

山东省鸡鼻气管鸟杆菌的分离与鉴定

吴海洋,刁有祥,李瑶瑶,李建侠,孙 静,刘 霞,陈 琳

(山东农业大学 动物科技学院, 山东 泰安 271018)

【摘 要】 【目的】对山东省鸡鼻气管鸟杆菌进行分离鉴定。【方法】采集山东省不同地区有呼吸道症状的病(死)鸡,进行鼻气管鸟杆菌(*Ornithobacterium rhinotracheale*, ORT)的分离,根据培养特性及生化试验和玻片凝集试验结果对分离的菌株进行鉴定;应用 PCR 方法对分离菌株 16S rRNA 基因的一段保守序列进行扩增,应用琼脂扩散沉淀试验(AGP)对分离菌株的血清型进行鉴定,并对分离株进行药敏试验。【结果】试验共分离到 5 株 ORT,所有分离菌株均能扩增到 1 条长 671 bp 的特异性片段,而阴性对照菌株的扩增结果为阴性;5 株 ORT 分离菌株可分为 3 个血清型,其中血清 A 型 3 株、血清 B 型 1 株、血清 D 型 1 株;分离 ORT 菌株对羟氨苄青霉素、头孢曲松、丁胺卡那、氧氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星高度敏感。【结论】从山东省病死肉鸡中分离鉴定到 5 株 ORT。

【关键词】 鼻气管鸟杆菌;分离鉴定;山东省;鸡

【中图分类号】 S831.7

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)07-0001-06

Isolation and Identification of *Ornithobacterium rhinotracheale*

WU Hai-yang, DIAO You-xiang, LI Yao-yao, LI Jian-xia, SUN Jing, LIU Xia, CHEN Lin

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong, 271018, China)

Abstract: 【Objective】 *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) from Shandong province was isolated. 【Method】 ORT, a causative agent of respiratory disease in fowl, was isolated from different commercial flocks showing respiratory symptoms in Shandong province. A slide agglutination test was used to detect ORT. PCR was performed to detect ORT. In order to determine the serotype of ORT, an agar gel precipitation test was performed and Antimicrobial susceptibility was also tested. 【Result】 Five strains were isolated. All of the isolates gave a positive reaction to the ORT antiserum. A 671 bp fragment of the 16S rRNA gene was amplified from all of the five isolates. Three serotypes were identified: three of the isolates were serotype A, one isolate serotype B and one serotype D. All of the isolates were found to be susceptible to Amoxicillin, Ceftriaxone, Amikacin, Ofloxacin, Enrofloxacin and Ciprofloxacin. 【Conclusion】 Five strains of ORT were isolated from Shandong province.

Key Words: *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT); isolation and identification; Shandong province; chicken

鼻气管鸟杆菌(*Ornithobacterium rhinotracheale* ORT)是近几年发现的与禽类呼吸道病有关的一种不运动、高度多形性、无芽孢的革兰氏阴性(G^-)小杆菌。ORT 在血液琼脂上生长缓慢;在体积分数 5%~10% CO_2 条件下,用体积分数 5%的

绵羊血液琼脂于 37℃ 恒温培养 24 h 后,可形成针尖大小、不溶血的灰白色圆形菌落,培养 48 h 后可形成圆形灰色到灰白色奶酪状的小菌落,有时颜色稍变浅红并发出类似酪酸的气味。在培养 ORT 时,为了抑制发育快的大肠杆菌和其他细菌的生长,可

* [收稿日期] 2009-12-30

[基金项目] 山东省自然科学基金项目(Y2006D10)

[作者简介] 吴海洋(1985—),男,山东寿光人,在读硕士,主要从事禽病学研究。E-mail: wuhaiyang2003@163.com

[通信作者] 刁有祥(1962—),男,山东胶州人,教授,主要从事禽病学研究。E-mail: yxdiao@163.com

在血液琼脂培养基中添加庆大霉素和多粘菌素^[1]。1997 年, Van 等^[2]采用单价抗血清, 以琼脂扩散沉淀试验(AGP)和酶联免疫吸附试验(ELISA), 对世界各地分离的 ORT 进行了生化和血清学研究, 将 433 株 ORT 鉴定为 7 种血清型(A~G); 随后 Van 等^[3]又发现 2 种血清型, 即 H 和 L 型。迄今为止, ORT 已有 18 个不同的血清型, 以英文字母 A~R 来命名^[4], 其中 A 型是最流行的血清型。

