

食品动物源沙门菌 *oqxAB* 基因的检测及水平传播机制研究

刘继¹, 宋立², 魏飞龙¹, 汤电¹, 张静远¹, 张小华¹, 李健¹, 蒋红霞¹

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广东 广州 510642; 2 中国兽药监察所, 北京 100081)

摘要: 为了调查食品动物源沙门菌 *Salmonella oqxAB* 耐药基因的流行情况和水平传播机制, 采用二倍琼脂稀释法测定临床分离的 31 株沙门菌对常用抗菌药物的敏感性, PCR 方法特异扩增耐药基因 *oqxAB*, 并对扩增产物克隆测序。通过接合转移试验验证 *oqxAB* 基因的水平传播。试验结果表明, 31 株沙门菌对氨基糖苷类的耐药率最高, 达 64.5%, 对氨基糖苷类、氯霉素类、四环素类、氟喹诺酮类的耐药率介于 42% ~ 55% 之间, 对头孢菌素类的耐药率最低, 约为 20%。31 株沙门菌中共检测到 12 株含有 *oqxAB* 基因, 检出率为 39%。以 J53Azi^R 为受体菌进行 *oqxAB* 基因阳性菌的质粒接合转移试验, 结果得到 5 株 *oqxAB* 基因接合子。接合子的药敏结果显示, 除了氟喹诺酮类药物的最低抑菌浓度 (MIC) 升高外, 对链霉素、四环素及氯霉素的耐药性也有不同程度的增加, 说明介导链霉素、四环素及氯霉素的耐药基因可能与 *oqxAB* 基因随质粒一起转移。

关键词: 沙门菌; *oqxAB* 基因; 最低抑菌浓度; 质粒; 接合

中图分类号: S859.79

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2011)04-0105-05

Detection and Dissemination of *oqxAB* Gene Among *Salmonella* Isolates from Food-Producing Animals

LIU Ji¹, SONG Li², WEI Fei-long¹, TANG Dian¹, ZHANG Jing-yuan¹, ZHANG Xiao-hua¹,
LI Jian¹, JIANG Hong-xia¹

(1 Guangdong Key Lab for Veterinary Drug Development and Safety Evaluation, College of Veterinary Medicine,
South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: Susceptibilities of total 31 *Salmonella* isolates were determined by agar dilution method. *oqxAB* gene was amplified among 31 *Salmonella* isolates using specific primers. PCR products were cloned into a vector pMD19-T for sequencing. Conjugation tests were conducted among *oqxAB* positive *Salmonella* using *Escherichia coli* J53Azi^R as a recipient. The susceptibilities of 31 *Salmonella* isolates for common use antimicrobials showed that the resistant occurrence for ampicillin was ranked the highest (64.5%), 42% – 55% for aminoglycosides, chloramphenicols, tetracyclines and fluoroquinolones, and less than 20% for cephalosporins. The occurrence of the *oqxAB* gene in 31 *Salmonella* isolates was found to be 39%. Five *oqxAB* positive conjugants were obtained from matching tests. The minimum inhibitory concentration (MIC) results of 5 transconjugants suggested that streptomycin, tetracycline, chloramphenicol and enrofloxacin resistant determinants were transferable with *oqxAB* gene on the same plasmid, which was in line with previous reports. Determinants indicated that β -lactams resistance was probably transferred with *oqxAB* on the same plasmid.

Key words: *Salmonella*; *oqxAB* gene; minimum inhibitory concentration; plasmid; conjugation

收稿日期: 2010-12-17

作者简介: 刘继 (1986—), 男, 硕士研究生; 通信作者: 蒋红霞 (1968—), 女, 副教授, 博士, E-mail: hxjiang@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30871890); 国家自然科学基金-广东省自然科学基金联合基金重点项目 (U0631006)

