

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.12.1

安徽省白羽肉鸡中副鸡禽杆菌的分离鉴定 及流行病学分析

王秀丽¹, 于永², 于雷³, 辛凌翔¹, 张媛¹, 李俊平¹, 李旭妮^{1*}

(1. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 2. 南京农业大学, 南京 210095; 3. 中牧实业股份有限公司, 北京 100095)

[收稿日期] 2020-06-22 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 12-0001-05 [中图分类号] S852.61

[摘要] 通过病原分离对安徽省多家白羽肉鸡养殖场持续出现疑似鸡传染性鼻炎的鸡群进行确诊, 从不同批次发生鸡传染性鼻炎疑似症状的鸡体内分离细菌, 经细菌分离、纯化、回鸡试验, 共分离到 8 株细菌, 经形态及培养特性、生化试验、血清学特性、16S rRNA 基因序列分析等方法对分离的细菌进行鉴定。结果表明, 所分离的细菌有 1 株为 A 型副鸡禽杆菌, 7 株为 B 型副鸡禽杆菌, 在安徽省持续引起幼龄肉鸡发生鸡传染性鼻炎的流行中 B 型副鸡禽杆菌是主要流行毒株。

[关键词] 副鸡禽杆菌; 传染性鼻炎; 分离; 鉴定

Isolation, Identification and Epidemiological Analysis of *Avibacterium Paragallinarum* in White Feather Broilers in Anhui Province

WANG Xiu-li¹, YU Yong², YU Lei³, XIN Ling-xiang¹, ZHANG Yuan¹, LI Jun-ping¹, LI Xu-mi^{1*}

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

3. China Animal Husbandry Industry Co Ltd, Beijing 100095, China)

Abstract: The pathogens were isolated and identified in order to diagnose the disease suspected infectious coryza in some large white feather broilers breeding companies in Anhui province. Bacteria were isolated from different batches of morbidity broilers suspected infectious coryza. At last, 8 strains of infectious coryza were isolated and identified according to purity test and chicken regression test. The isolated bacteria were identified by morphology and culture characteristic test, biochemical test, serum test and 16 s rRNA gene sequencing. Results showed that 1 of 8 strains was serotype A and 7 of 8 strains were serotype B, indicating that infectious coryza of serotype B was the more popular strain in the continuous epidemic of chicken infectious rhinitis in young broiler chickens in Anhui province.

Key words: *Avibacterium paragallinarum*; infectious coryza; isolation; identification

作者简介: 王秀丽, 助理研究员, 硕士, 从事细菌类生物制品检验及检测技术研究。

通讯作者: 李旭妮。E-mail: wxiuli123@163.com

传染性鼻炎(Infectious Coryza, IC)是由副鸡禽杆菌(*Avibacterium paragallinarum*, Apg)引起的一种鸡的急性上呼吸道疾病,以流鼻涕、打喷嚏、眶下窦肿胀以及脸部水肿为特征,在世界范围内广泛流行^[1]。20 世纪 80 年代起,我国开始发现本病的流行,冯文达^[2]于 1987 年首次在北京分离出一株致病菌,经血清型鉴定为 A 型副鸡禽杆菌。林毅等^[3]于 1995 年在发病蛋鸡场分离到 A 和 C 血清型。张惠玲、苗得园等^[4-5]于 2003 年和 2005 年分离出 B 血清型副鸡禽杆菌。近几年鸡传染性鼻炎在全国范围内广泛流行,给养殖业造成严重损失^[6]。2018 ~ 2019 年,安徽省多家白羽肉鸡养殖场持续出现疑似传染性鼻炎的爆发和流行,为了解鸡群疫病流行状况,制定更科学的防控策略,本研究从不同批次发病鸡的眶下窦中分离致病菌,并对其进行了全面鉴定。

1 材料及方法

1.1 病料来源 22 份病料,于 2018 年 8 月 ~ 2019 年 9 月从安徽省多家大型白羽肉鸡养殖公司疑似鸡传染性鼻炎发病鸡群中采集,发病鸡主要表现为面部单侧或两侧肿胀、打喷嚏,流鼻涕等。

