

胸膜肺炎放线杆菌毒素 apxIVA 基因的克隆与表达及间接 ELISA 方法的建立

Cloning and Expression of the *apxIVA* Gene of *Actionbacillus pleuroneumoniae* and Development of an Indirect ApxIVA-ELISA

黄红亮, 周 锐, 陈美玲, 刘建杰, 徐晓娟, 陈焕春*

HUANG Hong-Liang, ZHOU Rui, CHEN Mei-Ling, LIU Jian-Jie, XU Xiao-Juan and CHEN Huang-Chun*

华中农业大学动物医学院动物病毒室, 武汉 430070

Laboratory of Animal Virology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

摘 要 参照 APP 血清 1 型 apxIVA 基因序列合成了一对特异性引物, 从本实验室分离鉴定的胸膜肺炎放线杆菌 (APP) 血清 2 型中扩增了 apxIVA 基因 5' 端 2445bp 的片段。将该片段克隆到原核表达载体 pET-28b 的 T7 启动子下游, 与 6×His Tag 融合, 再转化大肠杆菌 BL21(DE3), 在 IPTG 的诱导下表达大小约 90kD 的蛋白。表达产物以包涵体的形式存在, 且能与 APP 标准阳性血清发生特异性反应。将包涵体变性和复性后被酶标板建立了间接 ELISA 方法 (ApxIVA-ELISA), 特异性良好。用 ApxIVA-ELISA 检测猪胸膜肺炎三价 (1、2 和 7 型) 灭活菌苗和基因工程类毒素菌苗免疫猪血清抗体均为阴性, 而 1、2、7 型 APP 活菌感染动物的血清抗体均为阳性。实验证明, ApxIVA-ELISA 不仅可以用于检测所有血清型 APP 的抗体, 而且还可以用于 APP 自然感染猪和灭活菌苗免疫猪的鉴别诊断。

关键词 胸膜肺炎放线杆菌, ApxIV, 克隆与表达, ELISA, 鉴别诊断

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)02-0294-06

Abstract Apx IV, a forth RTX toxin indentified in *Actionbacillus pleuropneumoniae* recently, is expressed by all *A. pleuropneumoniae* regardless the serotypes and inducible only *in vivo* toxin, so it is the optimal to develop species-specific and differentiated diagnostic assay. Here the 2445bp DNA fragment of apxIVA gene of *A. pleuroneumoniae* was amplified and fused in-frame to the downstream of the T7 promoter and 6 His Tag of the prokaryotic expression vector pET-28b. The construct was transformed into *E. coli* BL21(DE3). After induction by 1.0 mol/L IPTG, a recombinant protein about 90kD in size, designed as ApxIVAN, was detected, which was present as inclusion bodies and reacted specifically with swine antisera to the APP-serotype-1 by dot-blot. An indirect ELISA (ApxIVA-ELISA) was developed using purified recombinant ApxIVAN from the inclusion bodies as described previously, which had excellent specificity to *A. pleuroneumoniae*. Using the ApxIVA-ELISA, the ApxIV antibodies were not detected in the inactivated APP bacterins vaccinated pigs, but were detected in *A. pleuropneumoniae*

Received: August 30, 2004; Accepted: October 25, 2004.

This work was supported by Grants from Special Research Foundation of Important Technology of Agricultural Structure Reform (No.04-10-01A) and China Postdoctoral Sciences Foundation (No.20040350179).

* Corresponding author. Tel: 86-27-87282608; E-mail: hzauvet@public.wh.hb.cn

农业结构调整重大技术研究专项 (No.04-10-01A) 和中国博士后基金 (No.20040350179)。

serotype 1, 2 and 7 infected pigs and mice. These results suggested that *ApxIVA*-ELISA can be used not only to detect all serotypes of APP, but also to differentiate the naturally infected and inactivated vaccine immunized pigs.

