

## 鼻气管炎鸟疫杆菌株的分离鉴定及最低抑菌浓度测定

刘爱晶 潘青 田德雨 侯娜 何诚\*

(中国农业大学 动物医学院,北京 100193)

**摘要** 为测定鼻气管炎鸟疫杆菌对不同药物的敏感程度,本试验从北京、吉林、河北、内蒙和山东地区患严重气囊炎病鸡的肺脏以及辽宁肉种鸡蛋黄中成功分离到了6株鼻气管炎鸟疫杆菌(*Ornithobacterium rhinotracheale*, ORT),并通过染色镜检、生化试验和PCR法对其进行了鉴定。随后选择山东分离株在培养基上繁殖,经腹腔注射接种21日龄SPF鸡,接种后出现典型的肺炎和气囊炎,并测定其半数致死量。在此基础上,采用微量测定法测定6个临床分离菌株和3个对照菌株对12种药物的最小抑菌浓度(MIC)。9株ORT对于莫西沙星、甲磺酸加替沙星和乳酸环丙沙星比较敏感,MIC值为0.49~31.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;临床广泛使用的盐酸强力霉素MIC测定值变化较大,分布在1.90~125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;除北京株和吉林株外,其他7株ORT对利福平比较敏感,MIC值为3.91~15.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;分离株对于氟苯尼考、四环素、金霉素、磺胺间甲氧嘧啶、磷霉素钠和头孢噻肟钠不敏感,部分菌株的MIC值已超过1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**关键词** 鸡;鼻气管炎鸟疫杆菌;分离;鉴定;最小抑菌浓度

中图分类号 S 852.6

文章编号 1007-4333(2012)02-0124-06

文献标志码 A

## Isolation and identification and minimum inhibiting concentration determination of *Ornithobacterium rhinotracheale*

LIU Ai-jing, PAN Qing, TIAN De-yu, HOU Na, HE Cheng\*

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** To study the sensensitivity of *Ornithobacterim thinoatracheale* (ORT) on different medicines, six isolates were used after confirmed by Gram-stain, biochemical test and PCR methods, where five samples were isolated from the lungs with the severe pneumonia in broilers in Beijing, Hebei, Inner Mongolia, Jilin and Shandong province, and one was obtained from the broiler breeder's egg yolk in Liaoning. Subsequently, the typical pneumonia were replicated with the characterization of the airsaccitis in 21-day SPF chickens post infection intraperioneally with the Shandong isolate. Additionally, half lethal dose ( $LD_{50}$ ) was determined to be  $1.43 \times 10^8$  cfu/mL in SPF chickens. Furthermore, minimum inhibition concentrations (MIC) of nine isolates were determined post incubation with the different antibiotics, including 6 isolated strains and 3 reference strains. Nine ORT strains were more sensitive to moxifloxacin gatifloxacin, and ciproxacin and the average MIC arranged from 0.49 to 31.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Although doxycycline was widely used against avian respiratory disease, the MIC was found to be diversity arranged from 1.90 to 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As for the MIC of rifampcin, 7 ORT strains was found to be sensitive and the MIC values arranged from 3.91 to 15.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  except for the Beijing isolate and Jilin strain. Furthermore, 9 isolates were not sensitive to the drugs like florfenicol, tetracycline, aureomycin, sulfamonomethoxine sodium, fosfomycin sodium and cefotaxime sodium, the MIC values was higher than 1 000.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Key words** chicken; *Ornithobacterium rhinotracheale*; isolation; identification; minimum inhibition concentration

鼻气管炎鸟疫杆菌病是由鼻气管炎鸟疫杆菌(*Ornithobacterium rhinotracheale*, ORT)引起的一

种急性、高度接触性呼吸道传染病,主要感染肉鸡和火鸡,表现为呼吸困难、生长迟缓、产蛋率下降和高

收稿日期:2011-10-31

基金项目:中国农业大学动物医学院2010年URP计划资助

第一作者:刘爱晶,本科生, E-mail: laj\_91@qq.com

通讯作者:何诚,教授,主要从事畜禽疾病研究, E-mail: hecheng@cau.edu.cn

死亡率<sup>[1]</sup>。剖检呈现单侧或双侧纤维素性化脓性肺炎和气囊炎。如果与新城疫病毒、传染性支气管炎病毒、肺炎病毒、大肠杆菌和衣原体等病原混合感染,会导致较高的死亡率<sup>[2-5]</sup>。2008年以来,北京郊区、辽宁、吉林、河北、内蒙和山东等地相继发生一种顽固性的呼吸道疾病,发病率高达80%,死亡率达30%左右,临床多种抗生素均没有很好的治疗效果,每年因该病造成的经济损失已超过30亿人民币,给我国的养殖业造成了巨大的经济损失。

