

文章编号: 1000-1573(2007)06-0077-05

猪附红细胞体特异性 PCR 检测方法的建立^①

王承民¹, 王建永², 何宏轩³, 刘丽艳¹, 谢红兵¹,
马金友¹, 陈金山¹, 赵月兰²

(1. 河南科技学院 动物科学学院, 河南 新乡 453003; 2. 河北农业大学 中兽医学院, 河北 定州 073000;
3. 中国科学院动物研究所国家野生动物疫病研究中心, 北京 100080)

摘要: 从猪血中分离附红细胞体, 提取其基因组 DNA, 用 *EcoRI* 对基因组 DNA 进行酶切, 将酶切片段进行琼脂糖电泳, 得到一个 1.8 kb 的 DNA 片段, 根据 DNA 序列分析与 GenBank 已知基因比较和 PCR 方法确定该片段具有特异性, 以该片段为模板进行 PCR, 并将其扩增产物与其它猪的其他细菌 DNA 扩增产物相比较, 建立一种检测猪外周血中附红细胞体的特异性 PCR 检测方法, 并通过斑点杂交试验检测该产物特异性, 通过临床应用检验该法的适用性。结果表明: 扩增产物大小为 782 bp, 其序列与已知附红细胞体序列同源率为 100%, 斑点杂交试验证实该产物为附红细胞体特异性产物, 将该方法应用于检测 10 头临床症状典型的感染猪和 10 头健康猪的血液, 所有感染和隐性带菌猪的 PCR 检测结果为阳性, 健康猪为阴性。猪外周血中附红细胞体的特异性 PCR 检测方法适用于检测无临床症状的隐性带菌动物。

关键词: 猪; 附红细胞体; PCR

中图分类号: S 852.2

文献标识码: A

A specific polymerase chain reaction assay for detection of *Eperythrozoon suis* in pigs

WANG Cheng-min¹, WANG Jian-yong², HE Hong-xuan³, LIU Li-yan¹, XIE Hong-Bing¹,
MA Jin-you¹, CHEN Jin-Shan¹, ZHAO Yue-lan²

(1. Department of Animal Science, Henan Institute of Science Technology, Xinxiang 453003, China;

2. College of Chinese Traditional Veterinary Science, Agricultural University of Hebei, Dingzhou 07300, China;

3. State Research Center for Wildlife Animal Disease Control,

Institute of Zoology in Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China)

Abstract: To develop a polymerase chain reaction(PCR) assay for the identification of *Eperythrozoon suis* infected and latent-stage pigs, a 1.8 kb *EcoRI* DNA fragment of the *E. suis* genome was isolated from the blood of pigs experimentally infected with *E. suis*. Specificity of the DNA fragment was confirmed by DNA sequence analysis and PCR using primers directed against sequences contained in the 1.8 kb fragment. The homologies of nucleotide sequence of *EcoRI* DNA fragment of the *Eperythrozoon suis* Xin Xiang strains with other strains on GenBank were 100%. PCR products were 782 bp in size and were amplified only from *E. suis* particles prepared from the blood of experimentally infected pigs but not from any controls, comprising blood from healthy piglets and a panel of bacteria including other porcine mycoplasmas. PCR results were confirmed by dot blot hybridisa-

① 收稿日期: 2007-01-01

作者简介: 王承民(1978-), 男, 河北承德县人, 博士, 讲师, 从事预防兽医学教学和研究工作。

通讯作者: 王建永(1964-), 男, 河北石家庄市人, 从事兽医学教学和科研工作。

tion. The applicability of the PCR assay to diagnose *E. suis* infections in pigs was evaluated by investigating blood samples from 10 symptomatic pigs with clinical signs typical of porcine eperythrozoonosis and blood samples from 10 healthy pigs. The *E. suis*-specific PCR product was amplified from all samples taken at episodes of acute disease as well as from samples taken during the latent stage of infection, thus demonstrating the suitability of the PCR assay for detecting latent infected carrier animals.

