月,仍然出现呼吸道症状,从这一事实看来,可能存在着病毒性感染的呼吸道病^[1]。随后经病原的分离、鉴定,证明该场有鸡传染性支气管炎(该场分离的毒株称W株)。

病毒的分离和初步鉴定

(一) 病毒W株的分离

1. 病料的采集和处理: 选取经金霉素及链霉素治疗后仍有呼吸道症状的25天龄病雏, 剖检后取其支气管、肺及肾脏等组织为病料, 用灭菌研钵充分研磨, 以无菌生理盐水制成1:5悬液。然后按每毫升组织液加入青霉素和链霉素各1万单位, 置4℃冰箱内作用1小时, 离心取上清液作为接种材料。

2. 接种方法: 用上述上清液接种于9或10天龄健康鸡胚尿囊腔内, 每胚接0.2ml, 对照组接等量的生理盐水作对照。然后置37℃恒温箱培养。接种后24小时内死亡者废弃, 留种鸡胚在接种36小时后取出, 置于4℃冰箱内冷冻, 收获尿囊液(简称WF₁), 经无菌检验后置-20℃冰箱保存备用。其余鸡胚及对照鸡胚留到第8天, 观察胚体变化。自第二代起, 接种材料为上一代的鸡胚尿囊液。接种方法相同。

目前, 已继代第5代。第一代胚体无死亡, 胚体大小与对照组胚体无明显的差异。自第2代起, 开始陆续出现死亡, 并随代次的增加死亡胚数逐渐增多。死亡时间多数在72~168小时之间。第1—4代鸡胚变化情况见表一。

表1 W株IBV在鸡胚传代的适应情况

代次	接种胚数(个)	胚龄(日)	接种量C.C	接种部位	接种后胚体死亡时间								死亡率	胚体变化 (与对照组的比较)
					24小时	48小时	72小时	96小时	120小时	144小时	168小时	192小时		
WF ₁	5	10	0.2	尿囊腔									0/5	不明显
WF ₂	10	10	0.2	尿囊腔				3/10	1/10	1/10	1/10		6/10	稍萎缩
WF ₃	10	10	0.2	尿囊腔				3/10	2/10		1/10		6/10	萎缩
WF ₄	10	10	0.2	尿囊腔			2/10		3/10	2/10	1/10		8/10	明显萎缩
对照	10	10	0.2	尿囊腔									0/10	正常

注: 分母是接种胚数分子是死胚数

3. 胚体的肉眼病变: 第1代胚体无明显变化, 第2代胚体在接种后第3天即见胚体发育迟缓, 第5—8天则可见到鸡胚出现由IBV引起的典型病变, 即卷缩胚与侏儒胚(图3)。并随代次增加更趋明显, 萎缩胚只数也增加。照蛋时可见胚体变小, 活力减弱, 打开蛋壳见羊膜增厚, 表面较干燥, 紧贴于胚体上, 卵黄囊萎缩, 卵黄变浓, 羽毛发育不良, 呈僵化状, 两脚常抱住头部; 另一类侏儒胚, 其外型虽正常, 但因发育受阻而比对照组胚体短小。早期死亡的胚体皮肤有充血、出血现象, 后期死亡的或存活的胚体则无此种变化。剖检胚体的肉眼病变是: 肾脏和输尿管有多量尿酸盐沉积, 尿囊液增加。但绒毛尿囊膜均无特殊的变化, 经详细解剖接种W株第4代毒种, 第6~7天的胚

体15只，其中肝肿大占14/15，每只胚的尿囊液平均比对照组增多4.5ml，（对照组平均每胚尿囊液为7.8ml，接种组平均每胚为12.3ml）。

（二）W株对鸡红细胞的凝集试验

被检材料为上述病料经鸡胚接种第一代（WF₁）、第2代（WF₂）、第3代（WF₃）的尿囊液，按照鸡新城疫病毒的HA测定方法，分别测定WF₁、WF₂、WF₃对1%鸡红细胞的凝集作用，结果表明分离物（W株）对1%红细胞无凝集作用。见表2。

表2 W株IBV对鸡红细胞凝集试验

被检 分离物	稀释度	原 液	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	对 照	结 果
WF ₁	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	全部阴性
WF ₂	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	全部阴性
WF ₃	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	全部阴性