Key words *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *apxIVA*, cloning and expression, ELISA, differentiating diagnosis

猪传染性胸膜肺炎是由胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP) 感染而引起的一种猪的呼吸道疾病, 给全球养猪业造成巨大的经济损失^[1]。目前发现 APP 至少有 15 个血清型^[2], 各个国家和地区流行的优势血清型不尽相同, 因此该病的诊断和防治比较困难。目前, 我国主要应用猪胸膜肺炎三价(1/2/7 型或 1/3/7 型)灭活菌苗进行免疫接种^[3], 有效地预防和控制了该病的流行。

外毒素 *Apx* (*A. pleuropneumoniae*-RTX toxins) 是 APP 的主要毒力因子和保护性抗原^[4]。目前发现, APP 可产生 4 种 *Apx* 毒素, 即 *Apx I*、*Apx II*、*Apx III* 和 *Apx IV*。不同血清型的 APP 产生的 *Apx* 种类不尽相同, 但它们都能在宿主体内分泌 *Apx IV*^[5]。目前针对 *Apx* 的诊断方法主要是检测 *Apx I*、*Apx II* 和 *Apx III*^[6,7,8], 因此, 很难用一种检测方法检测所有血清型的 APP。此外, 针对 *Apx I*、*Apx II* 和 *Apx III* 的抗体也能在 APP 阴性的猪体内检测到, 这是因为除 APP 以外的其它放线杆菌也能分泌这三种外毒素, 如罗斯放线杆菌 (*A. rossii*)、猪放线杆菌 (*A. suis*) 以及非致病性的猪扁桃腺放线杆菌 (*A. porciusillarum*)^[9]。因此, 针对 *Apx I*、*Apx II* 和 *Apx III* 的诊断方法特异性差。然而, 最近发现, *Apx IV* 是 APP 特异性的外毒素, 它在体外培养条件下不表达, 而只能在宿主体内分泌, 并诱导产生高滴度的抗体^[5]。根据这一特性, 我们克隆和表达了 *Apx IV* 的特异性结构域, 并用表达产物建立了间接 ELISA 方法。该 *Apx IV* A-ELISA 不仅可以用于检测所有血清型 APP 的特异性抗体, 而且可以用于 APP 自然感染猪与灭活菌苗免疫猪的鉴别诊断。

1 材料与方法

1.1 材料

APP 血清 1-13、15 型参考菌株由澳大利亚 Pat Blackall 教授和 Ross Bowles 博士惠赠。APP 血清 1、2、7 型野毒菌株由本实验室分离鉴定并保存。大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 (DE3) 均由本实验室保存。pET-28b 由本实验室保存。pMD-18T、限制酶、EX Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自大连 TaKaRa 公司。DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。Goat anti-porcine IgG-HRP 和 Rabbit anti-mouse

IgG-HRP 购自美国 Sigma 公司。副猪嗜血杆菌 (HPS)、猪产毒素巴氏杆菌 (DNT⁺ Pm)、猪大肠杆菌 (*E. coli*)、猪伪狂犬病毒 (PRV)、猪细小病毒 (PPV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 和猪衣原体 (CP) 的标准阳性血清由本实验室保存。猪抗 APP 血清 1 型标准阳性血清由本实验室用血清 1 型 APP 活菌免疫猪制备。猪胸膜肺炎三价 (1、2 和 7 型菌) 灭活苗和猪胸膜肺炎新型基因工程类毒素菌苗 (由灭活的 7 型菌与 *Apx I*、*Apx II*、*Apx III* 基因工程表达产物制备而成) 是本实验室研制的中试产品。*Apx I* -、*Apx II* - 和 *Apx III* -ELISA^[6,8,10] 由本实验室研制。猪胸膜肺炎间接血凝试验 (IHA) 由兰州兽医研究所提供^[11]。

1.2 方法

1.2.1 引物: 根据 GenBank 上 APP 血清 1 型 *apxIV* 基因序列 (AF021919) 设计一对引物, 扩增该基因 5' 端编码区 2445bp 的片段。为了便于 PCR 产物的克隆, 上、下游引物分别添加一个 *Nde I* 和 *Hind III* 酶切位点。引物由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列如下:

上游引物 P1: 5'-cgccatagcgcgacaatgcctttttg-3'