ORT 主要感染鸡和火鸡, 也可以感染野鸟, 不同日龄的鸡均可感染, 其中 3~4 周龄鸡最易感, 24~52 周龄的肉用种鸡也可感染发病。火鸡感染本病则多见于 2 周龄, 但 14 周龄以上的成年火鸡和母火鸡感染本病时症状更严重^[5]。水平传播是 ORT 的主要传播途径, 健康鸡群会由于吸入含有病原菌的空气尘埃而感染。病鸡康复后是否成为带菌者, 能否长期向外排毒, 目前尚不完全清楚^[6]。

1981 年, 德国学者从 5 周龄火鸡的呼吸道中最先分离到该细菌, 随后英国、以色列、美国、比利时、法国、匈牙利、日本、巴西等十多个国家也相继报道发生本病^[4], 目前该病在世界各国的流行呈上升趋势。我国陈小玲等^[7]首次在国内分离到 2 株 ORT, 但是还未见关于从山东省分离到该菌的报道, 本试验应用生化试验和 PCR 方法首次从山东省的商品肉鸡中分离到 5 株 ORT, 现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 参考菌株和抗血清 鼻气管鸟杆菌标准阳性血清和参考菌株(编号为 ORV94108、B3263191、O-96121)由英特威(Intervet)公司谭子龙博士、丘鹤英博士惠赠。鸡大肠杆菌(E00799)由山东农业大学禽病学研究室分离并保存。

1.1.2 病料 具有呼吸道症状的病(死)肉鸡, 采自山东省不同地区的鸡场。

1.1.3 试剂与仪器 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L)、10 $\times$ PCR Buffer、MgCl₂(25 mmol/ μ L)、dNTPs(10 mmol/ μ L)、琼脂糖、10 $\times$ Loadingbuffer 和蛋白酶 K, 均购自上海生工生物工程有限公司; 营养琼脂、麦康凯培养基和生化试剂管, 购自杭州天和微生物试剂有限公司; PBS(pH7.4)及其他相关化学试剂均为国产分析纯。PCR 仪(Eppendorf, 德国), 电泳仪、凝胶成像仪(Biorad, 意大利)。

1.2 ORT 的分离培养

ORT 的分离按 Chin 等^[8]的方法进行。无菌采

集病死鸡的肺脏、气管, 用接种环在血平板上划线培养, 置于体积分数 5% CO₂ 环境中, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 将疑似菌落接种于麦康凯培养基, 对不能在麦康凯培养基上生长的细菌进行革兰氏染色镜检。

1.3 ORT 的生化鉴定

对培养后的 ORT 疑似菌落进行生化试验, 按常规方法进行氧化酶、过氧化氢酶试验及鸟氨酸脱羧酶、精氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶、尿素酶、乳糖、蔗糖、麦芽糖和果糖发酵。

1.4 ORT 的玻片凝集试验

参考文献^[9]的方法, 取纯化的各分离菌株分别与 ORT 的标准阳性血清进行玻片凝集试验, 以标准菌株做为阳性对照, 鸡大肠杆菌和生理盐水做为阴性对照, 1~3 min 后观察是否出现凝集现象。