（三）W株在鸡胚内对B₁系新城疫病毒（NDV—B₁）的干扰试验

根据Raggi (1975) (1976) 的报道^[7]，利用IBV在鸡胚内对NDV—B₁的干扰作用，可以鉴定IBV。其操作方法是取发育正常的9—10天龄鸡胚20只，其中10只于尿囊腔接种IBV（或被检病毒），10只于尿囊腔接种等量的正常鸡胚尿囊液作对照，于37℃温箱中培养6小时，再于尿囊腔中接入NDV—B₁10⁻⁴×0.1ml（相当于100CEID₅₀）然后置于37℃温箱内再孵化48小时，冷蛋后逐只收获，并分别测定其NDV—B₁的红细胞凝集价（HA）。当对照组90%的HA在1:40以上，而被检组HA50%在1:20以下时，则证明被检物中有IBV存在。因为鸡传染性喉气管炎、鸡新城疫、鸡痘等可引起鸡发生呼吸道症状的病毒均无此干扰现象，所以此法特异性强，敏感性高，可作为IBV的鉴定方法之一。

按Raggi提供的方法，我们分别测定WF₂、WF₃、WF₄对NDV—B₁的干扰作用，结果每一试验组均有50%的HA小于1:20。而对照组的HA则100%在1:40以上。见表三。

除了检查W株的干扰现象外，我们对农业部兽医药品监察所引进的标准强毒株PM株（PMF₁）上海分离的S株（SF₅）（以上二个IB毒株是上海市农科院畜牧兽医研究所吴志达赠送），也作了测试，结果也明显地干扰了NDV—B₁的血凝价，可见W株在干扰NDV—B₁血凝价方面与已知的PM株、S株等IBV的特性是相同的。见表4。

（四）人工复制病例及病毒回收

1. 用原始病料复制病例：接种鸡胚用的病料的上清液经气管内注入的途径，接种来自华南农学院鸡场15日龄健康星布罗鸡6只，每只接种0.2ml；对照组的健康鸡4只，每只气管内注入正常鸡胚尿囊液0.2ml，接种后试验组和对照组均用含0.1%土霉素的饲料连喂1周。结果试验组在18—36小时内出现气管罗音等传染性支气管炎的变化。对照组观察14天均未见发病。见表5。

表 3 W分离株对B₁系NDV的干扰试验结果

HA 接种材料	不凝集	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	HA在1:20以下占比例	判 别 (阳性表明IBV存在)
接种WF ₂ (先) + B ₁ (后)	5/10	3/10	2/10						8/10	阳 性
接种WF ₃ (先) + B ₁ (后)	4/10	2/10	3/10	1/10					6/10	阳 性
接种WF ₄ (先) + B ₁ (后)	3/10	2/10	4/10	1/10					5/10	阳 性
接种B ₁ 对照						1/10	4/10	5/10	HA在1:40以上10/10	阴 性

注 1. 每组接种鸡胚数均为10个。2. 分子为该滴度的胚数, 分母为鸡胚总数。

表 4 PM株、S株IBV对B₁系NDV的干扰试验

HA 接种材料	不凝集	1:10	1:20	0:40	1:80	1:160	1:320	1:640	HA在1:20以下的比例	判 别 (阳性表示IBV存在)
PMF ₁ + B ₁	10/10								10/10	阳 性
SF ₅ + B ₁	10/10								10/10	阳 性
B ₁ 对照						1/10	4/10	5/10	HA在1:40以上10/10	阴 性

表 5 用原始病料复制病例试验结果

组 别	项 目 数 学	品 种	日 龄	鸡 数 (只)	潜 伏 期 (小时)	发 病 数 (只)	主 要 症 状	死 亡 数 (只)	康 复 情 况	
									康 复 时 间	数 量
试 验 组		星布罗	15	6	31小时内	6/6	摇头、喷嚏、咳嗽、罗音	0/6	4~8天	6/6
对 照 组		星布罗	15	4	/	0/4	/	0/4	/	/

2. WF₃鸡胚尿囊液人工发病试验: 第一次WF₃鸡胚尿囊液人工发病, 试验鸡来自华南农学院鸡场15天龄健康星布罗雏鸡。接种材料: WF₃鸡胚尿囊液。试验组雏鸡6只, 每只气管内接种WF₃鸡胚尿囊液0.2ml。对照组雏鸡4只, 每只气管内注入正常鸡胚尿囊液0.2ml。结果试验组中3只于接种后24小时发病, 出现气管罗音, 其余3只在36小时内气管内也出现罗音, 此后症状逐渐加重, 有咳嗽、摇头、喘气等呼吸道症状。个别还有张口呼吸(图4), 发病后3天内体温正常, 第3天死亡一只, 剖检见上呼吸道有浆液性渗出物, 肺充血, 肾稍肿大, 并有少量尿酸盐沉积, 其余存活病鸡均

