

孙学飞,倪艳秀,茅爱华,等.猪链球菌、胸膜肺炎放线杆菌和副猪嗜血杆菌多重PCR检测方法的建立和应用[J].江苏农业学报,2016,32(5):1094-1099.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.05.022

猪链球菌、胸膜肺炎放线杆菌和副猪嗜血杆菌多重PCR检测方法的建立和应用

孙学飞^{1,2}, 倪艳秀², 茅爱华², 何孔旺^{1,2}

(1.安徽农业大学动物科技学院,安徽 合肥 230000; 2.江苏省农业科学院兽医研究所,江苏 南京 210014)

摘要: 根据已发表的猪呼吸道疾病主要致病菌猪链球菌(SS)、胸膜肺炎放线杆菌(APP)和副猪嗜血杆菌(HPS)基因序列合成3对特异性引物,通过单一PCR和三重PCR体系及条件优化,建立这3种致病菌的三重PCR检测方法,并对200份临床表观健康猪鼻拭子样品用三重PCR方法进行检测。结果显示:建立的三重PCR方法能对同一样品中的SS、APP、HPS 3种病原菌的DNA模板进行扩增,无交叉反应;对猪体内常见的猪多杀性巴氏杆菌、猪大肠杆菌、猪放线杆菌、猪葡萄球菌、猪丹毒杆菌、猪沙门氏菌进行扩增,并无任何扩增产物;对SS、APP、HPS细菌纯培养物的检测敏感性分别为 1×10^4 CFU/ml、 1×10^3 CFU/ml、 1×10^3 CFU/ml;对人工模拟SS、APP、HPS感染组织样品的敏感性均为 1×10^4 CFU/ml。三重PCR方法对200份临床表观健康猪鼻拭子样品的检测结果显示:SS阳性160份,阳性率80.0%;APP阳性3份,阳性1.5%;HPS阳性45份,阳性22.5%。分别用细菌分离法和三重PCR法对30份临床病料进行检测,两者检测结果的符合率达到93%。建立的三重PCR可在4.5 h左右得到检测结果。

关键词: 猪链球菌; 胸膜肺炎放线杆菌; 副猪嗜血杆菌; 多重PCR

中图分类号: S858.282.61 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)05-1094-06

Development and application of a multiplex PCR for detection of *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis*

SUN Xue-fei^{1,2}, NI Yan-xiu², MAO Ai-hua², HE Kong-wang^{1,2}

(1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230000, China; 2. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: To achieve the purpose of simultaneously detecting three kinds of pathogenic bacteria in porcine respiratory diseases, *Streptococcus suis* (SS), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) and *Haemophilus parasuis* (HPS), three pairs of specific primers were synthesized from published SS, APP and HPS gene sequences, and the multiplex PCR method for SS, APP, and HPS was established. The multiplex PCR method could simultaneously amplify SS, APP and HPS in the same sample, without cross reaction. *Pasteurella Multocida*, *Escherichia coli*, *A. suis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* and swine erysipelas were detected by the multiplex PCR respectively and no specific products were amplified. The minimum detection concentrations of SS, APP and HPS were 1×10^4 CFU/ml, 1×10^3 CFU/ml and 1×10^3 CFU/ml, respectively. The sensitivity of the multiplex PCR method to artificially infected samples of SS, APP and HPS was 10^4 CFU/ml. Among 200 nasal swabs of apparently healthy pigs from Jiangsu province, the positive rates for SS, APP and HPS were 80.0% (160/200), 1.5% (3/200) and 22.5% (45/200), respectively. The total coincidence rate between the bacterial isolation and the multiplex PCR for 30 clinical diseased samples was 93% (28/30). This multiplex PCR is a sensitive, specific and rapid method for the detection and

identification of major bacteria in porcine respiratory disease complex, taking only 4.5 h to get the results.

