

DOI:10.22144/jvn.2017.038

XÁC ĐỊNH *Actinobacillus pleuropneumoniae* DỰA TRÊN GENE ĐỘC TỐ *apxIVA* VÀ SỰ ĐỀ KHÁNG KHÁNG SINH CỦA VI KHUẨN GÂY BỆNH VIÊM PHỔI, MÀNG PHỔI TRÊN HEO TẠI TỈNH KIÊN GIANG

Phan Kim Thanh, Phạm Thị Hồng Chi và Lý Thị Liên Khai

Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 06/10/2016

Ngày nhận bài sửa: 14/01/2017

Ngày duyệt đăng: 26/06/2017

Title:

Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on *apxIVA* gene and antibiotic resistance of porcine pneumoniae in Kien Giang province

Từ khóa:

Actinobacillus pleuropneumoniae, *apxIVA*, gene kháng kháng sinh, heo, Kiên Giang

Keywords:

Actinobacillus pleuropneumoniae, *apxIVA*, antibiotic resistance genes, pig, Kien Giang province

ABSTRACT

The *apxIVA* gene has been frequently used as one of the most important molecular marker in the detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* that cause porcine pneumonia. The research selected 135 samples from nasal swab, lung pig and tonsil for all of ages in households, farm and slaughterhouses, isolated on chocolate agar, identified by PCR method, antibiotic resistance testing by disk diffusion method of Bauer et al. (1966) and PCR. The rate of respiratory disease in swine in Kien Giang province was 11,14%. and isolation rate of *A. pleuropneumoniae* in swine in Kien Giang province was 27,69% (18/65). *A. pleuropneumoniae* isolated in pigs in Kien Giang province was found resistant to antibiotics such as amoxicillin (88.89%), streptomycin (72.22%), gentamicin (66.67%), ampicillin (50.00 %) and colistin (50.00%). The rate of antibiotic resistance genes *blaROB-1*, *strA*, *strB*, *aadB*, *pmrA*, *pmrB* with 33,33%; 27,78%; 72,22%; 38,89%; 33,33% and 33,33% respectively.

TÓM TẮT

Gene *apxIVA* là một gene độc tố được dùng để xác định vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*) gây bệnh viêm phổi, viêm màng phổi trên heo. Một trăm ba mươi lăm mẫu dịch xoang mũi, hạch hạnh nhân và phổi heo ở các lứa tuổi tại các hộ, trại chăn nuôi và lò giết mổ gia súc tại Kiên Giang được thu thập, phân lập trên môi trường chocolate và làm kháng sinh đồ dựa trên phương pháp khuếch tán trên thạch của Bauer et al. (1966). Tỷ lệ heo bệnh hô hấp ở Kiên Giang là 11,14%. Kỹ thuật PCR sử dụng gene độc tố *apxIVA* xác định được *A. pleuropneumoniae* là 27,69% (18/65). Vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được trên heo ở tỉnh Kiên Giang đề kháng với các loại kháng sinh amoxicillin (88,89%), streptomycin (72,22%), gentamicin (66,67%), ampicillin (50,00%) và colistin (50,00%). Tỷ lệ các gene kháng kháng sinh *blaROB-1*, *strA*, *strB*, *aadB*, *pmrA*, *pmrB* của vi khuẩn lần lượt là 33,33%; 27,78%; 72,22%; 38,89%; 33,33% và 33,33%.

Trích dẫn: Phan Kim Thanh, Phạm Thị Hồng Chi và Lý Thị Liên Khai, 2017. Xác định *Actinobacillus pleuropneumoniae* dựa trên gene độc tố *apxIVA* và sự đề kháng kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh viêm phổi, màng phổi trên heo tại tỉnh Kiên Giang. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 50b: 67-76.

1 GIỚI THIỆU

Actinobacillus pleuropneumoniae là vi khuẩn gram âm, không sinh nha bào, không di động, là

nguyên nhân gây nhiễm trùng huyết và viêm phổi dính sườn, có thể dẫn đến tử vong hoặc nhiễm trùng mãn tính, giảm tốc độ tăng trưởng và tăng chi

phí điều trị (Gottschalk *et al.*, 2012). *A. pleuropneumoniae* lây nhiễm qua hô hấp, có thể lây nhiễm từ nái sang con trong giai đoạn cho bú và biểu hiện các dấu hiệu lâm sàng rõ nhất ở giai đoạn 10 tuần tuổi (trọng lượng cơ thể từ 25 – 30 kg) (Gottschalk *et al.*, 2012). Do đó, vi khuẩn có thể được phân lập từ các tổn thương ở phổi và dịch xoang mũi (OIE, 2009).