于第5—8天症状逐渐消失，对照组未见发病。

第二次以WF₃鸡胚尿囊液为人工发病的接种材料，方法与第一次人工发病相同，结果与第一次相似。见表6。

3. WF₃人工发病后病毒的回收及鉴定：取经WF₃人工发病接种后第五天仍有典型IB临床症状的病鸡2只，分别按上述(一)病毒W株的分离方法接种鸡胚回收病毒，至第二代起胚体出现萎缩变化，对NDV-B₁的干扰结果也与上述(三)的结果相同，证明引起试验鸡发病的病原确为IBV。

(五) 交互免疫试验

1. 第一次试验：疫苗毒株是澳大利亚Websters厂的商品疫苗，经10天龄鸡胚继代后收获的尿囊液。攻毒材料为WF₃毒株及中监所引进的PM强毒株原液。

在第一次试验中，第一组取7天龄雏鸡5只，每只口服疫苗原液0.2ml，第二组取8只，每只口服100倍稀释的疫苗0.2ml，免疫后第14天连同对照鸡一起攻毒，每只鸡均以WF₃毒株 $10^{-1} \times 0.2\text{ml}$ 气管内注射攻击。结果第I组免疫保护为4/5，第II组免疫保护为6/8，对照组发病为4/5。

2. 第二次试验：材料方法同第一次，取经WF₃毒株人工发病后复康鸡4只，与同龄健康鸡4只作对照组，以PM毒株原液攻毒，每只气管内注入0.2ml。结果免疫组保护为3/4，对照组发病数为4/4。见表七。

表6 WF₃人工发病试验结果

试验 次序	组 别	品 种	日 龄	试验 鸡数 (只)	潜 伏 期 (小时)	发 病 数	主 要 临 床 症 状	死 亡 数	康 复	
									时 间	数 量
1	试验组	星布罗	15	6	20~36	6/6	咳嗽、摇头、气管罗音、张口伸颈呼吸	1/6	5—8天	5/6
	对照组	星布罗	15	4		0/4		0/4		
2	试验组	星布罗	19	6	21~36	6/6	咳嗽、摇头、气管罗音	1/6	5—7天	5/6
	对照组	星布罗	19	4		0/4		0/4		

(六) 中和试验

免疫血清：用WF₃接种6周龄健康星布罗鸡，人工发病后21天采血，分离血清并于56℃灭能30分钟，保存于4℃冰箱中。正常血清是从健康6周龄星布罗鸡采血，分离血清，并于56℃灭能30分钟，保存于4℃冰箱中。

病毒株：SF₈株，其CEID₅₀为 $10^{-5.75} \times 0.1\text{ml}$ ；H₅₂株，CEID₅₀为 $10^{-6} \times 0.1\text{ml}$ 。

参照Fontaine (1963) 的方法^[3]，在第一组中，将SF₈作 10^{-4} 稀释，取病毒稀释液分别与等量的W株免疫血清及正常血清混合，置37℃温箱中作用1小时，然后将上述

表 7 WF_3 株与澳洲株PM株交互免疫试验结果

项 目 试验 次序	组 别	日 龄 (天)	鸡 数 (只)	免 疫 接 种			攻 毒			结 果		
				毒 株	剂 量 (ml/只)	途 径	接天 种后 数	毒 株	剂 量	途 径	攻发 毒病 后数	免保 护数
1	试验Ⅰ组	7	5	IB活	原液0.2ml	口	14	WF ₃ 毒株	10 ⁻¹ × 0.2ml/只	气 管 内 注 射	1/5	4/5
	试验Ⅱ组	7	8	毒疫苗	10 ⁻² ×0.2ml	服					2/8	6/8
	对 照 组	7	5								4/5	
2	试 验 组	19	4	WF ₃			14	PM 毒株	原液 0.2ml/只	气注 管 内 射	1/4	3/4
	对 照 组	19	4								4/4	