Key words: pigs; *Eperythrozoon suis*; PCR

附红细胞体病是由附红细胞体感染引起的以贫血、黄疸、发热等为主要临床特征的疾病,多数情况下呈隐性感染。附红细胞体附着在红细胞表面时,可改变红细胞膜结构,使红细胞形态发生改变,临床上常用直接镜检法检测血液变形的红细胞,但临床病例中有许多因素可引起红细胞变形,上述方法容易造成误诊。在免疫学方面,由于缺乏标准化的抗原,因此血清学诊断方法的应用也受到限制。有学者认为检查猪群的慢性感染附红细胞体的最佳方法是对去脾脏的猪进行急性刺激,并结合显微观察^[1],但是此方法不适合常规检测。分子生物学方法(如DNA杂交和PCR反应)的建立克服了诊断慢性病例中的低敏感性和显微镜下低检出率等问题^[2-7],但目前对附红细胞体基因组方面知之甚少,仅从16S rRNA基因中仅获得很少的核酸序列的数据,检测rRNA没有检测附红细胞体基因组的DNA准确性高,原因是从DNA到RNA存在着一定的变异。本研究参考国内外资料,试图从附红细胞体的基因组中找出一个特异的DNA序列,以此为基础建立快速、准确检测附红细胞体感染的PCR方法,以检测猪血液中附红细胞体(*Eperythrozoon suis*)。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 附红细胞体新乡株 从新乡市刘堤某猪场严重感染的急性病猪体内分离纯化得到附红细胞体,在电子显微镜下观察并鉴定,命名为附红细胞体新乡株^[8]。

1.1.2 附红细胞体阳性对照 采取10头具有明显临床症状的猪的血样,在显微镜下检测吡啶橙染色的血液涂片,发现有附红细胞体存在作为阳性对照。

1.1.3 附红细胞体阴性对照 取10头没有任何临床症状且血样检测没有发现附红细胞体的猪血样,作为阴性对照。收集病猪抗凝外周血样保存于Alsever溶液中,血样保存在-78℃备用。

1.1.4 试验对照菌株 似问号钩端螺旋体;肠沙

门氏菌;多杀性巴氏杆菌;溶血性曼氏杆菌;猪滑液霉形体;猪鼻霉形体;猪肺炎霉形体;流产亲衣原体;猪胸膜肺炎放线杆菌均为本实验室分离保存。

1.1.5 主要试剂 Alsever 溶液:111.0 mmol/L 葡萄糖,27.2 mmol/L 枸橼酸钠,71.8 mmol/L 氯化钠,pH 6.1; PBS:137.0 mmol/L NaCl,2.0 mmol/L KCl,13.5 mmol/L Na₂HPO₄,1.5 mmol/L KH₂PO₄,pH 7.4; 裂解缓冲液:100 mmol/L Tris,10.0 mmol/L EDTA,1.0 mol/L NaCl,pH 7.4; TE 缓冲液:10.0 mmol/L Tris,1.0 mmol/L EDTA,pH 8.0; PCR 缓冲液:60.0 mmol/L Tris-HCl,pH 10.0,7.5 mmol/L MgCl₂,15.0 mmol/L 磷酸铵; *EcoRI*;大肠杆菌 K12DH5a;碱性磷酸酶标记的抗地高辛配体的 Fab 片段、蛋白酶 K、Tag DNA 聚合酶、dNTP 均购于华美生物工程有限公司。

1.1.6 主要仪器 垂直振荡器(进口);高速台式低温离心机(进口,SIGMA);PCR 仪(美国进口);分光光度计(国产)。

1.2 方 法

1.2.1 附红细胞体的分离纯化 按照 Hall 等(1988)^[9]报道的方法对感染附红细胞体进行纯化。取200 mL 全血于200 mL 的 Alsever 抗凝溶液中,然后室温低速离心,300 r/min,15 min,去除血浆;然后用含有0.15% Tween-20 和3% EDTA 的100 mL PBS 重悬沉淀,并在室温下培养20 min,边孵育边小心震荡;然后室温低速离心,500 r/min,20 min,收集上清液,上清液在4℃高速离心,25 000 r/min,120 min。附红细胞体的沉淀用0.15 mol/L NaCl 重悬并保存在-20℃备用。其它血样按此方法处理。

1.2.2 DNA 的提取和纯化 常规方法提取DNA,取400 μL 附红细胞体悬液加45 μL 裂解缓冲液。然后分别加入蛋白酶 K 和 SDS 至终浓度为0.1 和1.0 mg/mL。然后样品在56℃孵育120 min 后,100℃加热10 min 灭活 Proteinase K,用同体积的酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)抽提DNA 3次,加入0.1 体积的3 mol/L 的醋酸钠和2 体积冰无水乙醇

