

网络出版时间:2014-12-12 09:30

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.01.028

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20141212.0930.028.html

副猪嗜血杆菌平板凝集检测方法的 建立与应用

高 艳,张定全,杨增岐,梁留存,刘海金,
吴朋朋,高小龙,常旭东,杜恩岐

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】建立快速检测副猪嗜血杆菌抗体的平板凝集试验方法,以便能够对副猪嗜血杆菌病进行快速、准确的诊断。【方法】利用 9 株(Ea、Ec、Ew、A1、A2、B1、B2、C1、C2)副猪嗜血杆菌陕西分离株制备平板凝集抗原,用其免疫健康家兔制备血清抗体,建立副猪嗜血杆菌平板凝集检测方法,对制备抗原的优势菌株进行筛选,并对该方法的特异性、敏感性、抗原最佳工作浓度进行检测。【结果】选出 Ew 株作为制备抗原的种子菌株,成功建立了检测副猪嗜血杆菌抗体的平板凝集试验方法;该方法具有良好的特异性和敏感性,抗原最适工作浓度为 8×10^9 CFU/mL。采用本试验建立的副猪嗜血杆菌平板凝集试验方法对临床血清样品的检测结果与临床诊断结果基本一致。【结论】建立的副猪嗜血杆菌平板凝集试验方法能够对副猪嗜血杆菌病做出较为快速、准确的诊断;陕西省存在副猪嗜血杆菌不同程度的感染,规模猪场集中饲养的猪感染副猪嗜血杆菌的比率明显高于散户。

【关键词】 副猪嗜血杆菌;抗原制备;平板凝集;抗体检测

【中图分类号】 S853.31

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2015)01-0021-05

Establishment and application of plate agglutination method for detecting antibody against *Haemophilus parasuis*

GAO Yan,ZHANG Ding-quan,YANG Zeng-qi,LIANG Liu-cun,
LIU Hai-jin,WU Peng-peng,GAO Xiao-long,
CHANG Xu-dong,DU En-qi

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

Abstract: 【Objective】 This study aimed to establish a rapid method for detecting antibody of Hps and prepare the plate agglutination antigen for the detection of serum Hps antibody. 【Method】 9 Hps strains (Ea, Ec, Ew, A1, A2, B1, B2, C1, and C2) stored in the infectious disease lab were revived and serum antibodies of immunizing rabbits was prepared. Then the plate agglutination method for detecting serum Hps antibody was established and the specificity, sensitivity, and best working concentration were decided. 【Result】 Ew strain was selected as the strain for generating antigen. The plate agglutination method for detecting antibody against *Haemophilus parasuis* was successfully established. The method had good specificity and sensitivity, and the suitable working concentration of antigen was 8×10^9 CFU/mL. The test results of clinical serum samples with the clinical diagnosis were basically the same. 【Conclusion】 The established

【收稿日期】 2013-09-13

【基金项目】 陕西省农业科技创新项目(2011NXC01-10)

【作者简介】 高 艳(1986—),女,陕西榆林人,在读硕士,主要从事动物传染病的诊断与防制研究。E-mail:616291725@qq.com

【通信作者】 杨增岐(1963—),男,陕西岐山人,教授,博士,博士生导师,主要从事动物疫病诊断与防制研究。

E-mail:yzq1106@nwsuaf.edu.cn

plate agglutination method of Hps measurement diagnosed Glässer's disease more rapidly and accurately. The results also showed that the Hps infection rate of scale pig farm was higher than that of scattered farms in Shaanxi.

