

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.11.02

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的 鉴定和耐药性研究

杨方, 崔明全, 张纯萍, 赵琪, 宋立, 徐士新*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2018-08-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 11-0006-08 [中图分类号] S852.61

[摘要] 猪传染性胸膜肺炎是由猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuralpneumoniae*, APP) 引起的一种高度传染性呼吸道疾病, 临床上准确鉴定该病原菌并合理选择抗生素施药十分重要。研究比较了应用传统方法、PCR 方法和 MALDI TOF 方法鉴定 45 株临床 APP, 并比较了三种优势血清型的毒力表型, 最后测定了其对于临床 34 种常见抗生素的 MIC。结果发现 MALDI TOF 微生物学鉴定方法具有快速、准确的优势; 临床菌株血清型主要包括 3 型 (20 株)、1 型 (13 株)、7 型 (7 株), 其他血清型菌株 5 株, 其中 1 型毒力最强; APP 对罗红霉素、头孢噻唑、恩诺沙星、氨苄西林等高度敏感, 对四环素、土霉素等耐药率较高。研究为临床快速鉴定 APP 和合理选择用药提供了参考依据, 为 APP 临床耐药折点的制定奠定了基础。

[关键词] 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌; 鉴定; 血清型; 耐药性

Identification and Antimicrobial Resistance of *Actinobacillus pleuralpneumoniae*

YANG Fang, CUI Ming-quan, ZHANG Chun-ping, ZHAO Qi, SONG Li, XU Shi-xin*

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

Corresponding author: XU Shi-xin, E-mail: 1559757434@qq.com

Abstract: *Actinobacillus pleuralpneumoniae* (APP) is the causative agent of porcine contagious pleuropneumonia, a highly contagious respiratory disease in pigs. With the severe situation of clinical bacterial resistance, it is very important to accurately identify the pathogen and rationally select antibiotics in clinical practice. Traditional methods, PCR assay and MALDI TOF method were used to identify APP, and the virulence was evaluated amongst isolates from three predominant serotypes. Lastly, the MICs of 34 common antibiotics in clinical practice were determined. The results showed that the MALDI TOF was more rapid and accurate than other methods. The serotypes of clinical strains mainly included type 3 (20 strains), type 1 (13 strains), type 7 (7 strains), and other serotype (5 strains). Among which, type 1 was the most virulent. MIC test showed that APP was sensitive to roxithromycin, ceftiofur, enrofloxacin, ampicillin, etc, and resistant to tetracycline and oxytetracycline.

基金项目: 国家重点研发计划专项“畜禽重要病原耐药性检测与控制技术研究”(2016YFD0501302)

作者简介: 杨方, 女, 硕士研究生, 从事兽医微生物和药理研究。

通讯作者: 徐士新。E-mail: 1559757434@qq.com

Therefore, this study provided a reference for clinical rapid identification of APP and rational selection of antimicrobial agents, and a foundation for the development of APP clinical breakpoints.

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; identification; serotype; antibiotic resistance.

猪传染性胸膜肺炎 (Porcine contagious pleuropneumonia, PCP) 在 1957 年, 被 Pattison 等人首次报道^[1], 并被国际公认为危害猪养殖业的三大呼吸道传染病之一^[2]。猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuralpneumoniae*, APP) 是一种重要的经济性病原体, 属巴氏杆菌科放线杆菌属^[3-4], 革兰氏阴性菌, 显微镜下观察多呈球杆状^[5]。根据 APP 生长是否需要烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 将其分为生物 I 型和生物 II 型^[6]。APP 血清型众多, 不同国家、不同地区的优势血清型不同, 我国主要流行血清型有 1、2、3、4、5、7 和 10 型, 以 1、3、7 型为主^[7]。

