<원 저>

돼지에서 분리한 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 혈청형 분포 및 항생제 감수성

정지열¹ · 장 현^{2,*}

¹농림수산검역검사본부 역학조사과, ²코미팜 중앙연구소
(접수: 2012년 2월 26일, 수정: 2012년 9월 11일, 게재승인: 2012년 9월 13일)

Serotype and antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from pigs in Korea

Ji-Youl Jung¹, Hyun Jang^{2,*}

¹Epidemiology Division, Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, Anyang 430-824, Korea

²Komipharm International, Siheung 429-848, Korea

(Received: February 26, 2012; Revised: September 11, 2012; Accepted: September 13, 2012)

Abstract : *Actinobacillus (A.) pleuropneumoniae* is the causative agent of pleuropneumonia which is one of the most important respiratory diseases in pigs worldwide. A total of 32 *A. pleuropneumoniae* isolates from diseased pigs during 2008 to 2010 were serotyped by polymerase chain reaction method. The susceptibility of the isolates to 13 antimicrobial agents were determined by disk diffusion test. In all the 32 isolates examined in this study, serotype 5 (16 isolates: 50%), 1 (7 isolates: 21.9%), 2 (5 isolates: 15.6%) and 12 (1 isolate: 3.1%) were found. Of all tested antimicrobial agents, resistance to oxytetracycline was found in 96.9% of isolates, followed by resistance to amikacin (81.2%), neomycin (68.7%), kanamycin (53.1%), penicillin (50.0%), gentamicin (43.7%), florfenicol (25.0%), ampicillin (18.7%), colistin (9.4%), trimethoprim/sulfamethoxazole, ceftiofur (8.3%), amoxicillin/clavulanic acid (3.1%) and enrofloxacin (0%). Oxytetracycline or florfenicol-resistant isolates were examined for the presence of resistance gene. Among the 31 oxytetracycline-resistant isolates, *tetB*, *tetH* and *tetO* genes were detected in 22 (71%), 8 (26%) and 1 (3%) isolates, respectively. The *floR* genes were detected in 8 (100%) of the 8 florfenicol-resistant *A. pleuropneumoniae* isolates.

Keywords : *Actinobacillus pleuropneumoniae*, antimicrobial susceptibility, pig, resistance gene, serotype

서 론

돼지 흉막폐렴은 *Actinobacillus(A.) pleuropneumoniae* 에 의해 발생하는 질병으로 섬유소성, 출혈성, 괴사성 폐렴을 일으킨다 [6, 8, 19]. 이 질병은 전 세계적으로 발생하고 있으며 농장에 막대한 경제적 손실을 끼치는 대표적인 호흡기 질병으로 알려져 있다. 돼지 흉막폐렴은 모든 연령의 돼지가 감수성이 있으나 특히 육성, 비육돈에서 다발하는 것으로 알려져 있으며 이환율과 폐사율이 높은 질병이다.

*A. pleuropneumoniae*는 그람 음성균의 세균으로 NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) 요구성인 biotype 1과 NAD 비요구성인 biotype 2로 나뉘고, 현재까지 협막항원에 따라 15개의 혈청형이 보고되어있다 [2]. 혈청형의 분포는 국가별, 지역별로 다양하게 분포하는 것으로 알려져 있는데 국내에서 분리되어 보고된 혈청형으로는 2, 3, 5, 6, 7 [9,

14, 17] 등이 있고 이 중 2번과 5번 혈청형이 우세한 것으로 알려져 있다. *A. pleuropneumoniae* 의 혈청형 분류는 질병의 전파를 이해하고, 치료 및 예방을 위한 약제와 백신의 선택시 수반되어야 할 중요한 과정이다. 여러 나라에서 돼지 흉막폐렴을 예방하기 위해서 사균백신과 서브유닛백신 등 새로운 백신들이 사용되고 있다 [19]. 그러나 아직까지도 본 질병을 제어하고 치료하기 위해서는 항생제의 사용이 효과적인 것으로 알려져 있어 국내, 외 축산농가에서 다양한 약제가 사용되고 있다 [6].

반면, 축산농가에서 광범위한 항생제의 사용으로 인한 문제점도 나타나고 있다. 항생제 내성을 나타내는 균주가 증가하고 있고 이는 곧 국민의 건강과 직결된다는 문제로 대두되고 있다. 또한 세계 각국이 항생제의 오남용에 따른 문제를 지적하고, 이에 따른 항생제의 신중한 사용을 요구하고 있는 실정이다 [7].