Key words: *Haemophilus parasuis*; antigen preparation; agglutination; antibody detection

副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, Hps)通常寄生于猪的上呼吸道,一般情况下不发病^[1],但在猪群存在其他病原感染以及环境变化等因素的影响下,能够引发以多发性浆膜炎、关节炎、脑膜炎、支气管肺炎等为特征的严重全身性疾病^[2]。临床上,猪链球菌、胸膜肺炎放线杆菌、巴氏杆菌、沙门菌等可引起与副猪嗜血杆菌病相似的症状,且往往与这些菌混合感染猪,所以应特别注意副猪嗜血杆菌病与这些病的鉴别诊断^[3-4]。检测副猪嗜血杆菌病的方法有很多种,如间接血凝抑制试验法、平板凝集试验法、琼脂扩散试验法、ELISA 等^[5]。但目前国内采用平板凝集试验法来检测副猪嗜血杆菌的详细文献报道较少。本试验在制备副猪嗜血杆菌平板凝集抗原的基础上,初步建立了副猪嗜血杆菌平板凝集检测方法,并用此方法对陕西部分地区猪场的猪进行了副猪嗜血杆菌血清抗体检测,证明本试验建立的副猪嗜血杆菌平板凝集试验方法具有简便、快速、经济、准确等优点,可用于集约化猪场和散养猪副猪嗜血杆菌病的检疫及流行病学调查。

1 材料与方法

1.1 材料

9 株副猪嗜血杆菌(Ea、Ec、Ew、A1、A2、B1、B2、C1、C2 株),由西北农林科技大学动物医学院传染病实验室从陕西省关中地区患多发性浆膜炎和关节炎猪场中分离鉴定和保存。猪传染性胸膜肺炎放线杆菌阳性血清、猪链球菌阳性血清、副猪嗜血杆菌标准阳性血清,均由西北农林科技大学动物医学院传染病实验室提供;其他血清是 2012—2013 年期间,采集自陕西部分猪场和散养户。1.5 kg/只左右的健康家兔,购自西北农林科技大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 副猪嗜血杆菌的复苏与扩大培养 从冰箱中取出冻存的副猪嗜血杆菌菌液,在 38℃ 左右水浴中快速使其复苏,将复苏菌液移至 TSA 固体培养基上,37℃ 培养 24~36 h,观察菌落形态并进行鉴定。

参考文献[6-8]中的方法并加以改进,将复苏鉴定好的菌株移至 TSA 固体培养基上进行培养,连续传 2~3 代复壮后制备抗原。

1.2.2 免疫阳性血清与阴性血清的制备 用制备好的副猪嗜血杆菌抗原与氢氧化铝佐剂按照体积比 1:1 混合,背部皮下多点注射免疫健康家兔,每个点注射 500 μL ,共免疫 3 次,每次 8×10^9 CFU/mL。一免以后间隔 7 d 进行二免,二免后间隔 7 d 进行三免,三免后 7 d 无菌心脏采血,分离血清,小量分装,置 -20℃ 保存备用。采集无副猪嗜血杆菌感染的健康家兔血清,作为阴性血清,置 -20℃ 保存备用。

1.2.3 副猪嗜血杆菌平板凝集检测方法的建立 按照平板凝集试验方法^[8],取 1 块洁净的玻璃板,垂直滴加制备好的抗原和血清各 50 μL ,用火柴棒充分混匀,室温放置 3~5 min,观察结果。同时,用生理盐水设立对照。

1.2.4 可靠性试验 以 9 株副猪嗜血杆菌为抗原,用本试验建立的副猪嗜血杆菌平板凝集试验方法,检测 134 份猪副猪嗜血杆菌标准阳性血清和 50 份标准阴性血清,记录结果。

1.2.5 优势抗原菌株的筛选 以 9 株副猪嗜血杆菌为抗原,用本试验建立的平板凝集试验方法检测 276 份血清,根据抗原与检测血清出现凝集反应程度的不同,筛选出制备抗原的最佳菌株。试验检测的 276 份血清中 142 份是 2012—2013 年期间采集自陕西省的一些发病猪场(神木某猪场 95 份、扶风某猪场 32 份、宝鸡某猪场 15 份),另外 134 份阳性血清由传染病实验室采集并检测。