1.2 培养基及试剂 TSA、TSB 培养基购自青岛海博生物技术有限公司;革兰氏染色液购自索莱宝生物科技有限公司;鸡血清、NAD、生化鉴定管购自 Fermentas 公司;DNA maker、2 × Taq PCR Mster Mix 购自北京博迈德基因技术有限公司。抗原 0083 (A)、0022 (B)、Modesto (C)、A、B、C 阳性对照血清由天津瑞普生物技术有限公司提供。

1.3 实验动物 35 ~ 40 d SPF 鸡,购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司。

1.4 副鸡禽杆菌的分离 将病鸡头置于超净台内,用烧红的刀片消毒眶下窦外表面,无菌切开眶下窦,用接种环取眶下窦分泌物,划线接种含 10% 鸡血清和 0.01% NAD 的 TSA 琼脂平板,将平板倒置于 5% CO₂ 培养箱中,37 °C 培养 18 ~ 20 h,观察细菌的生长特性。挑取圆形、露滴状、透明凸起带蓝色荧光的可疑菌落,接种含 10% 鸡血清和 0.01%

NAD 的 TSA 琼脂平板。于 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 培养 18 ~ 20 h,若平板上的细菌纯粹生长,挑取菌落分别接种含 10% 鸡血清和 0.01% NAD 的 TSA 琼脂平板和含 10% 鸡血清不含 NAD 的 TSA 琼脂平板,在 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 培养 18 ~ 20 h 后,观察细菌的生长情况。

1.5 回鸡试验 挑取在 10% 鸡血清和 0.01% NAD 的 TSA 培养基上生长,在不含 NAD 的 TSA 平板上不生长的单菌落,接种含 10% 鸡血清和 0.01% NAD 的 TSB 培养基中 37 °C 培养 16 ~ 18 h,取新鲜培养物 0.2 mL,分别眶下窦接种 8 只 35 ~ 40 d SPF 鸡,另 4 只注射等量含 10% 鸡血清和 0.01% NAD 的 TSB 作对照。接种后 24 ~ 48 h 观察其临床表现,发病鸡按 1.4 项进行病原分离。取仅在 10% 鸡血清和 0.01% NAD 的 TSA 培养基上生长的分离株进一步鉴定。

1.6 形态及生化特性 从含 10% 鸡血清和 0.01% NAD 的 TSA 琼脂平板上,取单菌落接种含 10% 鸡血清和 0.01% NAD 的 TSB 培养基,37 °C 培养 16 ~ 18 h,取适量新鲜菌液进行革兰氏染色,观察细菌形态;取适量细菌悬液接种微量细菌生化鉴定管(NAD 终浓度 0.01%),置 5% CO₂ 培养箱 37 °C 培养 18 ~ 20 h,观察细菌的生化特性。

1.7 16 s rRNA 序列分析 用细菌 16S rRNA 的通用引物 27F 和 1492R 扩增分离菌的 16S rRNA 序列。上游引物序列:5' - AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG - 3',下游引物序列:5' - GGTTACCTTGT-TACGACTT - 3'。反应程序:94 °C 5 min;94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 2 min (30 个循环);72 °C 10 min,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 扩增的结果。对扩增产物测序,与 GenBank 中公布的序列比对。

1.8 血清型鉴定 参照鸡传染性鼻炎诊断技术农业行业标准 NY/T538 - 2015^[7],用分离菌株制备血凝抗原,测定抗原的凝集效价,配制 4 单位抗原,与 A、B、C 型的分型血清进行血凝抑制试验,测定血凝抑制效价,判定分离株的血清型。根据 Ryuichi