二种混合物各接种10日龄鸡胚8只,接种途径为尿囊腔,每胚0.2ml。然后将鸡胚置 $37^{\circ}C$ 恒温箱继续孵化7天。接种后24小时至168小时内死亡并有IB病变的鸡胚,或于接种后168小时仍存活但剖检时发现胚体有IBV引起的肉眼病变者,判为受IBV所感染;在接种后第七天存活,且检查胚体正常者则判为受到保护。试验结果,接种 SF_5 毒株和W免疫血清混和物的8个鸡胚保护6/8,而接种 SF_5 毒株和正常血清混和物的8个鸡胚保护0/8。见表8。

在第二组中,所用的病毒是用 10^{-4} 稀释的 H_{52} 毒株,方法与第一组相同。结果接种 H_{52} 毒株和W免疫血清混和物的8个鸡胚保护7/8,而接种 H_{52} 毒株和正常血清混和物的8个鸡胚仅保护1/8。见表8。

表 8 血 清 中 和 检 验 结 果

项 目	第 一 组		第 二 组		其 它 对 照		
接种材料	$SF_5 + W$ 株免疫血清	$SF_5 +$ 正常 血 清	$H_{52} + W$ 株 免疫血清	$H_{52} +$ 正常 血 清	$SF_5 +$ 生理盐水	$H_{52} +$ 生理盐水	正常对照 不接种
结 果	6/8	0/8	7/8	1/8	0/8	0/8	8/8

注: 分子为保护数, 分母为接种鸡胚总数

从上述试验结果看来,由广州分离的W株免疫血清与 H_{52} 株及上海 SF_5 株IBV,在血清学上是有一定程度的交互免疫作用的。

讨 论

(一) 本文仅对鸡传染性支气管炎W株病毒进行初步的鉴定。从上述W株的分离,引起胚体的典型肉眼变化,不凝集鸡红血球,在鸡胚内对NDV-B₁的干扰作用,人工发病试验,交互免疫试验,病毒血清中和试验来看,W株的特性与PM株,及上海吴志达同志对S株的鉴定,与北京艾国光等同志对他们所分离出来的几个IBV分离株的鉴定结果是基本相符的,可以肯定W株是鸡传染性支气管炎病毒^{[5][2]}。

(二) 从广州某鸡场呼吸道病的流行情况,临床症状,病理剖检及病原的分离与初

步鉴定结果可以肯定该场确实存在着鸡传染性支气管炎病,并与CRD合并感染或相互继发,以致多年来,该场呼吸道病未能得到较好的控制。

(三)鸡传染性支气管炎在临床上与鸡新城疫、传染性喉气管炎、CRD、鸡传染性鼻炎等疾病都有相似之处,也可与上述疾病合并存在。所以,在发生鸡呼吸道疾病时,应注意鉴别,及早确诊,才能及时采取相应防治措施,减少损失。

(四)据文献报道,在IBV中有8个以上的血清型,彼此间是不能产生完全的交互免疫保护作用的。目前我们对W株的免疫原性及血清型仍未作精确的测定,但从交互免疫试验、病毒血清中和试验的结果看来,W株与H₅₂株是存在着一定程度的交互免疫作用的。在广州地区的IBV的血清型尚未确定之前,建议暂时先用H₁₂₀、H₅₂进行人工免疫,待血清型确定之后,再选用更合适的疫苗。

参 考 文 献

- (1) Broadfoot, D.I. 1956. Effects of Infectious Bronchitis in Baby Chicks, Poultry Science, 35: 757-762,
- (2) Cunningham, C.H. 1960. Recent studies on the Virus of Infectious Bronchitis. Am. J. Vet. Res. 21: 498-503.
- (3) Fontaine, M.P. 1963. A Simplified Technique for the Serum Neutralization Test in Infectious Bronchitis. Avian Diseases, 7: 203-207.
- (4) Gordon, R.F. 1977. Poultry Diseases, 106-112, Infectious Bronchitis.
- (5) Hofstad, M.S. 1978. Diseases of Poultry. Seventh Edition, 487-503, Avian Infectious Bronchitis.
- (6) Hungerford, T.G. 1969. Diseases of Poultry, 194-210, Uraemia or Cumming's Diseases.
- (7) Raggi, L.G. 1975. Identification of Infectious Bronchitis Virus by Interference with B-1 Isolant of Newcastle Disease Virus. Avian Diseases, 19: 334-342.

STUDIES ON INFECTIOUS BRONCHITIS IN THE CHICKEN

I. Isolation and Identification of its Causative virus in Guangzhou

Xin Chao-an

Chen Tian-jie

(Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine)

ABSTRACT

This article is an account of the occurrence of the epizootic situation of a respiratory syndrome in chickens and of the experimental methods for isolation and identification of the virus of infectious bronchitis on a poultry farm in Guangzhou.