*Corresponding author

Tel: +82-31-498-2124, Fax: +82-31-498-6616
E-mail: hjang71@snu.ac.kr

본 연구는 2008년에서 2010년까지 코미팜 병성감정실에 의뢰된 육성, 비육돈의 폐에서 분리한 *A. pleuropneumoniae*의 혈청형 분포를 확인하고, 항생제 감수성 검사를 통하여 효과적인 항생제 선발에 활용하고자 하였다. 또한 항생제 중에서 oxytetracycline과 florfenicol에 내성이 있는 균주에 대한 내성 유전자 분포를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

공시재료

2008년부터 2010년까지 전국 32개 농장으로부터 호흡기 문제로 코미팜 병성감정실로 검사 의뢰된 육성 및 비육돈의 폐를 세균 분리 재료로 사용하였다. 육안적으로 폐는 섬유소성 홍막염 및 폐출혈 등의 돼지홍막폐렴의 전형적인 소견을 나타내었고, 육안검사 후 병원체를 검출하기 위해서 폐 병변 부위를 무균적으로 채취하였다. 세균분리는 한일코메드(한국)에서 제조, 판매하는 5% 면양한천혈액배지와 초콜렛 한천배지를 사용하였고, 혈액배지에는 *Staphylococcus aureus* 균을 확신도말하였다. 배지는 촛불병배양법(Candle jar method)으로 3~5% CO₂ 환경을 만들어 37°C에서 18~24시간 배양하였다. 순수 배양된 집락을 위성집락현상, CAMP test 양성 및 유전자 검사법으로 Apx IV 유전자를 검사하여 확인하였다. 분리된 균은 총 32점으로 2008년 5점, 2009년 10점, 2010년 17점을 실험에 사용하였다.

혈청형 분류

초콜렛 한천배지에서 순수 배양된 집락을 채취하여 5 µg/mL의 NAD를 첨가한 Brain heart infusion(Difco, USA) 배지에 접종후 37°C에서 18시간 배양하였다. 배양된 액체배지를 200 µL 채취하여 G-spin Genomic DNA extraction kit(iNtron Biotech, Korea)를 사용하여 DNA를 추출하였다. DNA 추출은 kit의 매뉴얼을 따라 실시하였고 PCR에 사용되기 전 -20°C에 보관하였다. *A. pleuropneumoniae*로 확인된 균주에서 혈청형을 구분하기 위해 15가지 혈청형 중 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 12형에 대해 PCR을 실시하였다. 각 혈청형에 대한 primer 정보는 기존에 보고된 문헌을 참고하였다 [1, 11, 16, 21]. Premix는 Maxime PCR premix(i-Star Taq) (iNtron Biotech)을 사용하였고, 추출한 DNA 5 µL와 각각의 primer를 1 µL(10 pmol) 및 DNase RNase free water 13 µL를 첨가하여 최종 용량이 20 µL가 되도록 하였다. PCR 반응조건은 문헌에 나와있는 대로 혈청형별로 달리 하였으며 PCR이 끝난 산물은 1.2% agarose gel을 사용하여 전기영동 후 혈청형별 특이밴드를 확인하였다.

항생제 감수성 시험

총 32점의 *A. pleuropneumoniae* 분리균주에 대한 항생제 감수성 시험은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)의 방법에 준하여 디스크 확산법으로 실시하였다 [4]. 항생제 디스크는 Becton-Dickinson(USA)에서 판매하는 10종

인 penicillin(10 U), ampicillin(10 µg), amoxicillin/clavulanic acid(20/10 µg), neomycin(30 µg), amikacin(30 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin(30 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg), oxytetracycline(30 µg)과 CLSI의 매뉴얼을 참고하여 제작한 enrofloxacin(10 µg), florfenicol(30 µg), ceftiofur(30 µg) 디스크를 사용하였다. 멸균면봉으로 배양된 콜로니를 채취하여 PBS에 부유시켜 MacFarland No. 0.5로의 농도로 조절한 다음 NAD를 첨가한 Mueller-Hinton 배지에 도말하였다. 각각의 항생제 디스크를 접종한 후 37°C의 3~5% CO₂ 환경에서 18~24시간 배양한 다음 디스크 주위의 완전 억제존의 직경을 측정하여 내성여부를 판정하였다. 내성의 판정은 Becton-Dickinson 사 매뉴얼과 CLSI의 기준에 따라 판정하였고, 항생제 감수성 검사의 표준균주로 *A. pleuropneumoniae* ATCC 27090을 사용하였다. 또한 분리균 중에서 혈청형이 확인된 1, 2, 5, 12형에 한하여 혈청형에 따른 항생제 내성률을 비교하였다.