氟喹诺酮类药物是医学和兽医临床广泛使用的一类化学合成抗菌药,其中环丙沙星是首个用于临床,对革兰阴性菌有极强抗菌活性的药物. 恩诺沙星是该类药物中的第一个动物专用药物,在体内可代谢为环丙沙星. 随着氟喹诺酮类药物长期广泛用于兽医临床,肠道杆菌对这些药物的耐药性已经非常普遍,并且耐药性多以独立的、非克隆形式广泛传播. 过去普遍认为细菌对氟喹诺酮类药物产生耐药性的机制主要是药物作用靶位发生改变、细菌细胞膜外排泵表达增强及细胞膜通透性下降^[1]. 自从1998年首次发现了 *qnr* 基因——一个可随质粒水平转移的基因,其编码的 *Qnr* 蛋白可以保护 DNA 旋转酶免受氟喹诺酮药物的作用而使细菌产生耐药性,揭示了细菌也存在质粒介导的氟喹诺酮类药物耐药 (Plasmid-mediated quinolone resistance, PMQR) 机制^[1]. 目前发现质粒介导的氟喹诺酮类药物耐药决定基因有 *qnrA*、*qnrS*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD*、*aac* (6')-1b-cr、*qepA* 和 *oqxAB*, 其中 *qepA* 基因和 *oqxAB* 基因是近几年才发现的质粒介导的耐氟喹诺酮类外排泵转运蛋白编码基因. 丹麦科学家 Sørensen 等^[2] 2003 年从猪堆肥中分离的大肠埃希菌 *Escherichia coli* 中鉴定出一个可介导对兽医临床促生长剂喹乙醇耐药性的接合质粒. 该质粒上携带一个多药外排泵 *OqxAB*, 属于 RND 家族. *OqxAB* 在天然缺乏 *acrA* 基因的大肠埃希菌中特异表达,使萘啶酸和环丙沙星对大肠埃希菌的最低抑菌浓度 (MIC) 分别提高 8 倍和 16 倍. 目前质粒介导的 *OqxAB* 在人源大肠埃希菌中也检测到,同时在肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumoniae* 也发现位于染色体上的 *oqxAB* 基因^[2-7].

我国是动物源细菌耐药性最严重的国家之一,耐药性在动物、环境和人群间的扩散和传播已成为人们关注和研究的热点问题. 沙门菌 *Salmonella* 是重要的食源性人兽共患病原菌,其耐药性的扩散和传播对人类健康和公共卫生具有重要影响. 本研究对 2009 年从患病的猪、鸭、鹅分离的 31 株沙门菌进行耐药性分析,调查 *oqxAB* 基因在沙门菌的流行分布,并通过接合转移试验分析 *oqxAB* 基因水平传播机制,为动物源性沙门菌耐药风险评估及指导临床合理用药提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 沙门菌临床株的分离和鉴定

2009 年 10 月至 2010 年 2 月从佛山科技大学教学兽医院采集的患病动物或送检动物 (包括猪、鸭和鹅) 尸体的直肠拭子,每个动物只采集 1 个样品,分

离沙门菌. 具体步骤: 直肠拭子置于 SC 增菌液中, 37℃ 培养 12 ~ 16 h, 再用接种环蘸取培养过的增菌液在 SS 平皿上划线培养, 37℃ 培养 12 ~ 16 h. 挑取透明 (或者顶部有黑点) 的针尖状单菌落在 SS 平皿上连续传代纯培养, 直至菌落中无杂色. 革兰染色镜检确定无杂菌时, 纯培养物添加体积分数为 30% 的甘油, 置于 -20℃ 冰箱保存^[8].

纯培养物经生化鉴定和分子生物学鉴定^[9] (PCR 扩增 *invA* 基因) 后确定为沙门菌.

1.2 沙门菌血清型鉴定

各沙门菌纯培养物分别与沙门菌菌属诊断血清 O 多价、O 复合因子、H 多价因子血清做玻片凝集反应. 根据检测结果, 分别选用 O 单价及 H 单价血清做玻片凝集试验, 同时设立生理盐水为对照组.

1.3 主要试剂

rTaq 酶、DL2000 DNA marker、10 × Loading Buffer、pMD19-T 载体, 宝生物工程 (大连) 有限公司产品. SC 增菌液、SS 琼脂培养基、肠杆菌科细菌生化编码微量鉴定管, 均为杭州天和微生物试剂有限公司产品. 沙门菌属诊断血清, 北京陆桥技术责任有限公司产品; 琼脂糖, 英国 Difco 公司产品. 胰蛋白胨 (Tryptone)、酵母浸出物 (Yeast extract), 英国 Oxoid 公司产品.

