

范志宇, 魏后军, 胡 波, 等. 兔多杀性巴氏杆菌和支气管败血波氏杆菌复合 PCR 方法的建立及临床应用[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(2): 376-381.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.02.024

兔多杀性巴氏杆菌和支气管败血波氏杆菌复合 PCR 方法的建立及临床应用

范志宇, 魏后军, 胡 波, 宋艳华, 王 芳, 薛家宾, 徐为中, 苏国清

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014)

摘要: 根据 GenBank 中多杀性巴氏杆菌 ATP 合成酶基因 (*atpB*) 的保守序列设计特异性引物, 建立巴氏杆菌 PCR 检测方法, 并与已建立的支气管败血波氏杆菌 PCR 检测方法进行合并, 经反应条件的优化, 成功建立多杀性巴氏杆菌、支气管败血波氏杆菌复合 PCR 诊断方法。该方法检出的最小多杀性巴氏杆菌和支气管败血波氏杆菌菌数分别为 40 CFU 和 4 CFU; 对兔源产气荚膜梭菌、大肠杆菌、猪胸膜肺炎放线杆菌、猪鼻支原体、链球菌的检测结果均为阴性, 说明该方法具有良好的特异性。用该方法对中国 4 个省份采集的临床鼻拭子样本共 712 份进行检测, 结果显示, 多杀性巴氏杆菌阳性率为 25.56%, 支气管败血波氏杆菌阳性率为 34.55%, 双阳性率为 13.20%。该复合 PCR 方法能快速、敏感地从家兔鼻拭子样品中检出多杀性巴氏杆菌和支气管败血波氏杆菌, 为临床疾病检测和流行病学调查提供了技术保障。

关键词: 兔支气管败血波氏杆菌; 多杀性巴氏杆菌; 复合 PCR

中图分类号: S858.291.51⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)02-0376-06

Development and clinical application of multiple PCR assay for detection of *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* infections in rabbits

FAN Zhi-yu, WEI Hou-jun, HU Bo, SONG Yan-hua, WANG Fang, XUE Jia-bin, XU Wei-zhong, SU Guo-qing

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biologicals Engineering and Technology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

Abstract: A pair of specific primers was designed according to the sequences of *Pasteurella multocida* (Pm) ATP synthase (*atpB*) in GenBank to establish the *P. multocida* PCR method. Combined with the PCR method established before for detection of *Bordetella bronchiseptica* (Bb) infection, a multiple PCR method was successfully developed through the op-

收稿日期: 2014-08-22

基金项目: 现代农业产业技术体系基金项目 (CARS-44-C-1)

作者简介: 范志宇 (1982-), 男, 硕士, 山西太谷人, 助理研究员, 主要从事家兔疾病防治与兽医生物技术研究。(Tel) 025-84390337; (E-mail) fanzhiyu2007@163.com

通讯作者: 王 芳, (Tel) 025-84390337; (E-mail) rwangfang@126.com; (Fax) 025-84390330

timization of reaction conditions. The sensitivities of the multiple PCR method for detecting Pm and Bb were 40 CFU and 4 CFU, respectively. No cross reaction was detected by the multiple PCR for *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Actinobacillus pleuropneumonia*, *Mycoplasma hyorhinitis*, and *Streptococcus suis*. In 712 samples of rabbit nasal swab, the positive rates of Pm and Bb in-

fections were 25.56% and 34.55%, respectively, and the double positive detection rate of Pm and Bb infections was 13.20%. The nasal swab samples of Pm and Bb infection in rabbits could be detected rapidly and sensitively by the multiplex PCR method, which provided a technical support for clinical diagnosis and epidemic investigation of Pm and Bb.