1.2.6 抗原最佳工作浓度的确定 用 0.5% 的无菌石炭酸生理盐水调整副猪嗜血杆菌抗原为 1×10^{10} , 9×10^9 , 8×10^9 , 7×10^9 , 6×10^9 , 5×10^9 , 4×10^9 和 3×10^9 CFU/mL 8 个梯度,用此 8 个梯度的副猪嗜血杆菌抗原测定免疫兔血清中副猪嗜血杆菌抗体,以确定抗原的最佳工作浓度。

1.2.7 特异性试验 以 Ew 株副猪嗜血杆菌为抗原,用本试验建立的平板凝集试验方法检测制备好的兔副猪嗜血杆菌免疫阳性血清 30 份、兔阴性血清 30 份、猪传染性胸膜肺炎放线杆菌阳性血清 30 份、猪链球菌阳性血清 30 份,同时用生理盐水设立对照。

1.2.8 副猪嗜血杆菌平板凝集试验对临床样品的检测 试验检测的血清是 2012—2013 年期间,采集

自陕西省的一些猪场和散养户,共 282 份,其中扶风某猪场 32 份、宝鸡某猪场 15 份、勉县某猪场 14 份、华县某猪场 18 份、神木县某商品猪场 95 份、神木某种猪场(1)20 份、神木县某种猪场(2)38 份、神木县散养户猪场 50 份。所有采血猪均未进行副猪嗜血杆菌病疫苗免疫。用本试验建立的副猪嗜血杆菌平板凝集试验方法检测采集血清样,并结合临床诊断结果判断副猪嗜血杆菌病的流行情况。

表 1 副猪嗜血杆菌平板凝集抗原与猪阳性血清凝集试验结果

Table 1 Agglutination between plate agglutination antigen of Hps and swine positive serum			
抗原 Antigen	供试阳性血清 Tested positive serum	检测阳性数 Detection of positive	阳性率/% Positive rate
Ea	134	132	98.5
Ec	134	133	99.3
Ew	134	134	100.0
A1	134	130	97.0
A2	134	132	98.5
B1	134	130	97.0
B2	134	131	97.7
C1	134	129	96.3
C2	134	133	99.3

2.2 制备副猪嗜血抗原优势菌株的筛选

由表 2 可以看出,本试验制备的副猪嗜血杆菌抗体基本可检测出陕西地区副猪嗜血杆菌流行株;Ew 株较其他菌株抗原与阳性血清反应的凝集程度

2 结果与分析

2.1 副猪嗜血杆菌平板凝集试验方法的可靠性

9 株副猪嗜血杆菌抗原与阳性血清凝集反应率达 96.3%~100.0%(表 1),与阴性血清的凝集反应率为 0。说明本试验制备的副猪嗜血杆菌抗原及建立的平板凝集试验方法可靠,且具有很强的实用性。

强,其次为 Ea 株,其他菌株反应凝集情况基本相同。表明 Ew 菌株具有较强的凝集反应性,可作为今后制备副猪嗜血杆菌抗体和弱毒苗的备选菌株。

表 2 制备副猪嗜血杆菌抗原优势菌株的筛选

Table 2 Screening advantage strains for antigen preparation of Hps							
血清来源 Serum source	血清份数 Serum copies	Ea		Ec		Ew	
		检测阳性数 Positive number	阳性率/% Positive rate	检测阳性数 Positive number	阳性率/% Positive rate	检测阳性数 Positive number	阳性率/% Positive rate
神木某猪场 A swine farm in Shenmu	95	77	81.1	71	74.7	92	96.8
扶风某猪场 A swine farm in Fufeng	32	21	65.6	19	59.4	25	78.1
宝鸡某猪场 A swine farm in Baoji	15	13	86.7	12	80.0	13	86.7
陕西其他地方 Other areas in Shaanxi	134	132	98.5	133	99.3	134	100.0
血清来源 Serum source	血清份数 Serum copies	A1		A2		B1	
		检测阳性数 Positive number	阳性率/% Positive rate	检测阳性数 Positive number	阳性率/% Positive rate	检测阳性数 Positive number	阳性率/% Positive rate
神木某猪场 A swine farm in Shenmu	95	76	80	73	76.8	70	73.7
扶风某猪场 A swine farm in Fufeng	32	16	50	18	56.3	15	46.9
宝鸡某猪场 A swine farm in Baoji	15	12	80	12	80.0	11	73.3
陕西其他地方 Other areas in Shaanxi	134	130	97	132	98.5	130	97.0
血清来源 Serum source	血清份数 Serum copies	B2		C1		C2	
		检测阳性数 Positive number	阳性率/% Positive rate	检测阳性数 Positive number	阳性率/% Positive rate	检测阳性数 Positive number	阳性率/% Positive rate
神木某猪场 A swine farm of Shenmu	95	66	69.5	73	76.8	72	75.8
扶风某猪场 A swine farm of Fufeng	32	17	53.1	18	56.3	19	59.4
宝鸡某猪场 A swine farm of Baoji	15	12	80.0	10	66.7	13	86.7
陕西其他地方 Other areas in Shaanxi	134	131	99.2	129	97.7	133	99.3

