

两株副猪嗜血杆菌的分离鉴定及药敏试验

乔荣岑¹,王生富^{1,2},孙进忠¹,张许科¹,廖永洪^{1,2},白朝勇^{1,2*}

(1. 普莱柯生物工程股份有限公司,河南洛阳 471000;2. 国家兽药工程技术研究中心生物制品研究所,河南洛阳 471000)

[收稿日期] 2013-01-04 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 06-0016-05 [中图分类号] S852.61

[摘要] 从疑似副猪嗜血杆菌病发病猪场采集 58 份病料,分离到 2 株革兰氏阴性短小杆菌。对分离菌株进行培养特性、生化特性、血清型分型研究以及 PCR 检测和测序分析,结果表明,分离的两株细菌均为血清 4 型副猪嗜血杆菌。对分离菌株进行药敏试验分析,结果显示分离株对头孢噻肟、头孢噻吩、替米考星高度敏感,对四环素、丁胺卡那、恩诺沙星、环丙沙星中度敏感,对甲氧苄氨嘧啶、复方新诺明、链霉素、阿莫西林、新霉素均耐药。

[关键词] 副猪嗜血杆菌;分离;鉴定;血清型;药敏试验

Isolation, Identification and Drug Sensitivity Research of *Haemophilus parasuis* 2 Strains

QIAO Rong - cen¹, WANG Sheng - fu^{1,2}, SUN Jin - zhong¹,
ZHANG Xu - ke¹, LIAO Yong - hong^{1,2}, BAI Chao - yong^{1,2*}

(1. Pulike biological Engineering. INC. , Luoyang , Henan 471000 , China; 2. Institute of National Engineering and Research Centers for Veterinary Medicine , Luoyang , Henan 471000 , China)

Abstract: The two small gram - negative bacilli were isolated from 58 samples of pigs with suspected infection by

作者简介: 乔荣岑,工程师,从事动物生物制品的生产与开发。

通讯作者: 白朝勇。E-mail: chybai63vp@yahoo.com.cn

炎类灭活疫苗进口产品的质量监督检查过程中注意到,来自 3 个不同国家的企业提供的副鸡禽杆菌菌种在 -20 ℃ 的保存期分别为 10、13、20 年,且菌种经本实验室复苏后其生长特性及毒力均良好。菌种的复苏、复壮、繁殖、冻干和检定工作不仅需要投入较长的时间,同时尚需消耗一定数量的人力、财力和物力。因此,采用科学有效的保存方法并制定合理的保存期,既能有效地延续菌种的固有特性,又可避免不必要的资源浪费,并可提高工作效率。本试验的结果表明,真空冻干菌种于 -70 ℃ 保存 10、14、20 年,其毒力仍能满足要求;真空冻干菌种于 -70 ℃ 保存 14、20 年,其免疫原性仍能满足要求。因此,制定更长副鸡禽杆菌 Hpg - 8 株菌种的保存期显然是必要的,并且是可行的。

副鸡禽杆菌 Hpg - 8 株菌种在各年代繁殖冻干时均按《中华人民共和国兽用生物制品规程》(二

○○○版)的标准检定全部项目,本次试验对不同保存年代菌株的毒力和免疫原性重新进行了试验,结果均符合规定,表明该菌株于 -70 ℃ 保存 20 年,仍可作为鼻炎类疫苗制品的生产检验用菌种。

参考文献:

- [1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 北京:中国农业出版社,2007:144-147.
- [2] Blackall P J, Christensen H, Beekenhart T, et al. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55 (Pt1):353-362.
- [3] 农业部兽用生物制品规程委员会. 中华人民共和国兽用生物制品规程二○○○版[S].
- [4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典三部二○○一版[S].

(责任编辑:侯向辉)

Haemophilus parasuis in Henan. Isolates were identified as *Haemophilus parasuis* with the culture characteristics, biochemical method, PCR and sequencing. Two isolates were serotyped by kielitein - rapp - gabriedson as serotype 4. Results of drug sensitivity test showed that isolates were strong resistance to trimethoprim, sulfamethoxazole, streptomycin, amoxicillin, neomycin, highly sensitive to ceftiofur, cefotaxime, tilmicosin and sensitive to tetracycline, amikacin, enrofloxacin, ciprofloxacin.