1.4 临床分离沙门菌敏感性测定

沙门菌临床分离株敏感性测定按照美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 推荐的琼脂稀释法进行, 敏感性判定标准按照 CLSI 推荐的标准^[10]. 受试药物包括乙酰甲喹、喹乙醇、环丙沙星、恩诺沙星、左氧氟沙星、四环素、多西环素、氯霉素、氟苯尼考、氨苄西林、头孢噻吩、头孢噻肟、头孢他啶、头孢曲松、庆大霉素、卡那霉素、大观霉素、链霉素, 共 18 种药物. 沙门菌标准株 ATCCAB94008 为华南农业大学兽医学院药理实验室保存.

1.5 沙门菌 *invA* 基因和 *oqxAB* 基因的扩增

根据 GenBank 沙门菌种特异性 *invA* 基因序列 (登录号: NC_011294.1)^[9] 和沙门菌 *oqxA* 基因和 *oqxB* 基因序列 (登录号: GQ497565.1) 分别设计引物, 引物和 PCR 运行条件见表 1. 沙门菌总 DNA 采用热裂解法制备.

PCR 产物经 10 g/mL 琼脂糖凝胶电泳进行检测, PCR 产物直接送往上海英骏公司测序. 测序结果在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 进行 Blast 分析.

1.6 接合转移试验

接合转移试验以 *oqxAB* 基因阳性沙门菌作为供体菌, 大肠埃希菌 J53Azi^R 为受体菌. 按体积比 1:4

将供体菌和受体菌培养液混合,静置培养 4 h. 5 000 r/min离心 4 min,弃去上清,加 0.2 mL 的灭菌生理盐水做 10^{-1} 和 10^{-2} 的梯度稀释.取上述菌液 0.1 mL 涂布于适当质量浓度的氯霉素/喹乙醇的

MH 琼脂培养基上,培养 18~24 h.挑单菌落至 LB 肉汤震荡培养,PCR 扩增 *oqxAB* 基因进行鉴定,阳性者则为接合子.采用二倍琼脂稀释法测定接合子 MIC 值.

表 1 PCR 扩增所用引物序列、扩增片段长度及运行条件

Tab. 1 Sequences of specific primers used in PCR assay, size of amplicons and running conditions

引物名称	引物序列(5'→3')	扩增片段长度/ bp	PCR 运行条件
invA-F	GGTGATGGTCTGTGCGCC	283	(94 ℃,5 min) × 1 + { (94 ℃,45 s) (55 ℃,45 s) (72 ℃,1 min) } × 30 + (72 ℃,10 min) × 1
invA-R	GCTCGCCTTTGCTGGTT		
oqxA-F	AGTCCATACCAACCTCGTCTCC	529	(94 ℃,5 min) × 1 + { (94 ℃,30 s) (55 ℃,30 s) (72 ℃,30 s) } × 30 + (72 ℃,10 min) × 1
oqxA-R	GCGTGGCTTTGAACTCTGC		
oqxB-F	CATTGGCGGCGTGAAGA	637	(94 ℃,5 min) × 1 + { (94 ℃,30 s) (55 ℃,30 s) (72 ℃,30 s) } × 30 + (72 ℃,10 min) × 1
oqxB-R	CCTGATTATTGCGGGTGC		

2 结果

2.1 沙门菌血清型鉴定

共分离鉴定了 31 株沙门菌,其中猪源 9 株,鸭源 20 株,鹅源 2 株.31 株沙门菌血清型分别为印第安纳沙门菌 *S. indiana* 21 株,尼特拉沙门菌 *S. nitra* 4 株,巴吞鲁日沙门菌 *S. batonrouge* 2 株,另有海森歌沙门菌 *S. hisingen*、内夫腾巴赫沙门菌 *S. neftenbach*、堡垒沙门菌 *S. bergues*、坎特沙门菌 *S. charters* 各 1 株.

2.2 31 株临床分离沙门菌的抗菌药物敏感性测定

临床分离的沙门菌菌株对 18 种药物的耐药率和敏感率结果见表 2.从表 2 可以看出 31 株临床分离沙

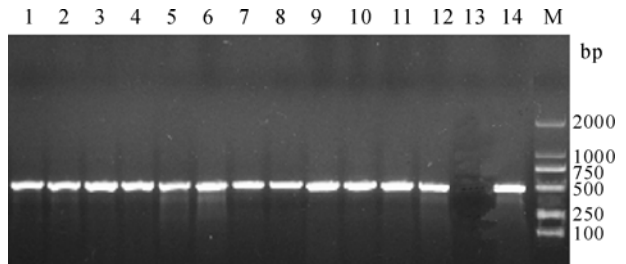
表 2 临床分离沙门菌对 18 种抗菌药物的敏感性测定结果
Tab. 2 Susceptibilities of *Salmonella* isolates to 18 antimicrobials