1.5 ORT 的 PCR 鉴定

1.5.1 细菌 DNA 的提取 参考文献^[10]的方法, 提取细菌基因组 DNA 作为模板。具体的操作步骤如下: 取对数生长期细菌细胞 1.5 mL, 8 000 r/min 离心 5 min, 将沉淀溶于 500 μ L TE 缓冲液中混匀加入 30 μ L 质量分数 10% 的 SDS 和 3 μ L 蛋白酶 K, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h; 加入 100 μ L 5 mol/L 的 NaCl 充分混匀, 再加入 80 μ L 的 CTAB/NaCl 混匀, 于 65 $^{\circ}$ C 温育 10 min; 加入等体积的氯仿/异戊醇(V(氯仿): V(异戊醇)=24:1)混合溶液混匀, 12 000 r/min 离心 4~5 min, 取上清液加入苯酚/氯仿/异戊醇(V(苯酚): V(氯仿): V(异戊醇)=25:24:1)抽提; 加入 0.6 倍体积的冷异丙醇、0.1 倍体积的乙酸钠(pH5.2)沉淀 DNA, 取絮状体加入体积分数 70% 冷乙醇洗涤, 7 500 r/min 离心 5 min。将得到的 DNA 样品溶解于 TE 中, 置-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5.2 PCR 反应 参考文献^[11]的方法, 根据 GenBank 已发表的 ORT16S rRNA 基因序列, 设计 1 对引物。上游引物为: 5'-ATAGCCCGGG GAAACTCGGATT-3', 下游引物为: 5'-GGCATCG TTTACTGCGTGGACT-3', 预期扩增的片段长度为 671 bp。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 用灭菌的双蒸水稀释为 25 μ mol/L, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

PCR 反应体系为 25 μ L: 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L, MgCl₂(1 mol/mL) 1 μ L, dNTP (25 μ mol/L) 1.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, 上、下游引物(25 μ mol/L) 各 0.8 μ L, *Taq*(5 U/ μ L) 酶 0.3 μ L, 灭菌双蒸水 16.1 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94

℃ 50 s;56 ℃ 50 s;72 ℃ 1 min,30 个循环后;72 ℃ 延伸 10 min。

1.5.3 PCR 扩增产物的检测 取 5 μL 的扩增产物与 3 μL 10×Loading Buffer 混匀,加到含 EB 的 8 g/L 琼脂糖凝胶中,同时加入 DNA Marker (DL2000),在电压为 90 V/cm 条件下,电泳 30 min 左右,于凝胶成像仪下观察并记录结果。

1.5.4 PCR 产物的克隆及序列测定 在紫外灯照射下切取特异性条带,自然干燥后称质量,按 TaKa-Ra Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 介绍的方法,纯化回收目的片段。将回收产物与 pMD 18-T Vector 连接,转化 DH-5α 大肠杆菌感受态细胞,经 *EcoR* I、*Sal* I 双酶切鉴定后送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。将测序获得的 DNA 序列与 GenBank 发表的其他 7 个 ORT 参考菌株 (PT-SB930728-A、YL-SB930715-C、LMG9086T、LMG15870、LMG11554、LMG14578、D95-36425) 的序列进行同源性比较,并绘制系统进化树。

1.6 ORT 的血清型鉴定

参考文献[12],采用琼脂扩散沉淀试验 (AGP) 对 ORT 分离株进行血清型鉴定,将各纯化菌株置沸水浴中 1 h,重悬于 9 g/L 的生理盐水中作为 AGP 抗原,按照常规方法进行试验。

1.7 动物回归试验

将纯化后的各菌株接种于含体积分数 5% 绵羊

血的琼脂培养基,37 ℃ 培养 24 h,调整菌液浓度至 10⁹ mL⁻¹,各分离菌株分别接种 10 只 10 日龄健康商品代肉鸡,每只气管接种 1 mL,连续观察 10 d 并进行剖检,记录结果。

1.8 药敏试验

应用圆纸片扩散法对分离的 ORT 菌株进行药物敏感性试验,参考文献[10]的标准对结果进行判断。供试药物包括青霉素、羟氨苄青霉素、头孢曲松、庆大霉素、丁胺卡那霉素、妥布霉素、链霉素、氧氟沙星、恩诺沙星和环丙沙星。

