

DOI:CNKI:61-1390/S.20111021.1703.006

网络出版时间:2011-10-21 17:03

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20111021.1703.006.html>

陕西省副猪嗜血杆菌的分离及其 基于 *tbpA* 基因的分型鉴定

刘 辉,陈胜利,杨增岐,刘海金,张淑霞,
杜恩岐,王兴龙,党如意

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】检测副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, Hps)在陕西关中地区的感染状况,并对分离菌株进行基因型分析,为该地区副猪嗜血杆菌病的流行病学研究提供依据。【方法】从陕西关中地区 14 个发生多发性关节炎和浆膜炎的猪场采集 30 份病料,分离细菌,通过其培养特性和形态观察及生化试验和 PCR 等方法对分离株进行鉴定,并用 Blast 软件对分离株的 16S rRNA 序列进行同源性比对,同时对分离菌株进行了几种常见药物的敏感性检测。通过 3 种限制性内切酶 *Taq* I、*Ava* I、*Afa* I,对已被鉴定为副猪嗜血杆菌菌株的转铁结合蛋白 A 编码基因(*tbpA*)进行 PCR-RFLP 基因分型。【结果】分离得到了 5 株疑似副猪嗜血杆菌菌株,经培养特性和形态观察、生化试验、PCR 鉴定及序列同源性比对,将其鉴定为副猪嗜血杆菌。PCR-RFLP 分型结果表明,从 5 株副猪嗜血杆菌分离株中共得到了 4 种基因型,分别为 EBC、BBJ、EBJ、EAD。药物敏感性检测结果表明,分离菌株的耐药性均较强,且不同分离株对同一药物敏感性不同。【结论】副猪嗜血杆菌病在陕西关中地区猪群中流行比较严重,其基因型较多且与其他地域的菌株有一定差异。

【关键词】 副猪嗜血杆菌;分离鉴定;*tbpA* 基因;PCR-RFLP 分型;陕西省

【中图分类号】 S855.1⁺2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)11-0019-06

Isolation and identification of *Haemophilus parasuis* and *tbpA* gene typing by PCR-RFLP in Shaanxi Province

LIU Hui, CHEN Sheng-li, YANG Zeng-qi, LIU Hai-jin, ZHANG Shu-xia,
DU En-qi, WANG Xing-long, DANG Ru-yi

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The study was to detect *Haemophilus parasuis* in swine herds in Guanzhong District in Shaanxi Province and type the *tbpA* gene by PCR-RFLP, providing references for the study of epidemiology of *H. parasuis*. 【Method】 From 30 samples of 14 pig farms in Guanzhong District of Shaanxi province, we isolated bacteria from the swine which were characterized by polyserositis and fibrinopurulent polyarthritis and identified them based on the cultural characteristics, morphologic characteristics, biochemical characteristics, PCR test and the sequence analysis through the Blast software. Meanwhile, the isolates were subjected to the drug sensitive tests for some common drugs and then were analyzed using PCR-RFLP based on the *tbpA* gene using *Taq* I, *Ava* I and *Afa* I endonucleases. 【Result】 We isolated and identified 5 *H. parasuis* isolates through the cultural characteristics, morphologic characteristics, biochemical charac-

* [收稿日期] 2011-04-27

[基金项目] 陕西省农业科技创新项目“规模化养猪业爆发新病副猪嗜血杆菌弱毒疫苗的研究”(2011NXC01-10)

[作者简介] 刘 辉(1985—),男,陕西渭南人,在读硕士,主要从事兽医细菌病学研究。E-mail: liuhui13209@gmail.com

[通信作者] 杨增岐(1963—),男,陕西岐山人,教授,博士生导师,主要从事动物传染病学研究。E-mail: yzq8162@163.com

teristics, PCR test and the sequence analysis. And through the analysis of the 1 900 bp *tbpA* amplification using *Taq* I, *Ava* I and *Afa* I endonucleases we obtained 4 genotyping patterns, naming them EBC, BBJ, EBJ, EAD, respectively. The drug sensitive tests results showed that the five isolates were not sensitive to the common drugs and the sensitivity of the isolates to the same drug differed from each other. 【Conclusion】 The results confirmed that the Glässer's disease existed in Guanzhong District in Shaanxi Province with numerous genotypes which differed from each other according to their different regions.