下游引物 P2: 5'-cgcaagcttacgaatgtctttatccgtcg-3'。

1.2.2 *apxIVA* 基因的克隆与表达载体的构建: 参照文献[12]介绍的方法进行 APP 的培养及其基因组 DNA 的提取。以本室分离的血清 2 型 APP 的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 *apxIV* 基因 5' 端编码区 *apxIVA5*。50 μ L 的 PCR 反应体系中含: 模板 DNA 2 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, 25mmol/L MgCl₂ 4 μ L, 2 μ mol/L dNTPs 2 μ L, DMSO 5 μ L, 10 μ mol/L P1 和 P2 各 2 μ L, 5u/ μ L Ex Taq DNA Polymerase 0.25 μ L 以及灭菌去离子水 27.75 μ L。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min 后, 进行 35 个循环 (94 $^{\circ}$ C 变性 40s, 49.5 $^{\circ}$ C 复性 90s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3min) 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。用 DNA 回收试剂盒回收 PCR 产物, 与载体 pMD-18T 连接后, 转化大肠杆菌 DH5 α , 获得重组质粒 pTapxIVA5。经 *Kpn I* 酶切鉴定后, 用 *Nde I* 和 *Hind III* 分别酶切重组质粒 pTapxIVA5 和表达载体 pET-28b, 回收 2445bp 的 *apxIVA5* 片段和线性化的 pET-28b, 经 T4 DNA 连接酶连接后, 转化大肠杆菌 DH5 α 。用碱裂

解法提取重组质粒 pETapxIVA5, 用 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切鉴定。

1.2.3 apxIVA5 的诱导表达和表达产物的提取: 将重组表达质粒 pETapxIVA5 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 挑取单菌落, 于 37℃ 培养至对数生长期 ($OD_{600} = 0.6 \sim 1.0$), 加入 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L, 继续诱导培养 3h, 收集菌体。同时设空白载体 pET-28b 转化子作对照。参照文献[13]提取包涵体, 即超声波将裂解菌体后, 离心取沉淀用 0.2% 十二烷基肌氨酸钠裂解, 然后用氧化型与还原型谷胱甘肽进行变性和复性。用紫外分光光度计测定蛋白浓度。菌体裂解液和包涵体提取物用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.4 Dot blotting 分析: 取 60μL 包涵体提取物点于硝酸纤维素滤膜上, 同时设 pET-28b 转化菌裂解液对照, 自然干燥后, 以 pET-28b 转化菌裂解液稀释的猪抗 APP 血清 1 型标准阳性血清 (1:20) 为一抗, 以 Goat anti-porcine IgG-HRP 为二抗, 按文献[14]进行 Dot blotting 分析。

1.2.5 鼠抗 APP 血清 1、2 和 7 型活菌抗血清的制备: 参照文献[12]介绍的方法进行 APP 的培养, 用平板稀释计数法进行活菌计数。APP 血清 1、2 和 7 型分别以 1.6×10^6 、 1.5×10^8 、 1.0×10^7 活菌于 0、2 周免疫昆明小鼠 (购自湖北省医学科学院), 首免后每 2 周采血检测 Apx IV A 的抗体。

1.2.6 猪胸膜肺炎疫苗免疫血清的制备: 用猪胸膜肺炎三价灭活苗和猪胸膜肺炎新型基因工程类毒素菌苗分别免疫 5 周龄大白猪 4 头, 首免后 3 周加强免疫 1 次。于首免后 2 周、二免后 2 周和 4 周分别采血, 分离抗血清。

1.2.7 间接 ELISA 方法的建立: 以不同浓度的包涵体提取物包被酶标板 (同时设 pET-28b 转化菌裂解液对照), 以制备的标准阴阳性猪血清作倍比稀释后进行方阵滴定, 按常规进行间接 ELISA 操作, 确定最佳抗原包被浓度和血清稀释度。用最佳浓度的抗原包被酶标板, 分别检测临床送检的 APP 阴性猪血清 (未免疫过胸膜肺炎疫苗、无胸膜肺炎病史且 IHA 检测为阴性)、猪胸膜肺炎疫苗免疫血清、鼠抗 1、2 和 7 型 APP 活菌血清, 以及猪 HPS、DNT⁺ Pm、*E. coli*、PRV、PPV、PRRSV、CP 的标准阳性血清。

1.2.8 对比试验: 用本文所建立的 Apx IV A-ELISA 和兰州兽医研究所的 APP IHA 试剂盒, 平行检测来自 6 个未免疫过胸膜肺炎疫苗猪场的 215 份血清, 比较二者的灵敏度和符合率。