2 结果与分析

2.1 分离菌的培养特性及染色特点

本试验共分离到 5 株疑似 ORT 菌株 (分别命名为 SD1~SD5),其菌落呈灰色到灰白色,不溶血,边缘光滑,稍突起,针尖大小,分散均匀,菌落直径为 1~2 mm,接种麦康凯培养基不生长。挑取典型菌落进行革兰氏染色,镜检可见阴性短杆菌或菌体稍大的短杆菌,单个或呈短丝状,呈现明显的多形性。

2.2 分离菌的生化试验

分离菌株生化试验结果 (表 1) 表明,分离菌株与参考菌株和国外分离菌株的生化结果相似,可初步判定为 ORT。

表 1 分离菌株的生化试验结果

Table 1 Results of the biochemical tests for ORT used in the identification of the isolates.

项目 Item	分离株 Isolates				
	SD1	SD2	SD3	SD4	SD5
氧化酶 Oxidase	+	+	+	+	+
过氧化氢酶 Catalase	—	—	—	—	—
尿素酶 Urase	+	+	+	+	+
在麦康凯培养基上的生长情况 Growth on MacConkey	—	—	—	—	—
鸟氨酸脱羧酶 Orinithine decarboxylase	—	—	—	—	—
精氨酸 Arginine dehydrolase	+	—	—	+	+
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	—	—	—	—	—
乳糖 Lactose	+	+	+	+	+
蔗糖 Sucrose	—	+	+	—	—
麦芽糖 Maltose	+	+	+	+	—
果糖 Fructose	+	+	+	+	+

2.3 玻片凝集试验

玻片凝集试验结果显示,标准阳性血清与阴性对照菌株均不产生凝集现象,而与标准参考菌株和分离菌株均能产生白色絮状凝集物。

2.4 分离菌的 PCR 检测

分离的 ORT 菌株经 PCR 检测后均能扩增到 1

条长度为 671 bp 的片段,与标准参考菌株所扩增的片段长度一致,而对照菌株鸡大肠杆菌未扩增到相应的片段 (图 1)。

2.5 同源性比较

将 ORT 分离菌株的 DNA 序列与 GenBank 中已发表的 ORT 序列进行比较,结果同源性均在

98%以上(表 2),分离株 SD4 与 PT-SB930728-A 的同源性最高,达 100%,表明扩增片段均为 ORT 特

异性片段。进化分析结果见图 2,由图 2 可知,5 株分离菌株的亲缘关系较近。

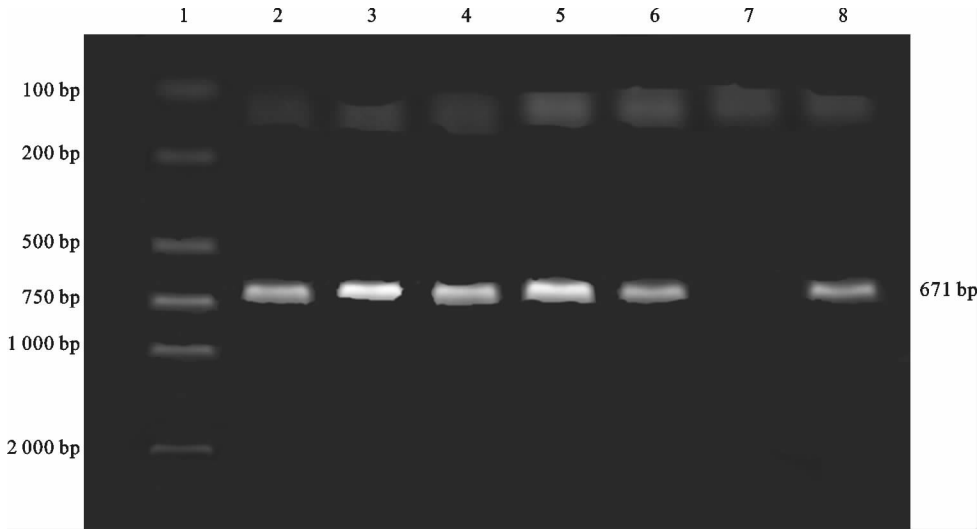


图 1 PCR 鉴定结果

1. Marker;2~6. 分别为分离株 SD1~SD5;7. 大肠杆菌;8. 标准菌株

Fig. 1 The amplification result of ORT isolate

1. Marker;2~6; Isolates SD1—SD5;7. *E. coli*;8. Type strain

表 2 DRT 分离株与 GenBank 上已发表菌株核苷酸序列同源性的比较

Table 2 The gene sequencing and comparison of homologies of ORT with the isolates of ORT publised in the GenBank

