

# 复合 PCR 鉴定胸膜肺炎放线杆菌方法的建立及初步应用

李树清<sup>1</sup> 易建平<sup>1</sup> 陈志飞<sup>1</sup> 王巧全<sup>1</sup> 周筱华<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 上海出入境检验检疫局 上海 200135)

(<sup>2</sup> 华南农业大学兽医学院 广州 510642) (<sup>3</sup> 上海大学生命科学学院 上海 200444)

**摘 要** 根据胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, App) *apxIVA* 毒素基因序列和 16S rRNA 序列分别设计了一对特异性引物 P1/P4 和一对通用引物 S7/S10, 建立了检测 App 全部 15 个血清型的复合 PCR 方法。对 App 的 15 个血清型国际参考株和国内的 11 个 App 菌株进行检测, 都能得到 363bp 和 692bp 的两个扩增片段。而放线杆菌等 13 株参考菌株只能得到 692bp 的扩增片段。该方法能将 15 个血清型的 App 菌株鉴定到种。检测的灵敏度达 9pg DNA/1300CFU。用建立的方法检测临床分离的 302 株可疑菌株, 阳性 4 株, 与其它鉴定方法相符。结果表明复合 PCR 可用于 App 菌株的鉴定。

**关键词** 胸膜肺炎放线杆菌, 复合 PCR, 鉴定

中图分类号: S852.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2005)06-0966-04

猪传染性胸膜肺炎是由胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, App)引起的猪的一种高度传染性呼吸道疾病。至今报道有 2 个生物型共 15 个血清型<sup>[1]</sup>。所有血清型都可能致病, 血清型之间致病严重程度有显著差异<sup>[2]</sup>。对分离菌株的鉴定是最重要的诊断方法之一。常规的生化方法鉴定不仅费时, 而且 App 的生化特性不是十分活泼, 常表现为迟发酵反应, 给可疑菌株的鉴定带来了困难。因此, 国内外学者都致力于建立分子生物学的鉴定方法<sup>[3-7]</sup>, 特别是以 App 毒力因素中编码毒素蛋白的 *apx I*、*apx II*、*apx III* 3 种毒素基因作为目标基因。但由于没有任何一种毒素基因存在于所有血清型的 App 中, 不可能使用一对引物同时鉴定所有血清型的 App。直到 1999 年 Alain Schaller<sup>[8]</sup>报道所有血清型的 App 都具有 *apxIVA* 基因, 且该基因 3' 端非常保守, 具有种特异性。使用一对引物同时鉴定所有血清型的 App 成为可能。为了准确快速的鉴定所有已知的 App 15 个血清型的菌株, 本研究针对 App 的 *apxIV* 基因的序列和 16S rRNA 序列分别设计了特异性引物 P1/P4 和通用引物 S7/S10, 建立了鉴定 App 15 个血清型的复合 PCR 方法, 并作了初步应用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌株** App 的 16 个参考菌株(表 1 中 No. 1~16)均引自丹麦兽医研究所, 血清型为 1~15 型, 其中 5 型为 5A 及 5B 2 株。另有 11 个国内 App 菌株(No. 17~27), 8 个放线杆菌参考株(No. 28~35)及 5 株其它猪源致病菌(No. 36~40)如溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*)、多杀性巴氏杆

菌(*Pasteurella multocida*)。华南农业大学 2004 年 1 月 14 日提供的可疑菌株 16 株。临床分离可疑菌株 286 株。分离材料为华南农业大学 2004 年 2 月 21 日提供 7 份猪肺组织病料, 2004 年 3 月 20 日提供 AppS1 型人工感染 35 号猪肺组织、与 35 号猪同居的 24 号猪肺门淋巴结。上海检验检疫局浦江分局 2004 年 2 月 17 日从上海金山大昌屠宰场、3 月 25 日从上海新农猪场采集的临床健康的猪肺、扁桃体和鼻拭子等样品共 51 份。