2 结果

2.1 apxIVA5 的克隆与表达载体的构建

PCR 扩增片段大小约为 2500bp, 与预计大小 (2445bp) 一致 (见图 1), 将 PCR 产物克隆到 pMD-18T, 获得的重组质粒 pTapxIVA5, 用目的片段中的 *Kpn* I (847 位) 酶切后, 片段大小分别为 1639bp 和 3498bp (见图 2), 说明 PCR 扩增获得片段为目的片段。然后将目的片段插入到 pET-28b 的 *Nde* I 和 *Hind* III 位点之间, 得到的重组表达质粒 pETapxIVA5 经 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切后, 酶切片段大小分别为 2436bp 和 5315bp (见图 3), 表明 apx IV A5 成功地插入到了 pET-28b 中。

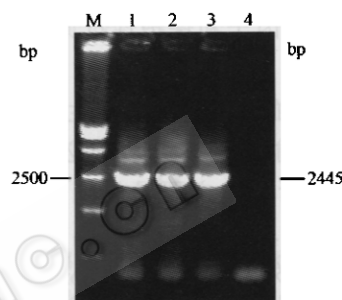


图 1 apxIVA5 的 PCR 结果

Fig.1 PCR result of apxIVA5

M: DL-15000; 1~3: PCR product (apxIVA5); 4: negative control.

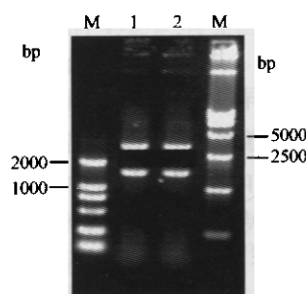


图 2 重组质粒 pTapxIVA5 的酶切鉴定

Fig.2 Identification of pTapxIVA5 by *Kpn* I digest

M (left): DL-2000; 1~2: pTapxIVA5/*Kpn* I; M (right): DL-15000

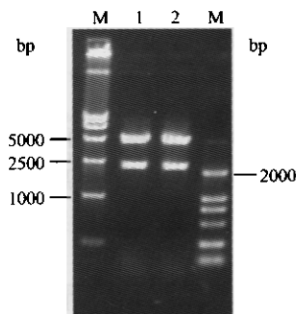


图 3 表达质粒 pETapxIVA5 的酶切鉴定

Fig.3 Identification of pETapxIVA5 by *Nde* I and *Hind* III digests

(left): DL-15000; 1~2: pETapxIVA5/*Nde* I + *Hind* III; M (right): DL-2000.

2.2 ApxⅣ A 的诱导表达及 Dot blotting 分析

将 pET-28b 和 pETapxIVA5 分别转化 BL21 (DE3),经 IPTG 诱导和 SDS-PAGE 分析,结果发现,在 pETapxIVA5 转化子的裂解物中出现一条大小约 90kD 的蛋白带,与预期的 ApxⅣ A 的分子量相符,该表达产物以包涵体形式存在(见图 4)。Dot blotting 结果显示,表达产物能与 APP 血清 1 型标准阳性血清发生特异性反应(见图 5)。

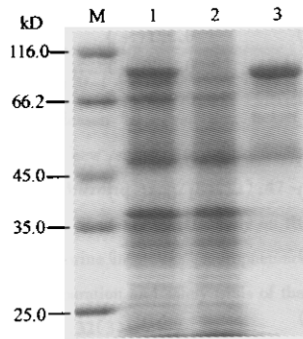


图 4 重组菌的 SDS-PAGE 结果

Fig.4 SDS-PAGE analysis of recombinant BL21(DE3) clones
M: protein marker SM-0431 (MBI); 1: lysate of the BL21 (DE3) transformed by pETapxIVA5; 2: lysate of the BL21(DE3) transformed by pET-28b; 3: inclusion bodies extracted from the BL21(DE3) transformed by pETapxIVA5.



图 5 Dot blotting 结果

Fig.5 Dot blotting analysis of ApxⅣ A

1: lysate of the BL21(DE3) transformed by pET-28b;
2: lysate of the BL21(DE3) transformed by pETapxIVA5.