Hầu hết các vi khuẩn thuộc họ *Pasteurellaceae* đều sản sinh các độc tố RTX nhưng không sản sinh độc tố ApxIV như *A. pleuropneumoniae* nên gene độc tố *apxIVA* được dùng để xác định vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* và điều đó chứng tỏ nó có tính chất đặc trưng cho loài (Schaller *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2011). Kỹ thuật PCR được xem là phương pháp để phát hiện và xác định *A. pleuropneumoniae* dựa trên gene độc tố *ApxIVA* (Schaller *et al.*, 2001).

Các serotype của *A. pleuropneumoniae* thay đổi theo vùng địa lý và giữa các nhóm tuổi của đàn heo. Tại châu Âu, Canada, Đài Loan, Hàn Quốc, Thái Lan, Trung Quốc đã xác định được các serotype 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 và 15. Riêng ở khu vực miền Bắc Việt Nam thì có sự lưu hành của các serotype 2 và 5 (Nguyễn Thị Thu Hằng, 2010). Nguyễn Thu Tâm, (2012) đã phân lập và xác định *A. pleuropneumoniae* trên phổi heo tại tỉnh Đồng Tháp dựa vào đặc tính sinh hóa.

Khả năng đề kháng kháng sinh của *A. pleuropneumoniae* được xem là nguyên nhân làm tỷ lệ bệnh viêm phổi, màng phổi trên heo tăng cao. Sự khác biệt của các kiểu đề kháng, khả năng đề kháng giữa các loài vi khuẩn và giữa các chủng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* khác nhau đã làm giảm hiệu quả điều trị bệnh viêm phổi, màng phổi của một số kháng sinh (Chang *et al.*, 2002).

Hiện nay, bệnh viêm phổi, màng phổi do *A. pleuropneumoniae* gây ra trên heo vẫn chưa được nghiên cứu tại tỉnh Kiên Giang. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định tỷ lệ bệnh hô hấp, định danh vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* theo nhóm týp huyết thanh dựa trên gene độc tố *apxIVA*, xác định sự đề kháng và gene kháng kháng sinh của vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* gây bệnh viêm phổi, màng phổi trên heo tại tỉnh Kiên Giang.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Một trăm ba mươi lăm mẫu (90 mẫu dịch mũi và 45 mẫu phổi) được thu thập từ 501 con heo

bệnh hô hấp tại 3 huyện Tân Hiệp, Giồng Riềng, Hòn Đất của tỉnh Kiên Giang từ tháng 9/2015 đến tháng 7/2016.

Kháng sinh: 14 loại gồm ampicillin (Am) 10µg, amoxicillin (Ax) 10 µg, amoxicillin/clavulanic acid (Ac) 20/10 µg, bactrim (Bt, sulfamethoxazole/trimethoprim) 1.25/23.75 µg, ciprofloxacin (Ci) 5 µg, ceftriaxone (Cx) 30 µg, colistin (Co) 10 µg, gentamycin (Ge) 30 µg, norfloxacin (Nr) 10 µg, nalidixic acid (Ng) 30 µg, neomycin (Ne) 30 µg, tetracycline (Te) 30 µg, streptomycine (Sm) 10 µg (Nam Khoa, Việt Nam) và florfenicol (FFc) 30 µg (Oxoid, UK).

Primer mã hoá gene độc tố *apxIVA* là *apxIVADWN-L*, *apxIVA-R* để xác định vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* và các primer mã hóa các gene kháng kháng sinh *bla_{ROB-1}*, *strA*, *strB*, *aadB*, *pmrA*, *pmrB* (Bioline, USA).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phương pháp phân lập vi khuẩn

Các mẫu dịch mũi, mẫu phổi được xử lý để nuôi cấy và phân lập *A. pleuropneumoniae* trên môi trường chocolate có bổ sung 5% máu cừu, ủ ở 37°C trong 24 giờ (Quinn *et al.*, 2004). Quan sát các khuẩn lạc *A. pleuropneumoniae* trên môi trường chocolate thường nhỏ 0,5 – 1 mm, màu xám trong mờ và trơn nhẵn (Pozzi *et al.*, 2011).

