

副猪嗜血杆菌 hhdB 基因的鉴定和分析

宋 帅, 李春玲, 杨冬霞, 李 淼

(广东省农业科学院 兽医研究所, 广东省兽医公共卫生实验室, 广东 广州 510640)

摘要: 为了明确副猪嗜血杆菌致病菌株的毒力相关因子, 从广东省不同地区发病猪场送检病猪中分离到 9 株细菌 (H1~H9), 并对其 hhdB 基因进行了鉴定和分析。结果显示, 所分离的 9 株细菌经形态观察、生化特性鉴定和 PCR 鉴定为副猪嗜血杆菌阳性, 并具有卫星现象和不溶血特征。用 hhdB 基因引物从分离菌株中扩增到了特异性片段, 序列分析表明, 所获得的 hhdB 基因序列与 GenBank 中副猪嗜血杆菌 SH0165 的 hhdB 基因同源率为 99%, 分离菌株 hhdB 基因之间序列同源率为 97.5%~99.8%, 推导的氨基酸序列与少数放线杆菌、杜克雷嗜血杆菌的溶血素激活蛋白具有一定的相似性。RT-PCR 扩增到了 hhdB 基因的目的条带, 表明该基因在分离菌株中得到了相应的表达。这将为副猪嗜血杆菌致病菌株毒力特征基因的鉴定以及副猪嗜血杆菌致病机理的研究奠定基础。

关键词: 副猪嗜血杆菌; hhdB 基因; 克隆; 分析

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2010)增刊-0017-05

Identification and Analysis of the hhdB Gene of *Haemophilus parasuis*

SONG Shuai, LI Chunling, YANG Dongxia, LIMiao

(Guangdong Open Laboratory of Veterinary Public Health, Institute of Veterinary Medicine, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The research aimed to know the virulence associated factors in pathogenic strains of *Haemophilus parasuis*. Nine strains (H1-H9) of bacteria were isolated from unsound swine within the different regions epidemic farms in Guangdong province, and the hhdB genes of the isolated strains were identified and analyzed. The results showed that the isolated strains belonged to *Haemophilus parasuis* by morphological observation, biochemical characterization and PCR identify, then had satellite phenomena and nonhemolytic characteristics. The nucleotide sequence similarities of hhdB genes between the isolated strains *Haemophilus parasuis* SH0165 are 97.5%—99.8% and 99% respectively. The amino acid sequence of isolated strains hhdB gene and the bacterial hemolysin activation protein (*Actinobacillus minor* NM305 and *Haemophilus ducreyi* 35000HP) were similar. RT-PCR indicated that the hhdB gene was expressed in all of the isolated strains. This study would be helpful for identification of virulence gene and pathogenic mechanism study of *Haemophilus parasuis*.

Key words: *Haemophilus parasuis*; hhdB gene; Cloning; Analysis

副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis* HPs) 是一种多形态、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 依赖型、革兰氏阴性细小杆菌, 属于巴斯德杆菌科嗜血杆菌属。该菌可引起猪的格氏病, 临床上以多发性浆膜炎、关节炎、脑膜炎、肺炎为特征^[1]。该病已成为世界范围内引起保育仔猪死亡的一个重要因素, 且发病率和死亡率均呈显著上升趋势; 在我国该病也日渐流行, 造成的损失日趋严重。该菌曾被认为是猪

呼吸道的常在菌或条件性致病菌, 而现在却在临床健康猪群中流行, 且常与其他病原菌混合感染^[2]。Kelsie 等^[3]利用血清学方法已鉴定出该菌的 15 个血清型, 并对每个血清型的代表菌株进行腹腔途径感染 SPF 猪, 证实了不同血清型的毒力差异性, 例如血清 1、5、10、12 型为强毒力血清型, 而血清 6、7、9、11 型为非毒力血清型。但对于某些分离菌株用血清型鉴定方法无法定型, 且同一血清型的不同

