

## 猪鼻腔棉拭子中胸膜肺炎放线杆菌检测与分离方法的优化

孙 裴, 施 雷, 魏建忠, 耿照玉, 殷宗俊, 顾秋成, 王海洋, 李好磊, 郭志英, 李 郁\*

(安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

**摘 要:** 为提高 APP 亚临床感染的核酸检出率和细菌分离率, 通过检测 3 种 PCR 的敏感性和特异性, 运用 3 种 PCR 方法分别检测母猪鼻腔棉拭子中 APP 核酸; 并同时使用 4 种选择性培养基分离母猪鼻腔棉拭子中 APP。结果显示, 3 种 PCR 的最低检测限度均为  $10^2$  CFU, 且除 APP 外与其他细菌不发生反应; dsbE-PCR 方法的 App 核酸检出率 (23.7%) 显著高于 omlA-PCR (8.1%) 和 ApxIVA-PCR (14.8%), 三者符合率较高, 分别为 84.4% (dsbE/omlA-PCR)、91.1%(dsbE/ApxIVA-PCR)和 93.3%(omlA/ApxIVA-PCR); mPPLO 的 APP 分离率 (11.9%) 显著高于 TSA (0.7%)、CA (5.2%) 和 BA (2.2%), 四者符合率较高, 分别为 88.9%(mPPLO/TSA)、93.3%(mPPLO/CA)、90.37%(mPPLO/BA)、95.6% (TSA/CA)、98.5%(TSA/BA)和 97.0%(CA/BA); dsbE-PCR 检测结果与 mPPLO 分离结果的符合率较高 (88.1%)。说明 dsbE-PCR 和 mPPLO 的检测分离效率最高, 可综合 2 种方法, 完善 APP 检测分离操作程序, 为 APP 亚临床感染的诊断和治疗以及疫苗免疫提供科学依据。

**关键词:** 胸膜肺炎放线杆菌; PCR; 选择性培养基; 优化

中图分类号: S855.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)05-0706-05

### Optimization of the detection and isolation method for *Actinobacillus pleuropneumonia* in swine nasal swab sample

SUN Pei, SHI Lei, WEI Jianzhong, GENG Zhaoyu, YIN Zongjun,

GU Qiucheng, WANG Haiyang, LI Haolei, GUO Zhiying, LI Yu

(School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** In order to improve the nucleic acid detection rate and bacterial isolation rate of APP subclinical infection, the sensitivity and specificity of three PCR methods used to detect APP nucleic acid nasal swab in sows were evaluated. The result of bacteria isolation using four selective media was also investigated. The results showed that the minimum detection limit using three PCR methods was  $10^2$  CFU, and it had no nonspecific amplification with other bacteria. The nucleic acid detection rate of dsbE-PCR method (23.7%) was significantly higher than that of omlA-PCR (8.1%) and ApxIVA-PCR (14.8%), and the coincidence rates were 84.4% (dsbE/omlA-PCR), 91.1% (dsbE/ApxIVA-PCR) 93.3% (omlA/ApxIVA-PCR). The APP isolation rate of mPPLO (11.9%) was significantly higher than that of TSA (0.7%), CA (5.2%) and BA (2.2%), and the coincidence rates were 88.9% (mPPLO/TSA), 93.3% (mPPLO/CA), 90.37% (mPPLO/BA), 95.6% (TSA/CA), 98.5% (TSA/BA) and 97.0% (CA/BA). The coincidence rates of the detection results of dsbE-PCR and mPPLO were relatively high (88.1%). It indicated that DsbE-PCR and mPPLO methods have high separation efficiency, which can be used together to improve APP detection and separation procedures, and provide scientific basis for diagnosis and treatment of subclinical infection of APP.