Key words: *Streptococcus suis*; *Actinobacillus pleuropneumoniae*; *Haemophilus parasuis*; multiplex PCR

收稿日期:2016-01-29

基金项目:公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303034-8)

作者简介:孙学飞(1990-),男,江苏南京人,硕士,研究方向为

动物传染病。(E-mail) sxf514524582@126.com

通讯作者:何孔旺, (E-mail) kwh2003@263.net

猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)、胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)和副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)是猪呼吸道常见的重要病原,且引起的临床症状很难区分,多重感染也给传统的细菌学诊断带来困难,有必要建立一种快速诊断鉴别这3种细菌的多重PCR方法。

猪链球菌是猪的一种常见病原体,其中猪链球菌2型引起的疾病是一种重要的人畜共患病。猪感染猪链球菌后可导致很多疾病如败血症、脑膜炎、关节炎等,严重时还会导致突然死亡,部分从业人群接触感染后会产生中毒性休克、败血症、脑膜炎及死亡等恶劣后果^[1-6]。近年来,在中国猪链球菌引发的疾病发病率呈现逐年上升趋势,致病菌以2型为主^[7-9],该病已成为危害养猪业最严重的疾病之一。

猪胸膜肺炎放线杆菌是猪传染性胸膜肺炎(Porcine contagious pleuropneumonia, PCP)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会导致体质量增加速度减慢,降低饲料转化率并延长上市时间^[10-11]。1990年杨旭夫等^[12]证实该病在中国的存在。PCP是引起猪呼吸道疾病综合征的主要原因之一,给中国养猪业造成巨大经济损失^[13]。检测APP亚临床感染猪难度大,ELISA方法和补体结合试验并不能够一定检测到亚临床感染猪。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^[14-15]。

副猪嗜血杆菌可以引起纤维素性多发性浆膜炎、关节炎和脑膜炎,是一种条件致病菌,在表征健康猪的上呼吸道可以经常分离到,常由于环境应激等因素诱发疾病^[16]。该病原引起的疾病又称为革拉泽氏病(Glasser's disease)。猪伪狂犬病、猪圆环病毒病等免疫抑制性疾病的隐性感染继发该病而引起保育仔猪大规模死亡的病例报道较多^[17-18]。该菌属于猪上呼吸道的正常菌群成员之一,仔猪出生数小时即出现,因此采用早期断奶难以控制该病^[19-20]。近年来,随着中国规模化、集约化猪场的发展,副猪嗜血杆菌病已成为养猪生产中的常见病和多发病,四川、甘肃、福建、湖南、江苏等地均有发生^[21-25]。

本研究以猪链球菌谷氨酸脱氢酶基因(*gdh*)、胸膜肺炎放线杆菌毒素4基因(*Apx IV*)和副猪嗜血杆菌16S rRNA基因为靶基因,建立同时检测猪鼻拭子中猪链球菌、胸膜肺炎放线杆菌、副猪嗜血杆菌

的多重PCR检测方法,为这3种病原检测提供一种快速准确、高效经济的检测手段。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

TSB培养基购自OXOID公司,THB培养基购自BD公司,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)购自南京生兴生物技术有限公司,犍牛血清购自GIBCO公司,DNA凝胶回收试剂盒购自AXYGEN公司,2×Taq PCR Master Mix购自东盛生物科技有限公司,DL 2000 marker购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.2 菌株

猪链球菌、猪胸膜肺炎放线杆菌、副猪嗜血杆菌、猪多杀性巴氏杆菌、猪大肠杆菌、猪放线杆菌、猪葡萄球菌、猪丹毒杆菌、猪沙门氏菌由江苏省农业科学院兽医研究所人兽共患病防控研究室保存。

1.3 引物的设计与合成

SS引物参照文献[26]描述的方法设计,其靶基因为SS的特异基因*gdh*;APP引物参照文献[27]描述方法设计,其靶基因为APP的特异基因*Apx IV*;HPS引物参照文献[28]描述的方法设计,其靶基因为HPS的特异基因16S rRNA。引物均由上海英潍捷基生物有限公司合成,其相关信息见表1。引物用ddH₂O稀释成10 nmol/ml, -20℃保存备用。