收稿日期: 2010-10-25

基金项目: 国家科技支撑计划子课题 (2008BAD96B07); 广东省农业科技重点专项子课题 (2009A020101006); 广州市重大专项畜禽重要疫病新型疫苗的研制及产业化 (2009A1-E041)

作者简介: 宋 帅 (1982-) 男, 河南汝州人, 硕士, 主要从事兽医微生物学研究。

通讯作者: 李春玲 (1965-) 女, 河南长葛人, 研究员, 主要从事兽医微生物学研究。

分离菌株其毒力也存在差异性^[4]。

目前,对副猪嗜血杆菌毒力相关因子也有所报道,例如神经氨酸苷酶、转铁结合蛋白、菌毛、外膜蛋白等。但对于编码神经氨酸苷酶的基因了解的还很少,转铁结合蛋白和菌毛相关基因则存在于副猪嗜血杆菌大多数的菌株中^[5],另外对副猪嗜血杆菌外膜蛋白所引起的致病性还处于研究鉴定阶段,从而利用上述毒力相关基因来区分致病菌株和非致病菌株存在不足。为了进一步明确致病菌株和非致病性菌株的差异性,对致病菌株所特有的毒力相关基因的鉴定就显得尤为重要。研究发现,在副猪嗜血杆菌致病菌株基因组内,有段核苷酸序列所编码的蛋白与杜克雷嗜血杆菌溶血素修饰蛋白(hhdB)存在相似性,将这段核苷酸序列假定为副猪嗜血杆菌hhdB基因,该基因序列存在于大多数致病菌株中,而非致病菌株为阴性,可考虑作为区分致病菌株和非致病菌株的候选对象^[6]。但对副猪嗜血杆菌hhdB基因以及编码蛋白的生物学特性还不是很清楚。因此,笔者对临床发病猪中所分离的副猪嗜血杆菌菌株进行hhdB基因的鉴定和分析,为探讨该基因的生物学特性、致病菌株和非致病菌株的区别鉴定以及副猪嗜血杆菌致病机理的研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病料 从广东省不同地区发病猪场送检病猪中采集病料,发病猪只大多为保育阶段,临床表现为消瘦、被毛粗乱、腹式呼吸、卧行等。剖检病理变化为淋巴结肿大、肺实质性病变并与胸腔壁粘连,胸腹腔内有淡黄色积液等。采集部位包括心脏、肺脏、肝脏、脾脏、脑、扁桃体、腹股沟淋巴结、胸腹腔积液等样品。

1.1.2 主要试剂及培养基 限制性核酸内切酶、TaqDNA聚合酶、dNTPs、DNA Marker、DNA片段纯化试剂盒、随机六聚体引物、反转录酶AMV等购自Takara公司, RNeasy Mini kit购自Qiagen公司, TSA、TSB培养基购自美国BD公司,配制时加10%小牛血清和0.01% NAD, 脲酶、氧化酶、接触酶、吡啶、葡萄糖等试剂均购自杭州微生物试剂有限公司,其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.3 引物 副猪嗜血杆菌16S rRNA的引物设计参照Oliveira等^[7], 16S rRNA For 5'-GATGAG-GAAGGGTGGTGT3', 16S rRNA Back 5'-GGCT-TCGTCACCCCTCTGT3', 预期扩增片段大小为821 bp。副猪嗜血杆菌hhdB的引物设计参照Meike

等^[6], hhdB For 5'-ATCTTGCCCTGATTAGAGAG-TAGGAGT-3', hhdB Back 5'-GTGAATATAG CCCT-TATCCAAATAGGC-3', 预期扩增片段大小为557 bp。以上引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 病原菌分离培养 在无菌操作条件下从发病猪的心脏、肺脏、肝脏、脾脏、脑、扁桃体、腹股沟淋巴结、胸腹腔积液等病料中采样,分别划线接种于含有NAD的TSA平板上。置37℃, CO₂培养箱培养36~48 h,挑取副猪嗜血杆菌的可疑菌落进行纯培养和鉴定。

