

网络出版时间:2014-12-12 09:30

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.01.029

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20141212.0930.029.html>

蛋鸡抗 IBV HI 抗体效价与攻毒后产蛋性能的相关性

李新生¹, 焦显芹¹, 高文明¹, 李双亮², 张秀文³, 崔保安¹

(1 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2 河南省出入境检验检疫局, 河南 郑州 450003;

3 浙江美保龙生物技术有限公司, 浙江 金华 321017)

[摘要] **【目的】**研究抗呼吸型 IBV HI 抗体水平与蛋鸡产蛋率的对应关系。**【方法】**将 180 只 SPF 鸡分为 4 组, 第 1 组和第 2 组首免用鸡传染性支气管炎 H₁₂₀ 活疫苗免疫, 1 羽份/只, 4 周后采血, 第 2 组鸡同时用 3 批次的鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感(H₉ 亚型)三联灭活疫苗(La Sota 株+M₄₁ 株+HN6 株)分别进行加强免疫, 试验同时设置攻毒对照第 3 组和不免疫攻毒对照第 4 组。灭活疫苗免疫 4 周后, 当产蛋率稳定在 80% 以上时, 对试验鸡采血测定抗体, 同时使用 M₄₁ 株病毒进行攻毒, 记录攻毒后 4 周内各组鸡的产蛋性能, 分析抗 IBV HI 抗体水平与攻毒后产蛋性能的相关性。**【结果】**弱毒活疫苗和灭活疫苗联合免疫组抗 IBV HI 抗体水平在 $2^{-8.2} \sim 2^{-9.3}$ 时, 免疫鸡能够耐受 IBV 强毒的攻击, 其产蛋性能不受影响。弱毒活疫苗免疫组抗体为 $2^{-4.8}$, 产蛋量下降了 12.69%。攻毒对照组抗体水平为 $2^{-2.0}$, 攻毒后产蛋量下降 45.22%。**【结论】**蛋鸡抗 IBV HI 抗体效价与产蛋率对鸡传染性支气管炎强毒的攻毒保护之间呈正相关, 可以用 HI 抗体检测来评价鸡传染性支气管炎灭活疫苗对产蛋鸡的免疫效果。

[关键词] IBV; HI 抗体效价; 攻毒; 产蛋性能

[中图分类号] S852.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2015)01-0026-05

Relationship between HI antibody titers against infectious bronchitis virus and egg production rate

LI Xin-sheng¹, JIAO Xian-qin¹, GAO Wen-ming¹, LI Shuang-liang²,
ZHANG Xiu-wen³, CUI Bao-an¹

(1 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 Henan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhengzhou, Henan 450003, China;

3 Zhejiang Meibaolong Biotechnology Ltd, Jinhua, Zhejiang 321017, China)

Abstract: **【Objective】**This paper studied the relationship between HI antibody titers against infectious bronchitis virus strain and egg production rate. **【Method】**180 SPF chickens were divided into 4 groups. Chickens in the first and second groups were immunized with H₁₂₀ live vaccine. 4 weeks later, the second group chickens were vaccinated with Newcastle disease, infectious bronchitis, and avian influenza virus (H₉ subtype) triple inactivated vaccine (La Sota+M₄₁+HN6 strain). Group 3 and Group 4 had no immunization. 4 weeks after vaccine was inoculated, the antibody in blood of tested chickens was determined when the egg production rate was stably over 80%. Then, the first three groups were challenged by virulent infectious bronchitis virus M₄₁ strain, and chicken laying performance and egg quality were recorded in the following 4 weeks. Then the relationship between HI antibody titers against infectious bronchitis virus

[收稿日期] 2013-09-20

[基金项目] 河南省科技创新人才计划项目(144100510009); 郑州市前沿技术研究开发项目(141PQYJS566)

[作者简介] 李新生(1969—), 男, 河南荥阳人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事分子病原学研究。

E-mail: harmony69@126.com

[通信作者] 崔保安(1948—), 男, 河南荥阳人, 教授, 学士, 博士生导师, 主要从事分子病原学研究。E-mail: baoancui@gmail.com

strain and egg production performance was analyzed. 【Result】 Chicken egg laying performance was not affected by virulent infectious bronchitis virus when their HI antibody titers against virulent infectious virus were $2^{-8.2} - 2^{-9.3}$. The first group which was only immunized by live attenuated vaccine had the HI titers of $2^{-4.8}$, and the egg production rate decreased by 12.69%. The HI tiers of control group were $2^{-2.0}$, and egg production rate decreased by 45.22%. 【Conclusion】 HI antibody titers and egg production performance were positively related. HI antibody detection can be used to evaluate the immune efficacy of inactivated vaccines with infectious bronchitis virus.