2.2.2 Phương pháp xác định vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* dựa vào gene mã hóa độc lực *apxIVA*

a. Ly trích DNA của vi khuẩn

DNA của *A. pleuropneumoniae* được ly trích theo phương pháp shock nhiệt của Kucerova *et al.* (2005). Sau khi tăng sinh *A. pleuropneumoniae* trên môi trường chocolate, thu sinh khối vi khuẩn cho vào ống eppendorf có chứa 0,5 ml nước cất tinh khiết vô trùng, hòa tan rồi đun cách thủy ở 100°C trong 10 phút. Sau đó tiến hành ly tâm huyền dịch trong eppendorf với vận tốc 10.000 vòng trong 15 phút. Tiếp theo rút lấy dịch trong bên trên, đây là mẫu DNA cho quá trình PCR. Trữ mẫu DNA ở -20°C với OD tương đương 50 ng/ml.

b. Xác định vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* bằng kỹ thuật PCR

Xác định *A. pleuropneumoniae* dựa vào gene độc tố *apxIVA* bằng phương pháp PCR (polymerase chain reaction) theo Rayamajhi *et al.* (2005) với trình tự primer được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1: Trình tự primer của gene độc tố *apxIVA* (Rayamajhi et al., 2005)

Gene	Trình tự primer	Kích thước phân tử (bp)	Serotype group
<i>apxIVA</i>	F: GCG AAA CAA TTC GAA GGG	1600	4, 9, 11
		2000	6
	R: GGC CAT CGA CTC AAC CAT	2400	1, 3, 12,13,14
		2800	2, 5, 8,10, 15

Thành phần hỗn hợp cho phản ứng PCR là 25 µl gồm master mix 12,5 µl, đoạn mỗi xuôi 1 µl, đoạn mỗi ngược 1 µl, mẫu DNA vi khuẩn 2 µl và 8,5 µl nước cất tinh khiết. Chu trình nhiệt bao gồm các giai đoạn tiền biến tính 94°C trong 5 phút, 35 chu kỳ gồm các giai đoạn: biến tính 94°C trong 30 giây, gắn mỗi 55°C ở 30 giây, kéo dài ở 90 giây và

giai đoạn kết thúc 72°C trong 10 phút (Rayamajhi et al., 2005).

2.2.3 Phương pháp kiểm tra sự đề kháng và gene kháng sinh của vi khuẩn *A. pleuropneumoniae*

Sự đề kháng kháng sinh của vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* được thực hiện theo phương pháp khuếch tán trên thạch của Bauer et al. (1966), (CLSI, 2016).

Bảng 2: Trình tự primer của các gene kháng kháng sinh của vi khuẩn *A. pleuropneumoniae*

Nhóm kháng sinh	Gene	Trình tự primer 5'-3'	Kích thước phân tử (bp)
β-lactam	<i>rob-1</i>	TGT TGC AAT CGC TGCC	400
		TTA TCG TAC ACT TTC CA	
Amino- glycosides	<i>aadB</i>	CTA GCT GCG GCA GAT GAGC	300
		CTC AGC CGC CTC TGG GCA	
	<i>strA</i>	TGG CAG GAG GAA CAG GAGG	405
		AGG TCG ATC AGA CCC GTGC	
Poly – peptide	<i>strB</i>	GCG GAC ACC TTT TCC AGC CT	621
		TCC GCC ATC TGT GCA ATG CG	
	<i>pmrA</i>	AGT TTT CCT CAT TCG CGA CCA	714
		TAC CAG GCT GCG GAT GAT ATT CT	
<i>pmrB</i>	GGA TGG CCT GAT GTG ACG CTG TC	1312	
	GCG CGG CTT TGG CTA TAT GCTG		

Các gene kháng kháng sinh và chu trình nhiệt cho phản ứng PCR được xác định theo Yoo et al. (2014) cho gene *bla_{ROB-1}*; Chuanchuen và Pawin (2009) cho các gene *strA*, *strB*; Chuanchuen và Pawin (2009) cho gene *aadB*; Quesada et al. (2014) đối với các gene *pmrA*, *pmrB* với các primer được trình bày ở Bảng 2.