Key words: *Haemophilus parasuis*; isolation and identification; *tbpA* gene; PCR-RFLP genotype; Shaanxi Province

近年来,随着规模化养猪业的发展,副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, Hps)病已成为世界范围内导致保育仔猪死亡的一个典型细菌性疾病,该病临床上以全身性感染,如多发性浆膜炎、关节炎、脑膜炎、支气管肺炎等为特征^[1],其发病率和死亡率逐年上升^[2]。

目前,在副猪嗜血杆菌的流行病学研究中,菌株分型大多是根据血清学分型信息展开的,但传统的根据热稳定性可溶性抗原和琼脂扩散试验^[3-5]的血清学分型方法无法确定部分副猪嗜血杆菌分离株的血清型,即便是协同凝集试验和间接血凝试验也无法对所有的副猪嗜血杆菌菌株进行分型^[6-7],这提示相关研究人员,血清学分型方法并不是副猪嗜血杆菌流行病学研究的最适合方法,而应进行基因分型研究。当前用于副猪嗜血杆菌基因分型的方法有多位点酶切图谱分析(Multilocus Enzyme Electrophoresis, MEE)^[8]、肠杆菌基因间重复序列一致性-聚合酶链式反应(Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR, PCR-ERIC)^[9]、限制性内切酶酶切片段多态性-聚合酶链式反应(Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR, PCR-RFLP)^[10]等多种方法,而相比 MEE 和 PCR-ERIC 这 2 种方法,PCR-RFLP 方法具有以特定基因为研究对象、不需细菌纯化等优点,被广泛应用于多种细菌的基因分型。

在我国,由于早期断奶方案和国外三点饲养系统的应用,造成了仔猪保育阶段的免疫空白期,导致副猪嗜血杆菌病频发;另一方面,一些病毒性疾病,如猪繁殖与呼吸综合征、猪流感、猪瘟等的流行造成了猪群免疫力下降,这也为副猪嗜血杆菌的发生提供了可趁之机,使该病给我国的养猪业带来了巨大的经济损失,相关报道^[11-12]屡见不鲜。但迄今为止尚未见有关陕西省副猪嗜血杆菌病的报道,而近年来陕西省部分养殖场中却有疑似副猪嗜血杆菌病的发生。为此,本试验从陕西关中地区 14 个出现患多

发性浆膜炎和关节炎猪只的猪场采集了 30 份病料,从中分离鉴定出了 5 株副猪嗜血杆菌,对其进行了药敏试验,并基于转铁结合蛋白 A 编码基因(*tbpA*),采用 PCR-RFLP 方法对其进行了基因分型,以期对陕西关中地区副猪嗜血杆菌病的流行病学研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料来源 病料于 2009—2010 年采自陕西关中地区西安、咸阳 2 市的 14 个不同猪场,共 30 份,包括肺脏、胸腹腔积水、心包积液、心血、关节液和脑组织等。疑似病猪出现咳嗽、呼吸困难、消瘦、跛行和被毛粗乱等症状;剖检病变表现为纤维素性胸膜炎、腹膜炎、心包炎和关节炎等。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶(*Taq* I、*Ava* I、*Afa* I)、*Taq* 酶、pMD18-T 载体、DNA Marker 和 DH5 α 等均购自大连宝生物公司;犊牛血清购自杭州四季青材料有限公司,使用前经 56 °C 灭活 30 min,过滤除菌;TSA、TSB 培养基购自北京奥博星公司;辅酶 I (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, NAD) 购自中国医药(集团)上海化学试剂公司;微量生化鉴定管、各种药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司;LB 固体、液体培养基为本实验室自制;所需其他各种试剂均为分析纯级试剂。

1.2 病原菌的分离、鉴定及药敏试验

1.2.1 病原菌的分离与培养 从疑似患副猪嗜血杆菌病猪只的肺脏、胸腹腔积水、心包积液、心血、关节液和脑组织等病料中进行无菌取样,在含体积分数 0.01% NAD 和 5% 犊牛血清的 TSA 固体培养基上划线接种,37 °C 培养 36~48 h,挑取单个菌落进行革兰氏染色镜检,对形态疑似副猪嗜血杆菌的菌落,继续接种于 TSA 固体培养基上进行纯培养并做进一步鉴定。