Sakamoto 等^[8]创建的多重 PCR 方法对分离菌株进行血清型鉴定。结合血清学鉴定和分子生物学鉴定的结果,判定分离菌株的血清型。

2 结果与分析

2.1 细菌的分离 从可疑病鸡中共分离出 8 株细菌,此 8 株菌均在含 10% 鸡血清和 0.01% NAD 的 TSA 琼脂平板上形成直径 0.3 mm 左右,圆形、光滑、灰白色、半透明露滴样、边缘整齐的小菌落(图 1),在低倍显微镜下 45°折光观察有较强的荧光。在不含 NAD 的 TSA 琼脂平板上不生长。

2.2 回鸡试验 8 株分离菌株接种 35 ~ 40 d SPF 鸡 24 h 后,试验鸡均出现食欲减少,面部和眼睑部水肿、流泪,流涕等临床症状,且均从发病鸡眶下窦中分离到副鸡禽杆菌。对照组无任何临床症状。

2.3 形态、培养特性及生化特性 从回鸡试验发病鸡眶下窦分离的细菌均在含 10% 鸡血清和 0.01% NAD 的 TSA 琼脂平板上形成直径 0.3 mm 左右,圆形、光滑、灰白色、半透明露滴样、边缘整齐的小菌落(图 1),且在低倍显微镜下 45°折光观察有较强的荧光;取菌落进行革兰氏染色,为革兰氏阴性短杆菌或球杆菌,单个或短链排列(图2);分

离的 8 株菌生化鉴定结果一致(表 1),符合副鸡禽杆菌的生化特性。

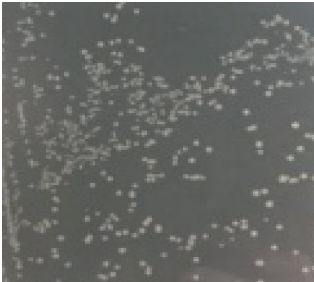


图1 分离株在含 10%鸡血清和 0.01%NAD 的 TSA 琼脂平板上的菌落形态

Fig 1 Characteristics of isolated bacteria on TSA plates with 0.01 % NAD and 10 % chicken serum

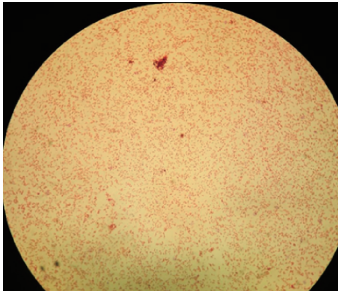


图2 副鸡禽杆菌革兰氏染色图

Fig 2 Gram stain of Avibacterium paragallinarum

表 1 分离株的生化特性

Tab 1 Characteristic of isolated strains

生化项目	结果	生化项目	结果	生化项目	结果	生化项目	结果
硝酸盐还原	+	氧化酶	+	蔗糖	+	海藻糖	-
硫化氢	-	吡啶试验	-	葡萄糖	+	M. R. 试验	-
过氧化氢酶	-	半乳糖	-	乳糖	-	V - P 试验	-

“+”表示阳性反应;“-”表示阴性反应。

2.4 16S rRNA 序列分析 8 株分离株均扩增出约 1.5 kb 的条带(图 3),序列与 GenBank 中的序列比对结果显示,8 株分离菌均为副鸡禽杆菌。

2.5 血清型鉴定 血凝抑制试验结果显示,8 株分离菌 AH - 1 为 A 型副鸡禽杆菌,AH - 2 ~ AH - 8

为 B 型副鸡禽杆菌(表 2);PCR 鉴定结果显示,AH - 1 株扩增出约 0.8 kb 的条带,为 A 型副鸡禽杆菌 AH - 2 到 AH - 8 株均扩增出约 1.1 kb 的条带,为 B 型副鸡禽杆菌(图 4)。血清学鉴定和 PCR 鉴定结果一致。