ORT最早在1981年由德国学者从5周龄火鸡的呼吸道中分离出来,以后英国、以色列、南非、美国相继有分离到ORT的报道。该菌于1994年被正式命名为鼻气管炎鸟疫杆菌。近年来,ORT分别在比利时、法国、荷兰、匈牙利、芬兰、埃及、土耳其、马来半岛、伊朗、巴西和秘鲁以及中国台湾地区均有该病暴发的报道<sup>[6-9]</sup>。2000年我国陈小玲等<sup>[10]</sup>在分离副鸡嗜血杆菌的同时分离出2株鼻气管炎鸟疫杆菌,这是国内首次报道分离该菌,但是对于其引起的致病性未进行深入研究。

本实验室前期采集北京、辽宁、河北、内蒙和山东5个省市发病鸡和康复鸡血清300份,已证明鼻气管炎鸟疫杆菌康复鸡血清阳性率达到35.0%(另篇报道)。在此基础上采集发病肺脏组织和追溯所属肉种鸡所产的种蛋,进行了分离和鉴定,成功分离到了6株鼻气管炎鸟疫杆菌。随后对分离的6个菌株,以及3株赠送菌株,测定了对12种抗菌素的最小抑菌浓度(MIC)。

本研究确定ORT分离株是否是目前广泛流行的气囊炎主要病原之一,找出病原的主要传播来源,进而进行药物筛选,旨在为临床防治鼻气管炎鸟疫杆菌提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂及菌株

普通肉汤、体积分数为5%的绵羊血琼脂平板,购自北京奥博星公司;细菌微量生化反应管,购自杭州天和微生物试剂有限公司;PCR引物合成由北京三博远志生物技术有限责任公司完成;血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒,2×*Taq* PCR Master Mix, D2000 DNA Marker 购自天根生化科技(北京)有限公司。

测试药品:利福平、莫西沙星、盐酸强力霉素、氟苯尼考、四环素、盐酸金霉素、磺胺间甲氧嘧啶、甲磺酸加替沙星、乳酸环丙沙星、螺旋霉素、磷霉素钠和

头孢噻肟钠。

ORT-97(1997年广西分离株)、ORT-98(1998年广西分离株)和ORT-511(北京株),由北京农林科学院畜牧兽医研究所陈小玲研究员惠赠。ORT-NM(内蒙蛋种鸡)、ORT-JL(吉林肉种鸡)、ORT-LN(辽宁海城种蛋)、ORT-HB(河北肉种鸡)、ORT-SD(山东肉鸡)和ORT-BJ(北京肉鸡),由本实验室分离鉴定。ORT标准株DNA(DSM 15997),购自德国微生物菌种保藏中心。

### 1.2 病料及SPF鸡

取自疑似ORT感染症状的病鸡肺脏、种蛋卵黄,其中发病肉鸡肺脏来源于吉林、河北、山东临沂和北京郊区,蛋鸡肺脏来源于内蒙;种蛋卵黄来源于辽宁海城。

21日龄SPF鸡60只,雄性,购自北京梅里亚维通实验动物有限公司。

### 1.3 细菌的分离及纯化

#### 1.3.1 肺脏细菌培养

无菌条件下采集出现临床症状的病鸡肺脏,挑取少量组织接种于绵羊血琼脂平板上,置37℃厌氧培养48h<sup>[11]</sup>。取单菌落进行革兰氏染色镜检,将形态可疑的单菌落接种于5%的绵羊血琼脂平板上进行2~3代纯化,备用。

#### 1.3.2 卵黄细菌培养

无菌条件下吸取病鸡种蛋卵黄液10 μL接种于5%的绵羊血琼脂平板上,用无菌接种环将卵黄液在血平板上划线,置37℃厌氧培养48h。挑取单菌落进行革兰氏染色镜检,将形态可疑的单菌落接种于5%的绵羊血琼脂平板上进行2~3代纯化,做进一步的鉴定。