Key words: *Haemophilus parasuis*; isolation; identification; serotypes; drug sensitivity test

副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, Hps) 属于巴斯德菌科嗜血杆菌属, 是引起猪格拉泽氏病 (Glasser's disease) 的病原菌^[1]。该病常见于 5 ~ 8 周龄的猪, 发病率一般在 50% ~ 70%, 死亡率可达到 10% 以上^[2]。主要引起猪的纤维素性多发性浆膜炎和关节炎, 急性型可引起败血症, 在不出现典型的浆膜炎时就呈现发绀, 皮下水肿和肺水肿, 甚至死亡, 急性感染后可能留下后遗症, 如公猪跛行^[3]。近年来, 副猪嗜血杆菌在我国各猪场引起多发性浆膜炎和关节炎的报道越来越多, 在卫生条件和管理水平均较好的猪场该病的发病率和死亡率也逐渐显著增多, 给养猪业带来巨大的损失。本研究从 2008 ~ 2009 年河南省发生猪浆膜炎和关节炎的猪场采集 58 份病料中分离到 2 株革兰氏阴性细小杆菌, 进行了一系列鉴定, 并对分离株进行了药敏分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料 2008 年 3 月至 2009 年 10 月, 从河南省不同地区发生猪关节炎和浆膜炎的 20 家猪场共采集病猪肺脏 55 份、关节液 3 份, 共 58 份病料。

1.1.2 主要试剂 革兰氏染色液, 北京索来宝公司; 微量生化鉴定管和药敏试纸, 杭州天和微生物试剂有限公司; 辅酶 NAD, 上海生工; dNTP、PCR buffer、rTaq DNA 聚合酶、DNAMarker DL 2000、pMD18-T 载体 (批号: B6805B)、DNA 胶回收试剂盒 (批号: 1208250006), 宝生物工程 (大连) 有限公司; 胰蛋白大豆琼脂 (TSA)、胰蛋白大豆肉汤 (TSB), Difco 公司; 优级胎牛血清, 浙江天杭生物科技有限公司。

1.1.3 标准分型血清 武汉科前动物生物制品有限责任公司 (批号: 0902001)。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离培养 无菌采集病猪肺组织、关节液用接种环接种于含 10% 血清和 1 μg/mL NAD 的 TSA 平板上, 37 °C 条件下含 5% CO₂ 培养箱中恒温培养 24 h, 挑取疑似菌落进行革兰氏染色镜检。

1.2.2 V 因子依赖试验 参照文献^[4], 将可疑菌落分别接种于含 NAD 及不含 NAD 的 2 种 TSA 平

板上, 于 37 °C 培养 24 h 后观察 TSA 平板上是否有菌落长出。

将含有 10% 脱脂绵羊血的 TSA 平板上, 划线接种金黄色葡萄球菌, 再垂直于金黄色葡萄球菌划线接种上述分离纯化的可疑菌, 在 37 °C 条件下含 5% CO₂ 培养箱中恒温培养 24 h, 观察是否有“卫星现象”和溶血发生。

1.2.3 生化鉴定 取纯培养菌落接种于脲酶、氧化酶、接触酶、硝酸盐还原、吲哚、葡萄糖、蔗糖、果糖、半乳糖、核糖和麦芽糖等微量生化鉴定管, 按说明书操作并观察结果。

1.2.4 PCR 鉴定 参照文献^[5]设计三条引物, 由 invitrogen (上海) 贸易有限公司合成:

HP1F3: 5' - TATCGRGAGATGAAAGAC - 3'

HP2F2: 5' - GTAATGTCTAAGGACTAG - 3'

HPRex: 5' - CCTCGCGCTTCGTC - 3'; 特异性扩增 Hps 部分 16S rRNA 基因, 预计扩增片段大小为 1090 bp。

1.2.4.1 基因组 DNA 的提取 挑取单菌落于含 50 μL 双蒸水中混匀, 水浴煮沸 5 min, 冰上放置 5 min, 10000 r/m 离心 2 min 取上清作为模板。

1.2.4.2 16sRNA 的 PCR 扩增 PCR 反应体系: 10 × Buffer 2.5 μL, dNTP 2.0 μL, MgCl₂ 1.5 μL, Taq 0.1 μL, 模板 2 μL, 引物 (上、下游) 各 0.8 μL, 加无菌水至总体积为 25 μL。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 50 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物电泳检测后 4 °C 保存。