表1 多重PCR引物

Table 1 Primer pairs for the multiplex PCR

引物名称	引物序列(5'→3')	基因	基因大小(bp)
SSF	CCATGGACAGATAAAGATGG	<i>gdh</i>	688
SSR	GCAGCGTATTCTGTCAAACG		
HPSF	GTGATGAGGAAGGGTGGTGT	16S rRNA	821
HPSR	GGCTTCGTCACCCCTCTGT		
APPF	TTATCCGAACCTTTGGTTTAGCC	<i>Apx IV</i>	417
APPR	CATATTTGATAAAACCATCCGTC		

1.4 细菌基因组DNA提取

1.4.1 液体培养物中细菌基因组DNA的提取 取纯培养的菌液或鼻拭子培养液1 ml放入1.5 ml EP管中,12 000 r/min离心5 min,去上清,用100 μl ddH₂O重悬EP管底部沉淀,100℃煮沸5 min,最后12 000 r/min离心5 min,取上清作为多重PCR反应模板, -20℃保存备用。

1.4.2 组织样品中细菌基因组DNA的提取 取2 g

感染猪肺脏组织,加入 1 ml PBS 研磨制成悬液,2 000 r/min 离心 5 min,取 500.0 μ l 上清液于 1.5 ml 离心管中,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 100.0 μ l 细菌裂解液(0.000 5% Tween20,0.5 g/L Proteinase K 和 0.1 mol/L Tris, pH8.5)重悬,57 $^{\circ}$ C 反应 1.0 h;100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,再 12 000 r/min 离心 5 min,取上清作为 PCR 反应模板。

1.5 PCR 扩增及其条件的优化

1.5.1 SS、APP、HPS 单一 PCR 扩增 反应体系:2 \times Taq PCR Master Mix 12.5 μ l,超纯水 8.0 μ l,上下游引物(10 nmol/ml)各 1.0 μ l,模板 DNA 2.5 μ l。反应参数:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,45~65 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 终延伸 7 min。取 10.0 μ l PCR 扩增产物于 20 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳,然后在紫外检测仪下观察,根据 PCR 扩增产物条带的亮度来确定最佳退火温度。

1.5.2 SS、APP、HPS 多重 PCR 扩增 将 SS、APP、HPS 引物进行 15 种不同浓度的组合,在最佳退火温度下进行 PCR,根据电泳结果确定最佳的引物组合用于多重 PCR 的扩增。

1.5.3 PCR 产物的鉴定 采用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化扩增片段,将纯化的扩增产物连接 T 载体并进行鉴定,将鉴定为阳性的质粒送往上海英潍捷基生物有限公司进行序列测定。所测序列与 GenBank 中收录的序列进行同源性比对,根据同源性高低鉴定 PCR 产物的正确性。

1.6 多重 PCR 特异性试验

按方法 1.4.1,提取猪多杀性巴氏杆菌、猪大肠杆菌、猪放线杆菌、猪葡萄球菌、猪丹毒杆菌、猪沙门氏菌的基因组 DNA,按确定的多重 PCR 反应条件进行扩增,以判定该方法对其他引起猪发病的主要病原菌的特异性。

1.7 多重 PCR 的敏感性试验

1.7.1 对细菌纯培养物的检测敏感性 对 SS、APP、HPS 的纯培养物分别进行平板计数后,将细菌的浓度调整至 1×10^9 CFU/ml,10 倍梯度稀释至 1×10^2 CFU/ml,提取其基因组进行多重 PCR 扩增。取 10.0 μ l PCR 扩增产物进行电泳,以确定多重 PCR 对细菌纯培养物的检测敏感性。

1.7.2 对组织样品的检测敏感性 对 SS、APP、HPS 的纯培养物分别进行平板计数后,将细菌的浓度调整至 1×10^7 CFU/ml,再 10 倍梯度稀释至 1×10^2

CFU/ml。用注射器吸取 0.5 ml 稀释好的菌液注入 2 g 未感染 SS、APP、HPS 病原的猪肺组织,用方法 1.4.2 提取猪肺组织中细菌基因组 DNA,进行多重 PCR 扩增。取 10.0 μ l PCR 扩增产物进行电泳,确定多重 PCR 对组织样品的检测敏感性。