抗生素类别	抗菌药物	耐药率/%	中介率/%	敏感率/%
氨基糖苷类	链霉素	61.3	0	38.7
	庆大霉素	41.9	0	58.1
	卡那霉素	45.2	9.7	45.2
	大观霉素	45.2	3.2	51.6
β -内酰胺类	氨苄西林	64.5	0	35.5
	头孢曲松	19.4	0	80.6
	头孢噻呋	19.4	0	80.6
	头孢他啶	16.1	0	83.9
	头孢噻肟	19.4	0	80.6
四环素类	四环素	51.6	3.2	45.2
	多西环素	54.8	3.2	42.0
氯霉素类	氯霉素	51.6	6.5	42.0
	氟苯尼考	51.6	25.8	22.6
氟喹诺酮类	环丙沙星	45.2	0	54.8
	恩诺沙星	41.9	3.2	54.8
	左氧氟沙星	45.2	0	54.8
喹恶啉类	喹乙醇	38.7	0	61.3
	乙酰甲喹	38.7	0	61.3

门菌对所有受试药物都表现出不同程度的耐药,其中对氨苄西林的耐药率最高,为 64.5%,其次是链霉素,61.3%.对氨基糖苷类其他药物、氯霉素类、四环素类的耐药率为 42%~55%,对氟喹诺酮类药物的耐药率约 45%.对头孢类药物耐药率相对较低,约 20%;对喹乙醇和乙酰甲喹的耐药率为 38.7%.

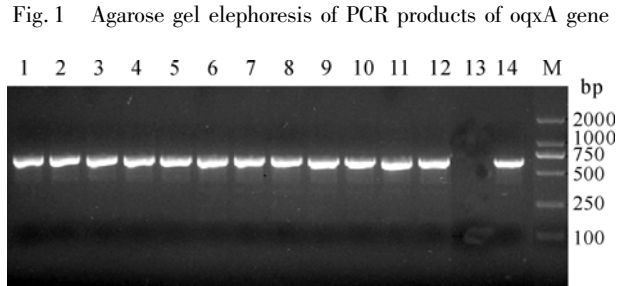
2.3 临床分离沙门菌 *oqxAB* 基因的扩增

各分离株用 *oqxAB* 基因特异性引物扩增,分别得到约 500 bp 和 >500 bp 的目的条带(图 1、2).经测序,共检测出 12 株沙门菌携带 *oqxAB* 基因.



M: DNA marker DL2000; 1~12 为 S31、S36、S38、S46、S47、S48、S49、S50、S56、S57、S58、S59; 13: 阴性对照; 14: 阳性对照.

图 1 *oqxA* 基因的 PCR 扩增图



M: DNA marker DL2000; 1~12 为 S31、S36、S38、S46、S47、S48、S49、S50、S56、S57、S58、S59; 13: 阴性对照; 14: 阳性对照.

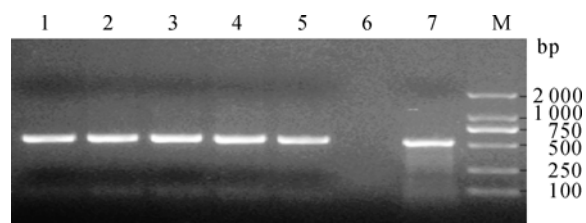
图 2 *oqxB* 基因的 PCR 扩增图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of *oqxB* gene

2.4 接合子的鉴定及 MIC 测定

将 12 株检测到 *oqxA* 基因和 *oqxB* 基因的沙门菌进行质粒接合转移试验,挑选疑似接合子的单菌落,用 *oqxA* 基因和 *oqxB* 基因的特异性引物

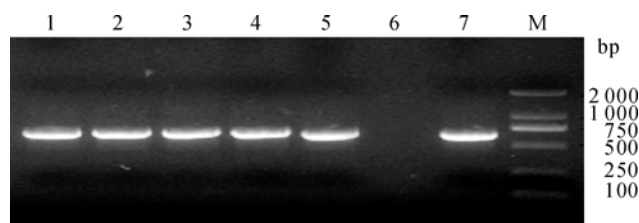
进行菌落 PCR 鉴定(图 3、4). 结果共获得 5 株 *oqxAB* 基因阳性接合子,接合成功率为 41.7%. 5 株 *oqxAB* 基因阳性接合子及原菌株敏感性测定结果见表 3.