### 1.4 细菌鉴定

#### 1.4.1 革兰染色镜检<sup>[12]</sup>

无菌条件下,挑取纯化的单个菌落,火焰固定后,革兰氏染色,1000倍油镜下观察细菌形态并拍照。

#### 1.4.2 生化试验<sup>[13]</sup>

用接种针蘸取部分单菌落分别接种于葡萄糖、果糖、麦芽糖、半乳糖、乳糖、蔗糖、甘露糖、甘露醇、赖氨酸、硝酸盐(还原)、V-P、尿素和明胶生化管中,置37℃厌氧培养24h后观察结果。

#### 1.4.3 PCR鉴定<sup>[14]</sup>

采用16S rRNA序列分析法对分离菌株进行种属分类鉴定。16S rRNA引物序列如下: primer1 5'-GAG AAT TAA TTT ACG GAT TAA G-3'

primer2 5'-TTC GCT TGG TCT CCG AAG AT-3', 扩增范围在 784 bp。提取分离菌株的总 DNA 后,按以下反应条件扩增并设 DSM 15997 菌株 DNA 阳性对照和空白对照。

PCR 扩增反应体系为 40  $\mu\text{L}$  反应体系:DNA MIX 酶 20  $\mu\text{L}$ ;上游引物(10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 1.5  $\mu\text{L}$ ;下游引物(10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 1.5  $\mu\text{L}$ ;模板 4  $\mu\text{L}$ ;ddH<sub>2</sub>O 13  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为 94  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min;45 个循环(94  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s;52  $^{\circ}\text{C}$  60 s;72  $^{\circ}\text{C}$  90 s);72  $^{\circ}\text{C}$ , 10 min。凝胶电泳检测 制备一块质量分数为 1%的琼脂糖凝胶,取扩增产物 5  $\mu\text{L}$ ,点样后电泳,EB 染色后于凝胶成像系统分析结果。

扩增产物由北京三博远志生物技术有限责任公司进行测序,将得到的碱基序列上传到 GenBank 数据库,并进行同源序列搜索,与数据库中的模式菌株或保藏于美国 ATCC 或德国 DSM 等国际菌种保藏中心的菌株基因序列进行比对。

### 1.5 山东分离株 LD<sub>50</sub>的测定<sup>[15]</sup>

首先将山东分离株接种肉汤培养基,在 37  $^{\circ}\text{C}$  增殖培养 48 h,然后接种血液培养基进行菌落计数,测定菌落总数,然后将菌液用肉汤进行 10 倍稀释。60 只 21 日龄 SPF 鸡随机分成 6 组,每组 10 只。第 1 组~第 5 组腹腔注射 0.5 mL 分别为  $2.49 \times 10^9$ 、 $2.49 \times 10^8$ 、 $2.49 \times 10^7$ 、 $2.49 \times 10^6$  和  $2.49 \times 10^5$  cfu/mL 的菌液。对照组腹腔注射 0.5 mL 灭菌生理盐水。攻毒后连续观察 14 d,记录其发病数及死亡数,第 14 天将存活鸡只实施安乐死,剖检靶器官并观察其病理学变化。根据每组 SPF 鸡的死亡数量,计算 ORT-SD 菌株的半数致死量(LD<sub>50</sub>)。

### 1.6 MIC 测定方法<sup>[16]</sup>

#### 1.6.1 待测菌的准备

纯化后的分离株接种于 10 mL 普通肉汤培养基中,160 r/min 震荡培养 24 h,培养菌液 10 倍梯度稀释,分别均匀涂布在 5%的绵羊血液琼脂平板上,37  $^{\circ}\text{C}$  厌氧培养 24 h 后菌落计数,计算各分离株菌落数,并将各个分离株的菌液稀释到  $2 \times 10^5$  cfu/mL 的菌液备用。

#### 1.6.2 待测药物的准备

分别称取待测药物 3.60 g,溶于 3 mL 溶剂中制备质量浓度为 1.20 g/mL 的母液。其中,利福平、莫西沙星、盐酸强力霉素、氟苯尼考、四环素、金霉素、磺胺间甲氧嘧啶和甲磺酸加替沙星的溶剂为 DMSO,乳酸环丙沙星、螺旋霉素、磷霉素钠和头孢