1.2.2 分离菌株的生化鉴定 用接种环分别挑取

纯培养可疑菌的单菌落,水平划线接种于鲜血琼脂培养基上,再挑取金黄色葡萄球菌垂直于水平线划线,37℃培养 24~48 h,观察是否有“卫星生长”和溶血现象。对有“卫星生长”现象但不溶血的单菌落进行纯培养,然后将其接种于含体积分数 0.05% NAD 的脲酶、氧化酶、接触酶、硝酸盐还原、靛基质、葡萄糖、蔗糖、果糖、半乳糖、核糖和麦芽糖等培养基中,37℃培养 24~36 h,观察菌株生长情况。

1.2.3 分离菌株的 PCR 鉴定 根据副猪嗜血杆菌 16S rRNA 序列(Genbank 号:M75065)设计引物,引物序列如下:上游引物:5'-GGCTTCGTCACCCTCTGT-3';下游引物:5'-GTGATGAGGAAGGGTGGTGT-3'。引物合成由上海生工公司完成。

用接种环刮取分离纯化菌株的 2 个菌落,洗脱于含 100 μL 无菌水的离心管中悬浮,涡旋后沸水浴 10 min,冻融后 10 000 r/min 离心 5 min,收集上清液作模板进行 PCR 反应。PCR 反应体系为 50 μL:10 倍缓冲液 5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 1.0 μL,1.5 μmol/L 上游引物 1.5 μL,1.5 μmol/L 下游引物 1.5 μL,Ex Taq E 0.5 μL,模板 10 μL,灭菌双蒸水 29 μL。以灭菌水为阴性对照。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 4 min;94℃ 50 s,59℃ 50 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。

1.2.4 PCR 产物的回收与测序 PCR 产物经质量浓度 80 g/L 的琼脂糖凝胶电泳后回收目的基因,将目的基因连入 pMD18-T 载体,并用连接产物转化 DH50 感受态细胞。筛选氨苄抗性阳性质粒,对其进行测序(由南京金丝瑞生物科技有限公司完成),并用 Blast 软件将测序结果与国内外其他分离菌株进行同源性比较。

1.2.5 分离菌株的药敏试验 用无菌棉签蘸取分离菌的 TSB 培养物,均匀涂布接种于 TSA 平板,晾干后,用无菌镊子将利福平、头孢呋新、氟喹酸、羧苄青霉素、头孢噻肟、庆大霉素、头孢哌酮、妥布霉素、卡那霉素等药敏纸片分别平贴于 TSA 培养基的表面,37℃培养 24~48 h 后测定抑菌环直径。

1.3 基于 *tbpA* 基因的分离菌株 PCR-RFLP 分型

1.3.1 *tbpA* 基因的 PCR 扩增 参考 Redondo 等^[10]发表的副猪嗜血杆菌 H411 分离株的 *tbpA* 基因序列(Genbank 号:AF336803)设计引物,其中上游引物为:5'-TTAGCCTTGCTCTTCTTAGCC-3',

下游引物为:5'-AAGCTTGAACTAAGGTACTCTAA-3'。引物由上海生工公司合成。

PCR 反应体系为 25 μL:10 倍缓冲液 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL,10 μmol/L 上游引物 1 μL,10 μmol/L 下游引物 1 μL,Ex Taq E 2.5 μL,模板 2 μL,灭菌双蒸水 12.5 μL。以灭菌水为阴性对照。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 45 s,40℃ 45 s,72℃ 2 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。PCR 产物经 80 g/L 琼脂糖凝胶电泳后回收目的条带,用于分离菌株 *tbpA* 基因的 RFLP 分型。

1.3.2 分离菌株的 PCR-RFLP 分型 以未经酶切处理的 PCR 产物为对照,采用 3 种限制性内切酶对 *tbpA* 基因进行酶切分析,其反应体系和反应条件如下。(1)*Taq* I。内切酶 0.5 μL(5 U),10×*Taq* I Basal Buffer 2 μL,体积分数 0.1% 的 BSA 2 μL,PCR 产物 10 μL,用灭菌双蒸水补至 20 μL;65℃ 作用 3 h。(2)*Ava* I。内切酶 0.5 μL(5 U),10×K Buffer 2 μL,PCR 产物 10 μL,用灭菌双蒸水补至 20 μL;37℃ 作用 3 h。(3)*Afa* I。内切酶 0.5 μL(5 U),10×T Buffer 2 μL,体积分数 0.1% 的 BSA 2 μL,PCR 产物 10 μL,用灭菌双蒸水补至 20 μL;37℃ 作用 3 h。酶切后参照 Redondo 等^[10]建立的方法对副猪嗜血杆菌进行 RFLP 模式分析命名,与文献[10]中的酶切图谱相同则命以相同名称,如果出现了文献中没有显示的酶切图谱则重新命名。