In the experiments, after the second passage in chicken embryos,

the isolated virus caused the embryos to be dwarfed with other lesions. When using virus material to inoculate into the trachea of the chicks, tracheal rales were audible in 18-36 hours. The virus could not agglutinate 1% of the chicken erythrocytes and interfered with the development of the hemagglutinins by the B-1 strain of Newcastle disease virus in the chicken embryos. The virus could be neutralized by the serum obtained from recovered chickens. Based on the results of the clinical observation and the laboratory findings, the isolated virus was proved to be infectious bronchitis in the chicken.

Finally, it proved that both *Mycoplasma gallisepticum* infection and infectious bronchitis in the chicken existed simultaneously on the same farm.

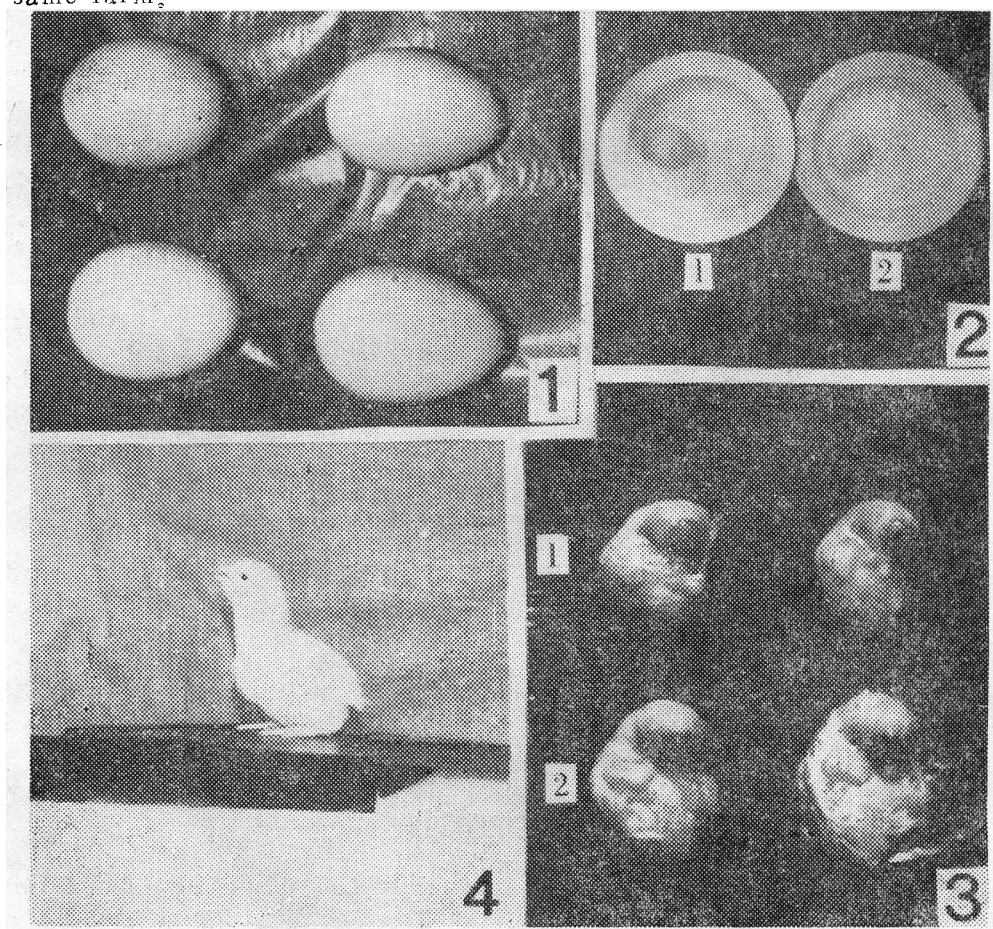


图1 患过IB的母鸡产的旦。右上旦壳上有褐色斑点；右下旦壳上有皱纹；左上旦壳上有白斑；左下旦呈乒乓球状。

图2 1.正常旦白呈椭圆形、粘稠。2.患过IB的母鸡产的旦，旦白呈水样散开。

图3 1.同日龄接入IBV的胚体，明显萎缩。2.正常胚体。

图4 W株IBV人工发病的病鸡张口呼吸。