**1.1.2 主要试剂** *Taq* DNA polymerase、dNTP Mix、MgCl<sub>2</sub>、10× *Taq* buffer 均购自上海生工生物工程技术有限公司; DNA marker DL2000 购自大连宝生物公司; NaI(β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)购自国药集团化学试剂有限公司; 电泳琼脂糖为加拿大 Bio Basic Inc. 产品; PPLQ(类胸膜肺炎微生物培养基)为美国 DIFCO 公司产品。

**1.1.3 主要仪器** DNA 扩增仪(MJ Research Minicycle PTC-225), 凝胶分析成像系统(BIO-RAD Gel DOC-2000), 核酸蛋白分析仪(Eppendorf Biophotometer), 微生物自动分析仪(VITEK-AMS M-128), 台式高速低温离心机(BECKMAN ALLEGRA 64R)。

### 1.2 引物设计

根据 GenBank 中 App 的 *apxIVA* 毒素基因和 16S rRNA 序列设计了一对特异性引物 P1/P4 和通用引物 S7/S10, 引物由上海基康公司合成。引物序列如下: 引物 P1: 5'-CGTAACTCGGTGATTGATGC-3'; 引物 P4: 5'-CGTTTGCTCATT CGATAAACG-3'。引物 S7: 5'-CTTTAGGGAGGGGTAGAATT-3'; 引物 S10: 5'-GATTACTAGCGATTCCGACTT-3'。P1、S7 为上游引物, P4、S10 为下游引物。

基金项目: 上海市科委标准专项基金资助(02DZ05026)

作者简介: 李树清(1964-), 女, 四川眉山人, 高级兽医师, 硕士, 从事进出口动物检疫工作。Tel: 86-21-68544059; Fax: 86-21-68546620; E-mail: lisq@shciq.gov.cn

其他作者: 罗满林<sup>2</sup>, 方怡<sup>3</sup>, 陈敏<sup>1</sup>, 夏谦<sup>1</sup>

收稿日期: 2005-03-03, 修回日期: 2005-07-01

表 1 试验用 App 及参考菌株

Table 1 App and reference strains used in test				
No.	Name	Strain	Serotype	Origin
1	<i>A. pleuropneumoniae</i>	4074	1	DVI
2	<i>A. pleuropneumoniae</i>	1536	2	DVI
3	<i>A. pleuropneumoniae</i>	1421	3	DVI
4	<i>A. pleuropneumoniae</i>	M62	4	DVI
5	<i>A. pleuropneumoniae</i>	K17	5A	DVI
6	<i>A. pleuropneumoniae</i>	L20	5B	DVI
7	<i>A. pleuropneumoniae</i>	Fem $\phi$	6	DVI
8	<i>A. pleuropneumoniae</i>	WF83	7	DVI
9	<i>A. pleuropneumoniae</i>	405	8	DVI
10	<i>A. pleuropneumoniae</i>	13261	9	DVI
11	<i>A. pleuropneumoniae</i>	13039	10	DVI
12	<i>A. pleuropneumoniae</i>	56153	11	DVI
13	<i>A. pleuropneumoniae</i>	8329	12	DVI
14	<i>A. pleuropneumoniae</i>	N273	13	DVI
15	<i>A. pleuropneumoniae</i>	3906	14	DVI
16	<i>A. pleuropneumoniae</i>	HS 143	15	DVI
17	<i>A. pleuropneumoniae</i>	259	1	CVCC
18	<i>A. pleuropneumoniae</i>	260	2	CVCC
19	<i>A. pleuropneumoniae</i>	261	3	CVCC
20	<i>A. pleuropneumoniae</i>	262	4	CVCC
21	<i>A. pleuropneumoniae</i>	264	6	CVCC
22	<i>A. pleuropneumoniae</i>	265	7	CVCC
23	<i>A. pleuropneumoniae</i>	266	8	CVCC
24	<i>A. pleuropneumoniae</i>	267	9	CVCC
25	<i>A. pleuropneumoniae</i>	268	10	CVCC
26	<i>A. pleuropneumoniae</i>	HUIZHOU	7	HNAU
27	<i>A. pleuropneumoniae</i>	ZHUHAI	1	HNAU
28	<i>A. lignieresii</i>	P670		DVI
29	<i>A. lignieresii</i>	P155		DVI
30	<i>A. lignieresii</i>	P671		DVI
31	<i>A. lignieresii</i>	ATCC 49236 ( NCTC 4189 )		DVI
32	<i>A. minor</i>	NM 305		DVI
33	<i>A. rossii</i>	ATCC 27072		DVI
34	<i>A. suis</i>	CAPM ( CCM ) 5586		DVI
35	<i>A. equuli</i>	NCTC 8529		DVI
36	<i>Mannheimia ( Pasteurella ) haemolytica</i>	NCTC 9380		DVI
37	<i>Pasteurella aerogenes</i>	ATCC 27883		DVI
38	<i>Pasteurella multocida</i>	CCUG 17976B		DVI
39	<i>S. pneumoniae</i>	ATCC 27336		SHCIQ
40	<i>E. coli</i>	ATCC 44338'		SHCIQ