APP 与副猪嗜血杆菌相似, 在实验室鉴定诊断时极易混淆, 准确快速鉴定出病原菌尤为重要。APP 血清型具有多样性且不同血清型菌株毒力不同, 血清型和毒力的鉴定给猪传染性胸膜肺炎诊断与免疫防控带来很大难度。临床中防治该病常使用阿莫西林和头孢类药物, 但效果并不理想, 且长期使用该类药会产生耐药性, 并影响猪肉的质量^[8], 给养猪业造成较大的经济损失^[9], 因此在治疗时应结合药敏试验结果选择抗菌药物。鉴于此, 研究比较了传统与新型鉴定方法, 鉴定国内流行致病性血清型和毒力表型, 并测定大量菌株对常用抗革兰氏阴性菌和广谱抗生素的耐药性, 比较了不同血清型的耐药性差异, 以期为临床提供迅速准确的鉴定方法, 指导临床合理用药。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株 实验室现有 45 株菌, 其中 30 株 APP 为 2009 年中国兽医药品监察所保存的临床分离菌株。15 株 APP 为 2016 年从河南地区猪场病死猪分离所得。质控菌株 ATCC 25922 由中国兽医药品监察所保存。

1.1.2 主要仪器和试剂 胰酪胨大豆琼脂培养基、

胰蛋白胨大豆肉汤培养基购自北京陆桥技术股份有限公司。氧化型辅酶 I (NAD) 购自罗氏公司。胎牛血清 (FAD) 购自德国 PAN Biotech 公司。基质 CHCA 购自美国 SIGMA 公司。微量生化反应试剂购自杭州滨河微生物试剂有限公司。2×Taq PCR Master Mix 购自北京博迈德公司。DL 2000 DNA Marker 购自 TaKaRa 公司。MALDI TOF 微生物鉴定仪器购自岛津公司。

1.1.3 动物 6 周龄 Balb/c 小鼠, 雌雄各半, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 细菌分离培养 无菌采取河南地区猪场病死猪肺脏和脾脏病料接种于添加 NAD 和 FAD 的胰蛋白大豆琼脂 (TSA) 培养基上, 置 37 °C 培养箱中培养 18~24 h, 观察细菌的生长情况, 并选取单菌落进行纯化培养, 以供后续实验。

1.2.2 革兰氏染色镜检 选取疑似单个菌落涂片, 进行革兰氏染色, 并在显微镜下进行观察。

1.2.3 生化鉴定 无菌操作挑取纯化后的单个菌落分别接种于乳糖、尿素、蔗糖等微量生化发酵管中 (含添加 NAD 及 FAD 的 TSB 培养基), 置于 37 °C 恒温培养箱内培养 24 h, 观察发酵结果。

1.2.4 PCR 分子鉴定 根据文献^[10]合成一段 APP IV 毒素基因的特异性引物。上游: 5'-TTATCCGAACCTTTGGTTTAGCC-3', 下游: 5'-CATATTTGATAAAACCATCCGTC-3'。目标产物片段大小约为 417 bp。DNA 的提取参考文献水煮方法^[11], PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 40 s, 65 °C 40 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳后观察分析。

1.2.5 MALDI TOF 微生物学鉴定 选取 1~2 个纯化培养的单个菌落, 加入 600 μL 70% 乙醇, 混匀; 12000 r/min 离心 2 min, 弃去上清; 在沉淀中加入 50 μL 70% 甲酸, 混匀, 再加入 50 μL 乙腈, 混匀,

12000 r/min 离心 2 min, 吸出上清; 在上样板上先点 1 μ L 上清, 待干后再点 2 μ L CHCA 基质, 放干后上样检测。

1.2.6 血清型鉴定 根据文献^[12-13]合成一段 APP_{apxIV} 基因特异性引物序列。本研究中使用的引物在表 1 中详细说明。1 型和 7 型反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 63 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 33 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 3 型反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 61 $^{\circ}$ C 90 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 25 个循环; 68 $^{\circ}$ C 15 min。