噻肟钠的溶剂为肉汤。

#### 1.6.3 MIC 的测定

96 孔细胞培养板中分别加入 100  $\mu\text{L}$  普通肉汤,将药物母液稀释至 4 mg/mL,在培养板的第 1 孔中加入 100  $\mu\text{L}$  待测药液,之后依次进行 2 倍稀释,稀释后每孔加入 100  $\mu\text{L}$  含  $2 \times 10^5$  cfu/mL 的菌液,37  $^{\circ}\text{C}$  厌氧培养 24 h,再向每孔中加入 5  $\mu\text{L}$  质量浓度为 5 g/L 的氯化三苯四氮唑(TTC),37  $^{\circ}\text{C}$  2 h 后观察颜色变化,细菌未生长的不变色,细菌生长呈红色。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌特征

37  $^{\circ}\text{C}$  厌氧培养 48 h 后,在含 5%的绵羊血琼脂平板上出现灰白色、圆形突起、表面光滑、直径约 1~2 mm 的菌落,无溶血现象。取单个菌落革兰氏染色,显微镜下观察到革兰氏阴性杆菌,呈现出长短不一的多形态性,结果见图 1 和图 2。

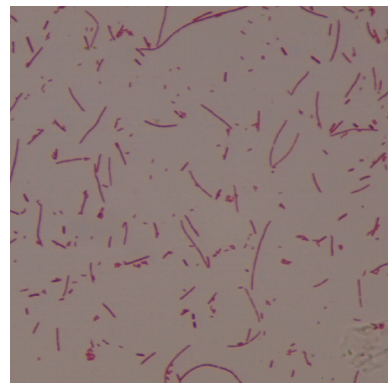


图 1 山东分离株( $\times 1000$ )

Fig. 1 Gram-stain isolate from broilers in Shandong Province( $\times 1000$ )

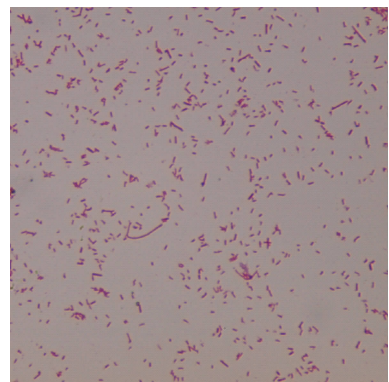


图 2 内蒙分离株( $\times 1000$ )

Fig. 2 Gram-stain isolate from the breeding layers in Inner Mongolia( $\times 1000$ )

2.2 生化试验结果

临床分离株 ORT-NM、ORT-SD、ORT-LN、ORT-JL、ORT-HB、ORT-BJ 和三株赠送株 ORT-97、ORT-98 和 ORT-511 分别接种到葡萄糖、果糖、麦芽糖、半乳糖、乳糖、蔗糖、甘露糖、甘露醇、赖氨

酸、硝酸盐、V-P、尿素和明胶生化管中,结果见表 1。除 ORT-BJ 外,葡萄糖、麦芽糖、果糖、半乳糖、甘露糖和甘露醇为阳性,蔗糖、V-P、硝酸盐和明胶为阴性。赖氨酸发酵试验中,除 ORT-LN 外,其他 8 株细菌呈现阳性。

表 1 9 株 ORT 分离株生化检测

Table 1 Detecting biochemical properties of nine isolates

指标	ORT-97	ORT-98	ORT-511	ORT-NM	ORT-JL	ORT-LN	ORT-HB	ORT-SD	ORT-BJ
葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	+	+	+	+	+	-
果糖	+	+	+	+	+	+	+	+	-
乳糖	+	+	+	-	+	-	+	+	-
半乳糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+
蔗糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-
甘露糖	+	+	+	+	+	+	+	+	-
甘露醇	+	+	+	+	+	+	+	+	-
V-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-
尿素	-	+	-	-	+	-	+	+	+
硝酸盐(还原)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
赖氨酸	+	+	+	+	+	-	+	+	+
明胶	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注：+为阳性，-为阴性。