毒株 Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	—	98.8	99.8	99.4	99.7	99.8	100.0	99.7	99.8	99.8	100	99.5
2	1.2	—	98.6	98.8	98.8	98.9	98.8	98.5	98.6	98.6	98.8	98.3
3	0.2	1.4	—	99.6	99.7	99.7	99.9	99.4	99.6	99.6	99.7	99.3
4	0.6	1.2	0.4	—	99.7	99.7	99.6	99.1	99.3	99.3	99.4	99.0
5	0.3	1.2	0.3	0.3	—	99.8	99.7	99.3	99.4	99.4	99.6	99.1
6	0.2	1.1	0.3	0.3	0.2	—	99.8	99.4	99.6	99.6	99.7	99.3
7	0.0	1.2	0.1	0.4	0.3	0.2	—	99.6	99.7	99.7	99.9	99.4
8	0.3	1.6	0.6	0.9	0.8	0.6	0.4	—	99.6	99.6	99.7	99.9
9	0.2	1.4	0.4	0.8	0.6	0.4	0.3	0.4	—	99.7	99.9	99.6
10	0.2	1.4	0.4	0.8	0.6	0.4	0.3	0.4	0.3	—	99.9	99.4
11	0.0	1.2	0.3	0.6	0.4	0.3	0.1	0.3	0.1	0.1	—	99.6
12	0.5	1.7	0.7	1.1	0.9	0.7	0.6	0.1	0.4	0.6	0.4	—

注:1. PT-SB930728-A;2. YL-SB930715-C;3. LMG9086T;4. LMG15870;5. LMG11554;6. LMG14578;7. D95-36425;8. 分离株 1;9. 分离株 2;10. 分离株 3;11. 分离株 4;12. 分离株 5.

Note:1. PT-SB930728-A;2. YL-SB930715-C;3. LMG9086T;4. LMG15870;5. LMG11554;6. LMG14578;7. D95-36425;8. Isolates SD1;9. Isolates SD2;10. Isolates SD3;11. Isolates SD4;12. Isolates SD5

2.6 血清型鉴定

应用琼脂扩散沉淀试验对分离的 5 株 ORT 进行血清型鉴定,结果发现分离的菌株中有 3 株为血清 A 型,1 株为血清 B 型,1 株为血清 D 型,表明山东省 ORT 的血清型存在多样性。

2.7 动物回归试验

5 株分离 ORT 菌株均可引起试验雏鸡发病,临床症状主要表现为:精神沉郁、咳嗽、呼吸困难;经剖

检可见有腹水,气囊有纤维素性渗出物,肺脏出血,气管环出血,纤维素性心包炎,肝周炎。

2.8 药敏试验

对分离的菌株进行药敏试验,结果见表 3。表 3 表明,5 株细菌对青霉素、链霉素、庆大霉素存在耐药性;对妥布霉素中度敏感;而对羟氨苄青霉素、丁胺卡那霉素、头孢曲松、氧氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星则高度敏感,不同分离菌株对同种药物的敏感性