DVI : Danish Veterinary Institute ; CVCC : Center for Veterinary Culture Collection ; HNAU : Huanan Agriculture University ; SHCIQ : Shanghai Export and Import Inspection and Quarantine Bureau .

1.3 菌株的培养和 DNA 提取

表 1 中 1 ~ 12 ,15 型 App 菌株和 *A. minor* 涂布接种于添加 0.07% NAD 的 PPLO 巧克力琼脂平板上<sup>[ 3 ]</sup> ,其它菌株涂布接种于普通血琼脂平板上 ,在 5% CO<sub>2</sub> 条件下 ,37℃ 培养 24h 后用灭菌水洗下平板上的菌落 ,离心后收集的细菌按文献 [ 9 ] 的方法提取 DNA。

1.4 PCR 反应和产物测序

30 $\mu$ L PCR 反应体系 ,10  $\times$  Taq buffer 3 $\mu$ L ,25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3 $\mu$ L 2.5mmol/L dNTP Mix 3 $\mu$ L ;引物 S7 和 S10 各 0.5 $\mu$ L ,P1 和 P4 各 0.75 $\mu$ L( 引物浓度均为 5 $\mu$ mol/L ) ;1 $\mu$ L DNA 模板( 10 ~ 20ng ) 5U/ $\mu$ L Taq DNA 聚合酶 0.2 $\mu$ L ,补充水至 30 $\mu$ L。 PCR 反应条件 :94℃ 3min ,94℃ 30s ,55℃ 30s ,72℃ 45s ,35 个循环 ; 72℃ 5min。 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 1  $\times$  TAE 缓冲液中电泳 , EB 染色后用凝胶成像系统分析。

引物 S7/S10 扩增菌株 HS143 和 HUIZHOU 的 PCR 产物和引物 P1/P4 扩增菌株 HS143、M62、261、HUIZHOU 和 ZHUHAI 的 PCR 产物由上海基康公司双向测序。对序列结果进行分析并与 GenBank 中 App 菌株的相应序列比较。

1.5 灵敏度试验

核酸蛋白分析仪测量菌株 56153 的 DNA 浓度 ,系列 10 倍稀释后进行 PCR 反应 ,以 PCR 反应检测 DNA 的含量的灵敏度。将菌株 1421 的细菌悬浮液系列 10 倍稀释后进行平板记数和 PCR 反应 ,以 PCR 反应检测细菌含量的灵敏度。

1.6 可疑菌株的分离和鉴定

肺、扁桃体等组织样品及鼻拭子按文献[ 10 ,11 ]分离 App ,挑选边缘整齐 ,半透明 ,中间呈灰白色的光滑闪光 ,直径 1mm 左右的菌落 ,接种于 PPLO 巧克力培养基上 ,5% CO<sub>2</sub> 条件下 ,37℃ 培养 24h 进行纯化 ,革兰氏染色阴性的为可疑菌落。

