

北京鸡传染性鼻炎病原菌分离及鉴定

冯 文 达

(中国兽药监察所, 北京)

摘要 北京 A 公司病鸡, 根据其临床症状的观察和对病鸡眶下窦渗出物分离菌的形态、培养特性和

参加本项工作的还有冯杉同志。

生化反应,血清学特征和致病力及交叉免疫试验,表明病鸡为传染性鼻炎,其病原菌是 *page A* 型副鸡嗜血杆菌 (*Hamophilious paragallinarum*)。

关键词 北京鸡传染性鼻炎;A型副嗜血杆菌

传染性鼻炎(ic)是由副鸡嗜血杆菌(Hpg)引起鸡的一种呼吸道传染病。本病见于世界各地,给养鸡业造成一定的经济损失。我国过去未见有本病的报道。近年来,随着集体化养鸡业的发展和国外良种鸡的大量引进,北京、西安等地的一些鸡场,曾发生类似于传染性鼻炎的鸡病。1986年初我们对北京A公司病鸡,经临床症状的观察及病原菌的分离鉴定,认为是由Hpg引起的传染性鼻炎。现介绍如下:

材 料 和 方 法

(一) 培养基

1. 鸡血清鸡肉汤琼脂(S-琼脂):按加藤和好^[1]介绍的方法制造鸡肉汤琼脂,待凉到50—60℃时,加入5%的过滤除菌的新鲜酵母提取液、2%的加热灭活的过滤除菌的健康鸡血清(无Hpg的抗体)和0.0025%(W/V)的还原型辅酶I(NADH)后,倒入平皿或试管制成斜面。用于分离和保存病原菌,测定生长因子、观察菌落的荧光性等。

2. 鸡血清鸡肉汤(S-肉汤):鸡肉汤中加入3%经过除菌过滤加热灭活的健康鸡血清。用作制备抗原、分离和保存病原菌。

(二) 病原菌的分离及其鉴定

按加藤和好^[1,2]介绍的方法进行。

(三) 人工发病试验

按G. G. Reid和P. J. Blackall^[3]介绍的方法进行。

1. 人工发病用鸡:来自本所无ic史的白色来抗鸡群,试验前,经测定无Hpg的特异抗体。

2. 参考菌株:引进日本的副鸡嗜血杆菌A型标准菌株221和捷克赠送的C型标准菌株6031。

3. 定型血清的制备:按A. M. Thornton^[4]等人介绍的方法进行。

4. 抗原的制备:按加藤和好^[2]介绍的方法

制备。6个分离菌株抗原再按Rimler^[5]等人介绍的方法用透明质酸酶作处理,以增加抗原的敏感度。最后加入2%的健康免疫血清,以增强其特异性。

5. 血清分型:按Sawata^[6]等介绍的快速平板凝集反应进行。阳性血清作二倍系列稀释。

6. 鸡红血球凝集试验和HI抗体的测定:按加藤和好^[7]介绍的方法进行。

7. 和221株的交叉免疫试验:选L₂株制成油佐剂死苗,注射成年鸡后二月,测定HI抗体,并用221株攻毒之。

结 果

(一) 病鸡的临床症状

送检种鸡群的8只母鸡和2只公鸡症状是:一侧或两侧眼的下部发生水肿,流水样鼻汁,流泪,精神沉郁,两只鸡拉绿色稀便,一只母鸡双目失明;公鸡肉垂和鸡冠严重水肿变厚,呼吸时发出咯噜咯噜的杂音。送检蛋鸡群的两只母鸡症状是:精神沉郁,消瘦,眼下部轻度水肿,一只鸡眼后有脓肿,别无其他明显变化。

(二) 病鸡病原菌的分离与鉴定

眶下窦渗出物涂片瑞氏染色镜检,见两端浓染的短小杆菌;涂片革兰氏染色镜检为革兰氏阴性短小杆菌和球杆菌。

眶下窦冲洗液初次培养,种鸡群获4株纯培养物;蛋鸡群初次培养物因染有杂菌,经分离后获纯培养。

分离菌株以烛光法在37℃培养24—48小时后,在S-琼脂平皿上,形成半透明、露珠样的圆整的小菌落;鸡肉汤琼脂平皿上,不形成可见的菌落;与金黄色葡萄球菌交叉接种的平皿上,在葡萄球菌菌苔周围形成有较密集的、比较大的、半透明的露珠样菌落,称之为卫星现象(Satellite Phenomenon)。表明分离菌株生长需要