1.2.2 生化鉴定 挑取纯化的单个菌落接种于添加NAD的葡萄糖、半乳糖、果糖、蔗糖、核糖、脲酶、氧化酶、接触酶、吡啶等生化管中,置CO₂培养箱,37℃培养12~48 h,观察生化反应结果。

1.2.3 16S rRNA PCR鉴定 从TSA平板上挑取可疑菌落接种到TSB培养液中,置37℃摇床中振荡(160 r/min)培养12 h左右,对菌液进行16S rRNA PCR鉴定。其反应体系如下:10× PCR Buffer 2.5 μL, dNTPs 2.0 μL, 上游引物各1.0 μL, Taq酶0.5 μL, 菌液1.0 μL, 加双蒸水至25 μL体系。反应程序:95℃预变性5 min, 94℃变性45 s, 58℃复性40 s, 72℃延伸1 min, 共30个循环;72℃延伸10 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳观察。

1.2.4 卫星现象及溶血鉴定 将上述方法初步鉴定为副猪嗜血杆菌阳性的TSB培养液均匀涂布于无NAD的鲜血琼脂平板上,并将金黄色葡萄球菌做2条平行划线接种于平板中央,同时也将阳性菌的TSB培养液划线接种到含有NAD的鲜血琼脂平板上,置CO₂培养箱,37℃培养12~36 h,观察细菌生长情况。

1.2.5 hhdB基因的扩增 以副猪嗜血杆菌阳性的TSB培养液为模板,反应体系为:10× PCR Buffer 5 μL, dNTPs 4 μL, hhdB基因上、下游引物各1.0 μL, Taq酶0.5 μL, 菌液1.0 μL, 加双蒸馏水至50 μL体系。反应程序:95℃预变性5 min, 94℃变性45 s, 58℃复性45 s, 72℃延伸1 min, 共30个循环;72℃延伸10 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳观察。

1.2.6 hhdB基因的克隆 用DNA琼脂糖凝胶回收试剂盒回收hhdB基因的PCR目的片段,进行连接。连接反应体系为10 μL,依次加入PCR产物4.5 μL, pMD18-T载体0.5 μL, Ligation Solution 15 μL, 16℃连接4 h。取5 μL连接产物转化至制备好的基因工程菌DH5α感受态细胞,涂布于含氨苄青

霉素 1B琼脂平板上, 37℃培养 12~16 h后, 挑取白色单个菌落。以碱裂解法小剂量制备质粒, 并进行酶切和 PCR鉴定, 将初步鉴定为阳性的重组质粒送上海生工生物工程公司测序。

1.2.7 hhdB基因的序列分析 将所测得的副猪嗜血杆菌 hhdB基因在 NCB网站中作 BLAST比较分析, 同时应用 DNA Star Meg4.0等生物学软件对序列进行分析和绘制系统进化树, 分析探讨所分离菌株 hhdB基因与其他细菌相似序列的遗传进化关系。

1.2.8 RT-PCR鉴定 hhdB基因 将鉴定分离的副猪嗜血杆菌菌株接种到 TSB培养液中, 37℃摇菌培养至 OD₆₀₀ = 0.4 取 5 mL培养菌液参考 RNeasy Mini kit操作说明提取细菌中的总 RNA, 同时用 DNA酶做相应处理, 然后进行反转录。反转录体系为: 总 RNA 1 μg dNTPs2.0 μL 随机六聚体引物 1.0 μL 5×RT Buffer4 μL 反转录酶 0.5 μL RNA酶抑制剂 0.5 μL 加双蒸水至 20 μL体系。混匀后置于 42℃水浴 2.5 h 99℃水浴 5 min 冰浴冷却备用。以反转录的 cDNA为模板扩增 hhdB基因, 其反应体系和反应程序同上述方法中 hhdB基因的扩增, 同时从反转录的 cDNA中扩增 16S rRNA的特异性片段作为该体系的阳性对照, 以未经反转录的总