1.8 SS、APP、HPS 多重 PCR 检测方法的临床应用

1.8.1 多重 PCR 法与细菌分离法检测结果的比较 30 份疑似感染 SS、APP、HPS 的发病猪肺组织来自江苏省不同地区猪场,对这些病料同时进行平板细菌分离检测和 PCR 检测。计算两种方法检测结果的符合率,符合率=(共同阳性数+共同阴性数)/所检样品 $\times 100\%$ 。

1.8.2 对表观健康猪鼻拭子的检测 将采集的 200 份表观健康猪鼻拭子分别放入含 5% 犍牛血清和 0.01% 的 NAD 的 TSB 培养液中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜,取菌液 1 ml 于 EP 管中,按照方法 1.4.1 提取细菌 DNA 用于多重 PCR 检测。

2 结果与分析

2.1 SS、APP、HPS 单一 PCR 扩增

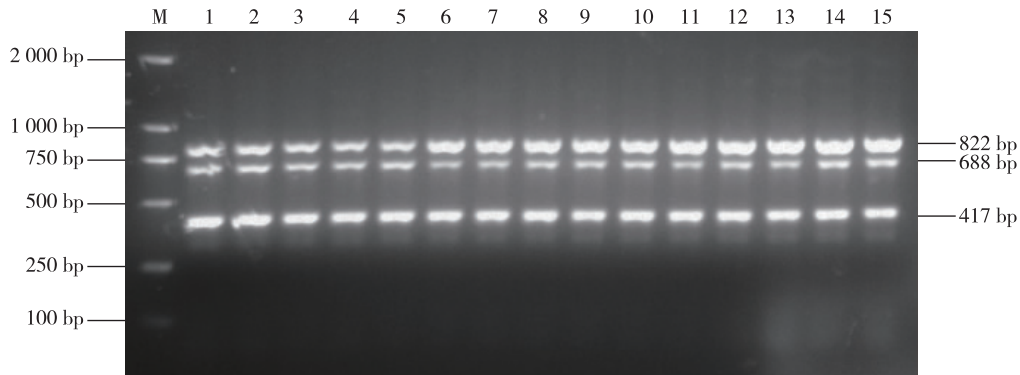
分别以 SS、APP、HPS 的基因组 DNA 为模板,在不同退火温度下进行单一 PCR 扩增。凝胶电泳检测结果显示:在退火温度为 58 $^{\circ}$ C 时,SS、APP、HPS 能扩增出相应分子量大小的目的片段(分别为 688 bp、417 bp、822 bp),均无其他非特异性条带,且 PCR 产物明亮。因此确定三重 PCR 程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 终延伸 7 min。

2.2 SS、APP、HPS 多重 PCR 扩增最佳引物用量组合

将 SS、APP、HPS 的引物按不同浓度用量组合后进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物的凝胶电泳检测结果(图 1)表明,泳道 15 显示的 3 个条带最为明亮,且没有非特异性条带,故选取此引物浓度组合为最佳组合,即在 25.0 μ l PCR 反应体系中各引物用量为:SS 上下游引物各 1.6 μ l,APP 上下游引物各 0.5 μ l,HPS 上下游引物各 0.6 μ l,SS、APP 和 HPS 的上下游引物浓度皆为 10 nmol/ml。

2.3 PCR 产物的鉴定

采用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化扩增片段,将纯化的扩增产物连接 T 载体并进行鉴定,将鉴定为阳性的质粒进行序列测定。将所测序列与 GenBank



M: DL 2000 marker; 1~15 代表多重 PCR 扩增引物不同用量配比 (SS:APP:HPS) 组合, 1: 0.8 μ l: 0.5 μ l: 0.2; 2: 1.0 μ l: 0.5 μ l: 0.2; 3: 1.2 μ l: 0.5 μ l: 0.2; 4: 1.4 μ l: 0.5 μ l: 0.2; 5: 1.6 μ l: 0.2 μ l: 0.2; 6: 0.8 μ l: 0.5 μ l: 0.4; 7: 1.0 μ l: 0.5 μ l: 0.4; 8: 1.2 μ l: 0.5 μ l: 0.4; 9: 1.4 μ l: 0.5 μ l: 0.4; 10: 1.6 μ l: 0.5 μ l: 0.4; 11: 0.8 μ l: 0.5 μ l: 0.6; 12: 1.0 μ l: 0.5 μ l: 0.6; 13: 1.2 μ l: 0.5 μ l: 0.6; 14: 1.4 μ l: 0.5 μ l: 0.6; 15: 1.6 μ l: 0.5 μ l: 0.6。