Key words: *Bordetella bronchiseptica*; *Pasteurella multocida*; multiple PCR

兔多杀性巴氏杆菌病,又称兔出血性败血病,是由多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)引起的一种在家兔生产中广泛存在而且危害性较大的呼吸道传染病。支气管败血波氏杆菌病是由支气管败血波氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*, Bb)引起的一种多发性呼吸道疾病。这两种呼吸道传染病的发病率均较高,各年龄家兔均易感,临床上常出现混合感染,给养兔业造成严重的经济损失^[1-2]。由于这两种疾病在流行特点、症状、病理变化等方面存在较多相似之处,常规方法很难快速、准确地作出诊断,并且容易造成误诊,耽误疾病的治疗。因此临床中需要一种快速、稳定、准确鉴别诊断这两种疾病的方法。

PCR 方法不仅耗时短,操作相对简单,且灵敏度高,结果稳定,已经成为临床病原学诊断最常用的检测方法之一。多重 PCR 可在同一反应体系中加入多对引物同时对多个目的基因进行扩增,一次 PCR 反应可检测诊断多个病原体。本实验室前期已经建立了兔支气管败血波氏杆菌的 PCR 检测方法^[3],在此基础上根据 Pm 的 ATP 合成酶基因设计特异性引物,可建立兔呼吸道疾病 Bb 与 Pm 两种致病菌的复合 PCR 方法。该方法的建立将为兔呼吸道疾病的临床检测和流行病学调查提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 菌种

兔源支气管败血波氏杆菌、多杀性巴氏杆菌 C51-17 株、产气荚膜梭菌 A 型苏 84-A 株、大肠杆菌、猪胸膜肺炎放线杆菌、猪鼻支原体、链球菌均由江苏省农业科学院兽医研究所分离、鉴定并保存。

1.2 试剂

柱式细菌 DNAout 试剂盒、柱式质粒 DNAout 试剂盒购自 TIANDZ 公司。DNA 凝胶回收试剂盒、限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III、DNA Marker DL2000、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 均购自 TaKaRa 公司。

1.3 引物

本实验室已经根据支气管败血波氏杆菌菌毛 *fim2* 基因序列建立了 PCR 方法^[3]。引物由上海英

潍捷基生物有限公司合成, P1: 5'-TGAACAATGGCGTGAAAGC-3', P2: 5'-TCGATAGTAGGACGGGAGGAT-3', 预期扩增的 DNA 产物片段大小为 425 bp。

根据巴氏杆菌 ATP 合成酶(*atpB*) 系列基因保守序列(序列号: NC_002663)设计 1 对特异性引物, 由上海英潍捷基生物有限公司合成, P3: 5'-TTCTGTTCGCTTCATCCT-3', P4: 5'-CTGTTCTGTTTCGCTTCATC-3', 预期扩增的 DNA 产物片段大小为 1 141 bp。

1.4 支气管败血波氏杆菌 PCR 方法

参考王欣等^[3]建立的方法, 并进行验证。

1.5 多杀性巴氏杆菌 PCR 方法的建立

1.5.1 标准菌株模板 DNA 的制备 将 -70 °C 保存的冻干 Pm 于马丁肉汤中复苏, 37 °C、200 r/min 振荡培养 16 h, 所得的菌液即可用来提取模板 DNA。模板 DNA 的提取按照 TIANDZ 公司的柱式细菌 DNAout 试剂盒说明书进行。

1.5.2 PCR 反应条件的优化 对 PCR 反应中的 Mg^{2+} 浓度、*Taq* 酶浓度、DNA 模板量、退火温度等进行筛选, 当出现特异性强、清晰度高的条带时即可确定最佳反应条件。反应体系: *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ l, 10 \times PCR buffer 2.5 μ l, 25 mmol/L $MgCl_2$ 2.5 μ l, 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μ l, P3、P4 各 1.0 μ l, DNA 模板 4.0 μ l, ddH₂O 11.5 μ l。PCR 反应条件: 94 °C 预热 5 min; 94 °C 变性 30 s, 53.9 °C 退火 30 s, 72 °C 复性 80 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

1.5.3 PCR 产物的电泳及鉴定 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 回收纯化目的片段后克隆入 pMD-19T 质粒, 转化 DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落培养并提取质粒后, 用 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 筛选的阳性克隆送至上海英潍捷基公司测序。