M: DNA marker DL2000; 1~5: 挑取的疑似接合子; 6: 阴性对照; 7: 阳性对照.

图 3 疑似接合子的 *oqxA* 基因的 PCR 扩增图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products of *oqxA* gene from suspected transconjugants



M: DNA marker DL2000; 1~5: 挑取的疑似接合子; 6: 空白对照; 7: 阳性对照.

图 4 疑似接合子的 *oqxB* 基因的 PCR 扩增图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of PCR products of *oqxB* gene from suspected transconjugants

表 3 *oqxAB* 基因阳性接合子 MIC

Tab. 3 The MICs of *oqxAB* gene positive transconjugants

菌号	恩诺沙星	头孢他啶	头孢噻吩	头孢曲松	头孢噻肟	氨苄西林	链霉素	四环素	氯霉素	喹乙醇
31	64.000	64.000	256.000	256.000	256.000	>256	64	>64	>256	256
TC31	64.000	32.000	128.000	64.000	128.000	>256	32	>64	>256	256
46	0.500	0.063	<0.031	<0.031	0.063	>256	128	>64	64	128
TC46	0.031	0.031	<0.031	<0.031	0.031	>256	64	64	32	128
48	0.125	1.000	2.000	0.125	0.125	>256	32	>64	>256	256
TC48	0.125	0.250	1.000	0.063	0.063	>256	32	32	128	256
49	0.125	1.000	4.000	0.063	<0.031	>256	32	32	256	256
TC49	0.031	0.500	2.000	0.031	<0.031	>256	16	4	64	256
50	0.125	1.000	2.000	0.063	0.125	>256	32	>64	>256	256
TC50	0.125	0.125	0.500	0.031	0.031	>256	32	64	256	128

3 讨论与结论

沙门菌是重要的人畜共患病病原之一,也是重要的食源性污染病原菌,在发展和发达国家仍然易造成严重的公共卫生问题. 近年来食源性沙门菌的耐药性急剧上升,多重耐药菌株日益增多,耐药性可通过食物链传播给人,造成医院临床治疗的失败. 马孟根等^[10]调查了 30 株猪源致病性沙门菌的耐药状况,沙门菌对四环素、强力霉素、磺胺甲基异恶唑、复方新诺明、链霉素、卡那霉素和氯霉素耐药率分别为 83.3%、80%、80%、76.7%、60%、56.7% 和 56.7%. 王晓泉等^[11]调查了江苏部分地区食源性和人源沙门菌对 16 种抗生素的敏感性,结果 50.4% 的菌株对 5 种以上的抗生素耐药,部分菌株对头孢菌素类耐药. 本研究分离的 31 株沙门菌,对常用药物呈现中等程度的耐药,对重要抗生素(氟喹诺酮类药

物)的耐药率达 45% 左右,对头孢菌素的耐药率高于前人^[4]的研究报道,对喹乙醇的耐药率为 38.7%. 本研究 31 株沙门菌主要来自鸭(20 株),大多为多重耐药菌,与钟传德等^[12]对 175 株鸭源致病性沙门菌的耐药性调查所得结果相似.

喹乙醇除了具有抗菌作用外,还有蛋白同化作用,能提高饲料转化率,提高猪的增质量率,因此一直作为动物促生长剂而广泛应用于养猪业. 近年来抗生素作为动物促生长剂的用法也成为受争议的话题,欧盟国家已禁止抗生素作为促生长剂的应用. 丹麦学者 Sørensen 等^[2]在一次调查研究中发现在动物中存在对喹乙醇耐药的菌株,获得了具有高接合转移频率的耐药质粒,进而发现该质粒同时介导对喹乙醇和氨苄西林耐药,并一定程度上对氯霉素和呋喃妥因耐药. 对质粒进行酶切测序发现大肠埃希菌对喹乙醇耐药是由质粒上 *oqxAB* 基因编码的外排泵