2.2.4 Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được phân tích và xác định mức ý nghĩa được xử lý thống kê bằng các phương pháp Chi-square test, Chi-square Yates test, Fisher’s exact test.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả khảo sát tỷ lệ bệnh hô hấp trên heo tại tỉnh Kiên Giang

Tỷ lệ bệnh đường hô hấp trên heo tại 3 huyện thuộc tỉnh Kiên Giang được trình bày qua Bảng 3.

Kết quả khảo sát 4.496 con heo tại 3 huyện Giồng Riềng, Tân Hiệp, Hòn Đất thuộc tỉnh Kiên

Giang đã xác định có 501 con heo bệnh đường hô hấp chiếm tỷ lệ 11,14%. Và sự khác biệt này rất có ý nghĩa thống kê (p<0,01). Tỷ lệ bệnh đường hô hấp ở huyện Hòn Đất cao là do mật độ trong chuồng nuôi cao, một số trang trại và hộ chăn nuôi chưa có hệ thống xử lý chất thải như túi ủ hay hầm ủ biogas, môi trường tiêu khí hậu chuồng nuôi kém thông thoáng, vệ sinh kém. Ở huyện Giồng Riềng, môi trường chăn nuôi thông thoáng ít bị ô nhiễm. Theo John (2001) Mousing (2006), các yếu tố quan trọng có ảnh hưởng trực tiếp đến bệnh đường hô hấp của heo như mật độ nuôi cao, không khí chuồng nuôi không thông thoáng, thiếu ánh sáng ảnh hưởng đến tiêu khí hậu chuồng nuôi. Ngoài ra, chăm sóc quản lý kém, không theo dõi kịp thời các triệu chứng lâm sàng lúc heo bệnh, không quan tâm đến vệ sinh chuồng trại sẽ làm giảm sức đề kháng của heo và tạo điều kiện cho vi sinh vật tấn công gây bệnh cũng là yếu tố làm tăng nguy cơ bệnh đường hô hấp heo (Mousing, 2006).

Bảng 3: Tỷ lệ heo bệnh đường hô hấp tại tỉnh Kiên Giang

Địa điểm	Số heo khảo sát	Số heo bệnh đường hô hấp	Tỷ lệ (%)
Huyện Giồng Riềng	1.892	145 ^a	7,66
Huyện Tân Hiệp	1.735	187 ^b	10,78
Huyện Hòn Đất	869	169 ^c	19,45
			P<0,01
Tổng	4.496	501	11,14

Kết quả nghiên cứu bệnh đường hô hấp ở tỉnh Kiên Giang thấp hơn kết quả nghiên cứu bệnh đường hô hấp của Loera-Muro *et al.* (2013) ở các trang trại vùng Aguascalientes, Mexico là 35,7% và cao hơn kết quả nghiên cứu của Pozzi *et al.* (2011) là 8%. Có sự khác nhau giữa các kết quả nghiên cứu này có thể là do khác nhau về vị trí địa lý, thời gian khảo sát sự lưu hành bệnh, các yếu tố môi trường, thời tiết, qui mô chăn nuôi.

3.2 Kết quả phân lập vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* trên heo tại tỉnh Kiên Giang

Qua khảo sát 501 con heo có biểu hiện bệnh đường hô hấp, đã có 65/135 con heo phân lập được vi khuẩn *Actinobacillus spp.*, kết quả được trình bày qua Bảng 4.

Bảng 4: Kết quả phân lập vi khuẩn *Actinobacillus spp.* trên heo bệnh hô hấp tại tỉnh Kiên Giang

Địa điểm	Số mẫu phân lập	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Huyện Giồng Riềng	45	25	55,56 ^a
Huyện Tân Hiệp	45	27	60,00 ^a
Huyện Hòn Đất	45	13	28,89 ^b
Tổng	135	65	48,15

Các giá trị của các chữ số mũ trong cùng một cột khác nhau thì khác nhau rất có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$)

Kết quả phân lập vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* trên 135 con heo bệnh đường hô hấp cho thấy có 65 mẫu dương tính chiếm tỷ lệ 48,15%. Kết quả cho thấy tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *Actinobacillus spp.* giữa huyện Giồng Riềng và huyện Tân Hiệp là tương đương nhau ($p > 0,05$). Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *Actinobacillus spp.* thấp nhất ở huyện Hòn Đất và có sự sai khác với 2 huyện Giồng Riềng và Tân Hiệp ($p < 0,05$). Tại Hòn Đất, trung tâm giống vật nuôi và cây trồng Kiên Giang thường xuyên tập huấn về kỹ thuật chăn nuôi và biện pháp phòng bệnh trên đàn vật nuôi cho các hộ chăn nuôi cho nên người chăn nuôi thực hiện tiêm phòng đầy đủ.