2.3 副猪嗜血杆菌抗原最佳工作浓度的确定

平板凝集试验结果(表 3)表明,兔副猪嗜血杆

菌阳性血清 4 倍稀释,抗原浓度为 8×10⁹ CFU/mL 时,抗原与血清凝集现象最明显,液体完全透明,凝

集颗粒物大如沙粒,因而确定抗原的最适工作浓度为 8×10^9 CFU/mL。

表 3 副猪嗜血杆菌抗原最佳工作浓度的确定

Table 3 Determination of the most suitable concentration of detection of Hps antigen

抗原浓度/(CFU·mL ⁻¹) Concentration of antigen	血清稀释倍数 Serum dilution times						
	1	2	4	8	16	32	64
1×10 ¹⁰	++++	++++	++++	++++	+++	++	+
9×10 ⁹	++++	++++	++++	+++	++	+	—
8×10 ⁹	++++	++++	+++	++	+	—	—
7×10 ⁹	++++	+++	++	+	—	—	—
6×10 ⁹	++	++	+	—	—	—	—
5×10 ⁹	++	+	+/-	—	—	—	—
4×10 ⁹	+	—	—	—	—	—	—
3×10 ⁹	+	—	—	—	—	—	—

注:“++++”. 液体完全透明,凝集颗粒物如大沙粒;“+++”. 出现较多的凝集颗粒物,液体几乎完全透明,即 75%凝集;“++”. 有沙粒状凝集颗粒物,液体不完全透明,即 50%凝集;“+”. 液体混浊,有较少的小的颗粒状物,即 25%凝集;“—”. 液体均匀混浊,无凝集物。

Note:“++++”. Liquid is completely transparent,aggregation of particles such as large sand;“+++”. Appearing more aggregated particles,liquid is completely transparent with 75% agglutination;“++”. Agglutination particles such as sand granular,the liquid is not completely transparent with 50% agglutination;“+”. Liquid is turbid, there are fewer small pellets with 25% agglutination;“—”. Liquid is evenly turbid,no aggregate.

2.4 副猪嗜血杆菌平板凝集试验方法的特异性

特异性试验结果表明,兔阴性血清对照组、猪传染性胸膜肺炎放线杆菌阳性血清和猪链球菌阳性血清无凝集现象;兔副猪嗜血杆菌阳性血清试验组 100%凝集,说明副猪嗜血杆菌平板凝集试验方法具有良好的特异性。

2.5 副猪嗜血杆菌平板凝集试验方法对临床样品的检测

对 7 个猪场和神木县部分散养户的 282 份血清

样进行检测,结果见表 4。结合表 4 结果及发病情况可知:(1) 检测出为阳性血清的猪,临床表现为被毛粗乱、消瘦、体温升高、关节肿胀、呼吸困难;剖检可观察到胸腔内纤维素性渗出严重,肺与胸腔壁黏连,胸腹腔积液较多,出现典型的绒毛心,脾脏梗死,肝脏有大量的出血斑等典型的副猪嗜血杆菌临床症状。检测结果与病猪剖检结果相符,表明试验结果可靠。进一步证明,建立的副猪嗜血杆菌平板凝集试验方法具有较强的临床实用性。