1.2.4.3 测序 用 DNA 柱回收试剂盒将 PCR 产物割胶回收, 将其克隆入 pMD-18T 载体, 进行蓝白斑筛选, 将鉴定为阳性的转化子送往 invitrogen 公司测序。

1.2.5 血清学分型 用 KieLetein - Rapp - Gabriedson (KRG) 琼脂扩散法^[6]进行血清分型, 其中中间孔加入标准阳性血清, 周边孔分别加入标准菌株热稳定抗原、待检菌株热稳定抗原和 PBS 液, 热稳定抗原参照文献^[7]制备。

1.2.6 药敏试验 挑取分离菌株, 于含 NAD 鲜血琼脂平板或 TSA 平板均匀划线, 用无菌镊子将药敏

纸片平贴于培养基表面,37℃培养 24 h 后测量抑菌圈直径。按照美国临床实验室标准委员会 (CLSI/NCCLS) 2006 版执行标准判定结果^[8-9]。

1.2.7 Balb/c 小鼠致死性试验 将分离菌划线接种于 TSA 培养基,37℃培养 24 h,用生理盐水洗脱并分别稀释至 1×10^{10} CFU/mL、 1×10^9 CFU/mL 和 1×10^8 CFU/mL,每只经腹腔注射 0.2 mL,每个分离株每个稀释度接种 5 只 Balb/c 小鼠,同时另设 5 只经腹腔各注射相同量的生理盐水作对照。接种后观察精神状态及死亡情况,连续观察 10 d,剖检 Balb/c 小鼠,无菌取其肺脏、心脏血液分离细菌。

2 结果

2.1 组织病料分离培养 采集的病料无菌条件下接种于含辅酶 I (NAD) 和小牛血清的 TSA 平板,37℃条件下含 5% CO₂ 培养箱中恒温培养 24 h,有针尖大小,约 1~2 mm 左右,半透亮,表面光滑的菌

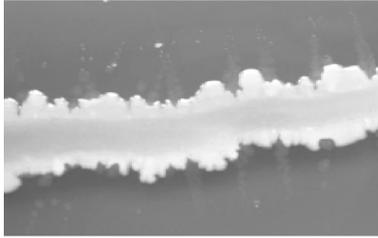


图1 HeN₁ 株 "卫星现象",且无溶血

2.4 生化鉴定结果 分离菌株生化试验鉴定结果为脲酶试验阴性,氧化酶试验阴性,接触酶试验阳性,硝酸盐还原试验阳性,吲哚试验阴性,并发酵葡

落长出。挑取单菌落进行革兰氏染色,有 2 株为革兰氏阴性短小杆菌,有 2 株为革兰氏阴性球杆菌。

2.2 纯化培养 挑取革兰氏染色为阴性小杆菌的 2 株疑似菌落,转接入新的 TSA 平板上,37℃条件下含 5% CO₂ 培养箱中进行了纯培养,36 h 后有单菌落长出,平板上菌落形态单一。

2.3 V 因子依赖试验和 "卫星现象" 2 株可疑菌株均在含 NAD 的 TSA 平板上生长,在不含 NAD 的 TSA 平板上无菌落生长。

将可疑菌株在绵羊鲜血琼脂平板上与金黄色葡萄球菌交叉划线,结果 37℃培养 36 h 后在金黄色葡萄球菌线两侧有针尖大小、圆形、边缘整齐的菌落生长,越靠近葡萄球菌的周围其生长越好,远离葡萄球菌的地方菌落较小,呈现出明显的 "卫星现象",且无溶血产生 (见图 1、图 2),因此命名 2 株菌分别为 HeN₁ 株和 HeN₂ 株。

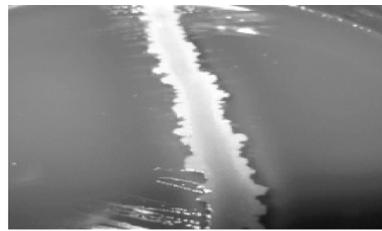


图2 HeN₂ 株 "卫星现象",且无溶血

萄糖、蔗糖、果糖、核糖和麦芽糖等碳水化合物,符合副猪嗜血杆菌的生化特性 (见表 1)。

表 1 V 因子依赖性和生化鉴定结果

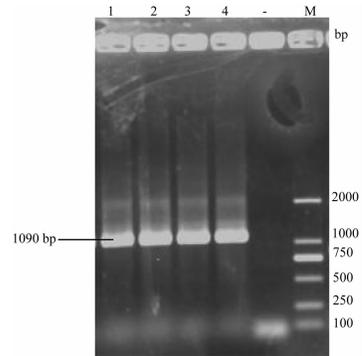
菌株	V 因子依赖	脲酶试验	氧化酶试验	接触酶试验	硝酸盐还原	吲哚试验	葡萄糖	蔗糖	果糖	核糖	麦芽糖
HeN ₁ 株	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
HeN ₂ 株	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+