1.6 复合 PCR 方法的建立

经退火温度筛选之后, 以一条泳道内出现清晰的两个特异性条带为目的, 建立复合 PCR 方法。反应体系为 25.0 μ l, 其中: *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ l,

10×PCR buffer 2.5 μ l, 25 mmol/L $MgCl_2$ 2.5 μ l, 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μ l, P1、P2 各 0.5 μ l, P3、P4 各 1.0 μ l, DNA 模板 (Pm、Bb) 各 4.0 μ l, ddH₂O 6.5 μ l。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}C$ 预热 5 min, 94 $^{\circ}C$ 变性 1 min, 53.0 $^{\circ}C$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}C$ 复性 80 s, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。

1.7 复合 PCR 敏感性试验

将培养的 Pm 和 Bb 菌液进行 10 倍系列稀释, 取 1×10^{-7} 和 1×10^{-8} 2 个梯度, 每个梯度 100.0 μ l, 分别涂布改良马丁平板和 10% 绵羊血鲍姜氏平板, 每个梯度涂 3 个平板进行细菌计数。根据细菌计数结果, 用 PBS 调整菌数, 使 Pm 和 Bb 菌数均为 1×10^9 CFU/ml, 菌液混合后提取 DNA 模板。将模板作 10 倍梯度稀释, 连续稀释 8 个梯度, 每个梯度取 8 μ l, 模板加入复合 PCR 反应体系 (每个反应体系各含支气管败血波氏杆菌和多杀性巴氏杆菌分别为 $4 \times 10^5 \sim 4 \times 10^{-2}$ CFU) 进行敏感性试验, 以出现特异性条带的最高稀释倍数的反应体系所含菌数为最低检出量。

1.8 复合 PCR 特异性试验

分别提取支气管败血波氏杆菌、多杀性巴氏杆菌、产气荚膜梭菌、大肠杆菌、猪胸膜肺炎放线杆菌、猪鼻支原体、链球菌的模板 DNA, 在相同条件下同步进行 PCR 扩增。

1.9 PCR 检测方法的临床应用

将江苏、浙江、安徽、广东 4 省采集的 712 份兔鼻拭子样本提取 DNA 模板后进行复合 PCR 检测。

对 2012 年 3 月在江苏省涟水县采集的 22 份鼻拭子样品同时进行病原菌的分离鉴定, 并与 PCR 结果进行比较。

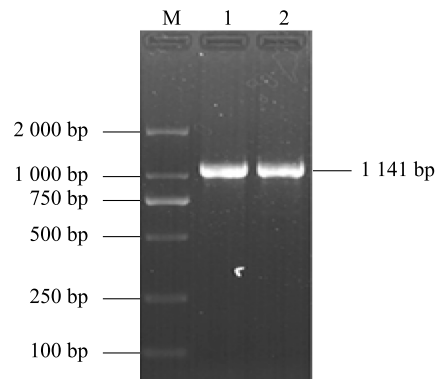
2 结果

2.1 支气管败血波氏杆菌的 PCR 检测

对已经建立的支气管败血波氏杆菌 PCR 检测方法进行验证, 在 425 bp 处产生特异性目的条带, 表明支气管败血波氏杆菌的 PCR 检测方法有效。

2.2 多杀性巴氏杆菌 PCR 方法的建立

优化 PCR 反应体系, 对多杀性巴氏杆菌进行 PCR 扩增, 在 1 141 bp 处产生特异性目的条带 (图 1), 大小与预期片段一致。将克隆基因序列与 GenBank 上公布的 *atpB* 序列进行 Blast 比对, 同源性达 99.7%。