**Key words:** *Actinobacillus pleuropneumonia*; PCR; selective medium; optimization

胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP) 是猪传染性胸膜肺炎 (Porcine contagious pleuropneumonia) 的病原。急性 PCP 特点是出

血性坏死性肺炎和纤维素性胸膜炎, 具有较高发病率和死亡率。慢性 PCP 会导致体重增加速度减慢, 降低饲料转化率并延长上市时间<sup>[1]</sup>。1990 年杨旭夫

收稿日期: 2015-04-10

基金项目: 安徽省畜禽产业共性技术研究院、现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-36-生猪)和安徽省生猪产业技术体系资金项目共同资助。

作者简介: 孙 裴, 博士, 副教授。E-mail: sunpei1979@126.com

\* 通信作者: 李 郁, 教授。E-mail: liyouer@163.com

等<sup>[2]</sup>证实该病在我国的存在,是引起猪呼吸道疾病综合征的主要原因之一,给我国养猪业造成巨大的经济损失<sup>[3]</sup>。

检测 APP 亚临床感染猪难度大,ELISA 方法和补体结合试验并不总是能够检测到亚临床感染的猪只。此外,检测 APP 抗体只是该病的间接诊断方法,只有检测并分离到 APP 才能最终确诊该病<sup>[4]</sup>。Jacobsen 等<sup>[5]</sup>报道用选择性培养基在人工感染 APP 的猪鼻腔和扁桃体中分离到了该菌,而鼻腔和扁桃体中其他微生物较多,因此加大了 APP 分离难度。

本研究通过运用不同 PCR 方法检测鼻腔棉拭子样品中的 APP 核酸,比较分析其特异性、敏感性及核酸 APP 阳性检出率,选择更加有效的 APP 核酸检测手段;同时,运用不同选择性培养基分离鼻腔棉拭子样品中 APP,比较分析其分离效率,筛选更加高效的分离培养方法,从而完善 APP 检测分离操作程序,为 APP 亚临床感染的诊断和 PCP 的监测提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株** APP 参考菌株 1 株,金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 1 株,大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 1 株,猪链球菌 (*Streptococcus suis*) 2 株,猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella suispestifer*) 2 株,猪红斑丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) 2 株,副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*) 2 株,多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*) 2 株,以上菌株由安徽农业大学动物科技学院动物传染病研究室保存。

**1.1.2 试剂** 洁霉素、杆菌肽和制真霉素购自上海 Aladdin 试剂有限公司;PPLO 琼脂、胰大豆蛋白胨琼脂购自美国 BD 公司;酵母提取物、胰蛋白胨、琼脂、葡萄糖购自英国 OXOID 公司;无菌小牛血清、无菌绵羊血购自北京平睿生物科技有限公司;2×Taq MasterMix、DNA Marker DL 600 和 NAD 购自北京天根生化科技有限公司。

**1.1.3 引物设计及合成** 分别参照[6-8]设计引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列如下:

omlAF 5'-AAGGTTGATATGTCCGCAC C-3'  
omlAR 5'-CACCGATTACGCCTTGCCA-3'  
ApxIVAF 5'-TGGCACTGACGGTGATGA-3'  
ApxIVAR 5'-GGCCATCGACTCAACCAT-3'  
dsbEF 5'-GATAAACCTTTTCCGGAATT-3'  
dsbER 5'-TACCACACCGTGTATTATCAA-3'

3 种 PCR 扩增的目的条带分别为 950、422 和 342 bp。

**1.1.4 鼻腔棉拭子** 无菌采集母猪群鼻腔棉拭子共 135 份,鼻腔棉拭子样品保存在添加洁霉素 (1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、杆菌肽 (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、制真霉素 (50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、NAD(100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、无菌小牛血清 (5%) 的 TSB 肉汤内,4℃ 保存,24 h 内送至实验室进行处理。