Key words: IBV; HI antibody titer; challenge; egg production

传染性支气管炎(IB)是由鸡传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus, IBV)引起的鸡的一种急性、高度接触传染性、病毒性呼吸道疾病,其特征是气管啰音、咳嗽和打喷嚏^[1-2]。该病可侵害呼吸道、生殖道,造成产蛋鸡产蛋数量和蛋品质下降,是危害养鸡业健康发展的重要疫病之一^[3-5],因此做好IB的防控工作具有重要意义。

目前,在生产实践中,使用传染性支气管炎弱毒疫苗和灭活疫苗免疫接种被认为是预防控制IB流行的有效手段^[6]。IB疫苗免疫效果的评价手段较多,如观察气管环纤毛保护情况、经鸡胚进行病毒分离鉴定^[7-8]、攻毒后观察鸡产蛋性能或攻毒后观察临床症状^[8]等。上述方法耗时繁琐,且因操作条件、试验动物级别等难以标准化,使检验结果可能会有较大误差。随着商品化IBV HI抗原的应用,使得利用血清学方法代替攻毒试验、病毒分离鉴定等对传染性支气管炎疫苗免疫效果的评价成为可能。为了了解鸡血清中抗IBV HI抗体效价与攻毒后产蛋性能之间的相关性,本研究参考文献[9-11]中的方法,用鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感(H₉亚型)三联灭活疫苗(La Sota株+M₄₁株+HN6株)(以下简称“三联疫苗”)免疫SPF鸡,分析抗IBV HI抗体效价与攻毒后产蛋性能的相关性,以期证实血清学检验方法与攻毒试验之间的平行关系。现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 检测用抗原 IBV M₄₁ HI抗原、标准阳性血清和阴性血清,均购于GD公司。

1.1.2 传染性支气管炎弱毒疫苗 鸡传染性支气管炎弱毒疫苗 H₁₂₀,购自北京市兽医生物药品厂。

1.1.3 攻击用毒种 IBV M₄₁株,由河南农业大学动物性食品安全重点实验室保存提供,经繁殖后测定病毒含量为每0.1 mL $10^{-7.5}$ EID₅₀。

1.1.4 试验用疫苗 分别制备鸡新城疫病毒、IBV和低致病性的禽流感病毒,按照规定的工艺浓缩、乳剂制备鸡新支流感(H₉亚型)三联灭活疫苗(La Sota株+M₄₁株+HN6株)3批中试产品,标记为1001、1002、1003。疫苗中含灭活的鸡新城疫病毒La Sota株(灭活前的病毒含量为每0.1 mL $\geq 3 \times 10^{-8.0}$ EID₅₀)、IBV M₄₁株(灭活前的病毒含量为每0.1 mL $\geq 3 \times 10^{-6.0}$ EID₅₀)和禽流感病毒(H₉亚型)HN6株(灭活前的病毒含量为每0.1 mL $\geq 3 \times 10^{-7.0}$ EID₅₀)。

1.1.5 检验用鸡 180只SPF白来航鸡(70日龄)购自北京梅里亚维通实验动物有限公司,饲养在河南农业大学实验动物中心SPF鸡正负压隔离器内。

1.2 方法

1.2.1 试验分组 参照OIE介绍的鸡传染性支气管炎灭活疫苗对产蛋鸡免疫效能的试验方法,进行如下试验。取140日龄SPF蛋鸡,第1组30只,仅接种IB H₁₂₀活疫苗1羽份首免,作为弱毒疫苗基础免疫对照组;第2组90只,先接种IB H₁₂₀活疫苗1羽份首免,4周后均分为3个小组,分别用3批新支流感三联灭活疫苗加强免疫(二免),0.5 mL/只;第3组和第4组各30只,不进行任何免疫作为对照组。各组鸡都隔离饲养,记录每组鸡的产蛋量,产蛋量稳定后(二免后3周左右),按照文献[12]的方法,对第1、2、3组试验鸡使用1:10稀释的M₄₁株病毒液进行点眼、滴鼻攻毒,0.3 mL/只,第4组30只未免疫试验鸡不攻毒作为空白对照组,统计攻毒后4周内产蛋的数量和质量。分别于H₁₂₀活疫苗免疫前、首免后4周和攻毒试验前采集各组鸡血样,分离血清,测定抗IBV HI抗体水平。分析HI抗体水平与攻毒后产蛋性能的相关性。