送检或纯化的可疑菌株每个挑取少量菌落分别于 100 $\mu$ L pH 7.2 0.01mol/L PBS 中混匀后 ,用 PBS 进行 10 倍、100 倍稀释。原液、10 倍、100 倍稀释液分别取 1 $\mu$ L 作为复合 PCR 扩增的模板。PCR 反应体系中加入 1% 灭菌 Tween-20。将 1.4 中反应循环参数 94℃ 3min 改为 96℃ 6min ,其他条件相同。PCR 阳性菌株进行 CAMF( 以 Christie、Athins 和 Munch-Peterson 3 人的姓命名的 ,用于无乳链球菌检验的试验方法 ) 试验<sup>[ 12 ]</sup> 及血清凝集试验进行验证。部分阴性菌株用微生物自动分析仪进行鉴定。

2 结果

2.1 PCR 检测和扩增产物的测序

供试的 App27 个菌株经过 PCR 扩增后 ,都能出现 692bp 和 363bp 的两条扩增产物 ,其中通用引物 S7/S10 的扩增产物为 692bp ,App 特异引物 P1/P4 的扩增产物为 363bp。其余的 13 个参考菌株只有通用引物的扩增产物 692bp( 图 1 )。表明引物 P1/P4 能特异性的扩增 App。

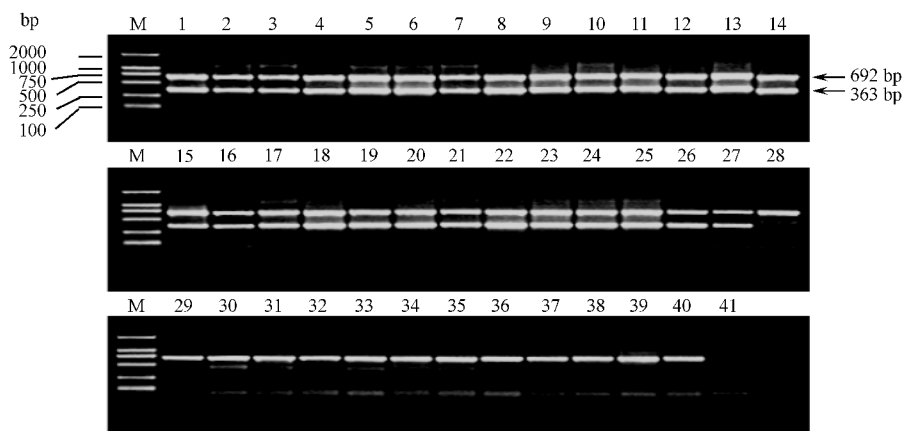


图1 引物 S7/S10 和 P1/P4 扩增 App 及参考菌株的 PCR 产物电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification products from App and reference strains

M. 2000bp DNA ladder; 1~16. PCR products from DNA of strain 4074, 1536, 1421, M62, K17, L20, Femø, WF83, 405, 13261, 13039, 56153, 8329, N273, 3906, HSI43; 17~27. PCR products from DNA of strain 259, 260, 261, 262, 264, 265, 266, 267, 268, HUIZHOU, ZHUHA; 28~40. PCR products from DNA of strain P670, P155, P671, ATCC 49236, NM 305, ATCC 27072, CAPM 5586, NCTC 8529, NCTC 9380, ATCC 27883, CCUG 17976B, ATCC 27336, ATCC 44338; 41. Negative control.