沉淀 DNA, -70°C , 30 min, 然后 $15\ 000\ \text{r}/\text{min}$, 4°C 离心 30 min。用 70% 的乙醇洗涤 DNA 沉淀, 风干, 然后溶解在 $20\ \mu\text{L}$ TE 缓冲液中。用分光光度计 $260\ \text{nm}$ 进行 DNA 浓度测定。

1.2.3 PCR 反应血液样品的制备 $200\ \mu\text{L}$ 体积的抗凝血与同体积的裂解缓冲液混合, $8\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 60 s, 然后再用 $400\ \mu\text{L}$ 的裂解缓冲液重悬沉淀, 再离心, 重复一次后, 用 $400\ \mu\text{L}$ 的 PBS 重悬。DNA 的提取方法同 1.2.2 所述。

1.2.4 限制性内切酶酶切图谱分析 取 $5\sim 10\ \mu\text{g}$ DNA 样品用 $20\ \text{U}$ 的 *EcoRI* 酶切, 37°C 过夜, 反应混合物通过 0.8% 的琼脂糖 (含 $0.3\ \text{mg}$ 溴化乙锭) 凝胶电泳分析, 电泳结果在凝胶成像系统下观察附红细胞体的基因组条带。

1.2.5 DNA 克隆和测序 按上述方法检测到的 $1.8\ \text{kb}$ *EcoRI* 片段用 DNA 纯化试剂盒回收纯化, 并克隆到 pUC 质粒载体上。转化到大肠杆菌 K12 DH5a, 含有 $1.8\ \text{kb}$ *EcoRI* 片段的大肠杆菌克隆株 pES1.8 被筛选出并进行 DNA 测序分析。用质粒纯化试剂盒纯化质粒 DNA 并进行 DNA 测序。

1.2.6 PCR 反应引物设计及反应条件 根据附红细胞体 pES1.8 的片段基因序列用引物筛选软件设计 PCR 引物 (OLIGO Primer Analysis Software version 4.0): 上游引物 MSU1 ($5' - \text{GCATTGCCAGTCCCCAAGGA} - 3'$), 与下游引物 MSU2 ($5' - \text{TGCGGGGAGTACGTGGGAAGG} - 3'$), 分别与 pES1.8 片段的 25-45 及 787-807 位点相对应。PCR 反应条件: PCR 混合物接近 $20\ \mu\text{L}$, 包括 $4\ \mu\text{L}$ 的 PCR 缓冲液, dNTP 的浓度为 $200\ \mu\text{mol}/\text{L}$, $400\ \text{nmol}/\text{L}$ 的引物, $1\ \text{U}$ 的 T_{aq} DNA 聚合酶, 每份加入 $2\ \mu\text{L}$ 的 DNA 模板。30 个循环, 反应程序如下: $1\ \text{min}$, 94°C , $30\ \text{s}$, 60°C , $30\ \text{s}$, 72°C , 完成后延伸 $7\ \text{min}$, 72°C 。每份取 $5\ \mu\text{L}$ 反应产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 同时用 $100\ \text{bp}$ DNA 标准作参照。PCR 产物的克隆和测序方法同 1.2.5 中所述。

1.2.7 DNA 杂交印迹和斑点杂交印迹分析 分别用附红细胞体基因组的 *EcoRI* 的内切片段和 PCR 扩增的特异性产物作为 DNA 探针, 用地高辛配体-11-dUTP 标记该探针。DNA 探针的特异性可通过与无附红细胞体感染猪的 DNA 和一些感染猪的其它微生物的 DNA 进行杂交。按照已报道的方法^[9], 将含有 REA 和 PCR 的产物的琼脂糖凝胶转到尼龙膜上。对斑点杂交分析, DNA 在 100°C 变性 $5\ \text{min}$, 每 $2\ \mu\text{L}$ 为一份, 点到尼龙膜上, 然后再用 0.4

mol/L NaOH 洗涤固定 $15\ \text{min}$ 。所有的膜用 $2\times\ \text{SSC}$ 冲洗 $10\ \text{min}$, 然后在 $8\ \text{mL}$ 的杂交液中, 37°C 预杂交 $30\ \text{min}$, 然后 37°C 与探针 $1.8\ \text{EcoRI}$ 或探针 $782\ \text{PCR}$ 杂交 $10\ \text{h}$, 然后室温用 $2\times\ \text{SSC} - 0.1\% \text{SDS}$ 液洗涤 2 次, $5\ \text{min}$, 然后在 62°C 用 $0.1\times\ \text{SSC} - 0.1\ \text{SDS}$ 洗涤 2 次, $20\ \text{min}$ 。用标记有碱性磷酸酶的抗地高辛配体的 Fab 片段作免疫检测, 通过比色检测系统观察检测结果。