(*OqxAB*)介导的。*OqxAB* 为多药外排泵,表达依赖于 TolC 外膜蛋白^[2-3,5]。编码 *OqxAB* 的质粒可较容易地水平传递到其他肠道病原菌,如沙门菌、肺炎克雷伯菌、克罗非菌 *Kluyver* sp. 和产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes*,接合子对喹乙醇、氯霉素和环丙沙星的敏感性降低^[6]。获得的携带 *OqxAB* 耐药质粒的菌株,除了介导对喹乙醇和乙酰甲喹耐药外,同时还表现出对氯霉素类、四环素类和氟喹诺酮类药物耐药,同时还介导对氨苄西林和氯霉素的连锁耐药^[2,5]。目前国内外只发现在大肠埃希菌中携带 *OqxAB* 的耐药质粒。本研究在沙门菌中检测到 *oqxAB* 基因,31 株沙门菌中有 12 株携带 *oqxAB* 基因,检出率为 39%。采用接合转移试验分析 *oqxAB* 基因阳性菌耐药基因是否发生水平转移,结果发现有 5 株沙门菌 *oqxAB* 基因随质粒发生转移。对 5 株 *oqxAB* 基因阳性接合子 MIC 测定结果显示,所有接合子都获得了原菌株对链霉素、四环素、氯霉素和喹乙醇等药物的耐药表型,说明介导这些药物的耐药基因可能随同 *oqxAB* 基因一起进行转移,这与前人^[2,7] 研究报道一致。另外在本试验中有 1 株同时对氟喹诺酮类和 β -内酰胺类耐药的菌株,其接合子也观察到对这两类药物的敏感性有所下降,这证实了多药外排泵 *OqxAB* 与氟喹诺酮类药物耐药性之间存在着必然联系^[11]。但是介导 β -内酰胺类药物的耐药基因是否也随 *oqxAB* 基因发生连锁转移,还需进一步研究证实。

本研究在沙门菌中检测出质粒源 *OqxAB* 外排泵编码基因。喹乙醇作为动物促生长剂广泛应用于动物生产养殖,在喹乙醇选择压力下筛选的耐药菌株,其耐药基因 *oqxAB* 可随质粒发生转移,甚至可能与介导四环素、氯霉素、氟喹诺酮类以及 β -内酰胺类药物的耐药基因发生连锁转移。沙门菌作为重要的食源性污染菌,耐药质粒随之传播将对人类健康造成严重威胁,提示动物养殖过程中要慎用喹乙醇类抗生素促生长剂。

参考文献:

- [1] STRAHILEVITZ J, JACOBY G A, HOOPER D C, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2009, 22(4): 664-689.
- [2] SØRENSEN A H, HANSEN L H, JOHANNESSEN E, et al. Conjugative plasmid conferring resistance to olaquinox [J]. *Antimicrob Agent Chemother*, 2003, 47: 798-799.
- [3] NORMAN A, HANSEN L H, SHE Qun-xin, et al. Nucleotide sequence of pOLA52 A conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enable biofilm formation and multidrug efflux[J]. *Plasmid*, 2008, 60(1): 59-74.
- [4] HANSEN L H, SØRENSEN S J, JØRGENSEN H S, et al. The prevalence of the *OqxAB* multidrug efflux pump amongst olaquinox-resistant *Escherichia coli* in pigs [J]. *Microb Drug Resist*, 2005, 11: 378-382.
- [5] KIM H B, WANG Ming-hua, PARK C H, et al. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolate of *Enterobacteriaceae* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(8): 3528-3584.
- [6] HANSEN L H, JENSEN L B, SØRENSEN H I, et al. Substrate specificity of the *OqxAB* multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007, 60(1): 145-147.
- [7] HANSEN L H, JOHANNESSEN E, BURMØLLE M, et al. Plasmid-encode multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(9): 3332-3337.
- [8] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 中国科学院微生物研究所翻译组译. 北京: 科学出版社, 2004: 392-442.
- [9] 陈金顶, 索青利, 廖明, 等. 沙门菌的 *invA* 基因序列分析与分子检测[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2004, 20(10): 868-871.
- [10] 马孟根, 王红宁, 余勇, 等. 猪源致病性沙门菌耐药基因的分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(1): 65-70.
- [11] 王晓泉, 焦新安, 刘晓文, 等. 江苏部分地区食源性和人源沙门菌的多重耐药性研究[J]. *微生物学报*, 2007, 47(2): 221-227.
- [12] 钟传德, 程安春, 汪铭书, 等. 规模化鸭场鸭源致病性沙门菌的药物敏感性检测及耐药性分析[J]. *中国兽医杂志*, 2008, 44(1): 35-37.

【责任编辑 柴 焰】