RNA作为该体系的阴性对照, 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳观察结果。

2 结果与分析

2.1 病料中副猪嗜血杆菌的分离和鉴定

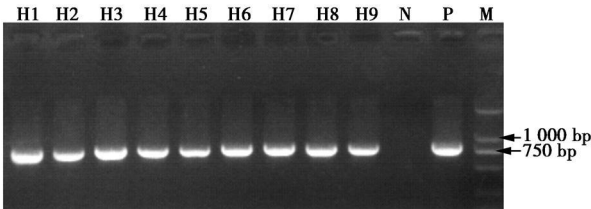
将采集的心脏、肺脏、脾脏、脑、胸腹腔积液等病料无菌划线接种 TSA平板上, 置 37℃培养箱培养 36~48 h 平板上出现了无色、透明、边缘整齐的小菌落, 涂片镜检可见革兰氏阴性的细小杆菌。挑取副猪嗜血杆菌可疑菌落接种到 TSB培养液中进行分离纯化培养, 结果表明, 从广东省不同地区发病猪场送检病猪中分离出 9株副猪嗜血杆菌可疑菌株(菌株编号为 H₁~H₉)。生化试验鉴定结果表明, 所分离的 9株菌株与副猪嗜血杆菌的生化特性相符(表 1)。用上述副猪嗜血杆菌 16S rRNA的特异性引物对分离菌株进行 PCR扩增, 结果表明所分离的 9株菌株均可扩增出与预期 821 bp大小相符的片段(图 1)。由此可知, 本试验所分离的 9株菌株为副猪嗜血杆菌阳性, 血清型鉴定结果显示所分离的菌株中有 7株(H₁~H₇)为 5型, 4型(菌株 H₈)和 12型(菌株 H₉)的各 1株。

表 1 分离菌株生化鉴定结果

Tab 1 Biochemical characteristics results of isolated strains

菌株 Strain	葡萄糖 Glucose	半乳糖 Galactose	果糖 Fructose	蔗糖 Sucrose	核糖 Ribose	脲酶 Urease	氧化酶 Oxydases	接触酶 Contact enzyme	吲哚 Indole
H1	+	+	+	+	—	—	—	+	—
H2	+	+	+	+	—	—	—	+	—
H3	+	+	+	+	—	—	—	+	—
H4	+	+	+	+	—	—	—	+	—
H5	+	+	+	+	—	—	—	+	—
H6	+	—	+	+	—	—	—	+	—
H7	+	+	+	+	—	—	—	+	—
H8	+	—	—	—	—	—	—	+	—
H9	+	+	+	+	—	—	—	+	—

注: H₁~H₉ 分离菌株; —, 阴性; +, 阳性。 Note: H₁~H₉ Isolated strains —, Negative +, Positive



H₁~H₉ 分离菌株; N 阴性对照; P 阳性对照; M DL-2000 DNA Marker; 下图同。
H₁~H₉ Isolated strains; N Negative control; P Positive control; M DL-2000 DNA Marker; The same below.

图 1 分离菌株 PCR 鉴定结果

Fig 1 PCR results of isolated strains

2.2 卫星现象及溶血鉴定结果

将分离鉴定的 9株副猪嗜血杆菌(H₁~H₉)分

别同金黄色葡萄球菌接种到无 NAD的鲜血琼脂平板上, 37℃培养 20 h左右后, 可观察到在距金黄色葡萄球菌越近菌落越大, 反之越小, 甚至不生长, 呈现卫星现象; 分离菌株接种到含有 NAD的鲜血琼脂平板上培养 20 h左右后, 在血平板上可见针尖大小、边缘整齐的非溶血菌落。由此可知所分离的菌株为 NAD依赖性、非溶血性细菌。

2.3 hhdB基因的扩增和克隆

将分离鉴定的 9株副猪嗜血杆菌(H₁~H₉)接种到 TSB培养液中, 用上述 hhdB基因的特异性引物从菌液中 PCR扩增得到约 557 bp的目的条带(图 2)。将凝胶纯化的 PCR扩增产物与 IMD18-T