### 1.2 方法

**1.2.1 培养基的制备** 改良 PPLO 琼脂培养基 (mPPLO): 称取 PPLO 琼脂 34.0 g,葡萄糖 1.0 g,酵母提取物 10 g,蒸馏水 1000 mL,115℃ 高压灭菌 20 min。

胰大豆蛋白胨琼脂 (TSA): 按照说明书配制。

巧克力琼脂培养基 (CA): 在 TSA 的基础上添加无菌绵羊血,添加时培养基温度控制在 80℃ 左右,并保持 10 min。

血琼脂培养基 (BA): 在 TSA 的基础上添加无菌绵羊血,添加时培养基温度控制在 45~50℃。以上培养基冷却至 45~50℃ 时添加洁霉素 (1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、杆菌肽 (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、制真霉素 (50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、NAD(100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 以及无菌小牛血清 (5%),抗生素及 NAD 需过滤除菌且现配现用,上述培养基保存在 4℃,7 d 内用完。

**1.2.2 3 种 PCR 方法敏感性比较** 培养并 10 倍梯度稀释 APP 参考菌株至  $10^1\sim 10^8$  CFU,煮沸法提取 DNA,分别进行不同 PCR 方法扩增。

**1.2.3 3 种 PCR 方法特异性比较** 分别培养并稀释 APP 参考菌株以及其他菌株至  $10^8$  CFU,煮沸法提取 DNA,分别进行不同 PCR 方法扩增。

**1.2.4 3 种 PCR 方法检测鼻腔棉拭子中 APP 核酸 DNA 提取:** 将浸有母猪鼻腔棉拭子的 TSB 肉汤放入摇床,37℃ 200 r·min<sup>-1</sup> 培养 2 h,取 500  $\mu\text{L}$  上述细菌混合培养物提取细菌 DNA,具体操作为 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后弃上清,用 50  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 重悬,反复冻融 3 次,12000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后取上清即可。

PCR 扩增体系: 3 种 PCR 均为 25  $\mu\text{L}$ ,包括 12.5  $\mu\text{L}$  2×Taq MasterMix,1  $\mu\text{L}$  上游引物,1  $\mu\text{L}$  下游引物,5  $\mu\text{L}$  DNA 模板,5.5  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。

dsbE-PCR 扩增条件: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 45 s,57℃ 退火 2 min,72℃ 延伸 1 min,共 3 个循环; 95℃ 变性 20 s,57℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,共 30 个循环; 72℃ 再延伸 10 min。

omlA-PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 50 s,63℃ 退火 50 s,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

ApxIVA-PCR 扩增条件: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 50 s, 60℃退火 50 s, 72℃延伸 1 min, 共 35 个循环; 72℃延伸 10 min。

**1.2.5** 4 种选择性培养基分离鼻腔棉拭子中 APP 用接种环蘸取上述母猪鼻腔棉拭子细菌混合培养物 4~6 环, 接种到 4 种选择性培养基中, 5% CO<sub>2</sub> 37℃培养 24~36 h 后, 挑取表面光滑、灰白色透明的菌落接种到血平板中, 选取 CAMP 反应为阳性的为 APP 可疑菌落, 并运用 dsbE-PCR 方法最终确诊。