1.2.2 抗IBV HI抗体水平的测定 按中国兽药典^[13]中有关鸡传染性支气管炎HI抗原的使用说明测定抗呼吸型IBV的HI抗体,具体操作如下。

①取96孔V型微量反应板,每孔加25 μ L PBS液。

②分别吸取 25 μL 待检血清,加至每块板的第一列各孔内,并在每块板上设标准阳性血清和阴性血清对照,然后 2 倍系列稀释。③分别向各孔中加入含 4 单位的抗原 25 μL ,2~8 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min。④每孔中加入体积分数 1% 的鸡红细胞悬液 25 μL ,轻轻混匀,2~8 $^{\circ}\text{C}$ 静置 40 min。⑤结果判定。将反应板倾斜,凡血清反应孔与鸡红细胞对照孔中红细胞以同样速度从孔底流淌者判为血凝抑制。当阴性血清 HI 效价 $\leq 2^{-3}$ 、阳性血清 HI 效价与规定效价相比误差 $\leq 2^{-1}$ 时,则试验成立。以完全抑制 4 单位抗原的血清最高稀释度作为 HI 效价。

表 1 攻毒前各试验组产蛋鸡的抗 IBV HI 抗体效价与产蛋率的关系($n=30$)

Table 1 Relationship between egg production before challenge and HI geometric mean titre ($n=30$)

组别 Group	疫苗 Vaccine	HI 抗体 HI titer			产蛋率/% Egg production		
		活疫苗免疫前 Before 1st vaccination	首免 4 周后 4 weeks after 1st vaccination	攻毒试验前 Before challenge	攻毒前 Before challenge	攻毒后 After challenge	较攻毒前 下降 Decreasing rate
1	H ₁₂₀ 活疫苗 H ₁₂₀ live vaccine	2 ^{-2.0}	2 ^{-2.9}	2 ^{-4.8}	80.4	70.2	12.69
	H ₁₂₀ 活疫苗+灭活疫苗(1001) H ₁₂₀ Live vaccine+ Inactive vaccine(1001)	2 ^{-1.2}	2 ^{-2.0}	2 ^{-8.6}	80.3	79.1	1.49
	H ₁₂₀ 活疫苗+灭活疫苗(1002) H ₁₂₀ Live vaccine+ Inactive vaccine(1002)	2 ^{-2.0}	2 ^{-2.2}	2 ^{-9.3}	80.6	79.3	1.61
2	H ₁₂₀ 活疫苗+灭活疫苗(1003) H ₁₂₀ Live vaccine+ Inactive vaccine(1003)	2 ^{-1.5}	2 ^{-2.0}	2 ^{-8.2}	80.5	79.0	1.86
	攻毒对照组 Mock	2 ^{-1.0}	2 ^{-2.0}	2 ^{-2.0}	80.5	44.1	45.22
4	空白对照组 Mock control	2 ^{-2.0}	2 ^{-2.5}	2 ^{-2.0}	80.4	80.3	0.12

注:1 组不进行二免;3 组和 4 组不进行免疫,4 组不攻毒。

Note:Chickens in group 1 had no the second vaccination;Chickens in group 3 and group 4 had no vaccination,chickens in group 4 had no challenge.

2.2 产蛋鸡抗 IBV HI 抗体水平与产蛋性能的关系

产蛋高峰前,监测每只鸡的产蛋量,新支流感(H₉ 亚型)三联灭活疫苗免疫 4 周后(即 28 周龄时),产蛋量达到高峰,产蛋率稳定维持在 80% 以上,此时对试验鸡采血测定二免抗体,即攻毒前抗体,采血后对试验鸡进行攻毒,统计攻毒后 4 周内各组试验鸡的产蛋数量和质量,结果见表 1。由表 1 可见,对第 1 组:只用 H₁₂₀ 弱毒活疫苗进行免疫,攻毒前抗体水平为 2^{-4.8},产蛋率为 80.4%,产蛋质量正常。攻毒后 4 周内,产蛋率下降至 70.2%,较攻毒前下降了 12.69%,并且所产蛋的品质也有所下降,蛋壳颜色变浅,有少量畸形蛋,约占 3%。