## 2.2 灵敏度试验

用 PCR 扩增菌株 56153 的 DNA 不同浓度和菌株 1421 的不同稀释度菌悬液(图 2、3)。图 2 中,菌株 56153 的 DNA 稀释度分别为每 1 $\mu$ L 含 DNA 9ng、900pg、90pg、9pg、0.9pg,前 4 个稀释度都出现阳性扩增,最后一个稀释度及空白对照无扩增,PCR 最低检出 DNA 浓度为 9pg。图 3 中,菌株 1421 菌悬液的稀释度分别为每 1 $\mu$ L 含  $1.3 \times 10^6$  CFU、 $1.3 \times 10^5$  CFU、 $1.3 \times 10^4$  CFU、 $1.3 \times 10^3$  CFU、 $1.3 \times 10^2$  CFU、 $1.3 \times 10^1$ ,前 4 个稀释度有扩增,PCR 最低可检测 1300 个细菌。

引物 S7/S10 扩增 HSI43 和 HUIZHOU 的 PCR 产物序列与 GenBank 中的 App (AY017472) 的同一段序列比较,同源性为 100%。引物 P1/P4 扩增 HSI43、M62、261、HUIZHOU 和 ZHUHAI 的 PCR 产物序列与 GenBank 中的 App (AF188867) 的同一段序列比较,同源性为 100%。结果表明通用引物和特异性引物都能扩增并得到目的片段。

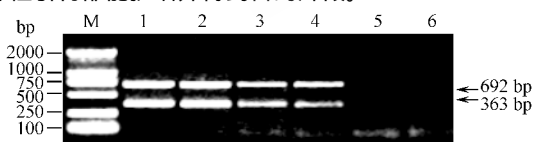


图2 引物 S7/S10 和 P1/P4 扩增菌株 56153 不同浓度 DNA 的 PCR 产物电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification products from DNA of strain 56153

M. 2000bp DNA ladder; 1~5. PCR products from diluted DNA of strain 56153 of 9ng, 900pg, 90pg, 9pg, 0.9pg; 6. Negative control.

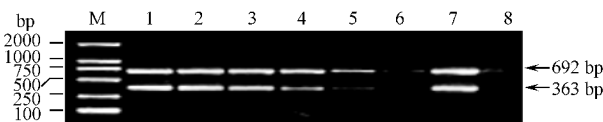


图3 引物 S7/S10 和 P1/P4 扩增菌株 1421 不同细菌数的 PCR 产物电泳图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification products from strain 1421

M. 2000bp DNA ladder; 1~6. PCR products from 1421 bacteria of  $1.3 \times 10^6$  CFU,  $1.3 \times 10^5$  CFU,  $1.3 \times 10^4$  CFU,  $1.3 \times 10^3$  CFU,  $1.3 \times 10^2$  CFU,  $1.3 \times 10^1$  CFU; 7. PCR product from DNA of strain 56153; 8. Negative control.

## 2.3 可疑菌株的复合 PCR 鉴定

经检测,华南农业大学提供的革兰氏阴性可疑菌株 16 株,全部为阴性;从华南农大提供猪肺组织病料中分离的 43 个菌株及从上海金山大昌屠宰场、上海新农猪场采集的临床健康的猪肺、扁桃体和鼻拭子等样品中分离 230 个菌株,全部为阴性;从华南农大提供的人工感染样品中分离菌株 13 株,4 株阳性。阳性菌株均有 CAMP 现象(胸膜肺炎放线杆菌生物 I 型菌生长需要 V 因子,即  $\beta$ -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸。金黄色葡萄球菌可以产生较多的 V 因子,当金黄色葡萄球菌在血培养基上划线时,胸膜肺炎放线杆菌在金黄色葡萄球菌  $\beta$ -溶血素周围产生一个不断增大的溶血区,越靠近金黄色葡萄球菌划线的菌苔,溶血区越大,形似杯状,这一现象称为 CAMP 现象)与 S1 型标准阳性血清均产生凝集,其中一株阳性分离菌(35-1)的 PCR 扩增见图 4。从华南农大送检的可疑菌株中选出 9 株用全自动细菌鉴定仪鉴定,其中大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 6 株,臭鼻克雷伯菌 (*Klebsiella ozaenae*) 2 株,肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 1 株。

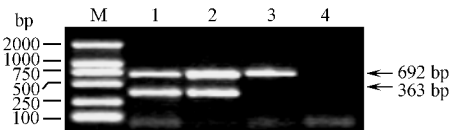


图4 引物 S7/S10 和 P1/P4 扩增产物电泳图

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification products from isolate of sample

M. 2000bp DNA ladder; 1. PCR product from bacterium isolated from lung; 2. PCR product from DNA of strain 1421; 3. PCR product from DNA of strain p670; 4. Negative control.