1.2.8 PCR 反应的敏感性确定 用分光光度计对质粒 pES1.8 提取的 DNA 和从感染猪外周血纯化的附红细胞体的 DNA 进行定量分析。质粒 DNA 和附红细胞体基因组 DNA 用 $0.15\ \text{mol}/\text{L}$ NaCl 进行 10 倍连续稀释, 其敏感性为出现特异性扩增产物的最高 DNA 稀释倍数。

1.2.9 PCR 特异性试验 用试验对照菌株 (似问号钩端螺旋体、肠沙门氏菌、多杀性巴氏杆菌、溶血性曼氏杆菌、猪滑液霉形体、猪鼻霉形体、猪肺炎霉形体、流产亲衣原体、猪胸膜肺炎放线杆菌) 与附红细胞体做交叉试验, 检测 PCR 方法的特异性。

1.2.10 扩大性试验 用此方法检测 10 例急性病猪的血样 DNA 和 10 头阴性对照猪的血样 DNA, 比较检测结果, 以验证 PCR 方法的实用性。

2 结果与分析

2.1 电子显微镜观察结果

在电子显微镜下观察到感染附红细胞体的红细胞发生变形, 呈车轮状或菠萝状, 红细胞上有许多虫体附着, 见图 1。



图 1 电镜下附红细胞体形态

Fig.1 Electron micrographs of *E. suis*

2.2 附红细胞体的 $1.8\ \text{kb}$ *EcoRI* DNA 酶切片段的鉴定

提取的附红细胞体试验组 DNA 的 *EcoRI* 消化片段都出现了 $1.8\ \text{kb}$ DNA 片段。总 DNA 的 *EcoRI* 消化片段和探针 $1.8\ \text{EcoRI}$ 进行 DNA 杂交, 印迹结果出现了阳性杂交信号。阳性对照的

pES1.8 质粒中也得到了这个片段(图 2),从而可以确定靶 DNA 序列与感染附红细胞体的血样具有相关性。

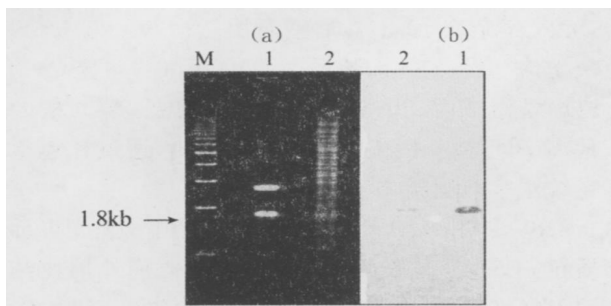


图 2 EcoRI 酶切片段的 DNA 杂交印迹结果
Fig. 2 Southern blot hybridisation of EcoRI- restricted *E. suis* DNA. Blots were probed with the DIG- labelled 1.8 kb DNA fragment of *E. suis* as probe

2.3 PCR 扩增及 DNA 测序结果
用自行设计的特异性引物 Primer MSU1/MSU2 对提取的 *E. suis* 模板样品进行 PCR 扩增,附红细胞体基因组 PCR 扩增出 782 bp 的 DNA 片段,与预期结果一致。用非感染健康猪血液 DNA 和临床上相关细菌的 DNA 分别作为模板进行 PCR 反应,其结果表明任何对照组都没有扩增出该 782 bp 片段,因此可以确定该片段只来源于附红细胞体,见图 3。扩增产物的 DNA 序列见图 4。分析表明其与附红细胞体 1.8 kb EcoRI 片段的引物限定部分 100% 吻合。与试验对照菌株做交叉试验,只能扩增出附红细胞体,说明本试验特异性强,结果见图 3。