图 1 多重 PCR 条件优化结果

Fig.1 Amplification of three bacteria by multiplex PCR with different proportions of primer concentrations

中收录的序列进行同源性比对, 结果表明, PCR 扩增片段均为相应的目的基因片段。

2.4 多重 PCR 的特异性

用建立好的 SS、APP、HPS 三重 PCR 方法检测 SS、APP、HPS 的基因组 DNA, 均有相应大小的特异 PCR 条带, 而对引起猪发病的主要细菌 (猪多杀性巴氏杆菌、猪大肠杆菌、猪放线杆菌、猪葡萄球菌、猪丹毒杆菌、猪沙门氏菌) 基因组 DNA 模板均无任何扩增产物 (图 2), 说明所建立的 SS、APP、HPS 多重 PCR 具有良好的特异性

2.5 多重 PCR 法对细菌纯培养物的检测敏感性

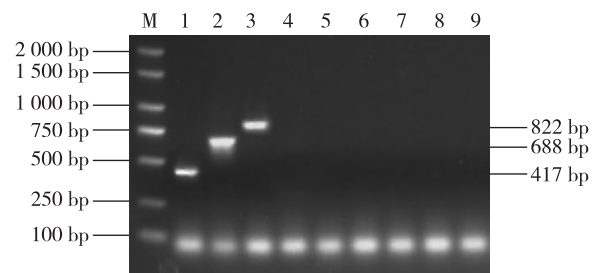
对 SS、APP、HPS 的纯培养物分别进行平板计数后, 将细菌的浓度调整至 1×10^9 CFU/ml, 10 倍梯度稀释后提取其基因组进行多重 PCR 扩增 (图 3)。由图 3 可知, 该三重 PCR 法对 SS、APP、HPS 纯培养物的敏感性分别为 1×10^4 CFU/ml、 1×10^3 CFU/ml、 1×10^3 CFU/ml。

2.6 多重 PCR 法对组织样品的检测敏感性

对人工模拟感染样品进行检测, 结果 (图 4) 表明, 用所建立的多重 PCR 方法可以不用增菌而直接检测组织样品, 整个检测过程约为 3.0 h, 对 SS、APP、HPS 感染样品的敏感性均为 1×10^4 CFU/ml。

2.7 SS、APP、HPS 多重 PCR 方法的临床检测

对采集的 30 份疑似病例同时进行平板细菌分离后 PCR 检测和本试验建立的多重 PCR 检测。结果显示: 细菌分离法检测到 3 株 HPS、3 株 APP、10 株 SS, 多重 PCR 法检测到 4 株 HPS、3 株 APP、11 株



M: DL 2000 marker; 1: 猪胸膜肺炎放线杆菌 (APP); 2: 猪链球菌 (SS); 3: 副猪嗜血杆菌 (HPS); 4: 猪多杀性巴氏杆菌; 5: 猪大肠杆菌; 6: 猪放线杆菌; 7: 猪葡萄球菌; 8: 猪丹毒杆菌; 9: 猪沙门氏菌。