有一定的差异,这可能与不同地区的用药习惯有关。

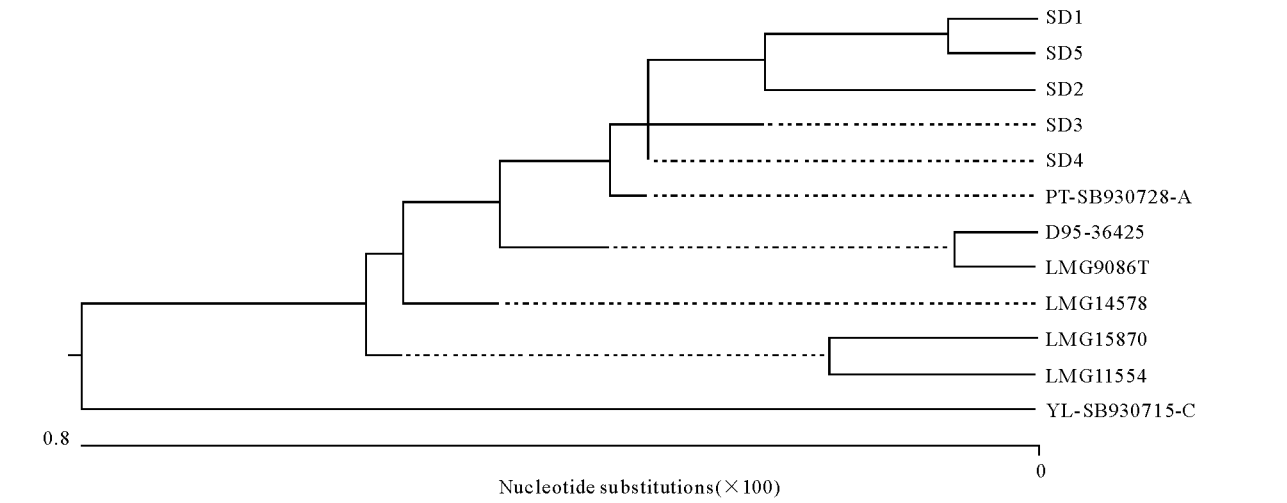


图 2 ORT 分离株与 GenBank 上已发表 ORT 菌株核苷酸的遗传进化分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of the isolates and 7 ORT isolates published in the GenBank

表 3 ORT 分离株的药敏试验

Table 3 Results of the antimicrobial susceptibility tests of the isolates

药物 Test substncea	抑菌圈直径/mm Inhibition zone exhibited by isolates in response to test substances				
	SD1	SD2	SD3	SD4	SD5
青霉素 Penicillin G	0	0	3	1	1
羟氨苄青霉素 Amoxicillin	25	30	24	26	29
头孢曲松 Ceftriaxone	20	19	22	17	20
庆大霉素 Gentamicin	8	10	9	5	7
丁胺卡那霉素 Amikacin	18	20	19	21	18
妥布霉素 Tobramycin	13	15	14	13	12
链霉素 Streptomycin	6	8	10	11	9
氧氟沙星 Ofloxacin	31	29	30	29	27
恩诺沙星 Enrofloxacin	25	30	26	29	24
环丙沙星 Ciprofloxacin	31	33	35	33	30

3 讨 论

对分离到的 5 株 ORT 进行生化鉴定,其中分离株 SD1、SD4 生化试验结果与标准参考菌株及国外分离菌株相似;但是 SD2、SD3 精氨酸脱羧酶阴性,可以发酵蔗糖产酸,这与 Charlton 等^[13]和 Hafez 等^[14]的研究结果一致,而与标准参考菌株不同;5 株 ORT 均不能发酵麦芽糖产酸,这与 Travers 等^[15]的研究结果有所不同,可能与不同地区分离株的生化特性不同有关。分离株培养特性和生化试验结果与 Vandamme 等^[16]和 Van Empel 等^[2]报道的结果基本一致,可初步鉴定为 ORT。

对本试验分离到的 5 株 ORT 进行 PCR 鉴定,结果均能扩增到与设计长度(671 bp)一致的特异性片段,而对照菌株扩增不出任何片段。将分离菌株的 DNA 序列与 GenBank 已发表的 ORT 序列进行比较,结果同源性均在 98% 以上,其中 SD4 与 PT-

SB930728-A 的同源性最高达 100%,表明扩增片段为 ORT 的特异性片段;各分离株之间也表现出高度的同源性。遗传进化分析结果表明,分离株 SD1 和 SD5 的亲缘关系最近,两者处于同一小分支上。分离株与 PT-SB930728-A 的亲缘关系最近,而与 YL-SB930715-C 的遗传关系最远。