表 1. 分离菌株的糖类发酵试验

菌株	葡萄糖	蔗糖	鼠李糖	半乳糖	麦芽糖	棉子糖	菊糖	山梨醇	水相素	肌醇	甘露醇	运动性
S ₂	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
S ₃	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
S ₆	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
S ₁₀	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
L ₁	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
L ₂	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
221	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6031	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

“+”表示发酵产酸不产气;“-”表示不发酵不产酸不产气。

鸡血清或L因子。在37℃普通温箱中培养的S-琼脂平皿上,不见有菌落的形成,表明分离菌株生长发育要求5—10%的CO₂环境。

分离菌株的菌落,在45℃斜光源照射下镜检,呈现虹色荧光。

(三) 分离菌株对鸡的人工发病试验

6个分离菌株对鸡均有毒力,人工感染能使1/2—2/2的鸡发病。潜伏期1—3天,发病后鸡的体温升高1—1.5℃,精神沉郁,食欲减少,眼下部水肿,流泪,淌水样鼻汁,产蛋停止,个别鸡双目失明。公鸡肉垂和鸡冠水肿,种鸡病程为一周之内;蛋鸡的L₂株病程为两周以上,症状严重。注射肉汤的对照鸡未发病。

从人工感染鸡的眶下窝内的抽取液中均分离到感染菌株。对照鸡的分离结果阴性。

(四) 糖类发酵试验结果(表1)

(五) 分离菌株的平板凝集反应的分型试验

分离菌株抗原对221菌株抗血清的平板凝集价在80以上,和221菌株抗原基本一致;而对6031菌株的抗血清不发生平板凝集,和6031抗原有明显差异。所有菌株抗原对阴性血清均无反应。

(六) 分离菌株抗原对鸡红血球的凝集反应

参试的分离菌株均具有一定的凝集鸡红血球的能力,其效价达16—64;221(A)抗原效价为128倍;而6031(C)菌株抗原无凝集鸡红血球的能力。

(七) L₂株产生HI抗体的能力和与221株的交叉免疫试验

用L₂株油佐剂死苗免疫注射鸡后两个月,其HI抗体效价达10—160;221株攻毒后,免疫鸡4/4保护,对照鸡2/2发病。

讨论和小结

分离菌株对鸡具有致病力,人工发病的鸡和原病鸡的临床症状一致,表明分离菌株就是其病原菌。这些病原菌为革兰氏阴性小杆菌,生长发育需要L因子和5—10% CO₂环境,发酵葡萄糖,产酸不产气,不发酵棉子糖、鼠李糖,和参考菌株221及6031一致。确认分离菌株为副鸡嗜血杆菌。

1962年page以平板凝集反应,把副鸡嗜血杆菌分为A、B和C三个血清型。现已得到公认。同时,日本学者加藤也指出,副鸡嗜血杆菌有相应的3个血清型。A型菌能凝集鸡等动物的红血球,而C型则不能,B型菌居两者之间。又指出B和C两型是A型在培养基或病灶中变化的结果。B型菌是过渡型,C型菌是变异型。分离菌株和A型及C型抗血清的平板反应结果与221菌株基本一致,和6031菌株有明显差异,并具有凝集鸡红血球的特性。选出的L₂株有产生HI抗体的能力,和221菌株有强的交叉免疫保护。故认为分离菌株是page A型副鸡嗜血杆菌。

本试验中对分离菌株作了透明质酶的处理,结果明显地提高了抗原的敏感性,和Rimler

的试验结果相一致。

本试验结果指出,在北京地区鸡传染性鼻炎是存在的,其病原菌为 page A 型副鸡嗜血杆菌。

参 考 文 献

- [1] 加藤和好:“伝染性コリ－ザ”——農林省家畜衛生試験場技術者集談会編:“家畜伝染病の診断”(増補版),昭和48年,p496—503。
- [2] 加藤和好:“伝染性コリ－ザ”——鶏病診断。堀内

貞治編,p. 259—278, 1982年。

- [3] G. G. REID and P. J. BLACKALL: *Veterinary Microbiology*, 9: 77—82, 1984.
- [4] A. M. THORNTON and P. J. BLACKALL: *Aust. Vet. J.* 61: 251—253.
- [5] Rimler, R. B. Davis, R. B. and Page. K: *Am. J. Vet. Res.* 40: 140, 1977.
- [6] Sawata. A., Kume. K and Nakase. Y: *A. m. J. Vet. Res.* 40: 1450, 1979.
- [7] 加藤和好、椿原彦吉:ニワトリの伝染性コリ－ザ,11分離菌の同定—家畜衛生試験研究報告,45号,21—26,1962。