注: "+" 表示依赖 V 因子生长或阳性, "-" 表示不依赖 V 因子生长或阴性。

2.5 PCR 结果

2.5.1 根据设计的副猪嗜血杆菌 16sRNA 引物进行了 PCR 鉴定,扩增结果经过琼脂糖凝胶电泳,出现约为 1090 bp 的目的条带,见图 3。

2.5.2 测序结果 将测序的结果与 GenBank 上发表的 M75065 进行了比对,发现 HeN₁ (测序号 PT5A) 和 HeN₂ (测序号 PT4A) 与 M75065 的同源性分别为 96.2% 和 96.0%,而与 M75066 的同源性均达 98.0%,可以确定分离的菌株为副猪嗜血杆菌 (同源性见图 4、进化树见图 5)。



M: marker; 1, 2: 分离菌株 HeN1 株; 3, 4: 分离菌株 HeN2 株; -: 阴性对照

图 3 HeN₁ 株和 HeN₂ 株的 PCR 鉴定结果

		Percent Identity								
		1	2	3	4	5	6	7		
Divergence	1	■	99.5	96.0	98.0	97.7	97.1	97.1	1	PT5A.seq
	2	0.5	■	96.2	98.0	97.3	97.3	97.3	2	PT4A.seq
	3	3.1	2.8	■	96.3	97.9	98.8	98.9	3	M75065.1.seq
	4	0.4	0.4	1.7	■	97.1	96.8	96.8	4	M75066.1.seq
	5	2.1	2.6	0.9	1.4	■	98.9	98.9	5	AY362910.1.seq
	6	2.9	2.6	0.1	1.7	0.7	■	99.9	6	AY362911.1.seq
	7	3.0	2.7	0.1	1.6	0.8	0.1	■	7	AB004041.1.seq
		1	2	3	4	5	6	7		

图4 副猪嗜血杆菌分离株同源性分析

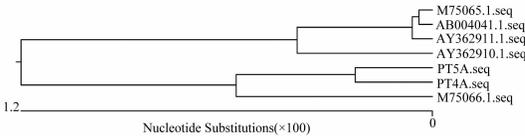


图5 副猪嗜血杆菌分离株进化树

2.6 血清学分型结果 根据琼脂扩散血清学分型结果表明, HeN1 株和 HeN2 株抗原孔均和副猪嗜血杆菌血清 4 型标准阳性血清孔之间出现沉淀线, 其它孔之间均未出现沉淀线, 因此 HeN1 株和 HeN2 株均为副猪嗜血杆菌血清 4 型菌株。

2.7 药敏试验结果 药敏试验结果表明, 两株分离株都对头孢噻肟、头孢噻吩、替米考星高敏, 对四环素、丁胺卡那、恩诺沙星、环丙沙星中敏, 对甲氧苄氨嘧啶、复方新诺明、链霉素、阿莫西林、新霉素均耐药(表 2)。

表 2 药敏试验结果

药物名称	平均抑菌圈直径/mm		中敏程度	
	HeN ₁ 株	HeN ₂ 株	HeN ₁ 株	HeN ₂ 株
丁胺卡那	18.5	19	中敏	中敏
头孢噻肟	38	36	高敏	高敏
头孢噻吩	32	30	高敏	高敏
替米考星	28	26	高敏	高敏
环丙沙星	17.5	16	中敏	中敏
甲氧苄氨嘧啶	8	9	耐药	耐药
新霉素	13.5	14	中敏	中敏
复方新诺明	11	12	耐药	耐药
阿莫西林	8.5	10	耐药	耐药
链霉素	9	9.5	耐药	耐药
四环素	26	27	中敏	中敏
恩诺沙星	20	17	中敏	中敏