Oxytetracyclin과 florfenicol 내성 유전자 검사

Oxytetracycline 또는 florfenicol에 내성을 나타낸 균주에 한하여 oxytetracycline 내성유전자인 *tetA*, *tetB*, *tetH*, *tetL*, *tetO* [3]와 florfenicol 내성 유전자인 *florR* [10]을 검출하기 위한 PCR을 실시하였다. 각각의 유전자를 검출하기 위한 primer 정보 및 PCR 조건은 기존의 문헌에 따라 실시하였다.

결 과

혈청형 분류

총 32점의 *A. pleuropneumoniae* 분리균주를 대상으로 PCR을 통해 혈청형을 검사한 결과, 5형이 16주(50.0%)로 가장 많았고, 다음으로 1형, 2형 및 12형이 각각 7주(21.9%), 5주(15.6%), 1주(3.1%)로 확인되었다. 나머지 3주는 혈청형이 확인되지 않았다.

항생제 감수성 시험

*A. pleuropneumoniae*에 대한 항생제 감수성 검사결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 검사에 사용한 항생제 중 enrofloxacin이 내성을 보이는 균주 없이 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다. 그 다음으로 amoxicillin/clavulanic acid, ceftiofur, trimethoprim/sulfamethoxazole 에서 내성률이 10% 미만으로 나타났다. 분리균의 50% 이상이 내성을 나타내는 항생제는 kanamycin, neomycin, amikacin, oxytetracycline이었으며 oxytetracycline은 총 32점의 균주 중 31점이 내성을 보여 96.9%로 가장 높은 내성률을 나타내었다.

혈청형이 확인된 1, 2, 5, 12형 균주에서 각 항생제별 내성률을 비교한 결과 혈청형에 따른 항생제 내성간의 유의성은 관찰되지 않았다(Table 2).

Oxytetracyclin과 florfenicol 내성 유전자 검사

Oxytetracycline과 florfenicol에 내성을 나타낸 31점, 8점

Table 1. Antimicrobial susceptibility of 32 *Actinobacillus (A.) pleuropneumoniae* isolates

Antimicrobials	No. of isolates			Resistance rate (%)
	Resistant	Intermediate	Susceptible	
Enrofloxacin	0	5	27	0
Amoxicillin/Clavulanic acid	1	0	31	3.1
Trimethoprim/sulfamethoxazole	2	4	26	6.3
Ceftiofur	2	20	10	6.3
Ampicillin	6	7	19	18.8
Florfenicol	8	2	22	25.0
Gentamicin	14	9	9	43.8
Penicillin	16	12	4	50.0
Kanamycin	17	15	0	53.1
Neomycin	22	10	0	68.8
Amikacin	26	6	0	81.3
Oxytetracycline	31	1	0	96.9

Table 2. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance rate of 29 *A. pleuropneumoniae* isolates

Antimicrobials	Serotype				No. of resistant isolates
	1 (n = 7)	2 (n = 5)	5 (n = 16)	12 (n = 1)	
Amikacin	6	5	12	0	23
Amoxicillin/Clavulanic acid	0	1	0	0	1
Ampicillin	2	2	2	0	6
Ceftiofur	0	1	1	0	2
Enrofloxacin	0	0	0	0	0
Florfenicol	1	1	5	0	7
Gentamicin	2	2	8	0	12
Kanamycin	4	3	8	1	16
Neomycin	5	4	11	0	20
Oxytetracycline	7	5	15	1	28
Penicillin	4	3	7	1	15
Trimethoprim/sulfamethoxazole	0	1	1	0	2

Table 3. Frequency of resistance genes for oxytetracycline and florfenicol

Antimicrobials	Resistance gene	No. of isolates positive for resistance genes (%)
Oxytetracycline	<i>tetA</i>	0/31 (0)
	<i>tetB</i>	22/31 (71.0)
	<i>tetH</i>	1/31 (3.2)
	<i>tetL</i>	0/31 (0)
	<i>tetO</i>	8/31 (25.8)
Florfenicol	<i>floR</i>	8/8 (100)

균주에 대한 내성 결정 유전자를 PCR법으로 조사하였다. Oxytetracycline 내성 결정 유전자 중 *tetA*, *tetB*, *tetH*, *tetL*, *tetO*에 한해 검사한 결과, *tetB*가 22점(68.75%)으로 확인되었고 *tetH*와 *tetO*는 각각 6점(19.35%)과 3점(9.67%)으

로 확인되었다. *tetA*와 *tetL*은 검출되지 않았다. florfenicol에 내성을 나타낸 8점의 균주에서는 8점 모두 florfenicol 내성 결정 유전자인 *floR*이 검출되었다(Table 3).