表 4 陕西猪场 Hps 血清抗体检测结果

Table 4 Detection results of antibody of Hps in Shaanxi swine farms

血清来源 Serum source	血清份数 Serum copies	检测阳性数 Positive number	可疑数 Suspicious number	阴性数 Negative number	阳性率/% Positive rate
扶风某猪场 A swine farm in Fufeng	32	25	0	7	78.1
宝鸡某猪场 A swine farm in Baoji	15	13	1	1	86.7
勉县某猪场 A swine farm in Mianxian	14	9	1	4	64.3
华县某猪场 A swine farm in Huaxian	18	15	1	2	83.3
神木县某商品猪场 A business swine farm in Shenmu	95	92	2	1	97.0
神木县某种猪场(1) A pig breeding farm in Shenmu	20	0	0	20	0
神木县某种猪场(2) A pig breeding farm in Shenmu	38	0	0	38	0
神木县散养户猪场 Scattered farms in Shenmu	50	3	2	45	6.0
总计 Total	282	157	12	113	—

(2)供检猪场均有副猪嗜血杆菌检出,其中关中 3 个猪场(扶风某猪场、宝鸡某猪场和华县某猪场)平均阳性检出率为 81.5%,陕南 1 个猪场(勉县某猪场)阳性检出率为 64.3%,陕北神木县 3 个猪场的平均阳性率达到 60.1%。表明陕西已有副猪嗜

血杆菌病流行,且流行覆盖面较广。

(3)发病季节多集中在秋冬、冬春冷热交替的季节,说明副猪嗜血杆菌病在秋冬、冬春冷热交替的季节较其他时间更容易发生。另外,检测血清多为 31~70 日龄保育舍发病猪,表明 4~10 周龄猪更容

易感染此病。

(4)神木县散养户猪场的 50 份血清中阳性血清 3 份,阳性率为 6.0%;3 个猪场的 153 份血清,检出副猪嗜血杆菌阳性血清 92 份,阳性检出率为 60.1%。此结果表明,副猪嗜血杆菌病在散养户猪场的发病率明显低于集约化猪场。因此,要求集中饲养的猪场在管理与疫病防控方面更要重视,以避免副猪嗜血杆菌的规模集中感染。

3 讨 论

检测副猪嗜血杆菌的方法很多,如用灭活的副猪嗜血杆菌菌体作为包被抗原的 ELISA 法、补体结合试验以及多聚酶链式反应(PCR)法等^[9-10],另外,林雪玲等^[11]还建立了副猪嗜血杆菌的快速聚合酶链式反应诊断技术,可对该病作出迅速的诊断。这些方法具有较强特异性和较高敏感性,但检测成本较高。本试验采用平板凝集试验法检测副猪嗜血杆菌血清抗体,虽然与上述几种方法相比,特异性和敏感性稍差,但操作简便快捷、易掌握、成本低,可对该病作出快速的诊断。本试验所用菌株是由西北农林科技大学动物医学院传染病实验室从陕西关中地区猪场中分离得到,是陕西地区流行的菌株。本试验制备的抗原可检测出陕西地区副猪嗜血杆菌阳性血清,可用于区别感染猪与非感染猪,也可用于陕西地区猪场副猪嗜血杆菌临床快速诊断和流行病学调查。