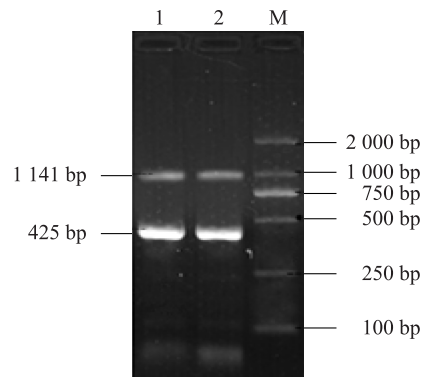
M: DNA 分子质量标准; 1~2: 多杀性巴氏杆菌特异性 PCR 产物。

图 1 多杀性巴氏杆菌的特异性 PCR 产物

Fig. 1 The specific PCR product of *Pasteurella multocida*

2.3 多杀性巴氏杆菌和支气管败血波氏杆菌复合 PCR 方法

经过反应条件的优化, 进行多杀性巴氏杆菌和支气管败血波氏杆菌复合 PCR, 在一条泳道内于 1 141 bp 和 425 bp 两处出现特异性条带 (图 2)。



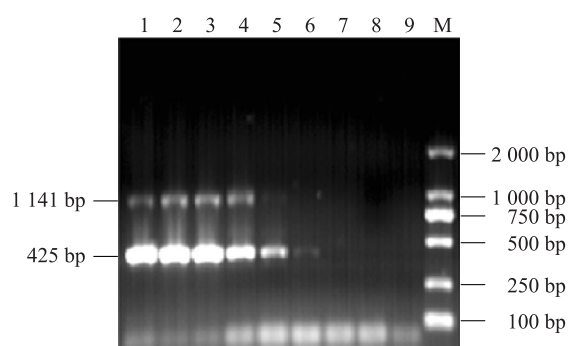
1、2: 支气管败血波氏杆菌 (425 bp) 及多杀性巴氏杆菌 (1 141 bp); M: DNA 分子质量标准。

图 2 支气管败血波氏杆菌与多杀性巴氏杆菌复合 PCR 扩增结果

Fig. 2 Amplification of *Bordetella bronchiseptica* and *P. multocida* by multiple PCR

2.4 PCR 敏感性

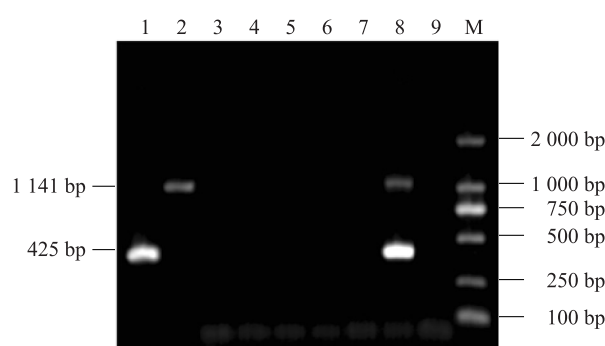
将不同稀释度的模板 DNA 进行 PCR 敏感性检测, 结果显示, 多杀性巴氏杆菌和支气管败血波氏杆菌分别第 5 和第 6 泳道出现最后一条目的条带 (图 3), 因此复合 PCR 对 Pm 和 Bb 的检测下限分别为 40 CFU 和 4 CFU。



1: 4×10^5 CFU; 2: 4×10^4 CFU; 3: 4×10^3 CFU; 4: 4×10^2 CFU; 5: 4×10^1 CFU; 6: 4 CFU; 7: 4×10^{-1} CFU; 8: 4×10^{-2} CFU; 9: 阴性对照; M: DNA 分子质量标准。

图3 复合 PCR 敏感性检测结果

Fig. 3 The sensitivity test of the multiple PCR assay



1: 支气管败血波氏杆菌; 2: 多杀性巴氏杆菌; 3: 产气荚膜梭菌; 4: 大肠杆菌; 5: 猪胸膜肺炎放线杆菌; 6: 猪鼻支原体; 7: 链球菌; 8: 多杀性巴氏杆菌和支气管败血波氏杆菌; 9: 阴性对照; M: DNA 分子质量标准。