2 结果与分析

2.1 疑似副猪嗜血杆菌的分离及鉴定

病料经 36 h 培养后,共得到 5 株疑似菌落,分别命名为 BJ100104、XA100128、YA100129、XA100512 和 XY100629。分离菌菌落在 TSA 平板上呈透明、圆形、隆起的露珠状;革兰氏染色镜检结果显示,分离菌呈革兰氏阴性,菌株形状从球杆状到长丝状。分离菌株的生化鉴定结果见表 1,PCR 检测结果见图 1。表 1、图 1 结果显示,分离菌株的生化特性及 16S rRNA 片段长度(822 bp)均符合副猪嗜血杆菌的特征,故初步判断其为副猪嗜血杆菌。Blast 软件比对结果显示,这 5 株疑似副猪嗜血杆菌分离株 16S rRNA 序列与 GenBank 中同类序列的同源性为 99%~100%,进一步证实其确是副猪嗜血杆菌。

表 1 5 株疑似副猪嗜血杆菌分离株的生化鉴定结果

Table 1 Results of biochemical tests of the five Hps isolates

项目 Item	BJ100104	XA100128	YA100129	XA100512	XY100629
NAD 依赖性 NAD Dependence	+	+	+	+	+
溶血性 Haemolyticus	—	—	—	—	—
卫星生长现象 Satellite growing phenomenon	+	+	+	+	+
脲酶 Urease	—	—	—	—	—
硝酸盐还原 Nitrate	+	—	+	+	—
靛基质 Indole	—	—	—	—	—
氧化酶 Oxidase	—	—	—	—	—
接触酶 Catalase	+	+	+	+	+
麦芽糖 Malt sugar	—	—	—	—	+
核糖 Ribose	—	—	—	—	—
半乳糖 Galactose	—	—	—	—	—
蔗糖 Saccharose	—	—	—	—	+
葡萄糖 Glucose	—	—	—	—	+
果糖 Fructose	—	—	—	—	+

注：“+”代表阳性；“—”代表阴性。

Note:“+” represents the positive result;“—” represents the negative result.

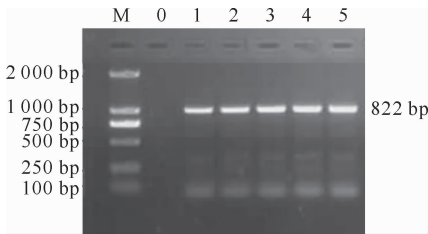


图 1 5 株疑似 Hps 分离株的 16S rRNA PCR 扩增结果

M. DNA 标准 DL 2000;0. 阴性对照;

1~5. 分别为 BJ100104、XA100128、YA100129、XA100512 和 XY100629 的 16S rRNA PCR 产物

Fig.1 PCR amplification of 16S rRNA of the Hps isolates

M. DNA Marker DL 2000;0. Negative control;1—5. 16S rRNA amplification products of BJ100104,XA100128,YA100129, XA100512 and XY100629 Hps isolates respectively

表 2 5 株副猪嗜血杆菌分离株的药敏试验结果

Table 2 Results of the drug sensitive tests of the five Hps isolates

药物 Drug	抑菌环直径/mm Diameter of bacteriostaticring				
	BJ100104	XA100128	YA100129	XA100512	XY100629
利福平 Rifampicin	22	19	18	17	26
头孢呋新 Cefuroxime	0	0	17	0	0
氟喹酸 Ofloxacin	23	22	22	19	20
羧苄青霉素 Carbenicillin	0	0	18	12	0
头孢噻肟 Cefotaxime	15	18	18	16	16
庆大霉素 Gentamicin	22	21	22	17	18
头孢哌酮 Cefoperazone	13	22	14	20	20
妥布霉素 Tobramycin	20	20	23	18	22
卡那霉素 Kanamycin	20	19	22	18	19