2.3 间接 ELISA 方法的建立

2.3.1 最佳包被浓度的确定:用棋盘滴定法确定, ApxⅣ A 蛋白最佳包被浓度为 2.97μg/mL。

2.3.2 临界值的确定:用 ApxⅣ A-ELISA 检测来自 APP 阴性猪场(无胸膜肺炎病史、未免疫过胸膜肺炎疫苗,且 IHA 检测为阴性)的 53 份血清,其 OD₆₃₀ 的平均值(mean)为 0.189,标准差(SD)为 0.049,因此确定阴阳性临界值为 mean + 2SD = 0.290,即当检测血清的 OD₆₃₀ > 0.290 时判为阳性,当检测血清的 OD₆₃₀ ≤ 0.290 时判为阴性。

2.3.3 对比试验:用 ApxⅣ A-ELISA 和 IHA 平行检测来自 6 个未免疫过胸膜肺炎疫苗猪场的 215 份血

清,结果见表 1。从表中可以看出,两种方法检测样品的阳性符合率为 86.4% (102/118),阴性符合率为 79.3% (77/97),总符合率为 83.3% (179/215)。

表 1 间接 ELISA 试验和间接血凝试验对比试验结果

Table 1 Comparative results of the ApxⅣ A-ELISA and IHA of 215 sera samples

		ApxⅣ A-ELISA		
		Positive	Negative	Total
IHA	Positive		102	16
	Negative		20	77
	Total	122	93	215

2.3.4 特异性试验:用 ApxⅣ A-ELISA 检测了猪传染性胸膜肺炎、副猪嗜血杆菌、猪产毒素巴氏杆菌、猪大肠杆菌、猪伪狂犬病毒、猪细小病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪衣原体的标准阳性血清,除 APP 标准阳性血清的 OD₆₃₀ > 0.290(临界值)判为阳性外,其它猪细菌和病毒性疾病的标准阳性血清的 OD₆₃₀ 均小于临界值,为阴性(见表 2),表明用体外表达的 ApxⅣ A 蛋白建立的间接 ELISA 方法特异性良好。

表 2 ApxⅣ A-ELISA 的特异性试验结果

Table 2 Specificity of ApxⅣ A-ELISA for APP

APP negative serum	Positive sera for								
	APP	HPS	DNT ⁺	Pm	E. coli	PRV	PPV	PRRSV	CP
OD ₆₃₀	0.087	0.960	0.050	0.073	0.095	0.014	0.106	0.019	0.039

2.3.5 疫苗免疫动物和活菌感染动物中 Apx 毒素抗体的检测:用 ApxⅠ -、ApxⅡ -、ApxⅢ -和 ApxⅣ A-ELISA 以及 IHA 分别检测猪胸膜肺炎三价灭活菌苗和基因工程类毒素菌苗免疫猪、以及 APP 血清 1 型活菌感染猪、APP 血清 1、2 和 7 型活菌感染小鼠的血清抗体,结果见表 3。从表中可以看出,APP 活菌感染动物的 ApxⅣ A 抗体均为阳性,而两种灭活疫苗免疫动物的 ApxⅣ A 抗体均为阴性。除 ApxⅣ A 抗体外,活菌感染动物中还存在另外 1 或 2 种 Apx 毒素的抗体,如 APP 血清 1 型活菌感染猪和小鼠中,ApxⅠ 和 ApxⅡ 的抗体也为阳性。此外,基因工程类毒素菌苗能够诱导免疫猪产生较高滴度的 ApxⅠ、ApxⅡ 和 ApxⅢ 的抗体,而普通三价灭活菌苗诱发的相应抗体较低。

表 3 四种毒素间接 ELISA 和 IHA 检测 APP 血清抗体的比较结果

Table 3 Detection of APP antibodies using IHA and indirect Apx I -, Apx II -, Apx III - and Apx IV - ELISA