图 2 多重 PCR 法的特异性

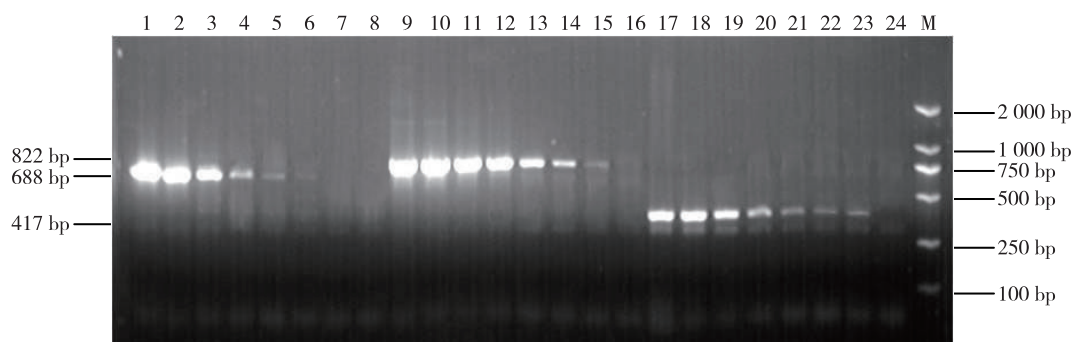
Fig.2 Specificity of the multiplex PCR

SS。2 种检测方法的符合率为 93%。说明不经增菌而直接从病料中提取基因组 DNA 进行多重 PCR 检测的方法是可行的。多重 PCR 法检测过程约为 4.5 h, 大大缩短了检测时间。

对 200 份临床健康猪的鼻拭子进行液体培养, 提取基因组 DNA, 用多重 PCR 法对基因组 DNA 进行检测。检测结果表明, SS、APP、HPS 阳性分别为 160 份、3 份和 45 份 (包含二重感染和三重感染), 阳性率分别为 80.0%、1.5% 和 22.5%; 同时感染 2 种病原的样品有 12 份, 占总病料的 6%; 同时感染 3 种病原的样品有 3 份, 占总病料的 1.5%。

3 讨论

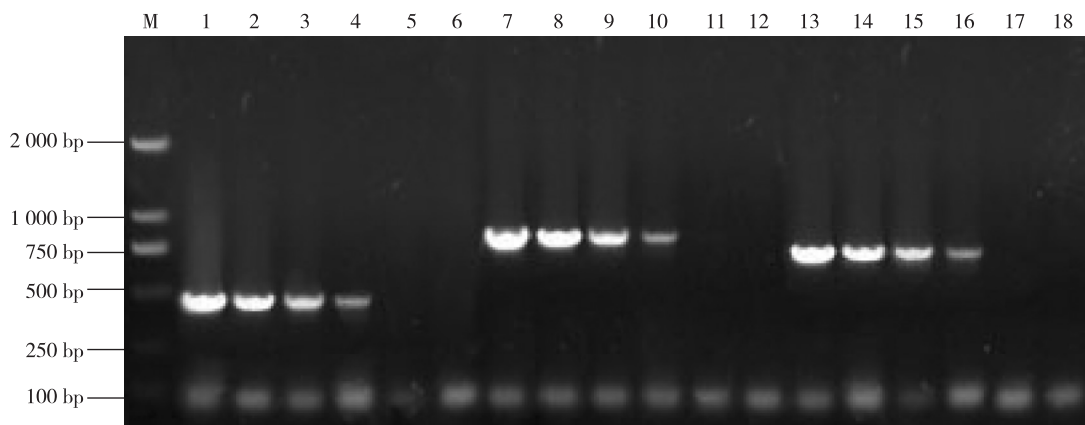
SS、APP、HPS 引起的疾病临床症状极为相似, 通



1~8:SS 菌液浓度依次为 1×10^9 CFU/ml、 1×10^8 CFU/ml、 1×10^7 CFU/ml、 1×10^6 CFU/ml、 1×10^5 CFU/ml、 1×10^4 CFU/ml、 1×10^3 CFU/ml、 1×10^2 CFU/ml; 9~16:HPS 菌液浓度依次为 1×10^9 CFU/ml、 1×10^8 CFU/ml、 1×10^7 CFU/ml、 1×10^6 CFU/ml、 1×10^5 CFU/ml、 1×10^4 CFU/ml、 1×10^3 CFU/ml、 1×10^2 CFU/ml; 17~24:APP 菌液浓度依次为 1×10^9 CFU/ml、 1×10^8 CFU/ml、 1×10^7 CFU/ml、 1×10^6 CFU/ml、 1×10^5 CFU/ml、 1×10^4 CFU/ml、 1×10^3 CFU/ml、 1×10^2 CFU/ml。M: DL 2000 marker。