载体 16℃连接 4 h后,转化 DH5α,挑取白色单个菌落制备质粒,经 PCR 酶切鉴定片段大小与预期结果相符。

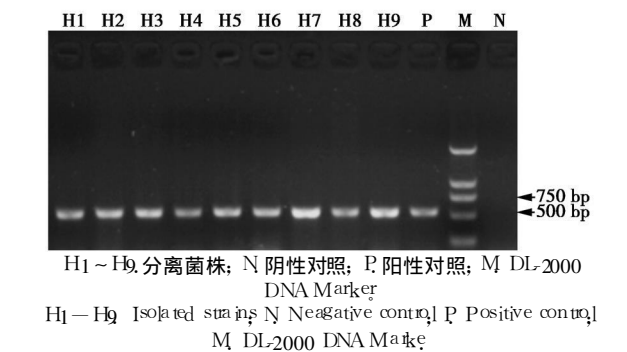


图 2 hhdB基因的 PCR 结果
Fig 2 PCR results of hhdB DNA

2.4 hhdB基因的序列分析

将所测得的 9株副猪嗜血杆菌(H₁~H₉) hhdB基因用 DNA Star软件做相应处理后,在 NCB 网站中做 BLAST核苷酸序列比较分析。结果显示所获得的序列与副猪嗜血杆菌 SH0165的 hhdB基因(登录号:CF001321)之间同源性为 99%,所测得的 9株副猪嗜血杆菌(H₁~H₉) hhdB基因之间同源性为 97.50%~99.8%(图 3),并与参考菌株 SH0165构成的遗传进化特性见图 4。同时对推导的氨基酸序列做 BLAST比较分析,其结果显示所获得的氨基酸序列与少数放线杆菌 hhdB序列(登录号:EER48112)之间同源性为 73%,与杜克雷嗜血杆菌 hhdB序列(登录号:AAP96147)之间同源性为 41%。

2.5 RT-PCR鉴定 hhdB基因

为了鉴定所分离菌株 hhdB基因的表达,将分离鉴定的副猪嗜血杆菌 5型 H₇菌株、4型 H₈菌株、12型 H₉菌株摇菌培养后提取总 RNA,经过反转录 PCR得到了相应的 hhdB基因(图 5),并对其他 6株分离菌(H₁~H₆)进行反转录 PCR也得到了相应的结果。

		Percent identity										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Divergence	1		98.7	98.9	99.8	98.6	98.7	98.6	98.9	98.7	1	H ₁
	2	0.4		97.8	98.6	99.8	97.7	99.8	98.0	97.7	2	H ₂
	3	0.2	0.2		98.7	97.7	99.8	97.7	98.2	99.8	3	H ₃
	4	0.2	0.5	0.4		98.4	98.6	98.4	98.7	98.6	4	H ₄
	5	0.5	0.2	0.4	0.7		97.5	99.6	97.8	97.5	5	H ₅
	6	0.4	0.4	0.2	0.5	0.5		97.5	98.2	99.6	6	H ₆
	7	0.5	0.2	0.4	0.7	0.4	0.5		97.8	97.5	7	H ₇
	8	1.1	1.1	0.9	1.3	1.3	0.9	1.3		98.0	8	H ₈
	9	0.4	0.4	0.2	0.5	0.5	0.4	0.5	1.1		9	H ₉
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		

图 3 分离菌株 hhdB基因序列同源性分析
Fig 3 Analysis on nucleotide similarity of hhdB from the isolated strains

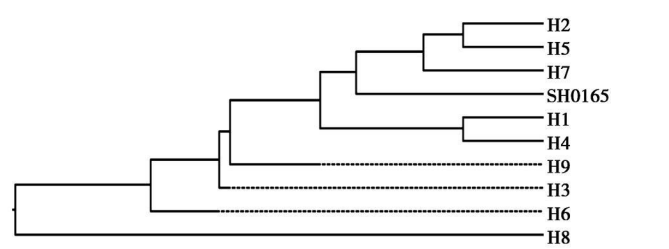


图 4 分离菌株与参考菌株 SH0165 hhdB基因的系统进化树
Fig 4 Phylogenetic tree constructed from hhdB gene of isolated and reference SH0165 strains