表 1 研究中使用的引物

Tab 1 Primers used in this study

引物名称	序列	目标片段/bp
AP1-F	GGGCAAGCCTCTGCTCGTAA	754
AP1-R	GAAAGAACCAAGCTCCTGCAAT	
AP3-F	CTATCATCTGTGCCAAGCTTACTACAC	520
AP3-R	GGTTTAGAGGGGCAAATTGACTTG	
AP7-F	GGTACTGGCGTACGCCAAA	396
AP7-R	GGGCTGCAGACTGACGTAA	

1.2.7 血清毒力鉴定 选取血清型为 1、3、7 型的菌株各一株, 纯化培养后选取单菌落接种于 TSB 培养基中培养 10 h。首先做预实验, 稀释菌液浓度为 $1 \times 10^7 \sim 8 \times 10^9$ CFU/mL, 每个稀释度 200 μ L 腹腔注射 5 只小鼠, 持续观察 1 周, 并统计致 90% 和致 10% 小鼠死亡的菌液浓度, 以此为正式试验的菌浓度界限。在此范围内 2 倍比稀释菌液浓度, 每个浓度梯度注射 10 只小鼠, 设置 6 只注射同等浓度生理盐水的小鼠为空白对照, 观察 1 周, 统计各组小鼠死亡情况。

1.2.8 药敏试验 参考 CLSI 的标准, 用微量肉汤稀释法^[14]测定 45 株 APP 对 34 种常用抗革兰氏阴性菌及广谱抗生素的 MIC 值。质控菌株为大肠杆菌 ATCC 25922。

2 结果

2.1 革兰氏染色镜检 取待测菌株单菌落进行涂板染色, 于显微镜油镜下观察细菌形态, 可见细菌为革兰氏阴性, 多呈短杆状, 两极着色明显(图 1)。

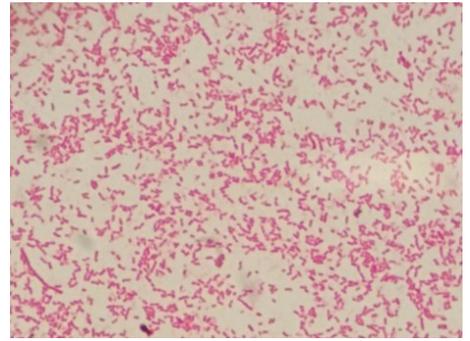


图 1 革兰氏染色结果

Fig 1 Results of gram staining

2.2 生化鉴定 取待测的细菌纯化培养物于各生化鉴定管中, 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 24 h, 由表 2 可知, 待测菌株均能够发酵乳糖、尿素、麦芽糖等。不发酵阿拉伯糖、棉子糖、核糖等。符合 APP 的生化特性。

表 2 生化鉴定结果

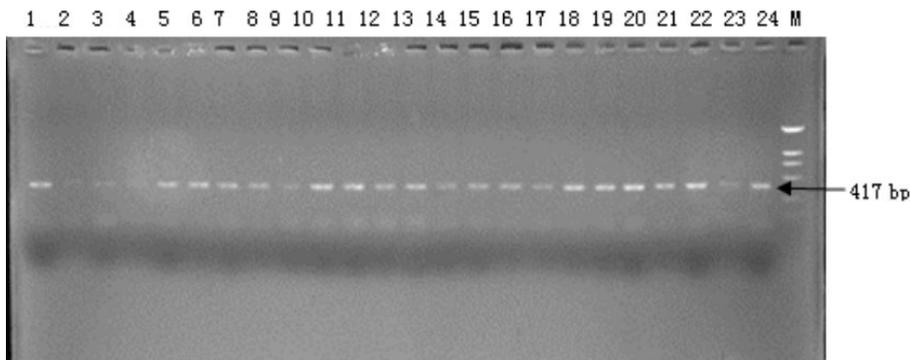
Tab 2 Results of biochemical identification

项目	结果	项目	结果
乳糖	+	尿素	+
麦芽糖	+	蔗糖	+
半乳糖	+	果糖	+
葡萄糖	+	甘露糖	+
木糖	+	阿拉伯糖	-
棉子糖	-	核糖	-
硫化氢	-	蛋白胨水	-