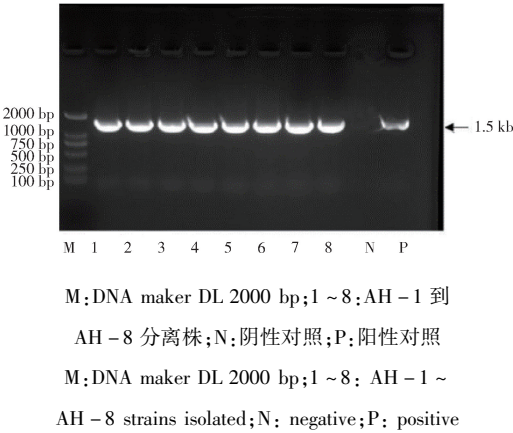


图3 8株分离菌16S rRNA基因PCR结果

Fig 3 16S rRNA PCR results for 8 strains isolated

表2 血凝抑制试验结果

Tab 2 Test results for HI

抗原	血清								
	(A)			(B)			(C)		
	200×	400×	800×	200×	400×	800×	200×	400×	800×
0083 (A)	-	-	-	+	+	+	+	+	+
0222 (B)	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Modesto (C)	+	+	+	+	+	+	-	-	-
AH-1	-	-	-	+	+	+	+	+	+
AH-2	+	+	+	-	-	-	+	+	+
AH-3	+	+	+	-	-	-	+	+	+
AH-4	+	+	+	-	-	-	+	+	+
AH-5	+	+	+	-	-	-	+	+	+
AH-6	+	+	+	-	-	-	+	+	+
AH-7	+	+	+	-	-	-	+	+	+
AH-8	+	+	+	-	-	-	+	+	+

“-”表示红细胞未凝集,“+”表示红细胞凝集。

3 讨论与结论

副鸡禽杆菌的血清型非常复杂,目前常用的有Page分型法,将副鸡禽杆菌分为A、B、C 3个血清型^[9],日本科研人员开发的一系列单克隆抗体将副鸡禽杆菌划分为Page血清型,但该方法单克隆抗体供应有限,只有很少实验室可以操作,有的没有血清型特异性,未被广泛应用^[10]。Kume等提出了一种血清学分类方法,目前认识的Kume血清型有9个,分别为A1、A2、A3、A4、B1、C1、C2、C3、C4^[11]。由于分类技术要求很高,Kume方案也未得到广泛

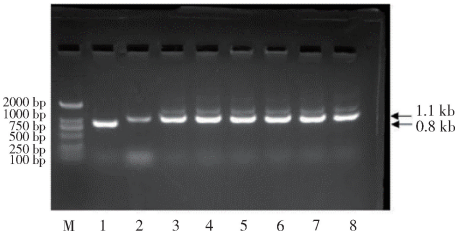


图4 分离株多重PCR结果

Fig 4 Multi-PCR results for isolated strains

认可,本研究按照鸡传染性鼻炎诊断技术农业行业标准NY/T538-20157的方法和PCR方法进行血清分型,结果一致。

2017年,龚玉梅等对我国鸡传染性鼻炎流行态势分析显示,我国近几年鸡传染性鼻炎以B型株为主^[6]。本实验室从2018~2019年对安徽省若干大型白羽肉鸡养殖场疑似感染鸡传染性鼻炎的病鸡体内分离到副鸡禽杆菌,以B型为主,据文献报道鸡传染性鼻炎造成的最大经济损失是育成鸡生长不良和产蛋鸡产蛋下降^[12]。本实验室近两年分离的副鸡禽杆菌均是从24~30 d的肉鸡中分离,感染鸡趋于低龄化;所有分离株均能复制出典型的鸡传染性鼻炎病例,说明流行毒株毒力较强;8次分离鉴定中7次为B型菌株流行,说明安徽地区B型菌株是重要的流行毒株;进行细菌分离的所有厂区均免疫了鸡传染性鼻炎的三价灭活疫苗,免疫失败说明该地区的流行毒株与疫苗株间交叉保护效果不理想。本次细菌分离及流行病学调查对于当地的疫病防控具有重要指导意义。

目前,我国应用的含有B型毒株的疫苗只有三种。免疫了传染性鼻炎A型、B型、C型三价灭活疫苗的鸡群,仍会持续爆发鸡传染性鼻炎。免疫失败表明副鸡禽杆菌同种血清型不同株之间的交叉保护效果不理想。有文献报道,NAD非依赖型的副鸡禽杆菌也在我国部分区域分离到,且NAD依赖型传染性鼻炎的疫苗对NAD非依赖型副鸡禽杆菌的保护性很低^[13]。分离、筛选出抗原性好、免疫谱广的菌株对研制疫苗和防控疾病具有重要意义。