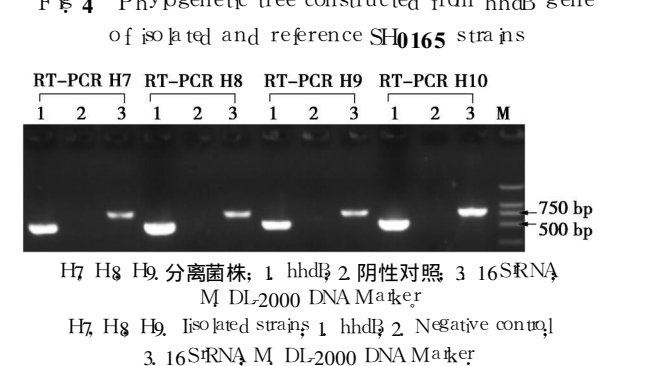


图 5 hhdB基因 RT-PCR鉴定结果
Fig 5 RT-PCR results of hhdB gene

3 讨论

溶血素作为细菌致病的重要毒力因子,在动物细菌性疾病的发病过程中起着不容忽视的作用。很多革兰氏阳性菌和阴性菌都产生溶血素,溶血素不同于其他通过哺乳动物靶细胞内化的毒素,而是作用于细胞膜,造成其结构和功能的紊乱,使大量细胞内的成分泄漏,导致细胞死亡。确切的说溶血素是穿孔毒素中的一部分,穿孔毒素又名攻膜毒,即跨细胞膜形成孔道的细菌蛋白毒素。穿孔毒素中有些不仅溶解红细胞,还损害其他多种类型的真核细胞,包括血小板、成纤维细胞、心肌细胞、单核细胞、粒细胞、内皮细胞等^[9]。此外,一些穿孔毒素是公认的毒力因子,可使细菌产生致病力。在杜克雷嗜血杆菌中,溶血素为 hhdA和 hhdB(参与了溶血素的分泌与修饰)编码,活性与沙雷菌的溶血素相同亦同源,具有细胞相关性,所作用的靶细胞有类上皮细胞、成纤维细胞、人包皮上皮细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞;其中 hhdB在相应的患者体内可产生免疫原性,但不具有毒性作用^[10]。另外某些病原菌不具有溶血特征,但存在有相应的溶血素激活蛋白,并在病原菌的致病过程中发挥一定的毒力作用。副猪嗜血杆菌是常规猪群上呼吸道的一种常在定居菌,在某些因素条件下,可突破黏膜屏障,从而引起严重的全身性感染^[11],对其发病机理以及相应的毒力因子鉴定还知之甚少。为了探讨副猪嗜血杆菌致病菌株的毒

力相关基因, Meike等^[6]利用代表性差异分析法对有毒菌株和无毒菌株进行了鉴定和分析, 发现 5 种毒力相关基因, 其中 hhdB 基因所推导的氨基酸序列与杜克雷嗜血杆菌 hhdB 具有一定的相似性, 但该基因是否是副猪嗜血杆菌毒力特征基因还不清楚。