2.3.2 RFLP 分型 基于 *tbpA* 基因对 5 株副猪嗜血杆菌分离株进行 RFLP 分析,结果显示 *Taq* I、*Ava* I 和 *Afa* I 酶切分型后,分别产生 2 种(B、E)、2

2.2 5 株副猪嗜血杆菌分离株的药敏试验

抑菌环直径在 20 mm 以上的为高度敏感;16~20 mm 为中度敏感;16 mm 以下为低度敏感;无抑菌环的为不敏感。本研究 5 株副猪嗜血杆菌分离株的药敏试验结果见表 2。由表 2 可见,5 株副猪嗜血杆菌分离株对各种药物呈现出了不同的敏感性,其中敏感性较高的药物有氟喹酸、妥布霉素和利福平,某些药物如头孢呋新、羧苄青霉素对大部分菌株不敏感,对个别菌株比较敏感。

2.3 基于 *tbpA* 基因的 5 株副猪嗜血杆菌的 PCR-RFLP 分型

2.3.1 PCR 扩增 图 2 结果显示,5 株副猪嗜血杆菌分离株均能扩增出长度为 1 902 bp 的片段,与预期结果一致。

种(A、B)和 3 种(C、D、J)基因图谱(图 3),共有 4 个基因型, BJ100104、 XA100128、 YA100129、 XA100512 和 XY100629 的基因型分别为 EBC、

BBJ、EBJ、EBJ 和 EAD。

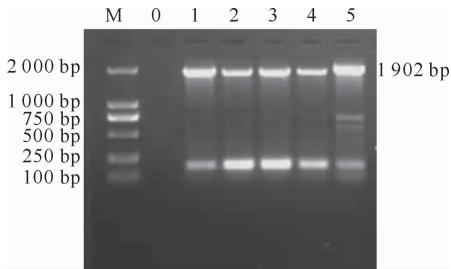


图 2 5 株 Hps 分离株 *tbpA* 基因的 PCR 扩增
M. DNA 标准 DL2000;0. 阴性对照;1~5. 分别为 BJ100104、
XA100128、YA100129、XA100512 和 XY100629
分离株 *tbpA* 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 2 PCR amplification of *tbpA* gene
of the five Hps isolates

M. DNA Marker DL2000;0. Negative control;
1~5. *tbpA* gene amplification products from BJ100104,
XA100128, YA100129, XA100512 and XY100629
Hps isolates repeatedly

3 讨 论

本试验从陕西关中地区 14 个患多发性浆膜炎和关节炎的猪场中分离到 5 株细菌,经培养特性和形态观察及生化鉴定、PCR 鉴定,初步判断其为副猪嗜血杆菌。副猪嗜血杆菌病由于常与其他一些细菌性及病毒性疾病,特别是一些免疫抑制性疾病,如猪繁殖与呼吸综合征、圆环病毒病等发生混合感染,

所以单纯根据病猪临床症状无法确诊该病。常规的细菌分离鉴定结果虽然比较可靠,但由于副猪嗜血杆菌较难培养,其分离鉴定既耗时而且分离率又低,生化试验结果也不是很稳定,所以本试验又进行了 16S rRNA 序列同源性比对,结果发现,5 株副猪嗜血杆菌分离株与国内外其他分离株 16S rRNA 序列的同源性均在 99% 以上,进一步确定了其为副猪嗜血杆菌。由此说明,副猪嗜血杆菌病在陕西关中地区也存在,且已对本地区养猪业构成了潜在威胁。

本研究参考 Redondo 等^[10]建立的针对副猪嗜血杆菌 *tbpA* 基因的 PCR-RFLP 分型方法,采用 3 种限制性内切酶 *Taq* I、*Ava* I、*Afa* I 对 5 个临床分离株进行了 RFLP 分析,得到了 4 种 RFLP 图谱。其中分离株 XA100128 的基因型(BBJ)与 Redondo 等^[10]报道的血清 13 型标准菌株的基因型相同,这与蔡旭旺等^[11]关于血清 13 型副猪嗜血杆菌在我国流行比较普遍的报道相符合,而其他 4 株的基因型则与蔡旭旺等^[11]得到的基因型(DBE、DBH 等)不同。李军星等^[12]对分离自我国东南地区 6 省市的副猪嗜血杆菌分离株进行了 RFLP 基因分型,共得到了 15 种基因型(DBN、ABN 等)。而本试验得到的 4 种基因型与这 15 种基因型均不相同,说明关中地区流行的副猪嗜血杆菌菌株与其他地区流行的菌株具有地域差异性。