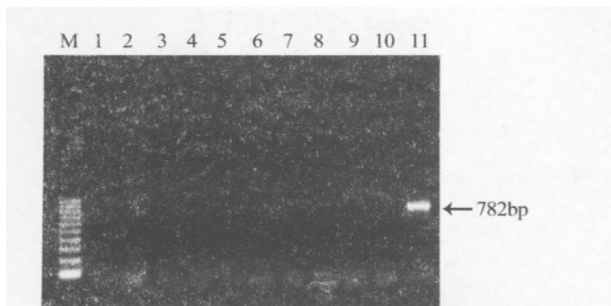


图 3 PCR 结果
Fig. 3 Specificity products of PCR

```

5'GCATTGCCAGTCCCAAGGA TACTGTCAACATTTTACTACTGTGCCAGAA ACCGG
CAGGTG AAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGGCTGGTGGCACCTCAGAGCCGTGTC
ATCACATGCACCTGTCTCTGGGTTCTATTATCCAGATATAGTGTACTACTGGTTCGCCAG
A CCTCCAGGA AAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGGTGGTGGAAAGCAGAC
CATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAC
TAGTTTTCTAA AATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATGTACTACTGTGCC
GAGAAAACCGGTATGGTAATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCCACCGTT
CATCCTCAGGTGGAGGCGGTTCA GGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATAAGACA
CAGAGCTCACTCAGTCTCCAGCTCCCTATCTGTATCTGTGGGAGACTGTCCACATCAG
AA TGTCGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTAATTTAGCATGGTGTGCTCAAGGTTG GCA
ATCAGCAGAAACAGGACCTCTCTCAGCTCCTGGTCTATGCTACAACTTAGCAGATG
GTAAGATTGGGAGTTAATGTC AACAGCCTGCATCAGTTGGGGTACTCAGTATTGGAT
CAGGCAACAGTATACTCTCTCTCA AGATCGAACACGTACACGTGAGGTTAAGAT
GGGCAGAGTGGTGGG AGCAGCTGGAGCTGATAACGGTGAAGATTGAGT
TCCGGGGAGTACGTGGGAAGG-3'

```

图 4 *Eperythrozoon suis* 基因序列
Fig. 4 Nucleotide sequence of *E. suis*

2.4 DNA 杂交印迹和斑点杂交印迹分析结果

从图 5 和图 6 的 DNA 杂交印迹和斑点杂交印迹试验结果表明,PCR 扩增产物只来源于附红细胞体。用 DIG- dUTP 随机标记 782 bp 的 PCR 扩增产物并与感染猪附红细胞体的血样 DNA、pES1.8 质粒 DNA、pES1.8 插入序列、782 bp 的 PCR 扩增产物、健康猪的 DNA 以及前面提到的一些微生物 DNA 进行杂交,感染附红细胞体的血样 DNA、质粒 DNA、pES1.8 插入序列出现杂交斑点,与 782 bp PCR 产物阳性对照结果一致,其他的样品都没有出现杂交斑点(图 6),靶 DNA 序列与附红细胞体在血液中出现具有相关性。

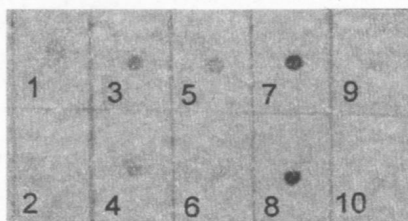


图 5 DIG 标记的 782 bp 片段探针与附红细胞体 DNA 杂交结果
1. 附红细胞体 DNA; 2. 非感染猪的 DNA; 3~ 5 附红细胞体 DNA; 6. 附红细胞体 DNAPCR 扩增产物; 7. pES1.8DNA; 8. pES1.8 质粒纯化的 1.8 kb 插入片段; 9. 阴性对照; 10. pUC18DNA

图 5 DIG 标记的 782 bp 片段探针与附红细胞体 DNA 杂交结果
Fig. 5 Dot blot hybridisation analysis with *E. suis* DNA preparations using the DIG- labelled 782bp amplicon of the *E. suis* PCR as probe

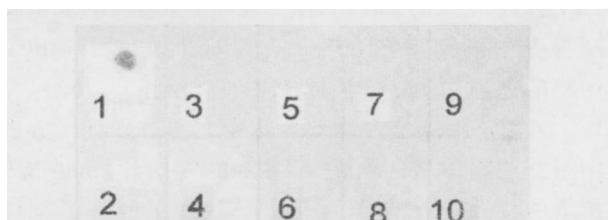


图 6 来源几种细菌的 DNA 杂交结果
1. 附红细胞体阳性对照; 2. 似问号钩端螺旋体; 3. 肠沙门氏菌; 4. 多杀性巴氏杆菌; 5. 溶血性曼氏杆菌; 6. 猪滑液霉形体; 7. 猪鼻霉形体; 8. 猪肺炎霉形体; 9. 流产亲衣原体; 10. 猪胸膜肺炎放线杆菌