Sera	Animal No.	IHA value	OD ₆₃₀			
			Apx I -ELISA ^a	Apx II -ELISA ^b	Apx III -ELISA ^c	Apx IV A-ELISA ^d
APP negative pigs	1	1:2	0.123	0.169	0.074	0.090
	2	1:2	0.152	0.222	0.167	0.113
	3	1:8	0.099	0.182	0.166	0.087
	4	1:4	0.136	0.142	0.203	0.145
Inactivated bacterin vaccinated pigs	1	1:32	0.210	0.512(+)	0.245	0.142
	2	1:64	0.231	0.485(+)	0.321(+)	0.126
	3	1:16	0.197	0.603(+)	0.332(+)	0.095
	4	1:32	0.247	0.549(+)	0.378(+)	0.210
Toxioid bacterin vaccinated pigs	1	1:23	1.026(+)	1.175(+)	0.961(+)	0.170
	2	1:64	0.937(+)	1.008(+)	1.065(+)	0.105
	3	1:64	0.982(+)	0.897(+)	0.885(+)	0.119
	4	1:128	1.128(+)	0.963(+)	1.109(+)	0.090
Live APP1 ^f infected pig	1	1:16	1.213(+)	0.994(+)	ND ⁱ	0.986(+) ^e
Live APP1 infected mouse	1	1:16	1.008(+)	1.218(+)	ND	1.182(+)
Live APP2 ^g infected mouse	1	1:32	ND	1.222(+)	0.871(+)	0.967(+)
Live APP7 ^h infected mouse	1	1:32	ND	0.864(+)	ND	1.073(+)

a: cut-off = 0.3; b: cut-off = 0.4; c: cut-off = 0.3; d: cut-off = 0.29; e: (+); OD₆₃₀ > cut-off, indicating the sample is positive; f: APP1 = APP serotype 1; g: APP2 = APP serotype 2; h: APP7 = APP serotype 7; i: ND = no detection.

3 讨论

由胸膜肺炎放线杆菌(APP)引起的猪传染性胸膜肺炎是一种严重危害我国养猪业的呼吸道传染病。由于 APP 的血清型有 15 种之多, 目前尚没有一种可靠的血清学诊断方法可以同时特异性地检测所有血清型 APP 的抗体。本文克隆和表达了 APP 特异性的 apxIVA 基因的 5' 端 2445bp 的片段, 并用表达产物包被酶标板, 建立了可以检测 Apx IV A 抗体的间接 ELISA 方法(Apx IV A-ELISA)。

因为胸膜肺炎放线杆菌每一血清型只分泌这三种毒素中的一种或两种, 所以 Apx I -、Apx II -和 Apx III -ELISA 具有血清型特异性, 不适于对所有血清型 APP 的普查, 而且大多数革兰氏阴性致病菌, 如巴氏杆菌、大肠杆菌等, 都分泌 RTX 家族的这三种毒素, 且与相应的 Apx I、Apx II、Apx III 同源性较高, 导致 Apx I -、Apx II -和 Apx III -ELISA 与这些致病菌的交叉反应强^[15,16]。Apx IV A-ELISA 与猪的多种细菌和病毒性传染病的标准阳性血清无交叉反应, 特别是与可产生 RTX 毒素的大肠杆菌、巴氏杆菌等无交叉反应(见表 2), 说明 Apx IV A-ELISA 特异性很好。同

时, 本研究进一步证明: 与 Apx I、Apx II 和 Apx III 具有型特异性不同, Apx IV 是 APP 种属特异性的外毒素(见表 3), 这与 Schaller 等的报道一致^[5]。本文以 1、2 和 7 型 APP 感染动物的血清为例, 用 Apx IV A-ELISA 均检测到高滴度的 Apx IV 抗体(见表 3), 可见, Apx IV A-ELISA 不仅可以用于检测所有血清型的 APP 的抗体, 而且较 Apx I -、Apx II -和 Apx III -ELISA 具有更好的特异性。最近, Dreyfus 等发表了类似的实验结果^[17]。

我们还用 Apx IV A-ELISA 检测了灭活菌苗免疫动物和 APP 活菌感染动物的 Apx IV A 的血清抗体, 并对其进行了比较, 结果表明, 两种灭活菌苗免疫动物的 Apx IV A 抗体均为阴性, 而 APP 活菌感染动物的 Apx IV A 的血清抗体均为阳性(见表 3)。这是因为 Apx IV 只在感染动物体内才分泌^[5], 两种灭活菌苗中均不含有 Apx IV, 而所有血清型的 APP 感染动物含有 Apx IV。由于我国目前使用的猪传染性胸膜肺炎疫苗多为 APP 1、2 和 7 型三联灭活菌苗, 所以, 本文以 1、2 和 7 型 APP 感染动物(猪和小鼠)为材料进行了此对比试验。对比试验证实, Apx IV A-ELISA 可以用于区分传染性胸膜肺炎灭活疫苗免疫动物和