通过对陕西地区一些猪场及散养户猪的血清抗体检测,了解和掌握了陕西地区副猪嗜血杆菌病的流行情况,对陕西地区该病的预防和控制有一定的指导价值。本研究结果显示,副猪嗜血杆菌病已成为陕西地区普遍流行的疾病,应提高警惕,加强防治管理。此外,规模猪场集中饲养的猪感染 Hps 的比率明显高于散户,说明集中饲养更容易造成猪的成批感染^[12];另外,从采样猪发病的时间可以看出,该病在秋冬、冬春等冷热交替的季节更容易发生。因此,气候变化时,猪场更应该注意加强饲养管理^[13]。猪场可利用“二点三点法”饲喂,即将猪场分散在不同的地点,按照猪成长阶段分批分群饲养在不同的地点,以避免疫病的交叉感染^[14]。具体操作方法为:哺乳仔猪在 21 d 前断乳,然后将其转移饲养到另外一个生产区,并对该生产区彻底消毒,保持猪舍干净整洁,以减少病原微生物,使仔猪处于较好的环境中生长发育,而且此时仔猪体内的特殊疾病免疫抗体还没有完全消失,具有较好的抵抗力^[15]。

〔参考文献〕

- [1] 陈申秒,魏建忠. 副猪嗜血杆菌病的研究进展 [J]. 养猪, 2007 (4): 52-54.
Chen S M, Wei J Z. Research progress of *Haemophilus parasuis* [J]. Swine Production, 2007(4): 52-54. (in Chinese)
- [2] 冯王龙. 副猪嗜血杆菌病原菌的分离与鉴定 [J]. 试验研究, 2008(6): 25-26.
Feng W L. Isolation and identification of *Haemophilus parasuis* [J]. Experimental Study, 2008(6): 25-26. (in Chinese)
- [3] 高 丰, 罗 毅, 成 军, 等. 副猪嗜血杆菌感染的诊断与防治 [J]. 动物医学进展, 2002, 23(4): 101-103.
Gao F, Luo Y, Cheng J, et al. Diagnosis and control of *Haemophilus parasuis* infection [J]. Animal Medical Progress, 2002, 23 (4): 101-103. (in Chinese)
- [4] 高鹏程, 储岳峰, 赵 萍, 等. 副猪嗜血杆菌病原的分离鉴定与药敏试验 [J]. 动物医学进展, 2007, 28(12): 27-29.
Gao P C, Chu Y F, Zhao P, et al. Isolation and identification of *Haemophilus parasuis* and pathogen susceptibility testing [J]. Animal Medical Progress, 2007, 28(12): 27-29. (in Chinese)
- [5] 司振书, 王桂英. 副猪嗜血杆菌病研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(6): 179-182.
Si Z S, Wang G Y. Research advances in *Haemophilus parasuis* disease [J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine of China, 2011, 38(6): 179-182. (in Chinese)
- [6] 郑太荣, 袁施彬, 伍春莲. 规模化猪场副猪嗜血杆菌病的诊断与综合防治 [J]. 中国畜禽种业, 2009(3): 113-115.
Zheng T R, Yuan S B, Wu C L. The diagnosis and prevention and control of *Haemophilus parasuis* disease in scale pig farm [J]. Livestock and Poultry Industry of China, 2009 (3): 113-115. (in Chinese)
- [7] 姜 平. 兽医生物制品学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 192-193.
Jiang P. Veterinary biological products [M]. Beijing: The Agriculture Press of China, 2003: 192-193. (in Chinese)
- [8] 王文豪, 章 胜, 张丹琳, 等. 副猪嗜血杆菌玻板凝集抗原的研制 [J]. 养猪, 2012(3): 109-110.
Wang W H, Zhang S, Zhang D L, et al. Development of *Haemophilus parasuis* glass plate agglutination antigen [J]. Swine Production, 2012(3): 109-110. (in Chinese)
- [9] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物学试验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 92-161.
Shen P, Fan X R, Li G W. Microbiology experiment [M]. Beijing: Higher Education Press, 2004: 92-161. (in Chinese)
- [10] 杨茂生, 吴位琚, 杨 莉, 等. 副猪嗜血杆菌病的检测与防治研究进展 [J]. 中兽医医药杂志, 2012, 62(3): 30-31.
Yang M S, Wu W H, Yang L, et al. Research progress in the detection and prevention of *Haemophilus parasuis* [J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2012, 62(3): 30-31. (in Chinese)

- 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)