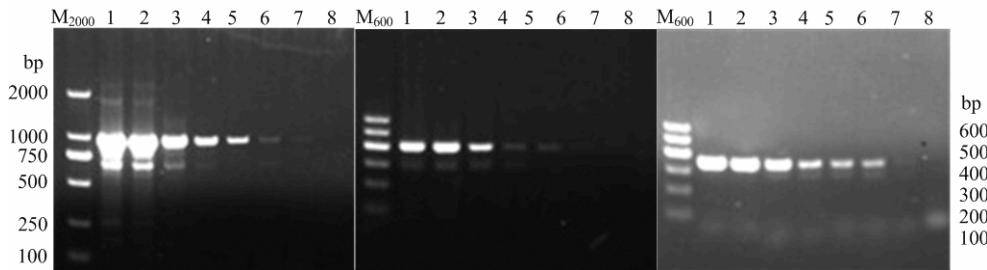
## 2 结果与分析

### 2.1 3 种 PCR 方法敏感性比较结果

敏感性试验结果显示, 3 种 PCR 最低检测极限均为 10<sup>2</sup> CFU, 见图 1。

### 2.2 3 种 PCR 方法特异性比较结果

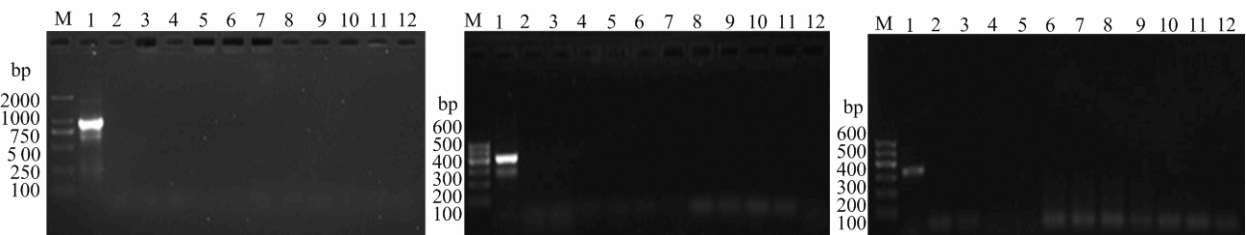
特异性试验结果显示, 3 种 PCR 均能对 APP 核酸扩增扩增出特异性条带, 与本试验中其他细菌核酸不反应, 见图 2。



1~8. 为 10<sup>8</sup>~10<sup>1</sup> CFU APP 样品 1-8. For 10<sup>8</sup>-10<sup>1</sup> CFU APP samples

图 1 omlA-PCR, ApxIVA-PCR 和 dsbE-PCR 敏感性试验结果

Figure 1 Sensitivity test results of omlA - PCR, ApxIVA-PCR and dsbE-PCR



1. 胸膜炎肺炎放线杆菌; 2. 金黄色葡萄球菌; 3. 大肠杆菌; 4. 猪链球菌; 5、6. 猪霍乱沙门氏菌; 7、8. 猪红斑丹毒丝菌; 9、10. 副猪嗜血杆菌; 11、12. 多杀性巴斯德菌

1. APP; 2. *Staphylococcus aureus*; 3. *Escherichia coli*; 4. *Streptococcus suis*; 5 and 6. *Salmonella suis*; 7 and 8. *Erysipelothrix rhusiopathiae*; 9 and 10. *Haemophilus parasuis*; 11 and 12. *Pasteurella multocida*

图 2 omlA-PCR, ApxIVA-PCR 和 dsbE-PCR 特异性试验结果

Figure 2 Specificity test results of OmlA - PCR, ApxIVA-PCR and dsbE-PCR

表 1 3 种 PCR 方法检测母猪鼻腔棉拭子中 APP 核酸结果

Table 1 Detection of APP nucleic acid in nasal swab using three PCR methods

PCR 方法 PCR method	样品总数 Total number of samples	APP 核酸阳性样品数 Number of APP nucleic acid positive samples	APP 核酸阳性检出率/% Detection rate of positive APP nucleic acid
dsbE-PCR	135	32	23.7 <sup>a</sup>
omlA-PCR	135	11	8.1 <sup>b</sup>
ApxIVA-PCR	135	20	14.8 <sup>c</sup>

注: 同列数据后所标字母相异表示差异显著( $P < 0.05$ ), 无字母表示差异不显著( $P > 0.05$ )。下同。

Note: The data with different letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ); the data with no letter in the same column indicate no significant difference ( $P > 0.05$ ). The same below.

表 2 3 种 PCR 方法检测结果符合率

Table 2 Coincidence rates of PCR detection using three PCR methods

符合率 Coincidence rate	dsbE-PCR	omlA-PCR	ApxIVA-PCR
dsbE-PCR	\	84.4% (114/135)	91.1% (123/135)
omlA-PCR	84.4% (114/135)	\	93.3% (126/135)
ApxIVA-PCR	91.1% (123/135)	93.3% (126/135)	\