## 3 讨论

胸膜肺炎放线杆菌 *apxIVA* 毒素基因 3'端非常保守,具有种特异性<sup>[8]</sup>。本文根据该基因序列设计的一对特异性引物 P1/P4,可扩增 App 的全部 15 个血清型。国外学者 Mateus<sup>[13]</sup> 和 Schaller<sup>[10]</sup> 也针对该基因序列建立了 App 检测方法。前者建立的方法可鉴定 1~12 血清型 App 及猪放线杆菌等相关菌株。后者可检测 App 14 个血清型,可能当时报道 App 只有 14 个血清型。Blackall 2002 年<sup>[1]</sup>才报道 App 第 15 个血清型。作者在试验中,用 Schaller 的引物扩增血清 15 型,同样能得

到与其它型一样的特异扩增产物,说明 Schaller 建立的 App 检测方法也可特异检测 App 的全部 15 个血清型。试验中, Schaller 根据 *E. coli* 16S rRNA gene 设计了通用引物,监测 DNA 提取结果,作为技术控制,但没有将两对引物放在同一体系中进行 PCR 反应。本文根据放线杆菌 16S rRNA 序列设计的通用引物 S7/S10,使 App 及与 App 同源性相近的菌种,都能扩增出来,并且将特异引物和通用引物放在同一体系中进行复合 PCR 反应,节约了时间和成本,增加了 PCR 过程中的质量控制体系,完善了试验方法。

本文应用建立的复合 PCR 方法,扩增 9 个国内 App 菌株及 2 个临床分离 App 菌株,都能得到与 16 个 App 国际标准菌株相同的两个目的片段。而与 App 基因同源性相近的林氏放线杆菌(*A. lignieresii*)、猪放线杆菌(*A. suis*)等参考菌株仅有通用引物扩增的一条目的片段,证明试验方法的特异性。应用建立的复合 PCR 方法,鉴定出的 4 株阳性菌株均有 CAMP 现象,并与标准阳性血清产生凝集。说明复合 PCR 鉴定的准确性。挑选 9 株 PCR 阴性的分离菌株用微生物自动分析仪进行具体菌株的鉴定(鉴于微生物自动分析仪成本较高,没有将全部 PCR 阴性菌株进行鉴定)结果为大肠杆菌等非 App 菌株,进一步证明复合 PCR 鉴定方法的准确性。

4 株阳性 App 菌株均分离自人工感染组织,其中人工感染 35 号猪肺组织的触片,经培养后在 PPLO 巧克力培养基上出现均匀一致的菌落,任意挑选 3 个,均为阳性。试验证明,从急性发病猪组织中易分离到 App 菌株,而临床健康的猪组织很难分离到 App 菌株,与国外报道<sup>[14]</sup>一致。

建立的复合 PCR 方法不仅特异、准确,还具有快速的特点。常规的生化鉴定至少需要 24h,而 PCR 鉴定可在 3h 内完成,一次可鉴定大量的菌株。由于该方法可鉴定所有血清型的 App 菌株鉴定中不易造成漏检。本文建立的复合 PCR 鉴定 App 的方法可应用于临床分离菌株的常规鉴定。