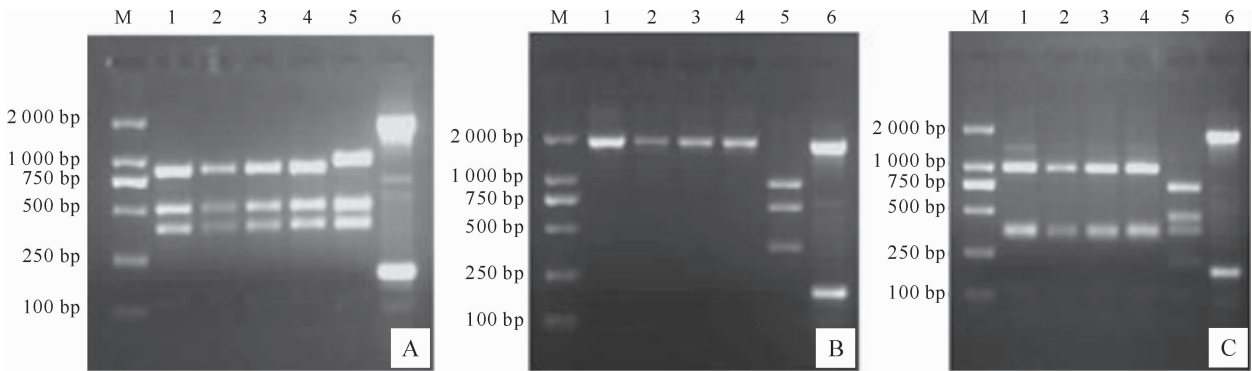


图 3 5 株 Hps 分离株 *tbpA* 基因 *Taq* I、*Ava* I、*Afa* I 的 RFLP 分型结果

A~C. 分别为 *Taq* I、*Ava* I、*Afa* I 酶切结果;M. DNA 标准 DL2000;1~5. 分别为 BJ100104、XA100128、YA100129、XA100512 和 XY100629 分离株 *tbpA* 基因酶切产物;6. *tbpA* 基因 PCR 产物对照;图 A 中 1,3~5 为 E 基因图谱,2 为 B 基因图谱;

图 B 中 1~4 为 B 基因图谱,5 为 A 基因图谱;图 C 中 1 为 C 基因图谱,2~4 为 J 基因图谱,5 为 D 基因图谱

Fig. 3 RFLP analysis of *tbpA* gene amplification products from the five Hps isolates

A~C. *tbpA* gene amplification product from the Hps isolates were digested with *Taq* I, *Ava* I and *Afa* I, respectively;

M. DNA Marker DL2000;1~5. Represent BJ100104, XA100128, YA100129, XA100512 and XY100629 of

Hps isolates respectively;6. *tbpA* gene amplification product from the Hps isolates;Figure A 1,3~5 represent E RFLP pattern,

2 represents B RFLP pattern;Figure B 1~4 represent B RFLP pattern,5 represents A RFLP pattern;

Figure C 1 represents C RFLP pattern,2~4 represent J RFLP pattern,5 represents D RFLP pattern

研究表明,副猪嗜血杆菌的血清型与毒力之间没有固定关系,即使是同一种血清型的不同副猪嗜血杆菌,其毒力大小也不尽相同^[13-14],说明血清学分型方法并不是研究副猪嗜血杆菌流行病学的最有效方法,因此 PCR-RFLP 方法可作为血清分型的一种替代方法来探寻副猪嗜血杆菌 RFLP 基因型与致病性之间是否有固定的关系^[15]。虽然到目前为止这种关系还没有确定,然而有研究表明,从有多发性浆膜炎症状的病猪中分离出的副猪嗜血杆菌菌株的 RFLP 基因型更具有相似性^[16]。由于本试验中分离得到的 5 株副猪嗜血杆菌均与其他病原体发生混合感染,所以无法直接用临床症状及病理变化等流行病学资料建立副猪嗜血杆菌 PCR-RFLP 基因型与其致病力的关系,要确定其关系尚需要更多的副猪嗜血杆菌 RFLP 基因型及其流行病学数据。