### 2.3 3种PCR方法检测鼻腔棉拭子中APP核酸结果

用3种PCR方法检测相同鼻腔棉拭子中的APP核酸。结果显示, dsbE-PCR方法核酸阳性检出率最高(23.7%)、与omlA-PCR(8.1%)和ApxIVA-PCR(14.8%)差异显著, 见表1。3种PCR的符合率为: dsbE-PCR与omlA-PCR为84.4%, dsbE-PCR与ApxIVA-PCR为91.1%, omlA-PCR与ApxIVA-PCR为93.3%。见表2。

### 2.4 4种选择性培养基分离鼻腔棉拭子中APP结果

用4种选择性培养基分离相同鼻腔棉拭子中APP, 结果显示, mPPLO分离率最高(11.9%), 与TSA(0.7%)、CA(5.2%)及BA(2.2%)差异显著, 见表3。4种选择性培养基的符合率为: mPPLO与TSA为88.9%, mPPLO与CA为93.3%, mPPLO与BA为90.37%, TSA与CA为95.6%, TSA与BA为98.5%, CA与BA为97.0%。见表4。

表3 4种选择性培养基分离鼻腔棉拭子中APP结果

Table 3 Four kinds of selective mediums for isolation of APP in the nasal swab

培养基 Medium	样品总数 Total number of samples	APP阳性样品数 Number of APP positive samples	APP分离率/% Isolation rate of APP
mPPLO	135	16	11.9 <sup>a</sup>
TSA	135	1	0.7 <sup>b</sup>
CA	135	7	5.2 <sup>c</sup>
BA	135	3	2.2 <sup>b</sup>

表4 4种选择性培养基分离结果符合率

Table 4 Coincidence rates of separation results using four kinds of selective mediums

符合率/% Coincidence rate	mPPLO	TSA	CA	BA
mPPLO	\	88.9% (120/135)	93.3% (126/135)	90.37% (122/135)
TSA	88.9% (120/135)	\	95.6% (129/135)	98.5% (133/135)
CA	93.3% (126/135)	95.6% (129/135)	\	97.0% (131/135)
BA	90.37% (122/135)	98.5% (133/135)	97.0% (131/135)	\

表5 dsbE-PCR检测结果与mPPLO分离结果的符合率

Table 5 Coincidence rates of dsbE-PCR detection and mPPLO isolation

样品 Sample	mPPLO阳性样品数 Positive number of mPPLO	mPPLO阴性样品数 Negative number of mPPLO	合计 Total
dsbE-PCR阳性样品数 Positive number of dsbE-PCR	16	16	32
dsbE-PCR阴性样品数 Negative number of dsbE-PCR	0	103	103
合计 Total	16	119	135

### 2.5 dsbE-PCR检测结果与mPPLO分离结果符合度

比较dsbE-PCR检测鼻腔棉拭子中APP核酸的结果和mPPLO分离鼻腔棉拭子中APP的结果, 两者符合率为88.1% (119/135), 具体见表5。

## 3 讨论

APP可长期存在感染猪的鼻腔、扁桃体和肺脏中, 当猪只免疫力下降时发病, 引起急性出血性纤维素性胸膜肺炎和慢性纤维素性坏死性胸膜肺炎<sup>[9]</sup>; 同时, 感染猪是该病的传染源, 可通过空气传播或直接接触传播导致猪群大规模发病<sup>[6]</sup>, 因此检测APP亚临床感染猪具有重要意义, 而该病的最终确诊则需要通过APP核酸的检测<sup>[10]</sup>。APP不同血清型菌株均可以造成猪的严重疾病和死亡, 但不同血清型之间毒力差异较显著。通常情况下生物I型毒力比生物II型更强<sup>[11]</sup>, 所以分离APP菌株并进行血清型分型可为猪场PCP的疫苗免疫及治疗提供指导作用。