图4 复合 PCR 特异性检测结果

Fig. 4 The specificity test of the multiple PCR assay

2.5 PCR 特异性

用复合 PCR 检测支气管败血波氏杆菌、多杀性巴氏杆菌、产气荚膜梭菌、大肠杆菌、猪胸膜肺炎放线杆菌、猪鼻支原体、链球菌,结果显示:多杀性巴氏杆菌和支气管败血波氏杆菌分别扩增出了特异性目的基因片段,其他菌株均未扩增出任何条带(图4)。

表1 临床样本检测结果

Table 1 The detection results of clinical samples by the multiple PCR

采样兔场地点	品种	采样时间 (年·月)	阳性数/样品数		
			支气管败血 波氏杆菌	多杀性 巴氏杆菌	支气管败血波氏杆菌 和多杀性巴氏杆菌
江苏省涟水县	肉兔	2012-03	17/22	11/22	7/22
江苏省南京市	肉兔	2012-06	25/120	23/120	14/120
广东省新兴县	肉兔	2012-07	6/24	4/24	2/24
广东省佛山市	獭兔	2012-07	16/18	12/18	8/18
广东省信宜市	肉兔	2012-07	2/12	1/12	0/12
广东省钱排镇	肉兔	2012-07	6/12	4/12	2/12
安徽省六安市	獭兔	2012-08	15/30	12/30	8/30
安徽省宿州市	肉兔	2012-08	12/24	10/24	3/24
江苏省南京市	肉兔	2012-10	57/200	38/200	15/200
江苏省南京市	肉兔	2013-04	21/58	15/58	14/58
江苏省南京市	肉兔	2013-07	10/20	8/20	2/20
浙江省嘉兴市	獭兔	2013-11	7/24	5/24	2/24
浙江省宁波市	獭兔	2013-11	5/24	3/24	0/24
江苏省南京市	肉兔	2013-11	8/20	6/20	3/20
江苏省盐城市	毛兔	2014-04	12/30	10/30	5/30
江苏省南京市	肉兔	2014-04	7/20	5/20	1/20
江苏省盐城市	毛兔	2014-07	13/30	9/30	6/30
江苏省南京市	肉兔	2014-07	7/24	6/24	3/24

2.6 PCR 方法的临床应用

对华东3省(江苏、浙江、安徽省)及广东省兔场随机采集的712份鼻拭子样品进行PCR检测,结果显示,支气管败血波氏杆菌和多杀性巴氏杆菌的阳性率分别为34.55%和25.56%,双阳性率为13.20%(表1)。

由表 2 可以看出,各年度、各地区、不同兔品种的鼻拭子样品均能检测到支气管败血波氏杆菌和多杀性巴氏杆菌,其中安徽省的阳性率最高,浙江省的阳性率最低,且肉兔品种的阳性率明显低于獭兔和毛兔。

对上述检验样本中江苏省涟水县采集的 22 份鼻拭子样品同时进行病原菌的分离鉴定和 PCR 方法检测,检测结果为:支气管败血波氏杆菌阳性数/

样本数为 17/22,多杀性巴氏杆菌阳性数/样本数为 11/22,双阳性数/样本数为 7/22,标记样品的检测结果两种方法均一致,证明了复合 PCR 方法的可靠性。在检测的阳性样品中随机挑选多杀性巴氏杆菌和支气管败血波氏杆菌各 3 份进行序列分析,经 BLAST 比对,与兔多杀性巴氏杆菌和支气管败血波氏杆菌相应序列的同源性为 99.7% 和 99.1% 以上。

表 2 临床样本检测数据分析

Table 2 Data analysis of the results of clinical samples

分类		阳性率 (%)		
		支气管败血波氏杆菌	多杀性巴氏杆菌	支气管败血波氏杆菌和多杀性巴氏杆菌
地区	江苏省	32.53	24.08	12.68
	广东省	45.45	31.81	18.18
	安徽省	50.00	40.74	20.37
	浙江省	25.00	16.67	4.17
品种	肉兔	32.01	23.56	11.69
	獭兔	44.79	33.33	18.75
	毛兔	41.67	31.67	18.33
年度	2012 年度	33.76	24.89	12.77
	2013 年度	34.93	25.34	14.38
	2014 年上半年	37.50	28.84	13.46