2.3 PCR 鉴定结果 PCR 产物经 1% 核酸凝胶电泳, 在凝胶成像仪中可见扩增产物在 417 bp 处有明显的扩增条带, 且与阳性对照菌株条带位置一致(图 2)。

2.4 MALDI TOF 微生物学鉴定 将待测菌株经过 MALDI TOF 微生物鉴定制样方法提取 DNA 后上样检测, 以 ATCC 25922 为标准菌株进行校准, 鉴定结果可得到峰比对比率高达 91.5%, 鉴定为巴氏杆菌科放线杆菌属(图 3)。

2.5 鉴定方法比较 对 45 株菌分别用革兰氏染色镜检、生化试剂鉴定、PCR 分子鉴定、MALDI TOF 微生物学鉴定四种方法进行鉴定, 以 PCR 分子鉴定结果为标准, 从菌株培养操作时间和准确率方面进行对比, 发现四种方法中以 MALDI TOF 微生物学鉴定方法最佳, 操作方便快捷、准确率高(表 3)。



M: DNA 分子质量标准; 1-23: 培养菌株; 24: 阳性对照

M: DL2000 DNA Marker; 1-23: Bacterial strain; 24: Positive control

图 2 培养菌株的 PCR 检测结果

Fig 2 PCR test results of cultured strains

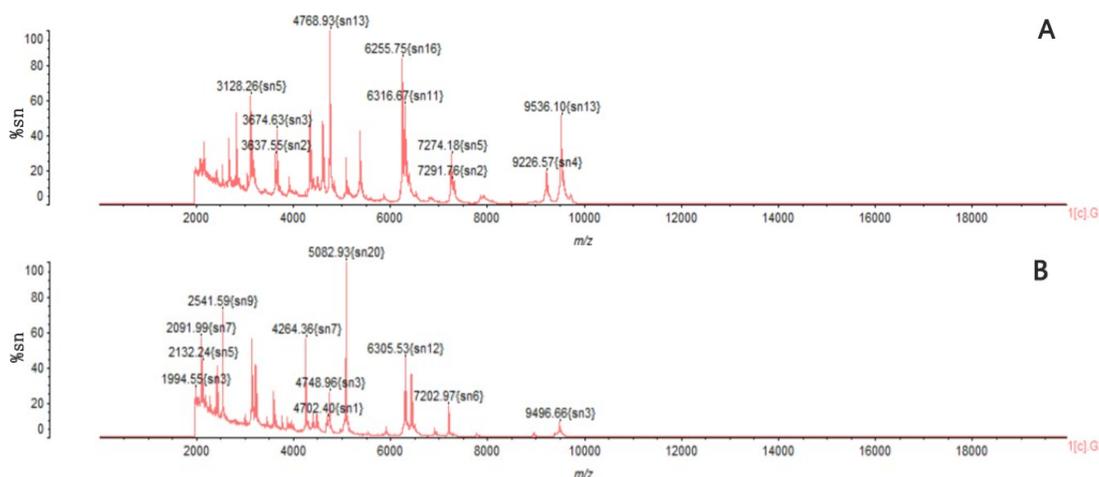


图 3 标准菌株 ATCC 25922 鉴定结果 (A) 和培养菌株鉴定结果 (B)

Fig 3 Identification results of standard strain ATCC 25922 (A) and culture strain (B)

表 3 鉴定方法的比较

Tab 3 Comparison of identification methods

鉴定方法	准确率	时间/h
传统鉴定方法	40(88.9%)	35
PCR 鉴定	45(100%)	20
MALDI TOF 鉴定	45(100%)	16

表 4 血清型 1、3、7 型分离率

Tab 4 Results of serotype 1, 3 and 7 separation rate

血清型	分离率(株/%)
1	13(28.9%)
3	20(44.4%)
7	7(15.6%)