고 찰

본 연구에서는 2008년에서부터 2010년까지 국내 양돈농장에서 분리된 *A. pleuropneumoniae* 32점에 대해 혈청형의 분포를 조사하고 항생제 감수성 검사를 통해 항생제에 따른 내성률을 확인하고자 하였다.

*A. pleuropneumoniae*는 세균의 성분인 협막 및 리보다당 질에 따라 현재까지 15개의 혈청형으로 분류되고 있다 [2, 13, 19]. 이러한 혈청형의 분류는 *A. pleuropneumoniae*의 세균학적 진단시 사용되며 일부 균주는 혈청형간 방어의 문제로 인해 백신 선발시 반드시 필요하다. 혈청형을 분류하는 방법에는 슬라이드 응집법, 공동응집법(coagglutination test)이 있다. 그러나 이러한 방법은 종종 비특이 반응이 관찰되어 확진을 하기 위해서는 한천겔확산법 및 간접혈구응집법 등이 사용되고있다 [19]. 최근에는 조직 유제 또는 분리된 균을 가지고 *A. pleuropneumoniae*의 capsular polysaccharides (*cps* gene) 유전자를 검출하여 혈청형을 구분하는 PCR 법이 사용되고 있다 [11]. 이 방법은 다른 진단법에 비해 민감도와 특이도가 뛰어나기 때문에 최근에 많이 사용되고 있다.

*A. pleuropneumoniae*의 혈청형은 나라별, 지역별로 다양하게 분포하고 있다. 캐나다에서는 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 12형이 분포하고 있고 이 중 1, 5형이 우세한 것으로 확인되었다 [18]. 미국에서 역시 1, 5, 7형이 우세하였다 [5]. 스페인에서 확인된 혈청형은 2, 4, 6, 7, 11, 12형으로 2, 4, 7형이 우세하였으며 [3, 12], 가까운 일본에서는 2, 5, 1, 15형 순으로 검출되었다 [15]. 국내 문헌에 따르면 100점의 균주에서 혈청형에 대한 연구 결과 2, 5, 6, 7형의 분포를 보고하였고 이 중 2, 5형이 우세하게 검출되었다 [14]. 또한 최근 보고된 문헌에 따르면 총 37건 중 5, 1, 2형 순으로 분포하였고 특히 5형은 83.8%로 기존의 보고에 비해 매우 높게 나타났다 [17].

본 실험에서는 국내 양돈농장에서 분리된 *A. pleuropneumoniae* 균주를 PCR 법을 이용하여 혈청형 조사를 하였다. 총 32점 중 5형이 16점으로 확인되어 50%로 가장 검출율이 높았고 다음으로 1, 2, 12형 순으로 확인되어 최근에 발표된 문헌과 [17] 비슷한 결과를 보였다. 국내에서 혈청형 1형이 처음 보고된 이후, 본 실험에서도 32점 중 7점이 혈청형 1로 확인되어 5형 다음으로 높게 조사되었다. 따라서, 새로운 혈청형의 국내 분포상황 등을 알기위한 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

2001년 Kim 등 [8]은 야외에서 분리된 *A. pleuropneumoniae* 76주에 대한 항생제 감수성 검사결과 penicillin, ceftiofur 및 enrofloxacin 등에 감수성이 높다고 발표하였다. 본 실험에서는 국내 각 지역에서 분리된 총 32개의 균주를 대상으로 12종의 항생제에 대해 감수성 시험을 하였다. 그 결과 enrofloxacin이 내성균 없이 모두 감수성이 있는 것으로 나타났으며 amoxicillin/clavulanic acid, trimethoprim/sulfamethoxazole, ceftiofur 가 내성률이 10% 미만으로 감수성이 좋은 약제로 확인되어 기존과 비슷한 결과를 보였다.