上述分离毒株的毒力、免疫原性均有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Blackall, P. J. , M. Matsumoto, and R. Yamamoto 1997. Infectious coryza. In B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald and Y. M. Saif (eds). Diseases of Poultry, 10th ed, Iowa State University Press: Ames, Iowa, 179 – 190.
- [2] 冯文达. 北京鸡传染性鼻炎病原菌分离及鉴定[J]. 微生物学通报, 1987, (5): 216 – 219.
Feng W D. Isolation and identification of Infectious Coryza pathogen in Beijing [J]. Microbiology China, 1987, (5): 216 – 219.
- [3] 林毅, 张道永, 王文贵. 鸡传染性鼻炎的病原分离鉴定及防治[J]. 中国兽医科技, 1995, (1): 20 – 21.
Lin Y, Zhang D Y, Wang W G, et al. isolation and identification of Infectious Coryza pathogen and its prevention and treatment [J]. Chinese Veterinary Technology, 1995, (1): 20 – 21.
- [4] Zhang, P. J. , Miao, D. Y. , Sun, H. L. . Infectious coryza due to *Haemophilus paragallinarum* serovar B in China[J]. Australian Veterinary Journal, 2003, (81): 96 – 97.
- [5] 孙惠玲, 苗得园, 王艳平, 等. B 型副鸡嗜血杆菌北京株的分离与鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2005, (2): 28 – 29.
Sun H L, Miao D Y, Wang Y P, et al. Isolation and identification of *Haemophilus paragallinarum* serovar B [J]. Chinese Veterinary Journal, 2005, (2): 28 – 29.
- [6] 龚玉梅, 张淑琼, 李淑芳, 等. 2012 – 2017 年我国鸡传染性鼻炎流行态势分析[J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(4): 3 – 5.
Gong Y M, Zhang S Q, Zhang S F, et al. Epidemic situation analysis of infectious Coryza in chickens in China from 2012 to 2017 [J]. Chinese Veterinary Journal, 2018, 54(4): 3 – 5.
- [7] 中华人民共和国农业部. NY/T538 – 20157 鸡传染性鼻炎诊断技术农业行业标准[S].
Ministry of Agriculture, PRC. NY/T538 – 20157 Agricultural Industry Standard for diagnosis of Infectious Coryza in chickens [S].
- [8] Sakamoto, R. , Kino, Y. Development of a multiplex PCR and PCR – RFLP method for serotyping of *Avibacterium paragallinarum* [J]. Vet Med Sci, 2012, 74(2): 271 – 273.
- [9] Page, L. A. *Haemophilus* infections in chickens, 1. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens [J]. Am J Vet Res 1962, 23: 85 – 95.
- [10] Blankall, P. J. , Y. Z. Zheng T. Yamaguchi, et al. Evaluation of a panel of monoclonal antibodies in the subtyping of *Haemophilus Paragallinarum* [J]. Avian Dis, 1991, 35: 955 – 959.
- [11] Blankall, P. J. , L. E. Eaves, D. G. Roges. Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus Paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme [J]. Clin Microbio, 28: 1185 – 1187.
- [12] Y. M. Saif. 禽病学[M] 北京: 中国农业出版社, 2018: 930.
Y. M. Saif. Disease of Poultry [M] Beijing: China Agricultural Press, 2018: 930.
- [13] 马洪梅, 牛家强, 张海燕, 等. 一株不依赖 NAD 生长的副鸡嗜血杆菌的分离与鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(6): 500 – 503.
Ma H M, Niu J Q, Zhang H Y, et al. Isolation and identification of an *Avibacterium paragallinarum* strain independent of NAD [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2018, 40(6): 500 – 503.

(编辑: 侯向辉)