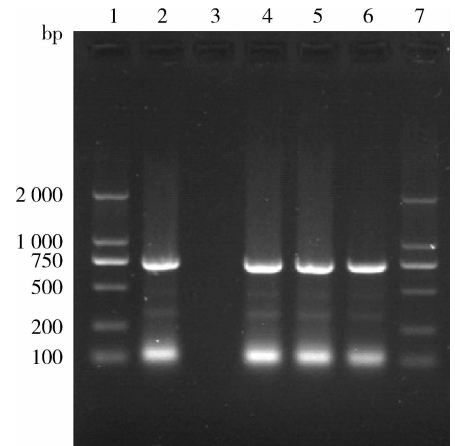
2.3 PCR 结果

分别提取标准菌株、3 株赠送菌株 (ORT-97、ORT-98、ORT-511) 和 6 株临床分离菌株的全基因组 DNA, 进行 PCR 扩增, 得到菌株的 16S rRNA 的 PCR 扩增片段, 大小为 784 bp, 部分电泳结果见图 3。将 ORT-SD 和 ORT-NM 菌株扩增片段进行测序, 并将序列与 GenBank 中已报道菌株的同源性进行比较, 结果表明菌株与 ORT 同源性达 98%~100%。ORT-NM 和 ORT-SD 的碱基序列已上传 GenBank (Accession # JN415767 和 JN415768)。

2.4 山东分离株回归试验及 LD<sub>50</sub> 测定

前期试验结果显示, 分别通过点眼、滴鼻和腹腔注射进行攻毒, 腹腔注射发病率和死亡率较高, 发病时间较快, 因此本试验选择腹腔注射途径。攻毒后观察临床症状, 主要为张口喘气和头部肿胀, 14 d 后, 各个稀释度死亡数量分别为 10/10、6/10、1/10、0/10 和 0/10 (表 2)。用 reed-muench 法计算得半数致死量 LD<sub>50</sub> 为 1.43 × 10<sup>8</sup> cfu/mL。取死亡后的

鸡进行剖检, 观察靶器官的病理学变化, 成功复制出类似临床病鸡的症状, 出现了典型气囊炎和肺出血,



1 为 D2000 Marker; 2 为 ORT 标准株; 3 为阴性对照; 4 为 ORT-SD 菌株(山东分离株); 5 为 ORT-NM 菌株(内蒙分离株); 6 为 ORT-LN 菌株(辽宁种蛋分离株); 7 为 D2000 Marker。

图 3 PCR 电泳图

Fig. 3 PCR detection

并且从病死鸡及存活鸡的肺脏都成功分离到了病原。

表2 山东分离株的LD<sub>50</sub>测定

Table 2 LD<sub>50</sub> determination of the isolate in Shandong

组别	数量	攻毒 剂量/mL	菌液/ (cfu/mL)	死亡数	死亡率/ %
1	10	0.5	2.49×10 <sup>9</sup>	10	100
2	10	0.5	2.49×10 <sup>8</sup>	6	60
3	10	0.5	2.49×10 <sup>7</sup>	1	10
4	10	0.5	2.49×10 <sup>6</sup>	0	0
5	10	0.5	2.49×10 <sup>5</sup>	0	0
6	10	0.5	灭菌生理盐水	0	0

## 2.5 分离株的最低抑菌浓度测定(MIC)

9株ORT菌株对12种药物的MIC测定结果见表3。3株早期分离株对于利福平、莫西沙星、盐酸强力霉素、甲磺酸加替沙星以及乳酸环丙沙星的敏感度较高,其中利福平MIC为7.81 μg/mL。对磷霉素钠、螺旋霉素、磺胺间甲氧嘧啶和头孢噻肟钠不敏感,其MIC值大于500 μg/mL。

蛋鸡分离株敏感药物为甲磺酸加替沙星(1.95 μg/mL)、莫西沙星(3.91 μg/mL)、氟苯尼考(3.91 μg/mL)、乳酸环丙沙星(3.91 μg/mL)。相反,盐酸强力霉素、四环素、金霉素和磺胺间甲氧嘧啶MIC值升高。此外,卵黄分离株对于测试抗生素均敏感,其中莫西沙星、甲磺酸加替沙星、环丙沙星、头孢噻