그러나 penicillin은 50%로 내성률이 비교적 높게 나타났다. 국외에서도 penicillin에 대한 내성균이 점차적으로 증가하고 있다 [6, 15]. 이는 본 항생제가 국내, 외 축산업계에서 양돈 질병 치료제로 지속적으로 사용되었다는 점과 연관성이 있을 것으로 사료된다.

국내 축산업에서 항생제는 질병의 치료 및 예방의 목적으로 많이 사용되고 있다. 뿐만 아니라 성장촉진용으로 사용되고 있는 항생제는 가축의 생산성을 높여 국내 축산업이 발전할 수 있는데 공여하였다. 그러나 이러한 항생제를 장기간 동안 무분별하게 사용함으로써 항생제 내성균이 증가하고 있고 이는 곧 국민의 건강과 직결되고 있어 공중보건학상 큰 문제로 대두되고 있다. 2003년에 발표된 항생제 사용량에 따르면 돼지에서의 사용량이 전체 50%를 넘는 것으로 확인되었고 그 뒤로 닭, 수산용, 소의 순으로 사용되었다. 또한 항생제 종류별 사용량을 보면 tetracycline 계가 가장 많았고 다음으로 sulfonamide, penicillin 순으로 사용되었다 [7].

Tetracycline은 다양한 세균성 감염을 막는데 사용되는 광범위 항생제로 양돈 농장에서 사료 첨가제로 사용되어 왔다. 이 항생제의 지속적인 사용으로 인해 1990년대부터 이 약제에 대한 내성이 높아지고 있다. 본 연구에서 oxytetracycline에 대한 내성률을 보면 96.9%로 32점 중 31점에서 내성을 나타냈다. 다른 나라에서도 tetracycline 계에서 가장 높은 내성률을 보고하였지만 이 결과는 대만 [20]의 52.6%와 일본 [15]의 27.7%보다 월등히 높은 수치였다. 항생제의 내성과 관련하여 tetracycline의 내성 유전자, 즉 *tet* 유전자가 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 2006년 스페인에서는 46개의 *A. pleuropneumoniae* 분리균에서 여러 *tet* 유전자에 대한 검사결과 70%가 *tetB* 유전자였고 뒤이어 *tetO*, *tetH*, *tetL* 유전자가 검출되었다 [3]. 일본에서도 tetracycline에 내성을 보이는 80개의 균주를 모아서 실험한 결과 *tetB* 유전자가 76.25%로 가장 많이 검출되었고 다음으로 *tetH*, *tetO*, *tetA* 가 검출되었다 [15]. 본 실험에서 oxytetracycline에 대한 내성을 보이는 31개의 분리주에서 *tet* 유전자를 검사한 결과, 70% 가까이 *tetB* 유전자가 검출되어 비슷한 결과를 보였으며 국내에서도 이와 관련하여 내성균이 상당히 많이 퍼져있을 것으로 생각된다.

Florfenicol은 thiamphenicol의 형광유도체로써 그람 양성 및 음성 세균에 대해 광범위한 항생제로 이용되고 있다. 국내의 사용량을 보면 2003년부터 소와 닭에서 사용되기 시작하였고 양돈 산업에서 매우 급격히 사용량이 증가하는 등 매우 증가하는 추세를 띠고 있다 [7]. 일부 문헌에 따르면 야외 분리된 *A. pleuropneumoniae*에서 florfenicol에 대한 항생제 감수성 검사결과, 내성균 없이 효과가 좋아 돼지 흉막 폐렴의 예방 및 치료제로 널리 사용되고 있다 [6, 15]. 그러나 최근 체코에서 *A. pleuropneumoniae*의 florfenicol에 대한 내성률이 0.8%로 확인되었고 이들 균주에서 항생제 내성 유전자인 *floR*를 검출하였다 [10]. 본 연구에서는 이보다 훨씬 높은 25%의 내성률을 보여 항생제의 사용량과 연관되어 향후 내성을 획득하는 균주가 더 많아질 것으로 생각된다.