对第 2 组:各灭活疫苗小组攻毒前的抗体水平分别为 2^{-8.6},2^{-9.3} 和 2^{-8.2},产蛋率分别为 80.3%,80.6% 和 80.5%,所产蛋质量正常。攻毒后 4 周内,产蛋率分别为 79.1%,79.3% 和 79.0%,较攻毒前分别下降了 1.49%,1.61% 和 1.86%,所产蛋的

2 结果与分析

2.1 免疫前后产蛋鸡抗 IBV HI 抗体的变化

由表 1 可知,免疫前各组试验鸡抗体水平在 2^{-1.0}~2^{-2.0};首免 4 周后,1、2 组试验鸡抗体水平为 2^{-2.0}~2^{-2.9};对第 2 组的 3 个小组进行二免,攻毒前其抗 IBV HI 抗体水平达 2^{-8.2}~2^{-9.3},是首免抗体水平的 4.1~4.3 倍,而此时第 1 组蛋鸡的抗体仅为 2^{-4.8};第 3、4 组试验鸡未作任何免疫,在整个采血期内抗体变化不显著,抗 IBV HI 抗体水平均 $< 2^{-3.0}$ 。

品质正常,无畸形蛋和软壳蛋,产蛋率的下降主要发生在攻毒后产蛋率统计周期的第 1 周,随后受试鸡产蛋率就恢复到了正常水平,这种产蛋率的下降可能是由于攻毒时引起的应激造成的。

对第 3 组:试验鸡未进行任何免疫,攻毒前抗体水平为 2^{-2.0},产蛋率为 80.5%,产蛋质量正常。攻毒后产蛋率下降为 44.1%,较攻毒前下降了 45.22%,并且产蛋的品质下降,蛋壳颜色变浅,有畸形蛋和软壳蛋,占 5%~8%。

对第 4 组:试验鸡未进行任何免疫,不攻毒作为空白对照组,整个试验周期内,产蛋率为 80.3%~80.4%,无明显波动,所产蛋的品质正常。

3 讨论

3.1 弱毒疫苗和灭活疫苗联合免疫提高鸡抗 IBV 的 HI 抗体水平

本研究中,免疫前,各组鸡的抗 IBV 的 HI 抗体水平均 $\leq 2^{-2.0}$;使用 H₁₂₀ 活疫苗免疫后 4 周,HI 抗

体水平上升至 $2^{-2.0} \sim 2^{-2.9}$; H_{120} 活疫苗免疫后再用新支流感三联灭活疫苗加强免疫,4 周后抗体水平达到 $2^{-8.2} \sim 2^{-9.3}$,而此时单独免疫 H_{120} 活疫苗的 HI 抗体水平仅为 $2^{-4.8}$,而未免疫组的 HI 抗体水平仍 $< 2^{-3.0}$ 。从试验结果来看,仅使用 IB 弱毒活疫苗进行免疫,并不能使试验鸡产生较高的 HI 抗体水平,这可能与活疫苗主要引起机体的细胞免疫反应有关^[14-15];而在活疫苗进行基础免疫的情况下,再使用灭活疫苗加强免疫,能够刺激机体产生较强的免疫应答,HI 抗体水平显著升高,由此可见,使用弱毒疫苗和灭活疫苗进行联合免疫能显著提升鸡抗 IBV 的 HI 抗体水平。