表3 9个ORT菌株的MIC测定结果

Table 3 MIC determination of nine isolates

指标	ORT-97	ORT-98	ORT-511	ORT-NM	ORT-JL	ORT-LN	ORT-HB	ORT-SD	ORT-BJ
莫西沙星	31.25	15.63	31.25	3.91	62.50	<0.49	15.63	15.63	31.25
甲磺酸加替沙星	15.63	15.63	15.63	1.95	31.25	<0.49	15.63	15.63	15.63
乳酸环丙沙星	31.25	15.63	15.63	3.91	31.25	<0.49	15.63	15.63	15.63
利福平	7.81	7.81	7.81	15.63	250.00	15.63	7.81	3.91	125.00
盐酸强力霉素	15.63	15.63	15.63	62.5	125.00	1.95	15.63	15.63	62.50
四环素	62.50	62.50	125.00	125.00	250.00	0.98	62.50	125.00	250.00
金霉素	31.25	31.25	125.00	125.00	250.00	3.91	62.50	62.50	250.00
磺胺间甲氧嘧啶	500.00	500.00	500.00	500.00	1 000.00	500.00	500.00	500.00	500.00
螺旋霉素	>1 000	>1 000	>1 000	31.25	>1 000	7.81	>1 000	500.00	62.50
氟苯尼考	500.00	250.00	500.00	3.91	500.00	1.95	250.00	250.00	500.00
磷霉素钠	>1 000	>1 000	>1 000	15.63	>1 000	0.98	>1 000	>1 000	125.00
头孢噻肟钠	>1 000	>1 000	>1 000	<0.49	>1 000	0.49	500.00	62.50	500.00

肟钠MIC值最低(0.49 μg/mL),磺胺间甲氧嘧啶测定值最高(500 μg/mL)。

商品肉鸡分离株MIC测定特点:甲磺酸加替沙星和乳酸环丙沙星MIC值最小(15.63 μg/mL),氟苯尼考、磺胺间甲氧嘧啶和头孢噻肟钠测定值均为500 μg/mL。除北京分离株外,利福平MIC分布在3.90~7.81 μg/mL,而螺旋霉素、四环素和金霉素产生了轻度耐药。

肉种鸡分离株(ORT-JL、ORT-HB)对于甲磺酸加替沙星、乳酸环丙沙星和莫西沙星MIC分布在15.63~62.5 μg/mL,磷霉素钠、氟苯尼考、金霉素、四环素、头孢噻肟钠、螺旋霉素和磺胺间甲氧嘧啶测定

值较高(15.6~1 000 μg/mL),不同地区分离株盐酸强力霉素的MIC差异较大(15.63~125 μg/mL)。

## 3 讨论

### 3.1 鼻气管炎鸟疫杆菌与气囊炎发病的关系

通过对临床送检的病料和种蛋细菌分离培养,纯化后用染色镜检、生化试验、PCR等方法对分离的细菌进行了鉴定,6株分离株均为鼻气管炎鸟疫杆菌。其中蛋种鸡1株(ORT-NM)、肉种鸡2株(ORT-JL、ORT-HB)、种蛋1株(ORT-LN)、肉鸡2株(ORT-BJ、ORT-SD)。各菌株的生化试验结果出现了一些细小的差别,可能是由于菌株产生药物耐

药性或者毒力变异所致。

同时,通过腹腔注射途径成功复制出典型气囊炎症状,并且从病死鸡和存活鸡的肺脏成功分离到了病原,测定了山东分离株的半数致死剂量。本试验确认鼻气管炎鸟疫杆菌可能是造成肉鸡、蛋鸡气囊炎的主要病原之一。此外,本试验发现 ORT 可以从种蛋的卵黄液和卵黄膜分离获得,表明种蛋携带病菌实施垂直传播,这可能是气囊炎在肉鸡、蛋鸡群中大量爆发的主要原因。因此,必须采取相应的措施阻断鼻气管炎鸟疫杆菌通过种蛋垂直传播,防止子代感染。

目前 ORT 在临床上导致蛋鸡、肉鸡 20%~30%死亡率的主要原因在于:1)对于发病的病原误诊颇多,影响了正确的治疗措施。气囊炎常常被误诊为大肠杆菌病和鸡毒支原体混合感染,或禽流感与大肠杆菌混合感染,导致临床治疗上用药错误而延误时机;2)种鸡垂直传播加重了 ORT 扩散和爆发。本试验从辽宁肉种鸡的种蛋中分离到 ORT,之后也从山东肉种鸡种蛋内分离出 ORT,分离率达到 45%,证明了 ORT 的垂直传播。国外也有报道 ORT 通过种蛋蛋壳进行传播,导致商品代肉鸡孵化后携带病原。此外,ORT 毒力的增强也可能是造成本病流行的另外一个原因,需要进一步研究不同分离株毒力的差异。