特异性和特异性试验结果显示, DsbE-PCR, omlA-PCR和ApxIVA-PCR最低检测极限均为 $10^2$  CFU, 3种PCR均只对APP核酸扩增出特异性条带, 与本试验中其他细菌核酸不反应, 这与Chiers等<sup>[6]</sup>、Gram等<sup>[7]</sup>和Xiao等<sup>[8]</sup>报道结果一致。但dsbE-PCR和ApxIVA-PCR对林氏放线杆菌有反应, 此细菌与APP联系紧密<sup>[12]</sup>, 且林氏放线杆菌不能从猪的呼吸道中被发现<sup>[13]</sup>, 因此3种PCR方法的敏感性和特异性良好。Chiers等<sup>[6]</sup>构建了一种基于DsbE基因的PCR方法用于检测APP。王贵平等<sup>[14]</sup>验证了一种ApxIVA-PCR方法的敏感性和特异性。李树清等<sup>[15]</sup>建立了基于ApxIVA基因和16S rRNA序列的复合PCR方法, 该方法特异性良好且检测极限9 pg, 因此该方法的敏感性强。庞耀珊等<sup>[16]</sup>在上述PCR方法基础上进行了改进, 增强了其特异性的同时易化了产物的延伸, 从而增加了其敏感性, 但以上方法均未运用于直接检测鼻腔棉拭子中APP。Xiao等<sup>[8]</sup>描

述了一种基于 *ApxIVA* 和 *omlA* 基因的多重 PCR, 用于直接检测猪鼻腔棉拭子中 APP。本试验同时运用 3 种 PCR 方法分别直接检测猪鼻腔棉拭子中 APP, 并比较其阳性检出率, 结果显示, *dsbE*-PCR 的 APP 核酸检出率显著高于其他 2 种 PCR 方法, 三者符合率较高。原因可能是猪鼻腔中存在大量其他微生物, 样品提取的 PCR 模板中含有其他微生物核酸等 PCR 抑制成分, 这些成分对 *dsbE*-PCR 的抑制作用相对于另 2 种 PCR 更小<sup>[6]</sup>。

Shimizu 等<sup>[17]</sup>和 Eaves 等<sup>[18]</sup>报道 APP 对杆菌肽和洁霉素的高度耐药, Branki 等<sup>[19]</sup>运用洁霉素、杆菌肽和制霉菌素配制分离 APP 的选择性培养基。Gilbride 等<sup>[20]</sup>用添加洁霉素、结晶紫、杆菌肽和 NAD 的 TSA 培养基从 80 份屠宰生猪扁桃体切面分离 APP, 分离率为 5%。Sidibe 等<sup>[21]</sup>发现用添加 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  洁霉素、2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  结晶紫、156  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  杆菌肽和 0.0001% NAD 的 PPLO 培养基分离 APP 比前者效率更高, Möller 等<sup>[22]</sup>报道用添加 300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  杆菌肽的巧克力平板和血平板分离扁桃体样品中的 APP, 发现 22% 的猪携带 APP。本试验同时使用 4 种选择性培养基分离猪鼻腔棉拭子中 APP, 结果显示, 添加洁霉素(1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、杆菌肽(100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、制霉菌素(50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、NAD(100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )以及无菌小牛血清(5%)的 mPPLO 对鼻腔棉拭子中 APP 的分离更加有效, 四者的符合率较高原因可能是 mPPLO 的营养成分更有利于 APP 的生长, 利于肉眼观察并挑取可疑菌落, 从而提高 APP 分离率。

本试验分别运用 3 种 PCR 方法和 4 种选择性培养基检测并分离母猪群鼻腔棉拭子中的 APP, 其中 *dsbE*-PCR 和 mPPLO 阳性检出率及分离率最高, 且两者的检测分离结果符合率较高, 可综合 2 种方法, 完善 APP 检测分离操作程序, 为猪场 PCP 的监测提供辅助手段, 并为 APP 亚临床感染的诊断和治疗以及疫苗免疫提供科学依据。