图 6 来源几种细菌的 DNA 杂交结果
Fig. 6 Dot blot hybridisation analysis of specificity control using DNA from several bacteria using the DIG- labelled 782 bp amplicon of the *E. suis* PCR as probe

2.5 PCR 的敏感性的检测结果

检测到 0.15 mol/L NaCl 中含有 0.21 pg pES1.8 的质粒 DNA, 大约等同于 500 个附红细胞体的基因组当量。若从猪血中提取附红细胞体 DNA, 其敏感性可达到 210 pg (相当于 5000 个附红细胞体), 与国外报道的水平相当^[10]。

2.6 扩大性试验结果

用此方法从 10 例急性病猪中的 9 例血样中扩增出了特异性产物, 1 例阴性结果, 对此阴性结果的血样靶 DNA 进行 1: 10 和 1: 100 稀释后, 扩增出了特异性产物。对 10 例阴性结果猪的血样靶 DNA 进行 1: 10 后, 未扩增出了特异性产物。10 头无症状猪中有 1 头为阳性, 其余为阴性。临床应用验证了该 PCR 方法具有一定适用性。

3 讨论

目前附红细胞体在体外培养比较困难, 对其基因组进行分析需要从试验感染猪分离纯化病原体, 这个过程比较复杂, 对附红细胞体的基因组的了解目前还有限, Rikihisa 等^[11]报道了附红细胞体的 16S rRNA 基因的 1 436 bp 和 1 374 bp 两个片段。本研究纯化和分析了来自感染猪血样的 DNA, 通过限制酶切分析和 DNA 杂交分析, 从附红细胞体的 DNA 中纯化并鉴定出了一个 1.8 kb *EcoRI* 片段, 通过与数据库现有的其他细菌的 DNA 序列进行比较, 发现没有同源性。与猪的基因序列比较也无同源性, 表明这段序列来源于附红细胞体。为了进一步阐明 1.8 kb *EcoRI* 片段确实来源于附红细胞体, 根据 *EcoRI* 片段的数据设计用于扩增感染猪血样 DNA 的 PCR 引物进行 PCR 扩增, 对扩增产物进行 DNA 序列分析和斑点杂交印迹, 结果表明附红细胞体的 PCR 扩增产物与 1.8 kb 片段的引物限制部分相互补。通过对猪体内已知的重要细菌 DNA 和健康猪血样 DNA 的一系列研究验证了该 PCR 扩增产物的特异性。

为了评价该 PCR 诊断方法的适用性, 对附红细胞体感染猪和健康猪的血样进行检测, 从 10 例急性病猪检测出 9 例有 782 bp 扩增产物, 1 例 PCR 假阴性的出现可能是从严重感染病例的血样中提取附红细胞体的 DNA 存在抑制物质造成的, 对靶 DNA 进行 1: 10 和 1: 100 稀释后, 降低这种抑制作用, 因此出现阳性结果。本研究中所有对照样品都是阴性, 因此可以确认每组反应均没有被污染。10 头健康猪的 PCR 扩增结果有一头为阳性, 可能为隐性感

染。自然感染健康猪血样中发现附红细胞体 DNA, 试验对照菌株均为阴性结果, 表明所建立的 PCR 方法的特异性高, 其敏感性为每个反应检测到 500 个附红细胞体。

王妍等^[12]、张浩吉等^[13]、陈明等^[14]、杨鹏华等^[15]报道的建立的 PCR 诊断方法均是以 16SrRNA 为基础, 本试验建立的是以基因组 DNA 的酶切特异性片断为模板扩增目的基因。

本研究发现了一个附红细胞体特异性 DNA 片段, 这个片段与 Ludwig E 等^[10]报道的相一致, 附红细胞体特异性 DNA 片段将为附红细胞体的基因结构和生活史深入研究提供基础。

参考文献:

- [1] HEINRITZI K. A contribution on splenectomy in swine [J]. Tierarztl Prax, 1984, 12: 451- 454.
- [2] HENDERSON J P, O H A G A N J, H A W E S M, *et al.* Anaemia and low viability in piglets infected with *Eperythrozoon suis*[J]. Vet Rec, 1997, 40: 144- 146.
- [3] OBERST R D, HALL S M, SCHONEWEIS D A. Detection of *Eperythrozoon suis* DNA from swine blood by whole organism DNA hybridizations[J]. Vet Microbiol, 1990a, 24: 127- 134.
- [4] OBERST R D, HALL S M, JASSO R A, *et al.* Recombinant DNA probe detecting *Eperythrozoon suis* in swine blood[J]. Am J Vet Res, 1990b, 51: 1760- 1764.
- [5] GWALTNEY S M, WILLARD L H, OBERST R D. Detection of *Eperythrozoon suis* using the polymerase chain reaction[J]. J. Vet Diagn Invest, 1993a, 5: 40- 46.
- [6] GWALTNEY S M, WILLARD L H, OBERST R D. In situ hybridizations of *Eperythrozoon suis* visualized by electron microscopy[J]. Vet Microbiol, 1993b, 36: 99- 112.
- [7] MESSICK J B, COOPER S K, HUNTLEY M. Development and evaluation of a polymerase chain reaction assay using the 16S rRNA gene for detection of *Eperythrozoon suis* infection[J]. J. Vet Diagn Invest, 1999, 11: 229- 236.
- [8] 王承民, 马金友, 秦建华, 等. 猪附红细胞体病的病原形态学研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(14): 3317- 3318.
- [9] HALL S M, CIPRIANO J A, SCHONEWEIS D A, *et al.* Isolation of infective and non-infective *Eperythrozoon suis* bodies from the whole blood of infected swine [J]. Vet Rec, 1988, 123: 651. (下转第 85 页)

参考文献:

- [1] BODENSTEINER K J. Synchronisation of emergence of follicular waves in cow [J]. *Theriogenology*, 1996, 45: 1115- 1128.
- [2] ROBERTSON D M, FOULDS L M, FINDLAY J K, *et al.* Pituitary gonadotrophins in Booroola and control Merino sheep [J]. *Journal of Reproduction and fertility*, 1984, 71: 189- 197.
- [3] EVANS A C O, KOMAR C M, WANDJI S A, *et al.* Changes in androgen secretion and luteinizing hormone pulse amplitude are associated with the recruitment and growth of ovarian follicles during the luteal phase of the bovine estrous cycle [J]. *Biology of Reproduction*, 1997, 57: 394- 401.
- [4] 张英杰, 刘月琴, 储明星. 小尾寒羊高繁殖力和常年发情内分泌机理的研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2001, 32 (6): 510- 516.
- [5] CAHILL L P, MARIANNA J C, MUALEON P. Total follicular population in ewes of high and low ovulation rates [J]. *Journal of Reproduction and fertility*, 1979, 55: 27- 36.
- [6] DUFOUR J J, MATTON P. Identification of ovarian follicles at oestrus and development of their ensuing corpora lutea in single and multiple ovulating ewes on two feeding regimes [J]. *Canadian journal of Animal Science*, 1977, 57: 647- 652.
- [7] HARESIGN W. The influence of nutrition on reproduction in the ewe. 1. Effects on ovulation rate, follicle development and luteinizing hormone release [J]. *Animal Production*, 1981, 32: 197- 202.
- [8] BAIRD D T, MCNEILLY A S. Gonadotrophin control of follicular development and function during the oestrous cycle of the ewe [J]. *Journals of Reproduction and Fertility*, 1981, 30(Sup.): 119- 133.

(编辑: 李 川)

(上接第 81 页)

- [10] LUDWIG E, HOELZLE, DAGMAR ADEL T, *et al.* Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in porcine blood [J]. *Veterinary Microbiology*, 2003: 185- 196.
- [11] RIKIHISA Y, KAWAHARA M, WEN B, *et al.* Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *Eperythrozoon suis* [J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 823- 829.
- [12] 王妍, 张守发, 刘思国, 等. 猪附红细胞体 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国农业科学*, 2005, 38(10): 2153- 2156.
- [13] 张浩吉, 谢明权, 等. 猪附红细胞体 PCR 检测方法的建立和初步应用 [J]. *中国兽医学报*, 2005, 25(5): 480- 483.
- [14] 陈明, 黄维义, 张为宇, 等. 奶牛附红细胞体感染 PCR 诊断方法的建立 [J]. *中国畜牧兽医*, 2005, 32(4): 22- 23.
- [15] 杨鹏华, 秦建华, 赵月兰, 等. 羊附红细胞体病 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国兽医学报*, 2005, 25(4): 366- 367.

(编辑: 李 川)