### 3.2 鼻气管炎鸟疫杆菌 MIC 测定及临床用药借鉴

ORT 对 12 种药物的 MIC 测定结果显示莫西沙星、甲磺酸加替沙星、乳酸环丙沙星和利福平为高度敏感药物,传统使用的盐酸强力霉素和氟苯尼考敏感性显著下降,提示已经产生较高的耐药性。四环素和金霉素在 3 株肉鸡分离株属于中度敏感药物,其他分离株已经产生耐药性。此外,9 个分离株对于螺旋霉素、磷霉素钠、头孢噻肟钠和磺胺间甲氧嘧啶不敏感,因此不建议在临床使用。对于出口肉鸡喙诺酮类药物、利福平和盐酸强力霉素已经严格禁止使用,如何防治出口型肉鸡 ORT 引起的气囊炎还需要进一步筛选药物。

## 4 结论

本试验通过分离培养、染色镜检、生化试验和 PCR 的方法鉴定 6 株鼻气管炎鸟疫杆菌,并且通过 SPF 鸡回归试验复制相同的病变,这也证明鼻气管

炎鸟疫杆菌是我国北方地区广泛流行气囊炎的主要病原之一。分离株对于部分喙诺酮类、强力霉素敏感,而对于氟苯尼考、磷霉素、头孢类药物已经严重耐药,临床用药应参考药敏结果,依据药物敏感性测定试验来制定科学、合理的用药措施,方能有效控制 ORT 的流行。

## 参 考 文 献

- [1] 乔健,陈明勇,甘孟侯,等.禽鼻气管炎鸟疫杆菌感染研究概况[J].中国兽医杂志,1998,24(1):42-43
- [2] 谢红波,李双宇,张莹,等.鸡鼻气管炎的诊断及防治措施[J].养殖技术顾问,2008(7):107
- [3] van Empel P, Hafez H. *Ornithobacterium rhinotracheale*: A review[J]. Avian Pathology, 1999, 28: 217-227
- [4] Niwat C, Wisanu W, Jiroj S. Seroprevalence and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from broiler and broiler breeder flocks in Thailand[J]. Avian Diseases, 2007, 51(3): 777-780
- [5] 冯元璋. 鸡鼻气管炎鸟疫杆菌感染及其研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2003, 30(3): 289-293
- [6] 王明亮,刁有祥,纪巍,等.鼻气管炎鸟疫杆菌病的研究现状[J]. 动物医学进展, 2008, 29(10): 73-78
- [7] 马保华,毕英佐,吕平,等.鼻气管炎鸟疫杆菌病的研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2002, 24(3): 232-234
- [8] 李瑶瑶,秦永彪,王伟,等.禽鼻气管炎鸟疫杆菌的研究现状[J]. 家禽科学, 2010(11): 40-43
- [9] 李瑶瑶. 鼻气管炎鸟疫杆菌诊断方法的研究与应用[D]. 泰安: 山东农业大学, 2010
- [10] 陈小玲,宋程,罗廷荣,等.鼻气管炎鸟疫杆菌中国株的鉴定[J]. 中国家禽, 2004, 28(18): 8-12
- [11] Canal C W, Leao J A, Rocha S L S, et al. Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens in Brazil[J]. Research in Veterinary Science, 2005, 35(2): 225-230
- [12] 潘青,杨君敬,李树梅,等.变质鸡蛋中蜡样芽孢杆菌的分离与鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2011, 47(4): 18-20
- [13] van Empel P, Han B, Peter L, et al. Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35(2): 418-421
- [14] Anil J T, Binu T V, Vanessa C L, et al. Application of polymerase chain reaction fingerprinting to differentiate *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates [J]. J Vet Diagn Invest, 2007, 19: 417-420
- [15] 何诚,杨明,杨建民,等.中药制剂 SHY 对新城疫、禽流感 H9、H5 亚型病毒的抑制和攻毒保护效果[J]. 中国农业大学学报, 2005, 10(6): 7-10
- [16] 陈慧. 绵马贯众提取物的体外抑菌作用试验[D]. 保定: 河北农业大学, 2007