2.6 血清型鉴定 用 PCR 方法鉴定 45 株待测菌株,结果见表 4。血清型 1 型菌株 13 株分离率为 28.9%,血清型 3 型菌株 20 株分离率为 44.4%,血清型 7 型菌株 7 株分离率为 15.6%,其余 5 株菌株非 1 型、3 型和 7 型。

2.7 血清型毒力鉴定 经过预实验确定菌液浓度范围分别为血清型 1 型: $1 \times 10^9 \sim 0.625 \times 10^8$ CFU/mL; 血清型 3 型: $2 \times 10^9 \sim 1.25 \times 10^8$ CFU/mL; 血清型 7 型: $4 \times 10^9 \sim 2.5 \times 10^8$ CFU/mL。小鼠死亡情况如表 4,根据寇氏法^[15]计算出三种血清型的半数致死

量分别为 2.04×10^8 CFU/mL、 4.08×10^8 CFU/mL、 1.07×10^9 CFU/mL。由表 5 可见,血清 1 型致病力强于 3 型,血清 3 型致病力强于 7 型。

2.8 药敏试验 根据 CLSI 标准,替卡西林对质控菌株 ATCC 25922 的 MIC 为 $4 \sim 16 \mu\text{g/mL}$,本实验测得的 MIC 为 $8 \mu\text{g/mL}$,实验条件和实验操作符合标准。以 CLSI 已有的 APP 药敏结果为判定标准,通过对 MIC 结果分析,得出 APP 对氟苯尼考、头孢类等高度敏感,对四环素类耐药性较高(表 6)。分别测定血清型 1 型(13 株)、3 型(20 株)、7 型(7 株)的耐药性,结果显示强毒力血清型 1 型对四环素类(包括四环素、多西环素、金霉素、土霉素)耐药率均高于 3 型,3 型高于 7 型,且血清 1 型对泰乐菌素、卡那霉素、庆大霉素等的 MIC 值明显高于 3 型及 7 型(表 6)。同时比较了 2009 年分离的 30 株和 2016 年分离的 15 株 APP 的耐药性变化,发现 2016 年分离的菌株对四环素、土霉素、金霉素、多西环素的耐药率明显高于 2009 年分离的菌株(表 7)。

表 5 血清型 1、3、7 型菌株对小鼠的致病性实验结果

Tab 5 Pathogenicity test results of serotype 1, 3 and 7 strains on mice

菌株	菌液浓度梯度 /(CFU · mL ⁻¹)	死亡数/只	半数致死量 /(CFU · mL ⁻¹)
S-1	1×10^9	10	2.04×10^8
	0.5×10^9	9	
	0.25×10^9	6	
	1.25×10^8	3	
	0.625×10^8	0	
S-3	2×10^9	10	4.08×10^8
	1×10^9	9	
	0.5×10^9	7	
	0.25×10^9	3	
	1.25×10^8	0	
S-7	4×10^9	10	1.07×10^9
	2×10^9	8	
	1×10^9	4	
	0.5×10^9	2	
	2.5×10^8	0	
空白对照	生理盐水	0	-

表 6 APP 对抗生素的 MIC 分布和耐药率

Tab 6 MIC distribution and resistance rate of APP to antibiotics

抗菌药物	45 株 APP 的 MIC 分布和耐药率			血清型 MIC 及耐药率/%		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	耐药率/%	1	3	7
	/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)				
四环素	0.5	1	24.4	1(46.2)	1(20)	0.5(14.3)
头孢噻唑	1	4	0	4(0)	2(0)	2(0)
头孢克洛	1	2	0	2(0)	2(0)	2(0)
头孢哌酮	1	2	0	2(0)	1(0)	0.5(0)
多西环素	0.5	1	6.7	2(30.8)	1(0)	1(0)
头孢吡肟	1	2	0	2(0)	1(0)	1(0)
头孢曲松	1	2	0	2(0)	1(0)	1(0)
氟苯尼考	1	2	0	4(0)	2(0)	1(0)
金霉素	0.5	1	20	2(53.8)	2(10)	1(0)
土霉素	0.5	1	15.6	2(38.5)	2(10)	0.5(0)
泰乐菌素	16	32	-	64(-)	32(-)	8(-)
复方新诺明	0.06	0.25	-	2(-)	0.5(-)	0.12(-)
卡那霉素	8	16	-	64(-)	16(-)	2(-)
庆大霉素	2	4	-	8(-)	4(-)	1(-)
萘啶酸	2	8	-	16(-)	8(-)	2(-)