## 参考文献:

- MacInnes J I, Rosendal S. Prevention and control of *Actinobacillus*(*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* infection in swine: a review[J]. *Can Vet J*, 1988, 29: 572-574.
- 杨旭夫, 彭发泉. 我国猪胸膜肺炎嗜血杆菌感染的确定和诊断[J]. *畜牧兽医学报*, 1990, 21(3): 243-245.
- 吕素芳, 郭广君, 唐娜, 等. 猪胸膜肺炎放线杆菌分子生物学研究进展[J]. *中国人兽共患病报*, 2011, 27(6): 574-577.
- Jacobsen M J, Nielsen J P, Nielsen R, et al. Comparison of virulence of different *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes and biotypes using an aerosol infection model[J]. *Vet Microbiol*, 1996, 49: 159-168.
- Jacobsen M J, Nielsen J P. Development and evaluation of a selective and indicative medium for isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from tonsils[J]. *Vet Microbiol*, 1995, 47: 191-197.
- Chiers K, Overbeke I V, Donne E, et al. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in cultures from nasal and tonsilla swabs of pigs by a PCR assay based on the nucleotide sequence of a *dsbE*-like gene[J]. *Veterinary Microbiology*, 2001, 83: 147-159.
- Gram T, Ahrens, P. Improved diagnostic PCR assay for *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on the nucleotide sequence of an outer membrane lipoprotein[J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36: 443-448.
- Xiao G S, Cao S J, Duan L L, et al. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in infected and subclinically infected pigs by multiplex PCR based on the genes *ApxIVA* and *OmlA*[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2006, 5(2): 146-154.
- Bertram T A. Pathobiology of acute pulmonary lesions in swine infected with *Haemophilus* (*Actinobacillus*) *pleuropneumoniae*[J]. *Can Vet J*, 1988, 29: 574-577.
- Dom P, Haesebrouck F. Comparative virulence of NAD-dependent and NAD-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains[J]. *J Vet Med Ser*, 1992, B 39: 303-306.
- Gttsehalck M, Broes A, Mittal K R, et al. Non-pathogenic *actinobacillus* isolates antigenically and biochemically similar to *Actinobacillus pleuropneumoniae*: a novel species[J]. *Vet Microbiol*, 2003, 92(2): 87-101.
- Dewhirst F E, Paster B J, Olsen I, et al. Phylogeny of 54 representative strains of species in the family *Pasteurellaceae* as determined by comparison of 16S rRNA sequences[J]. *J Bacteriol*, 1992, 174: 2002-2013.
- de la Puente-Redondo V, Garcia del Blanco N, Gutierrez-Martin C B, et al. Detection and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* and *tbpB* genes[J]. *Res Microbiol*, 2000, 151(8): 669-681.
- 王贵平, 何启盖, 刘军发, 等. 猪胸膜肺炎放线杆菌快速 PCR 检测方法的建立[J]. *中国兽医学报*, 2004(2): 129-130.
- 李树清, 易建平, 胡永强, 等. 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的套式 PCR 检测[J]. *中国预防兽医学报*, 2005, 45(6): 966-969.
- 庞耀珊, 谢芝勋, 刘加波, 等. 二温式 PCR 检测猪传染性胸膜肺炎放线杆菌方法的建立与应用[J]. *广西农业科学*, 2006, 37(2): 203-205.
- Shimizu M, Kuninon K, Sakano T, et al. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* isolates from swine[J]. *Jpn J Vet Sci*, 1982, 44: 359-63.
- Eaves L E, Blackall P J, Fegan M. Characterization and antimicrobial sensitivity of haemophili isolated from pigs[J]. *Austr Vet J*, 1989, 66(1): 1-4.
- Branki V, Grgic Z, Zorica N, et al. Selective media for the isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from the pig[J]. *Acta Veterinaria* (Beograd), 2004, 54(5/6): 395-401.
- Gilbride K A, Rosendal S. Evaluation of a selective medium for isolation of *Haemophilus pleuropneumoniae* [J]. *Can J Comp Med*, 1983, 47: 445-50.
- Sidebe M, Messier S, Lariviere S, et al. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the upper respiratory tract as a complement to serological tests[J]. *Can J Vet Res*, 1993, 57: 204-208.
- Möller K, Vraa Andersen L, Christensen G, et al. Optimization of detection of NAD dependent, *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of slaughterhouse pigs[J]. *Vet Microbiol*, 1993, 36: 261-271.