3 讨论

支气管败血波氏杆菌是一种引发猪、兔等多种哺乳动物急、慢性呼吸道疾病的重要病原菌^[4-5]。多杀性巴氏杆菌引起的疾病发病严重,伴随着败血症和炎性出血过程为特征^[4,6]。谷子林等^[1]对以传染性鼻炎为主的呼吸道疾病进行跟踪调查研究,总结其基本特点为发病率高、传染性强、复发率高、容易恶化以及易继发感染其他疾病,是生产中最为顽固的疾病之一。Berglöf 等^[7]认为,兔支气管炎和肺炎的主要病原是支气管败血波氏杆菌。Deeb 等^[4]的研究显示,25% 的试验断奶兔感染多杀性巴氏杆菌,75% 的断奶兔感染支气管败血波氏杆菌,50% 的 2~4 月龄的家兔发生由多杀性巴氏杆菌和/或支气管败血波氏杆菌感染引发的呼吸道疾病。Rougier 等^[8]对 2 月龄以上的 121 只宠物兔流行病学调查结果显示,多杀性巴氏杆菌感染率为 54.8%,支气管

败血波氏杆菌感染率为 52.2%,假单胞菌感染率为 27.9%,葡萄球菌为 17.4%,而且其中 28.9% 的宠物兔混合感染支气管败血波氏杆菌和多杀性巴氏杆菌。可见,这两种致病菌是兔呼吸道感染最主要的病原菌,两者混合感染,会引发严重的呼吸道疾病,是家兔养殖中发病率和死亡率升高的重要原因之一。当前检测兔多杀性巴氏杆菌和支气管败血波氏杆菌的方法主要通过细菌分离培养和镜检,并进一步用免疫学方法进行血清学检查。此方法不仅较为繁琐、耗时,敏感性也较低。因此,建立针对多杀性巴氏杆菌和支气管败血波氏杆菌的复合 PCR 诊断方法有助于兔群的大规模检测和流行病学调查。

本研究选取支气管败血波氏杆菌的 *fim2* 基因和多杀性巴氏杆菌的 *atpB* 基因的特异性保守片段设计引物。波氏杆菌 *fim2* 基因为其菌毛基因,具有较高的保守性^[3]。巴氏杆菌的 *atpB* 编码 ATP 合成酶的 β 亚基,基因进化速率缓慢,序列保守^[9]。本

研究设计的 2 对特异性引物在优化的试验条件下,分别能从兔支气管败血波氏杆菌和多杀性巴氏杆菌中扩增出 425 bp 和 1 141 bp 的 DNA 片段,而对照产气荚膜梭菌、大肠杆菌、猪胸膜肺炎放线杆菌、猪鼻支原体、链球菌等扩增结果均为阴性,证实所建立的复合 PCR 方法具有良好的特异性。利用建立的复合 PCR 方法和常规菌分离培养方法对江苏省涟水县采集的 22 份鼻拭子样品进行检测,结果一致,进一步证明了复合 PCR 方法的可靠性。

本研究中,利用复合 PCR 方法检测南京地区不同时间采集的样品,发现多杀性巴氏杆菌的检出率没有明显变化而波氏杆菌有明显差别,春秋季节明显高于夏季。不同地区采集的样品检测结果显示,安徽省的阳性率最高,广东省和江苏省次之,而浙江省的阳性率最低,可能与地理位置和饲养管理水平有关。不同品种检出率差异的分析表明,肉兔品种的阳性率显著低于獭兔和毛兔,可能由于獭兔和毛兔比肉兔的饲养周期长有关。