为了明确 hhdB 基因在副猪嗜血杆菌不同菌株中的分布特征, 本研究从广东省不同地区发病猪场送检病猪中采集病料分离副猪嗜血杆菌。送检病猪呈现副猪嗜血杆菌全身性感染的特征, 解剖后可看到胸腔内心、肺粘连并有大量纤维性渗出物和淡黄色积液, 腹腔内也有大量纤维性渗出物和淡黄色积液, 腹股沟淋巴结肿大出血等症状。采集病料分离到 9 株细菌 (H₁ ~ H₉), 经形态观察、生化特性鉴定和 PCR 鉴定为副猪嗜血杆菌阳性。所分离的 9 株细菌中, 分别分离自从不同发病猪的脑 (H₃、H₇)、心 (H₅、H₆)、肺 (H₈)、脾 (H₄、H₉)、胸腹腔积液 (H₁、H₂), 经血清型鉴定为 4 型 (H₈)、5 型 (H₁ ~ H₇)、12 型 (H₉) 均属强毒力致病菌株。用副猪嗜血杆菌 hhdB 基因的特异性引物从所分离的 9 株细菌中均扩增到了相应的目的条带, 并将获得的序列在 NCB 网站中进行 BLAST 分析, 结果显示与参考菌株 SH0165 的 hhdB 基因具有较高的同源性, 说明所分离的菌株中均含有相应的 hhdB 基因序列。在副猪嗜血杆菌 15 个血清型中, 其血清型与该菌毒力的关系尚不完全清楚, 不同血清型之间甚至同一血清型的不同菌株的交叉保护性差别较大^[12], 从而用血清型判定其毒力差异存在一定的缺陷。由同源性比对及同源系统进化树可知, 所分离菌株的 hhdB 基因之间, 以及与 GenBank 中副猪嗜血杆菌 SH0165 的 hhdB 基因之间序列高度同源, 同源性均在 97% 以上, 同时发现 hhdB 基因在致病菌株中具有良好的保守性。相关资料报道 hhdB 基因在非致病菌株中为阴性, 由此可考虑将 hhdB 基因作为区分致病菌株和非致病菌株的候选对象, 来完善副猪嗜血杆菌致病菌株的鉴定方法。

根据获得的 hhdB 基因推导相应的氨基酸序列, 在 NCB 网站中进行 BLAST 分析, 与少数放线杆菌、杜克雷嗜血杆菌的溶血素激活蛋白具有一定的相似性。但所分离菌株在含有 NAD 的血平板上进行培养时并没有溶血现象, 与金黄色葡萄球菌培养时出现卫星现象, RT-PCR 扩增到了同样的目的条带。表明 hhdB 基因在菌体内得到了相应的表达, 但所发挥的生物学作用还有待进行研究。

参考文献:

- [1] Amano H, Shibata M, Kaji N, et al. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method [J]. *VetMed Sci* 1994; 56(4): 639—644
- [2] MacInnes J, Desrosiers R. Agents of the "swine diseases" of swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis* and *Streptococcus suis* [J]. *Can J Vet Res* 1999; 63(2): 83—89
- [3] Kelsie P, Rapp-Gabrielson V. J. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat stable antigen extracts [J]. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 862—865
- [4] Oliveira S, Pijon C. Computer based analysis of *Haemophilus parasuis* protein fingerprints [J]. *Can J Vet Res* 2004; 68: 71—75
- [5] Metcalf D, MacInnes J. J. Differential expression of *Haemophilus parasuis* genes in response to iron restriction and cerebrospinal fluid [J]. *Can J Vet Res* 2007; 71: 181—188
- [6] Meike S, Nina B. Identification of novel potential virulence associated factors in *Haemophilus parasuis* [J]. *Vet Microbiol* 2009; 136: 382—386
- [7] Oliveira S, Galina L, Pijon C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections [J]. *Vet Diagn Invest* 2001; 13(6): 495—501
- [8] Palmer K, L, Thomson A, C, Forney K, R, et al. Evaluation of an isogenic hemolysin deficient mutant in the human model of *Haemophilus ducreyi* infection [J]. *J Infect Dis* 1998; 178: 191—199
- [9] Du Toit S, M, Wood G, E, Totten P, A. Prevalence of antibody response to and immunity induced by *Haemophilus ducreyi* hemolysin [J]. *Infect Immun* 1999; 67: 3317—3328
- [10] Thrum R, E, Spinoja S, M. Transcription of candidate virulence genes of *Haemophilus ducreyi* during infection of human volunteers [J]. *Infect Immun* 2001; 69: 1483—1487
- [11] Smart N, L, Minajns O, P, MacInnes J. J. Analysis of *Haemophilus parasuis* isolates from southern Ontario swine by restriction endonuclease fingerprinting [J]. *Can J Vet Res* 1988; 52(9): 3192—324
- [12] Rapp-Gabrielson V, J, Gordon J, K, Jeffrey T, C, et al. *Haemophilus parasuis* immunity in swine after vaccination [J]. *VetMed* 1997; 92: 83—90