2.8 致病性试验结果 分离菌株菌液感染的 Balb/c 小鼠在 12 h 后出现死亡, 在 24 ~ 72 h 内呈现死亡高峰, 对照组全部健活(表 3)。取死亡 Balb/c 小鼠的肺脏、心脏血液划线接种含 NAD 的 TSA 培养基进行分离鉴定, 从发病死亡的小鼠肺心

表 3 不同剂量菌液注射 Balb/c 小鼠后死亡结果

菌株	不同剂量菌液注射后 Balb/c 小鼠死亡率(死亡数/感染数)		
	2 × 10 ⁹ CFU	2 × 10 ⁸ CFU	2 × 10 ⁷ CFU
	HeN ₁ 株	5/5	3/5
HeN ₂ 株	4/5	2/5	1/5
对照	0/5		

中再次分离菌株与攻毒菌株一致, 均为副猪嗜血杆菌。分离的 HeN1 株和 HeN2 株以 2 × 10⁹ CFU/只的攻毒剂量可致 80% ~ 100% 小鼠死亡, 表明分离的菌株对小鼠有较强的毒力。

2 讨论

副猪嗜血杆菌病与猪的链球菌病、支原体肺炎、传染性胸膜肺炎等临床上很容易将它们混淆^[10]。副猪嗜血杆菌对生长条件要求比较苛刻, 分离鉴定存在耗时长、分离率低等缺点, 本文用分离细菌常用的菌落形态、生长特性、染色镜检、生化鉴定等方法结合 16S rRNA 的 PCR 检测。根据 *ysten A* 等建立的复合 PCR 检测方法, 设计了 3 条引物, 扩增到 1090 bp 左右的片段, 该 PCR 方法具有高度的种特异性, 能够将副猪嗜血杆菌与吡啶放线杆菌^[5]、猪放线杆菌相区别^[11], 在分离培养过程中结合 16S rRNA 的 PCR 检测法, 排除了 2 株革兰氏阴性球杆菌, 大大提高了分离效率。同时所建立的 PCR 检测方法不仅可从分离培养物中对进行鉴定, 而且可以直接对病料进行 PCR 检测, 因此, 可以应用于临床诊断中。

我国的副猪嗜血杆菌病流行病学调查显示, 优势血清型为血清 4 型、5 型、12 型和 13 型^[12]。笔者从 58 份病料中仅分离到 2 株副猪嗜血杆菌, 经血清学分型均为副猪嗜血杆菌血清 4 型, 与调查结果相似, 未分离到其它血清型菌株, 原因可能是样品采集地区主要流行血清 4 型菌株, 也可能是用过抗生素或者是部分病例死亡时间过长造成的。由于副猪嗜血杆菌的血清型众多, 血清型之间缺乏有效的交叉保护^[13], 副猪嗜血杆菌又具有明显的地方特征, 而疫苗的使用是预防副猪嗜血杆菌的最有效的方法之一。其防疫用疫苗在西班牙、日本、澳大利亚、加拿大和美国应用极广泛^[14]。因此本文研究为今后副猪嗜血杆菌的临床诊断和疫苗的研制奠定了基础。

药敏试验结果表明, 副猪嗜血杆菌分离株对头孢噻肟、头孢噻吩、替米考星高度中敏, 对四环素、丁胺卡那、恩诺沙星、环丙沙星中敏, 对甲氧苄氨嘧啶、复方新诺明、链霉素、阿莫西林、新霉素均耐药。给猪场在合理使用抗生素时提供了一定的参考。

参考文献:

[1] Oliveiar S, Pijoan C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control [J]. *Veterinary Microbiology*, 2004, 99: 11 - 12.

[2] Turni C, Blackall P. J. Comparison of sampling sites and detection methods for *Haemophilus parasuis* [J]. *Australian Veterinary Journal*, 2007(5): 177 - 184.