续表

抗菌药物	45 株 APP 的 MIC 分布和耐药率			血清型 MIC 及耐药率/%		
	MIC ₅₀ /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MIC ₉₀ /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	耐药率/%	1	3	7
环丙沙星	1	4	-	8(-)	4(-)	1(-)
氯霉素	1	4	-	8(-)	4(-)	2(-)
罗红霉素	0.5	1	-	1(-)	1(-)	0.5(-)
阿米卡星	8	32	-	64(-)	32(-)	16(-)
阿莫西林/拉维酸	0.5	1	-	1(-)	1(-)	0.5(-)
链霉素	16	32	-	32(-)	16(-)	4(-)
磺胺嘧啶	256	512	-	512(-)	512(-)	256(-)
大观霉素	16	32	-	64(-)	32(-)	16(-)
多黏菌素 E	0.5	2	-	2(-)	2(-)	1(-)
恩诺沙星	0.5	1	-	1(-)	1(-)	0.5(-)
红霉素	2	4	-	8(-)	4(-)	2(-)
达氟沙星	2	4	-	8(-)	8(-)	2(-)
氧氟沙星	1	4	-	8(-)	1(-)	1(-)
螺旋霉素	16	32	-	32(-)	16(-)	4(-)
北里霉素	2	4	-	4(-)	2(-)	2(-)
甲矾霉素	0.5	1	-	2(-)	1(-)	0.5(-)
氨苄西林	0.5	1	-	2(-)	1(-)	0.5(-)
左氧氟沙星	1	4	-	4(-)	2(-)	1(-)
磺胺异恶唑	64	128	-	128(-)	128(-)	128(-)

表 7 2009 年和 2016 年 APP 耐药性变化

Tab 7 Change of drug resistance of APP between in 2009 and in 2016

抗菌药物	耐药率(株/%)	
	2009 年	2016 年
四环素	4(13.3)	7(46.7)
金霉素	5(16.7)	4(26.7)
土霉素	4(13.3)	3(20)
多西环素	1(3.3)	2(13.3)

3 讨论

分离鉴定 APP 是实验室诊断猪传染性胸膜肺炎的重要途径,多用传统方法和 PCR 分子鉴定方法^[16]。本实验分别通过革兰氏染色镜检、生化试剂鉴定、PCR 分子鉴定对 45 株 APP 进行鉴定,发现传统鉴定方法操作复杂、准确率相对较低、重复性稍差,PCR 鉴定方法准确率高,但操作费时。

MALDI TOF 微生物学鉴定方法目前主要应用于临床样本中微生物的鉴定^[17]。本研究首次运用 MALDI TOF 方法对 45 株 APP 进行鉴定,发现该方法操作简单快捷,准确率高,可重复性好,适用于样本数量多的鉴定方法。综上研究可知 MALDI TOF 微生物学鉴定方法最佳,适用于临床快速鉴定细菌并进而开展药敏筛查。

了解我国 APP 的主要流行致病血清型对于流行病学追踪、细菌的研究及治疗猪传染性胸膜肺炎都有重要作用。准确鉴定致病血清型对临床诊断至关重要,传统的血清型鉴定方法基于抗体反应,但是交叉反应严重^[18]。经查阅文献发现目前血清型鉴定方法主要是运用 PCR 分子生物学,该方法操作简单准确率高。本研究通过 PCR 分子实验鉴定了我国主要流行血清型 1 型、3 型、7 型,发现待测菌株中血清 3 型所占比例最大。流行致病血清