对江苏、浙江、安徽及广东 4 省采集的 18 个兔场次的临床样品检测显示,波氏杆菌的阳性率均明显高于巴氏杆菌,有的阳性率甚至达到 50%,可能是由于多杀性巴氏杆菌有疫苗可以用于免疫,而波氏杆菌暂时没有疫苗提供。在普通环境中,支气管败血波氏杆菌引起的感染依赖于细菌的致病性和家兔的抵抗力^[10-12],当动物抵抗力降低,粘膜对细菌的敏感性增强时,容易引发感染和流行。Pathak^[13]等研究表明,支气管败血波氏杆菌可以和寄生虫混合感染,提高寄生虫在宿主体内的感染强度并延长感染时间。对猪支气管败血波氏杆菌的研究也表明该菌和其他病原体之间有协同作用,这样的作用能够提高呼吸道疾病的发病率并增加其他病原的发病程度^[14-16]。因此,随着中国家兔集约化养殖的不断深入,兔群中支气管败血波氏杆菌的高带菌率对呼吸道疾病的防控是一个潜在的威胁,需要引起足够的重视。

参考文献:

- [1] 谷子林. 近年我国兔疾病发生规律和特点及其防控策略[J]. 中国养兔, 2014(1): 4-9.
- [2] 范志宇, 王欣, 王芳, 等. 兔支气管败血波氏杆菌 OMP-ELISA 抗体检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(3): 566-570.
- [3] 王欣, 恽时锋, 王芳, 等. 兔支气管败血波氏杆菌 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国比较医学杂志, 2008(18): 40-44.
- [4] DEEB B J, DIGIACOMO R F, BERNARD B L, et al. *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* infections in rabbits[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1990, 28(1): 70-75.
- [5] KUMAR S, SINGH B R, BHARDWAJ M, et al. Occurrence of *Bordetella* infection in pigs in northern India[J]. International Journal of Microbiology, 2014(1): 1-6.
- [6] DE JONG A, THOMAS V, SIMJEE S, et al. Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe[J]. Vet Microbiol, 2014, 172(1-2): 202-215.
- [7] BERGLÖF A, NORLANDER T, FEINSTEIN R, et al. Association of bronchopneumonia with sinusitis due to *Bordetella bronchiseptica* in an experimental rabbit model[J]. Am J Rhinol, 2000, 14(2): 125-30.
- [8] ROUGIER S, GALLAND D, BOUCHER S, et al. Epidemiology and susceptibility of pathogenic bacteria responsible for upper respiratory tract infections in pet rabbits[J]. Vet Microbiol, 2006, 115(1-3): 192-198.
- [9] 刘红梅, 张宪春, 曾辉. DNA 序列在蕨类分子系统学研究中的应用[J]. 植物学报, 2009, 44(2): 143-158.
- [10] JOHN G C. Environmental sensing mechanisms in *Bordetella*[J]. Advances in Microbial Physiology, 2001, 44: 141-181.
- [11] 裴洁, 何华, 赵战勤, 等. 支气管败血波氏杆菌的研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息, 2006(2): 4-6.
- [12] GRAINNE H L, DIVYA S, ANDREW F R, et al. Identifying the age cohort responsible for transmission in a natural outbreak of *Bordetella bronchiseptica*[J]. PLoS Pathogens, 2010, 6(12): 1-10.
- [13] PATHAK A K, PELENSKY C, BOAG B, et al. Immuno-epidemiology of chronic bacterial and helminth co-infections; observations from the field and evidence from the laboratory[J]. Int J Parasitol, 2012, 42(7): 647-55.
- [14] 程雷刚, 杨建亮. 支气管败血波氏杆菌[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2004, 24(3): 47-48.
- [15] CRYSTAL L L, SUSAN L B, AMY L V, et al. Influenza virus coinfection with *Bordetella bronchiseptica* enhances bacterial colonization and host responses exacerbating pulmonary lesions[J]. Microbial Pathogenesis, 2010(49): 237-245.
- [16] ASHUTOSH K P, KATHLEEN E C, JACOB R W, et al. Immune regulation of a chronic bacteria infection and consequences for pathogen transmission[J]. BMC Microbiology, 2010, 10: 226.

(责任编辑: 孙 宁)