돼지 흉막폐렴은 전세계적으로 널리 발생하고 있으며, 양돈 산업에서 경제적으로 매우 중요한 질병 중 하나이다. 이 질병을 효과적으로 예방하고 치료하기 위해서는 백신접종, 항생제 사용, 돈사소독, 사육환경개선 등이 이루어져야 한다. 효과적인 예방을 위해서는 나라별로 유행하는 혈청형을 바탕으로 하는 백신 개발이 필요하다. 또한, 시기별로 감수성이 좋은 항생제 종류가 달라지고 있는 만큼 이에 대한 조사 및 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Angen Ø, Ahrens P, Jessing SG. Development of a multiplex PCR test for identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 7, and 12. Vet Microbiol 2008, **132**, 312-318.
2. Blackall PJ, Klaasen HLBM, Van den Bosch H, Kuhnert P, Frey J. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. Vet Microbiol 2002, **84**, 47-52.
3. Blanco M, Gutiérrez-Martín CB, Rodríguez-Ferri EF, Roberts MC, Navas J. Distribution of tetracycline resistance genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from Spain. Antimicrob Agents Chemother 2006, **50**, 702-708.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved standard—Third Edition. NCCLS document M31-A3. CLSI, Pennsylvania, 2008.
5. Fales WH, Morehouse LG, Mittal KR, Bean-Knudsen C, Nelson SL, Kintner LD, Turk JR, Turk MA, Brown TP, Shaw DP. Antimicrobial susceptibility and serotypes of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* recovered from Missouri swine. J Vet Diagn Invest 1989, **1**, 16-19.
6. Gutiérrez-Martín CB, del Blanco NG, Blanco M, Navas J, Rodríguez-Ferri EF. Changes in antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Spain during the last decade. Vet Microbiol 2006, **115**, 218-222.
7. Ha JI, Hong KS, Song SW, Jung SC, Min YS, Shin HC, Lee GO, Lim KJ, Park JM. Survey of antimicrobial agents used in livestock and fishes. Korean J Vet Public Health 2003, **27**, 205-217.
8. Kim B, Min K, Choi C, Cho WS, Cheon DS, Kwon D, Kim J, Chae C. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Korea using new standardized procedures. J Vet Med Sci 2001, **63**, 341-342.
9. Kim JA, Kim SI, Woo HC, Lim YK, Bae JH, Kim HS, Lee DS. Studies on biochemical characteristics and serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pneumonic lungs of swine in Che-ju. Korean J Vet Public Health 1998, **22**, 147-155.
10. Kucerova Z, Hradecka H, Nechvatalova K, Nedbalcova K. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from clinical outbreaks of porcine respiratory diseases. Vet Microbiol 2011, **150**, 203-206.
11. Lo TM, Ward CK, Inzana TJ. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 by multiplex PCR. J Clin Microbiol 1998, **36**, 1704-1710.
12. Maldonado J, Valls L, Martínez E, Riera P. Isolation rates, serovars, and toxin genotypes of nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* among pigs suffering from pleuropneumonia in Spain. J Vet Diagn Invest 2009, **21**, 854-857.
13. Matter D, Rossano A, Limat S, Vorlet-Fawer L, Brodard I, Perreten V. Antimicrobial resistance profile of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus porciton-sillarum*. Vet Microbiol 2007, **122**, 146-156.
14. Min K, Chae C. Serotype and *apx* genotype profiles of *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates in Korea. Vet Rec 1999, **145**, 251-254.
15. Morioka A, Asai T, Nitta H, Yamamoto K, Ogikubo Y, Takahashi T, Suzuki S. Recent trends in antimicrobial susceptibility and the presence of the tetracycline resistance gene in *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates in Japan. J Vet Med Sci 2008, **70**, 1261-1264.
16. Schuchert JA, Inzana TJ, Angen Ø, Jessing S. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2, and 8 by multiplex PCR. J Clin Microbiol 2004, **42**, 4344-4348.
17. Shin DH, Byun JW, Kim HY, Kim DK, Jang WN, Moon OK, Lee OS, Jung BY. Distribution of serotype and biofilm of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs. Korean J Vet Public Health 2011, **35**, 7-12.
18. Sidibé M, Messier S, Larivière S, Gottschalk M, Mittal KR. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological tests. Can J Vet Res 1993, **57**, 204-208.
19. Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ. Disease of Swine. 9th ed. pp. 563-576, Blackwell, Ames, 2006.
20. Yang CY, Lin CN, Lin CF, Chang TC, Chiou MT. Serotypes, antimicrobial susceptibility, and minimal inhibitory concentrations of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from slaughter pigs in Taiwan (2002-2007). J Vet Med Sci 2011, **73**, 205-208.
21. Zhou L, Jones SCP, Angen Ø, Bossé JT, Nash JHE, Frey J, Zhou R, Chen HC, Kroll JS, Rycroft AN, Langford PR. Multiplex PCR that can distinguish between immunologically cross-reactive serovar 3, 6, and 8 *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. J Clin Microbiol 2008, **46**, 800-803.