型及毒力鉴定对临床治疗该病会有很大帮助。本研究测定的血清毒力结果与田永祥等^[19]报道的一致,并在此基础上比较了血清 7 型的毒力。对比三种血清型的半数致死量,发现血清 1 型毒力强于 3 型,3 型强于 7 型。

临床中治疗猪传染性胸膜肺炎主要使用抗生素,而 APP 容易产生耐药性,所以在预防及治疗方面有一定的困难,测定其 MIC 值,对解决这一难题有重要的作用。本实验对 2009 年分离保存的 30 株和 2016 年分离保存的 15 株 APP 进行药敏试验。目前 CLSI 仅制定了 APP 对四环素类、头孢类、氟苯尼考的折点,对其他药物暂无相关判定标准,本研究测定的药敏数据对制定 APP 对其他药物的折点具有重要意义。研究结果表明,45 株 APP 对氟苯尼考和头孢类抗生素高度敏感,对四环素、金霉素、土霉素等耐药性较强,耐药率分别为 24.4%、20%、15.6%。APP 对罗红霉素、恩诺沙星、氨苄西林等抗生素的 MIC₅₀ 值仅为 0.5 μg/mL,而对磺胺嘧啶、磺胺异恶唑的 MIC₅₀ 值分别高达 265 μg/mL、64 μg/mL。对比 2009 年和 2016 年 APP 的耐药差异,发现 2016 年分离的 APP 对四环素、金霉素、土霉素、多西环素的耐药性明显高于 2009 年分离的菌株,且对比 2009 年和 2016 年 APP 的药敏结果发现, MIC 值明显增大。其原因可能与近几年抗菌药物使用量增加有关。据中国兽药协会的年度抗菌药物原料药生产统计^[20],我国兽用抗菌药物原料药销售量由 2009 年的 28400 吨,增加到 2016 年 50400 吨。

我国 APP 主要流行的致病血清型为 1、3、7 型^[21],因此研究比较了国内流行的三种血清型的耐药性特点。不同血清型对四环素类抗生素的耐药性存在明显差异,血清型 1 型对四环素类抗生素多表现为耐药性,耐药率高于 30.8%。血清型 1 型对四环素类耐药率高于 3 型,3 型高于 7 型,且血清 1 型的 MIC 值明显高于血清 3 型,3 型高于 7 型,说明不同毒力血清型耐药性有差异,强毒力血清型耐药率相对更高。但是我们关注强毒力型细菌耐药性高是否也导致致病性更强,由于未开展有关研

究,尚无法得出结论,仍需进一步研究。

在临床中使用抗生素治疗猪传染性胸膜肺炎时应注意合理用药,关注耐药性变化趋势,防范于未然,减少耐药菌株的出现。本研究通过比较鉴定方法及分析药敏数值,为临床折点制定提供数据支撑,对临床中猪传染性胸膜肺炎的诊断治疗提供科学依据,同时为该病的防控及兽医临床抗生素的使用风险评估提供参考。

参考文献:

- [1] Bei W, He Q, Zhou R, *et al.* Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of *Actinobacillus pleuropneumoniae* HB04C(-) mutant lacking a drug resistance marker in the pigs[J]. *Veterinary Microbiology*, 2007, 125 (1/2): 120-127.
- [2] Blanco M, Kadlec K, Gutierrez Martin C B, *et al.* Nucleotide sequence and transfer properties of two novel types of *Actinobacillus pleuropneumoniae* plasmids carrying the tetracycline resistance gene tet(H)[J]. *Antimicrobial Chemotherapy*, 2007, 60 (4): 864-867.
- [3] Janine T B, Yanwen L, Marcelo G, *et al.* A unique capsule locus in the newly designated *Actinobacillus Pleuropneumoniae* serovar 16 and development of a diagnostic PCR assay [J]. *Clinical Veterinary Microbiol*, 2016, 55 (3): 902-903.
- [4] Haeseboruek F, Chiersk, Ovebrekevi, *et al.* *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection [J]. *Veterinary Microbiology*, 1997, 58 (2/3): 239-249.
- [5] Nabin R, Sung J S, Sang G K. Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates[J]. *Veterinary Diagnostic Investigation*, 2005, 17: 359-362.
- [6] Blackall P J, Klaasen H L B M, Kuhnert P, *et al.* Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15[J]. *Veterinary Microbiology*, 2002, 84 (1/2): 47-52.
- [7] Srkzi R, Makrai L, Fodor L. Identification of a proposed new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Serovar 16[J]. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2015, 63 (4): 444-450.
- [8] Savaeye C, Jobert J L, Berthelot_H F, *et al.* A PCR assay used to study aerosol transmission of *Actionobacillus pleuropneumoniae* from samples of live pigs under experimental conditions [J]. *Veterinary Microbiology*, 2000, 73 (4): 337-347.
- [9] Shin M K, Kang M L, Jung M H, *et al.* Induction of protective

- immune responses against challenge of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by oral administration with *saccharomyces cerevisiae* expressing Apx toxins in pigs [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2013, 151 (1/2): 132-139.
- [10] Yu Z Y, Zhou J M, Ni Y X, *et al.* Isolation and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 5 in large scale pig farms [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2015, 47 (7): 91-93.
- [11] Ma L, Wang L Y, Chu Y F, *et al.* Characterization of chinese *Haemophilus parasuis* isolates by traditional serotyping and molecular serotyping methods [J]. *Plos One*, 2016, 1371 (10): 1-3.
- [12] Janine T, Bossé, Lucy A, *et al.* Multiplex PCR assay for unequivocal differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1 to 3, 5 to 8, 10, and 1 [J]. *Clinical Microbiology*, 2014, 52 (7): 2380-2385.
- [13] Øystein A, Peter A. Development of a multiplex PCR test for identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1,7, and 12 [J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 132 (3/4): 313-318.
- [14] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S22 performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-second informational supplement [R]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- [15] Saganuwan A S. The new algorithm for calculation of median lethal dose (LD50) and effective dose fifty (ED50) of *Micrarus fulvius* venom and antivenom in mice [J]. *Veterinary Science and Medicine*, 2016, 4: 2-4.
- [16] 郭志英. 猪胸膜肺炎放线杆菌的分离鉴定及其生物学特性的研究 [J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(09): 1103-1106.
- Guo Z Y. Isolation and identification of *actinobacillus* from swine pleural pneumonia and its biological characteristics [J]. *Veterinary Science in China*, 2016, 46 (09): 1103-1106.
- [17] Snehal J, Danielle S, Mrinal B, *et al.* Detection of *Listeria monocytogenes* from selective enrichment broth using MALDI-TOF Mass Spectrometry [J]. *Journal of Proteomics*, 2014, 97: 100-106.
- [18] Zhou L, Jones S C, Angen Ø, *et al.* A multiplex PCR that can distinguish between immunologically crossreactive serovar 3, 6 and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains [J]. *Clinical Microbiology*, 2008, 46: 800-803.
- [19] 田永祥. 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的分离鉴定、致病性与药敏试验 [J]. *湖北农业科学*, 2014, 53(21): 5206-5207.
- Tian Y X. Isolation, identification, pathogenicity and susceptibility test of *Actinobacillus pneumonia* in pigs [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2014, 53 (21): 5206-5207.
- [20] 中国兽药协会. 兽药产业发展报告 [R]. 2009-2016 年度.
- China Veterinary Drug Association. *Veterinary drug industry development report* [R]. 2009-2016.
- [21] 朱秀高. 猪胸膜肺炎放线杆菌感染和血清型分布 [J]. *动物医学进展*, 2017, 38(10): 111-113.
- Zhu X G. Infection and serotype distribution of *Actinobacillus pneumonia* in pigs [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2017, 38 (10): 111-113.

(编辑:李文平)