AGP 是一种用来对 ORT 进行血清分型的方法^[12]。本研究结果显示,分离得到的 5 株 ORT 有 3 株为血清 A 型,1 株为血清 B 型,1 株为血清 D 型。

动物回归试验结果表明,分离菌株对试验肉鸡具有致病性。5 株 ORT 均能引起试验肉鸡发病,且临床症状和病理变化均与自然发病情况相似。

本试验首次从山东省商品肉鸡群中分离到 ORT,证明山东省商品肉鸡群中存在 ORT 感染。对分离菌株进行血清型鉴定和药敏试验,结果为 ORT 的防制提供了理论依据,但是在 ORT 的流行病学和致病力等还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Van Empel P C, Hafez H M. *Ornithobacterium rhinotracheale*: A review [J]. *Avian Pathology*, 1999, 28: 217-227.
- [2] Van Empel P, Van den Bosch H, P Loeffen, et al. Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(2): 418-421.
- [3] Van Empel P, Van den Bosch H. Vaccination of chickens against *Ornithobacterium rhinotracheale* infection [J]. *Avian Dis*, 1998, 42(3): 572-578.
- [4] Hafez H M. Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale* [J]. *J Poult Sci*, 2002, 19: 114-118.
- [5] Saif Y M. 鼻气管鸟疫杆菌感染. 禽病学 [M]. 11 版. 北京: 中国农业出版社, 2005: 775-780.
Saif Y M. The infection of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Diseases of Poultry* [M]. 11th Edition. Beijing: China Agriculture press, 2005: 1281-1285. (in Chinese)
- [6] 冯元璋. 鸡鼻气管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.
Feng Y Z. Advance in *Ornithobacterium rhinotracheale* [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2003, 30(3): 289-293. (in Chinese)
- [7] 陈小玲, 宋 呈. 我国鼻气管鸟疫杆菌鉴定初报 [J]. *中国兽药杂志*, 2000, 34(2): 62-63.
Chen X L, Song C. Identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from China [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2000, 34(2): 62-63. (in Chinese)
- [8] Chin R P, Droual R. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection [C]//Calnek B W, Barnes H J, Beard C W, et al. *Diseases of Poultry*. 10th Ed Ames: Iowa State University Press, 1997: 1012-1015.
- [9] 姚火春. 兽医微生物学实验指导 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 46-47.
Yao H C. *Veterinary Microbiology Experiment Manual* [M]. Beijing: China Agriculture press, 2002: 46-47. (in Chinese)
- [10] F. 奥斯伯, R. 布伦特, K 斯特拉尔等. 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 39-40.
Frederick M. A, Roger Brent, Kevin Struhl, et al. *Short Protocols in Molecular Biology* [M]. Beijing: Science Press, 1998: 39-40. (in Chinese)
- [11] 李瑶瑶, 刁有祥. 鼻气管鸟杆菌 PCR 诊断方法的建立与应用 [J]. *福建农业学报*, 2009, 24(1): 19-23.
Li Y Y, Diao Y X. PCR method for *Ornithobacterium rhinotracheale* detection [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2009, 24(1): 19-23. (in Chinese)
- [12] Paul Van Empel. Identification and Serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(2): 418-421.
- [13] Charlton B R, Charming-Santiago S E, Bickford A, et al. Preliminary characterization of a pleomorphic gram-negative rod associated with avian respiratory disease [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1993, 5(1): 47-51.
- [14] Hafez M, Reinhard. Investigations on different *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates [J]. *Avi Dis*, 1999, 43: 1-7.
- [15] Travers A F. Concomitant *Ornithobacterium rhinotracheale* and Newcastle disease infection in broilers in South Africa [J]. *Avian Dis*, 1996, 40: 488-490.
- [16] Vandamme P, Segers P. *Ornithobacterium rhinotracheale*. gen. nov, sp. nov. Isolated from the avian respiratory tract [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44(1): 24-37.