从药敏试验结果来看,分离菌株对大部分抗生素敏感性不高,只对少数抗生素比较敏感,表明在关中地区流行的副猪嗜血杆菌菌株的耐药性均比较强。对头孢呋新和羧苄青霉素这 2 种抗生素而言,仅有个别菌株对其中度敏感,而大部分分离株对其高度不敏感,表明不同分离菌株对同一抗生素的敏感性不同。对于还未产生耐药性的抗生素,可用其对相应猪场进行治疗,但应与其他药物交叉使用,以避免菌株短期内对其产生耐药性。本试验发现,分离菌株对抗生素产生耐药性,与猪场长期大量使用该抗生素有关,说明药物治疗并不是防控副猪嗜血杆菌病的最有效措施,应该将副猪嗜血杆菌的疫苗研制作作为今后防治该病的一个重要方向。

[参考文献]

- [1] Aragon V, Bouchet B, Gottschalk M. Invasion of endothelial cells by systemic and nasal strains of *Haemophilus parasuis* [J]. The Veterinary Journal, 2010, 186(2): 264-267.
- [2] 斯特劳. 猪病学 [M]. 8 版. 刘文军, 张中秋, 译. 北京: 中国农业大学出版社, 1998: 407-416.
Straw B E. Diseases of swine [M]. 8th edition. Liu W J, Zhang Z Q, translation. Beijing: China Agricultural University Press, 1998: 407-416. (in Chinese)
- [3] Morozumi T, Nicolet J. Some antigenic properties of *Haemophilus parasuis* and a proposal for serological classification [J]. J Clin Microbiol, 1986, 23(6): 1022-1025.
- [4] Kielstein P, Rosner H, Muller W. Typing of heat-stable soluble *Haemophilus parasuis* antigen by means of agar gel precipitation and the dot-blot procedure [J]. J Vet Med B, 1991, 38(7): 315-320.
- [5] Kielstein P, Rapp-Gabrielson V J. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extract [J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(4): 862-865.
- [6] Del Rio M L, Gutierrez C B, Rodriguez Ferri E F. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis* [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(2): 880-882.
- [7] Tadjine M, Mittal K R, Bourdon S, et al. Development of a new serological test for serotyping *Haemophilus parasuis* isolates and determination of their prevalence in North America [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(2): 839-840.
- [8] Blackall P J, Trott D J, Rapp-Gabrielson V, et al. Analysis of *Haemophilus parasuis* by muotilocus enzyme electrophoresis [J]. Vet Microbiol, 1997, 56(12): 125-134.
- [9] Rafiee M, Stephens C P. Application of ERIC-PCR for the comparison of *Haemophilus parasuis* [J]. Aust Vet, 2000, 78(12): 846-849.
- [10] Redondo P, Navas Mendez J, Garda del Blanco N, et al. Typing of *Haemophilus parasuis* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* gene [J]. Vet Microbiol, 2003, 92(3): 253-262.
- [11] 蔡旭旺, 刘正飞, 陈焕春, 等. 副猪嗜血杆菌的分离培养和血清型鉴定 [J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(1): 55-58.
Cai X W, Liu Z F, Chen H C, et al. Isolation and serovar identification of *Haemophilus parasuis* in China [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2005, 24(1): 55-58. (in Chinese)
- [12] 李军星, 姜平, 王艳, 等. 副猪嗜血杆菌 *tbpA* 基因 PCR-RFLP 分型 [J]. 中国动物传染病学报, 2009, 17(1): 45-50.
Li J X, Jiang P, Wang Y, et al. Characterization of *Haemophilus parasuis* field isolates from China by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* gene [J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2009, 17(1): 45-50. (in Chinese)
- [13] Rapp-Gabrielson V J, Gordon J K, Jeffrey T C, et al. *Haemophilus parasuis*: Immunity in swine after vaccination [J]. Vet Med, 1997, 92(7): 83-90.
- [14] Aragon V, Fraile, Mombarg M. Correlation between clinico-pathological outcome and typing of *Haemophilus parasuis* field strains [J]. Veterinary Microbiology, 2010, 142(3/4): 387-393.
- [15] Sack M, Baltes N. Identification of novel potential virulence-associated factors in *Haemophilus parasuis* [J]. Veterinary Microbiology, 2009, 136(3/4): 382-386.
- [16] Olvera A, Segales J, Aragon V. Update on the diagnosis of *Haemophilus parasuis* infection in pigs and novel genotyping methods [J]. Veterinary Journal, 2007, 174(3): 522-529.