3.2 鸡抗 IBV HI 抗体水平与产蛋性能的关系

为研究 SPF 鸡血清抗体与攻毒后对产蛋性能保护的对应关系,当试验鸡产蛋量稳定在 80% 以上时,采血测定抗 IBV HI 抗体,并进行攻毒,统计攻毒后 4 周内各组鸡产蛋情况,结果表明,非免疫对照组抗体 $< 2^{-3.0}$,攻毒后的产蛋率较攻毒前下降了 45.22%,蛋品质也下降;免疫活苗后接种灭活苗的试验组抗体水平均在 $2^{-6.0}$ 以上,且二免抗体是首免抗体的 4 倍以上,攻毒后的产蛋量与攻毒前相比基本没有下降,与空白对照组的产蛋量基本一致,均维持在 79% 以上,并且蛋品质正常;仅进行弱毒活苗基础免疫的试验鸡攻毒前 HI 抗体水平为 $2^{-4.8}$,攻毒后产蛋率下降了 12.69%,下降幅度介于以上两组之间,且蛋品质有部分下降。由此可见,鸡只的 HI 抗体水平与攻毒后对产蛋性能的保护力呈密切正相关,抗体水平越高,对鸡只的保护力也就越强。当 HI 抗体水平 $\geq 2^{-6.0}$ 时,攻毒后可保护产蛋鸡的产蛋量较稳定,当抗体水平 $< 2^{-6.0}$ 时,对产蛋鸡的保护力相对较低,抗体水平越低,攻毒后鸡只的产蛋量下降也较多。据英国药典^[16]规定,合格疫苗的标准应该是,能够刺激机体产生 $\geq 2^{-6.0}$ 的抗体,而在 OIE 中对用于产蛋鸡免疫疫苗的效力评价同样规定,免疫 SPF 鸡 4 周后平均 HI 效价 $> 2^{-6.0}$ 。本研究结果与上述标准一致。

3.3 用 HI 抗体水平检测开产鸡的免疫力

根据 OIE 规定,在进行含有 IBV 灭活疫苗免疫效能检验(对产蛋鸡)时,可进行如下分组:弱毒苗基础免疫试验组、弱毒苗基础免疫和三联灭活疫苗联合免疫试验组和不进行任何免疫对照组。本研究在试验分组时,又增加了空白不攻毒对照组,同时将灭活疫苗加强免疫的时间设在了产蛋高峰前 4 周,当免疫后 4 周采血时产蛋率已达高峰,所检测的抗体

水平即可作为攻毒前抗体水平,避免了多次采血对试验鸡的应激影响。OIE 规定对照组攻毒后产蛋率下降至少 67%,而目前国际上对攻毒试验的判定标准有放宽的趋势,如欧洲药典^[17]规定,用麻省型的毒株对非免疫鸡群攻毒能引起 35% 以上的产蛋下降时,疫苗免疫组对产蛋的保护才认为有效。本试验中,对照组攻毒后产蛋率下降了 45.22%,未达到 OIE 中的规定,这可能是由于攻击用 M_{41} 毒株使用的量以及攻毒株繁殖代次等原因造成的毒力变化所致,也可能是随 SPF 鸡日龄的增加其抵抗力有所增强造成的。由于影响试验鸡产蛋率的因素较多,试验过程中必须进行标准的饲养管理,保证试验鸡处在相同的外部环境中,排除任何可能会影响到试验结果的因素。由于受试验条件的限制,对产蛋鸡的攻毒试验在以往的研究中较少,积累的经验缺乏,有待以后开展更大规模的研究验证工作。

[参考文献]

- [1] Saif Y M, Barnes H J, Glisson J R, et al. Diseases of poultry [M]. Ames: Iowa State University Press, 2003: 139-141.
- [2] Jones R C. The isolation and some biological properties of a variant avian infectious bronchitis virus [J]. Vet Rec, 1976, 98 (14): 278-279.
- [3] Cavanagh D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus [J]. Vet Res, 2007, 38(2): 281-297.
- [4] Ignjatovic J, Sapats S. Avian infectious bronchitis virus [J]. Rev Sci Tech, 2000, 19(2): 493-508.
- [5] Han Z, Sun C, Yan B, et al. A 15-year analysis of molecular epidemiology of avian infectious bronchitis coronavirus in China [J]. Infect Genet Evol, 2011, 11(1): 190-200.
- [6] 王文秀, 顾节清, 沈志强. 鸡传染性支气管炎病毒变异机理及疫苗研究现状 [J]. 动物医学进展, 2010, 31(12): 116-119.
Wang W X, Gu J Q, Shen Z Q. Research status in mechanism of variability and vaccine of avian infectious bronchitis virus [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2010, 31 (12): 116-119. (in Chinese)
- [7] Boroomand Z, Asasi K, Mohammadi A. Pathogenesis and tissue distribution of avian infectious bronchitis virus isolate IR-FIBV32 (793/B serotype) in experimentally infected broiler chickens [J]. Scientific World Journal, 2012, 2012: 402-537.
- [8] Dhinakar R G, Jones R C. Protectotypic differentiation of avian infectious bronchitis viruses using an *in vitro* challenge model [J]. Vet Microbiol, 1996, 53(3/4): 239-252.
- [9] 姜北宇, 张建伟, 李林, 等. 鸡新城疫 传染性支气管炎 减蛋综合征 传染性脑脊髓炎 三联灭活疫苗 传染性支气管炎 部分效力 试验研究 [J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(1): 17-20.
Jiang B Y, Zhang J W, Li L, et al. Efficacy test of IB part in the tetravalent inactivated vaccine against Newcastle disease, infectious bronchitis, egg drop syndrome and avian encephalomyeli-