野毒感染动物。

综上所述,ApX IV A-ELISA 不仅可以用于检测所有血清型的 APP 的抗体,而且可以用于猪传染性胸膜肺炎灭活疫苗免疫动物和野毒感染动物的鉴别诊断。本研究建立的 ApX IV A-ELISA 为我国在该传染病的预防、控制乃至根除中提供了重要的技术手段。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Rohrbach BW, Hall RF, Hitchcock JP *et al.* Effect of subclinical infection of *Haemophilus pleuropneumoniae* in comingled feeder swine. *J Am Vet Med Assoc*, 1993, **202**:1095 - 1098
- [2] Blackall PJ, Klaasen HL, van den Bosch H *et al.* Proposal challenge of a new serovar of *Actionbacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet Microbiol*, 2002, **84**(12):47 - 52
- [3] Lu ZX, Zhao P, Shao YD *et al.* Study on the inactivated trivalent vaccine against swine infectious pleuropneumoniae: selection of the seed strain, preparation and safety trials of the vaccine. *Chin J Vet Scie Tech*, 2002, **32**(3): 7 - 9
- [4] Frey J, Nicolet J. Immunological properties of *Actionbacillus pleuropneumoniae* hemolysin I. *Vet Microbiol*, 1991, **28**:61 - 73
- [5] Schaller A, Kuhnert R, Nicoli J *et al.* Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actionbacillus pleuropneumoniae*. *Microbiol*, 1999, **145**:2105 - 2116
- [6] Liu JJ(刘建杰), He QG(何启盖), Chen HC(陈焕春) *et al.* Cloning, expression and establishment of the ELISA detection method of the apxICA gene of *Actionbacillus pleuropneumoniae*. *Scie Agri Sin*, 2004, **37**(1):148 - 151
- [7] Leiner C, Franz B, Struzberg K *et al.* A novel enzyme-linked immunosorbent assay using the recombinant *Actionbacillus pleuropneumoniae* Apx II antigen for diagnosis of pleuropneumonia in pig herds. *Clin Diagn Lab Immuno*, 1999, **6**(4):630 - 632
- [8] Chen HY(陈汉阳), Liu JF(刘军发), He QG(何启盖) *et al.* Cloning and expression of the apxIIIA gene of *Actionbacillus pleuropneumoniae*. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2003, **43**: 324 - 329
- [9] Gottschalk M, Broes A, Mittal KR *et al.* Non-pathogenic *Actionbacillus* isolates antigenically and biochemically similar to *Actionbacillus pleuropneumoniae*: a novel species? *Vet Microbiol*, 2003, **92**:87 - 101
- [10] Xu XJ(徐晓娟), He QG(何启盖), Xu GY(徐高原) *et al.* Cloning and expression of the gene apxIICA of *Actionbacillus pleuropneumoniae* and primary development of enzyme-linked immunosorbent assay. *Chin J Vet Sci*, 2004, **24**:335 - 337
- [11] Lu ZX(凌忠新), Lu BY(鲁炳义), Zhao P(赵萍). Detection of swine pleuropneumoniae with indirect haemoagglutination assay. *Chin J Vet Scie Tech*, 1999, **29**:25 - 27
- [12] Christopher T, Lesley P, Jolanta K. Protection of mice against challenge with homologous and heterologous serovars of *Actionbacillus pleuropneumoniae* after live vaccination. *Current Microbiol*, 1998, **37**:324 - 332
- [13] Marshak DR, Kadonaga JT, Burgess RR *et al.* Strategies for Protein purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1996
- [14] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [15] Schaller A, Kuhnert P, Puente-Redondo VA *et al.* Apx toxins in Pasteurellaceae species from animals. *Vet Microbiol*, 2000, **74**:365 - 376
- [16] Frey J. Virulence in *Actionbacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol*, 1995, **3**: 257 - 261
- [17] Dreyfus A, Schaller A, Nivollet S *et al.* Use of recombinant Apx IV in serodiagnosis of *Actionbacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the Apx IV ELISA. *Vet Microbiol*, 2004, **99**:227 - 238