呋喃唑酮代谢物人工抗原的合成及抗体的制备

贾慧勤¹,丁焕中^{1*},刘晓云²,李小红¹,张炳旭¹,鲁晓雄¹

(1. 华南农业大学兽医学院,广州 510642;2. 广州万孚生物技术股份有限公司,广州 510641)

[收稿日期] 2013-01-16 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 06-0020-04 [中图分类号] S859.84

[摘要] 为改进和完善免疫检测呋喃唑酮代谢物方法,制备了抗呋喃唑酮代谢物(AOZ)特异性抗体。采用对醛基苯甲酸对 AOZ 进行衍生化得到 CPAOZ,还原 CPAOZ 结构中的 C=N 双键得到半抗原,半抗原用 N-羧基琥珀酰亚胺活化酯法与 BSA 偶联制备免疫原,免疫新西兰大白兔制得特异性抗体,采用间接(竞争)ELISA 法评价抗血清效价及特异性。结果显示,试验获得了较高效价(1:1280000)的抗 AOZ 血清,AOZ 半抑制浓度为 5.9 ng/mL;抗血清与结构类似物呋喃它酮代谢物的交叉反应率仅为 0.76%,与呋喃妥因代谢物和呋喃西林代谢物无交叉反应;利用该抗体建立的间接竞争 ELISA 检测法,AOZ 在 1~27 ng/mL 与抑制率呈线性关系。结果表明,该特抗体虽然灵敏度较低,却对 AOZ 而非 AOZ 衍生物有特异性,可为畜产品中 AOZ 残留检测提供新的思路和方法。

[关键词] 呋喃唑酮代谢物;特异性抗体;间接(竞争)ELISA

Synthesis of Artificial Antigens and Preparation of Specific Antisera against 3 - amino - 2 - oxazolidinone, a Metabolite of Furazolidone

JIA Hui - qing¹, DING Huan - zhong^{1*}, LIU Xiao - yun², LI Xiao - hong¹, ZHANG Bing - xu¹, LU Xiao - xiong¹

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Guangzhou Wondfo Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou 510641, China)

Abstract: In order to prepare specific antibody against 3 - amino - 2 - oxazolidinone (AOZ), a metabolite of furazolidone, AOZ was activated by 4 - formylbenzoic acid and then reduced the schiff base, then conjugated with

作者简介: 贾慧勤,硕士研究生,从事兽药残留快速残留检测研究。

通讯作者: 丁焕中。E-mail: hzding@scau.edu.cn

[3] Oliveira S, Galina L, Blanco I, et al. Naturally - farrowed, artificially - reared pigs as an alternative model for experimental infection by *Haemophilus parasuis* [J]. Can J Vet Res. 2003, 67 (2):146 - 150.

[4] Kielstein P, Wuthe H, Angen O, et al. Phenotypic and genetic characterization of NAD - dependent Pasteurella spp. from the respiratory tract of pigs and their possible pathogenetic importance [J]. Vet Microbiol, 2001 (81):243 - 255.

[5] ystein A, Simone O. Development of an improved species specific PCR test for detection of *Haemophilus parasuis* [J]. Vet Microbiol. 2007, 119(2 - 4):266 - 276.

[6] Rafiee M, Blackall P. J. Establishment, validation and use of the Kielstein - Rapp - Gabrielson Serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*. Australian Veterinary Journal, 2000, 78(3):172 - 174.

[7] Kielstein P, Rapp - Gabrielson VJ. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat - stable antigen extracts [J]. J Clin Microbiol. 1992, 30(4):862 - 865.

[8] 孙长贵译. 抗微生物药物敏感性试验执行标准[S]. 第十六版信息增刊. CLSI 文件 M100 - S16 (ISBN1 - 56238 - 556 - 7). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 - 1898 USA, 2006.

[9] 倪语星, 洪秀华. 细菌耐药性监测抗感染治疗[M]. 2002.

[10] 钟登科, 魏建超. 副猪嗜血杆菌病实验室诊断方法研究进展 [J]. 中国兽医杂志, 2009, 11:41 - 43.

[11] 米丰泉, 陈小玲, 王翠敏, 等. 猪的胸膜肺炎放线杆菌、多杀性巴氏杆菌和副猪嗜血杆菌复合 PCR 检测方法的建立 [J]. 动物医学进展, 2005, 26(5):85 - 88.

[12] 蔡旭旺. 副猪嗜血杆菌的分离鉴定及诊断方法与灭活疫苗的研究 [D]. 华中农业大学博士论文, 2006.

[13] Barbar E. Straw. 猪病学第九版 [M]. 2008, 769 - 782.

[14] Morikoshi T, Kobayashi K, Kamino T, et al. Characterization of *Haemophilus parasuis* isolated in Japan [J]. Nippon Juigaku Zasshi, 1990, 52(3):667 - 669.

(责任编辑:陈 希)