图 3 多重 PCR 法的敏感性试验结果

Fig.3 The sensitivity test of the multiple PCR assay to the bacterial culture



1~6:人工模拟感染组织样品的 APP 菌液浓度依次为 1×10^7 CFU/ml、 1×10^6 CFU/ml、 1×10^5 CFU/ml、 1×10^4 CFU/ml、 1×10^3 CFU/ml、 1×10^2 CFU/ml; 7~12:人工模拟感染组织样品的 HPS 菌液浓度依次为 1×10^7 CFU/ml、 1×10^6 CFU/ml、 1×10^5 CFU/ml、 1×10^4 CFU/ml、 1×10^3 CFU/ml、 1×10^2 CFU/ml; 13~18:人工模拟感染的组织样品 SS 菌液浓度依次为 1×10^7 CFU/ml、 1×10^6 CFU/ml、 1×10^5 CFU/ml、 1×10^4 CFU/ml、 1×10^3 CFU/ml、 1×10^2 CFU/ml; M:DL 2000 marker。

图 4 多重 PCR 对人工感染组织样品的敏感性

Fig.4 The sensitivity of the multiplex PCR to the artificially infected samples

过传统的临床症状观察以及病例解剖进行诊断,虽然快速简便,但只能做出初步判断。常用的血清学检测,具有较强的特异性,但不能区分自然感染与疫苗接种所产生的抗体,容易发生误诊。病原菌分离方法的检测周期长且难以达到某些病原菌的生长分离条件,其局限性较大。单一 PCR 方法,虽然特异性高,检测范围广,但难以应对目前多种病原混合感染的检测。因此,寻找一种适用范围广、高通量、特异性强、灵敏度高、快速准确的检测方法迫在眉睫^[29]。

通过 PCR 扩增条件的优化,确定 3 对引物的最

佳退火温度为 58 ℃。在单引物敏感性试验的基础上,通过优化引物用量组合,最后建立了多重 PCR 检测方法。细菌纯培养物的敏感性试验结果表明,建立的多重 PCR 检测方法能够检测的 SS、APP、HPS 最低浓度分别为 1×10^4 CFU/ml、 1×10^3 CFU/ml、 1×10^3 CFU/ml,说明本 PCR 方法有较高的敏感性。用本多重 PCR 法对其他常见的猪病病原体进行检测,结果均无特异性扩增,证明该方法具有较高的特异性,相比于其他多重 PCR 方法^[30],本方法的特异性更好。

分别用细菌分离法和多重 PCR 法检测 30 份发

病猪肺组织,通过对比发现两种方法检测结果的符合率达 93%,说明本多重 PCR 方法准确率较高。本多重 PCR 方法从 DNA 提取、PCR 扩增到琼脂糖凝胶电泳检测,整个过程仅需 4.5 h 左右,这为 SS、APP、HPS 的诊断提供了快速、准确而且敏感的方法,同时为动物及动物产品 SS、APP、HPS 的流行病学调查及疫情检测提供了技术支撑。

用建立的多重 PCR 方法对 200 份来自江苏省不同地区猪场的不同日龄表观健康猪鼻拭子样品进行检测,结果显示:SS 在猪场中感染率较高,达到 80.0%,APP 与 HPS 的感染率分别为 1.5% 和 22.5%。此外,我们对人工模拟感染的猪肺进行了检测,本检测法对 3 种病菌的敏感性均达到 1×10^4 CFU/ml,说明本多重 PCR 法可直接检测猪肺组织。

参考文献:

- [1] 王海丽,徐公义,赵德明.多重 PCR 检测猪链球菌种及主要致病血清型[J].江苏农业科学,2014,42(8):212-213,221.
- [2] 祝昊丹,倪艳秀,周俊明,等.猪链球菌丝氨酸/苏氨酸激酶基因缺失株的构建及其致病性[J].江苏农业学报,2014,30(6):1360-1368.
- [3] GOT SCHALK M, XU J, CAL ZAS C, et al. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen[J]. Future Microbiol, 2010, 5(3):371-391.
- [4] 王凤云,林峰,陈玉霞,等.猪瘟与猪链球菌病混合感染的诊断与防治[J].江苏农业科学,2014,42(9):183-185.
- [5] BAUMS C G, VERKUHLEN G J, REHM T, et al. Prevalence of *Streptococcus suis* genotypes in wild boars of Northwestern Germany[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(3):711-717.
- [6] 汪伟,何孔旺,倪艳秀,等.猪链球菌 2 型粘附相关因子荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].江苏农业学报,2014,30(3):560-566.
- [7] 纪少博,白雪梅,刘凯.我国不同地区健康猪猪链球菌检出率调[J].中国人兽共患病学报,2013,29(5):423-426.
- [8] 祝昊丹,倪艳秀,周俊明,等.猪链球菌 2 型丝氨酸/苏氨酸磷酸酶的鉴定和特性分析[J].江苏农业学报,2014,30(3):548-553.
- [9] 胡巧云,袁小宁,熊毅,等.2 型猪链球菌 SspA 基因序列及其免疫原性分析[J].南方农业学报,2015,46(7):1310-1314.
- [10] 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.
- [11] 王涛,陈广仁,蔡丙严.猪传染性胸膜肺炎放线杆菌的分离鉴定与药敏试验[J].江苏农业科学,2014,42(10):207-208.
- [12] 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.
- [13] 邹捷,姜永康,曹国文,等.四川猪嗜血杆菌胸膜肺炎血清学调查[J].动物检疫,1990(6):21-22.
- [14] 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.
- [15] 张俊,张飞,文心田,等.四川地区猪传染性胸膜肺炎流行病学调查[J].中国预防兽医学报,2015,37(8):608-610.
- [16] 陈天寿.微生物培养基的制造与应用[M].北京:中国农业出版社,1995:257-343.
- [17] 苏丹萍,王文豪,张显浩,等.高致病性猪繁殖与呼吸综合征、猪圆环病毒和副猪嗜血杆菌病混合的诊断和防治[J].中国畜牧兽医,2012,39(8):186-189.
- [18] 鲁杏华,朱中武,谈志祥,等.规模化猪场圆环病毒 2 型和副猪嗜血杆菌混合感染[J].中国兽医杂志,2010,46(3):46-48.
- [19] 刘正飞,蔡旭旺,陈焕春.传染性副猪嗜血杆菌的研究进展[J].养殖与饲料,2004(10):7-10.
- [20] 马增军,芮萍,杨宗泽.副猪嗜血杆菌主要生物学特性测定[J].黑龙江畜牧兽医,2005(1):41-42.
- [21] 李建华,沈峻宇,杨嵩.阉中市副猪嗜血杆菌病的分子流行病学调查及主要血清型确定[J].四川畜牧兽医,2015(8):23-26.
- [22] 祁玮,魏彦明.一例仔猪副猪嗜血杆菌病的诊治[J].兽医临床,2015(45):44-45.
- [23] 洪江庭.一起非典型副猪嗜血杆菌病案例分析[J].福建畜牧兽医,2015(4):37-38.
- [24] 徐志伟,薛爽.猪伪狂犬病与副猪嗜血杆菌混合感染的病例[J].畜牧兽医杂志,2015(6):104-105.
- [25] 陈高,刘运镇.滨海县部分猪场副猪嗜血杆菌病的血清学调查与药敏试验[J].江苏农业科学,2013(2):181-182.
- [26] OGI O, MICHAEL O C, EILEEN S. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 218:79-84.
- [27] ZHOU L, JONES S C, ANGEN O, et al. A multiplex PCR that can distinguish between immunologically cross-reactive serovar 3, 6 and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains[J]. Clin Microbiol, 2008, 46:800-803.
- [28] OLIVEIRA S, GALINA L, PI J C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections [J]. J Vet Diagn Invest, 2001, 13(6):495-501.
- [29] OPRIESSNIG T, GIMENEZ-LIROLA L G, HALBUR P G. Polymicrobial respiratory disease in pigs[J]. Anim Health Res Rev, 2011, 12(2):133-148.
- [30] 朱吕昌,陈义平,李明义,等.猪胸膜肺炎放线杆菌、多杀性巴氏杆菌和副猪嗜血杆菌复合 PCR 检测方法的建立[J].中国动物检疫,2008,25(11):22-25.

(责任编辑:张震林)