- tis [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2009, 43(1): 17-20. (in Chinese)
- [10] 世界动物卫生组织. 哺乳动物、禽、蜜蜂 A 类和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册 [M]. 4 版. 农业部兽医局, 中国动物卫生与流行病学中心, 译. 北京: 中国农业出版社, 2002: 655-664.
- The World Organization for Animal Health. Terrestrial animal diagnostic tests and vaccines (mammals, birds and bees) [M]. 4th ed. Bureau of Ministry of Agriculture, Veterinary China Animal Health and Epidemiology Center. Beijing: China Agriculture Press, 2002: 655-664. (in Chinese)
- [11] Tarpey I, Huggins M B, Orbell S J. The efficacy of an avian metapneumovirus vaccine applied simultaneously with infectious bronchitis and Newcastle disease virus vaccines to specific-pathogen-free chickens [J]. Avian Dis, 2007, 51(2): 594-596.
- [12] De Wit J J, Boelm G J, van Gerwe T J, et al. The required sample size in vaccination-challenge experiments with infectious bronchitis virus, a meta-analysis [J]. Avian Pathol, 2013, 42(1): 9-16.
- [13] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. The People's Republic of China veterinary pharmacopoeia [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005. (in Chinese)
- [14] Okino C H, Alessi A C, Montassier M F, et al. Humoral and cell-mediated immune responses to different doses of attenuated vaccine against avian infectious bronchitis virus [J]. Viral Immunol, 2013, 26(4): 259-267.
- [15] Emmott E, Munday D, Bickerton E, et al. The cellular interactome of the coronavirus infectious bronchitis virus nucleocapsid protein and functional implications for virus biology [J]. J Virol, 2013, 87(17): 9486-9500.
- [16] British Pharmacopoeia. Avian infectious bronchitis vaccine (inactivated) [M]. London: Cambridge University Press, 2013: 205-206.
- [17] European Pharmacopoeia. Avian infectious bronchitis vaccine (inactivated), strasbourg [M]. Paris: EDQM, 2012: 3881-3882.

(上接第 25 页)

- [11] 林雪玲, 黄耿森, 冼琼珍, 等. 副猪嗜血杆菌分离鉴定与 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 吉林农业大学学报, 2006, 28(3): 322-324.
- Lin X L, Huang G S, Xian Q Z, et al. Isolation and identification of *Haemophilus parasuis* and establishment of PCR detection and application [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2006, 28(3): 322-324. (in Chinese)
- [12] 董淑珍, 刘玉芹, 杨彩然, 等. 副猪嗜血杆菌病的诊断与防治 [J]. 中国兽医杂志, 2011, 47(2): 86.
- Dong S Z, Liu Y Q, Yang C R, et al. Diagnosis and treatment of *Haemophilus parasuis* [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2011, 47(2): 86. (in Chinese)
- [13] 张荣铨. 副猪嗜血杆菌病的防治及体会 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2013(1): 93-94.
- Zhang R Q. The experience of *Haemophilus parasuis* pig disease prevention and control [J]. Shanghai Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2013(1): 93-94. (in Chinese)
- [14] 万春云, 汪伟, 龚大春. 湖北荆州地区副猪嗜血杆菌血清学调查 [J]. 养猪, 2010(5): 112-113.
- Wan C Y, Wang W, Gong D C. Serologic investigation on pig *Haemophilus parasuis* in Hubei Jingzhou area [J]. Swine Production, 2010(5): 112-113. (in Chinese)
- [15] 李芸. 哺乳动物、禽、蜂蜜 A 和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002: 13-19.
- Li Y. Mammal, bird, honey A and B diagnostic tests and vaccines standards manual [M]. Beijing: Agricultural Science and Technology Press of China, 2002: 13-19. (in Chinese)