致谢 本研究得到潘良文、沈禹飞、张舒亚、李晓红、张树宏、梁金华等同志的帮助;本文承蒙南京农业大学陆承平教授审阅,在此一并致谢。

## 参 考 文 献

- [1] Blackall P J, Klaasen H, Van Den Bosch H, *et al.* Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet Microbiol*, 2002, **84**: 47–52.
- [2] Øystein A, Jannie J, Dorte T L. Evaluation of 5' nuclease assay for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Clin Microbiol*, 2001, **39**(1): 260–265.
- [3] 刘军发, 何启盖, 陈焕春, 等. 用 PCR 检测猪胸膜肺炎放线杆菌. *华中农业大学学报*, 2001, **20**(2): 156–158.
- [4] Gram T, Ahrens P, Andreassen M, *et al.* An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR typing system based on the *apx* and *omlA* genes-evaluation of isolates from lungs and tonsils of pigs. *Vet Microbiol*, 2000, **75**(1): 43–57.
- [5] Savoye C, Jobert L, Berthelot H F. A PCR assay used to study aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from samples of live pigs under experimental conditions. *Vet Microbiol*, 2000, **73**: 337–347.
- [6] 王牟平, 刘思国. 猪传染性胸膜肺炎 PCR 诊断方法的建立. *中国兽医学报*, 2003, **23**(4): 305–309.
- [7] Terry M L, Christine K W, Thomas J I. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**(6): 1704–1710.
- [8] Schaller A, Rolf K, Peter K, *et al.* Characterization of *apx* IV A, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology*, 1999, **145**: 2105–2116.
- [9] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al.* 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [10] Schaller A, Steven P D, Graeme J E, *et al.* Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene *apx* IV A. *Vet Microbiol*, 2001, **79**: 47–62.
- [11] 梁金华, 刘镇明, 顾万军, 等. 猪胸膜肺炎放线杆菌的分离及 PCR 诊断方法的建立. *中国预防兽医学报*, 2004, **26**(1): 36–38.
- [12] 孔繁瑶, 蔡宝祥, 王 志, 等. 兽医大辞典. 北京: 中国农业出版社, 1999: 558.
- [13] Mateus M C, Catia S K, Raquel B, *et al.* Evaluation of PCR based on gene *apx* IV A associated with 16S rDNA Sequencing for the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and related species. *Current Microbiology*, 2004, **48**: 189–195.
- [14] Marc S, Edmond G L, Roger C L. Construction of a DNA probe and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1991, **29**(6): 1183–1187.

## Development and application of multiplex-PCR for identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*

LI Shu-qing<sup>1\*</sup> YI Jian-pin<sup>1</sup> CHEN Zhi-fei<sup>1</sup> WANG Qiao-quan<sup>1</sup> ZHOU Xiao-hua<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Shanghai Export and Import Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

(<sup>2</sup> College of Veterinary Medicine, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

(<sup>3</sup> College of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

**Abstract:** A multiplex-PCR assay was developed to identify *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App). Two pairs of polymerase chain reaction (PCR) primers were designed for the 16S rRNA and the *apx* IV A gene, which is specific to all serotypes of App. Two PCR products of 692bp and 363bp were obtained, from the 16S rRNA and the *apx* IV A gene respectively, for 27 reference *A. pleuropneumoniae* strains. Only the 692bp fragment was amplified for closely related strains including *A. lignieresii*. Using the designed primers, the method is capable of detecting *A. pleuropneumoniae* of as low as  $1.3 \times 10^3$  CFU or 9pg DNA. For 302 suspected isolates, this multiplex-PCR method correctly identified 4 *A. pleuropneumoniae* strains. The result suggests the use of the multiplex-PCR for routine identification of App.

**Key words:** *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Multiplex-PCR, Identification

Foundation item: Shanghai Municipal Committee of Science and Technology(02DZ05026)

\* Corresponding author. Tel 86-21-68544059, Fax 86-21-68546620, E-mail: lisq@shciq.gov.cn

Other authors: LUO Man-lin<sup>2</sup>, FANG Yi<sup>3</sup>, CHEN Min<sup>1</sup>, XIA Qian<sup>1</sup>

Received date 03-03-2005