Kết quả nghiên cứu tại tỉnh Kiên Giang (48,15%) cao hơn kết quả của Nguyễn Thu Tâm (2012) tại tỉnh Đồng Tháp là 22,69%. Nghiên cứu khác nhau có thể do khác nhau về thời gian, địa điểm thu thập mẫu và cách lấy mẫu để phân tích.

3.3 Kết quả xác định vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* dựa vào gene *apxIVA* bằng kỹ thuật PCR

Trong 65 mẫu dương tính với vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* có 18 mẫu dương tính với gene độc lực *apxIVA*, kết quả được trình bày qua Bảng 5.

Bảng 5: Kết quả xác định vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* bằng PCR dựa vào gene độc lực *apxIVA*

Địa điểm	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Huyện Giồng Riềng	25	7	28,00
Huyện Tân Hiệp	27	6	22,22
Huyện Hòn Đất	13	5	38,46
			$p > 0,05$
Tổng	65	18	27,69

Kết quả cho thấy có 18/65 mẫu dương tính với gene mã hóa độc lực *apxIVA* chiếm tỷ lệ 27,69%. Sự phân bố của các gene *apx* khác nhau trong các serotype *A. pleuropneumoniae* cho thấy gene *apxIVA* hiện diện trong cả hai biotype (Frey *et al.*, 1995; Frey, 2002; Rayamajhi *et al.*, 2005). Không có sự khác biệt tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* trên heo ở 3 huyện Giồng Riềng, Tân Hiệp, Hòn Đất ($p > 0,05$). Kết quả nghiên cứu tại tỉnh Kiên Giang (27,69%) cao hơn kết quả nghiên cứu của Loera – Muro *et al.* (2013), vùng Aguascalientes, Mexico là 19,8% và tương đương với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Lương Trường Giang và ctv. (2015) là 27,78%. Điều này có thể do ngoại độc tố *apxIVA* có thể mất đi qua cấy chuyển trong phòng thí nghiệm (Schaller *et al.*, 2001). Vì vậy, trong một vài trường hợp khi phát hiện vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* bằng kỹ thuật sinh học phân tử dựa vào gene *apxIVA* đôi khi gặp khó khăn (Rossi *et al.*, 2014). Do vậy, đây có thể là

nguyên nhân làm cho tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* thay đổi khi xác định bằng kỹ thuật PCR.

3.4 Kết quả định danh các chủng *A. pleuropneumoniae* theo nhóm serotype dựa vào gene độc lực *apxIVA* bằng kỹ thuật PCR

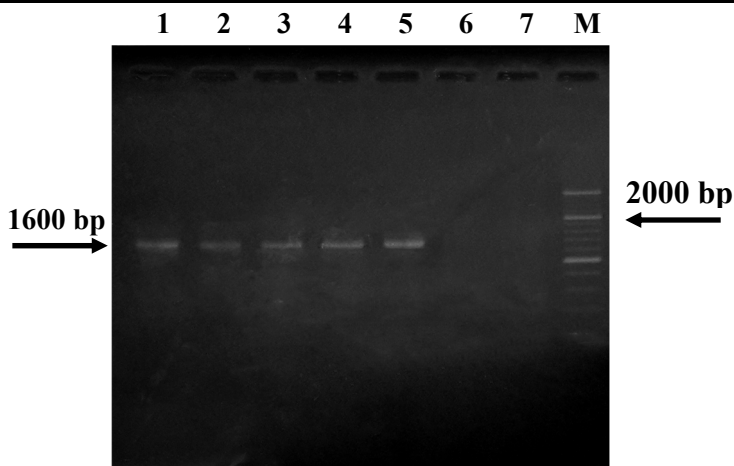
Định danh 18 chủng vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* dương tính với gene độc lực *apxIVA* theo nhóm serotype gây bệnh viêm phổi,

màng phổi trên heo tại tỉnh Kiên Giang, kết quả được trình bày qua Bảng 6.

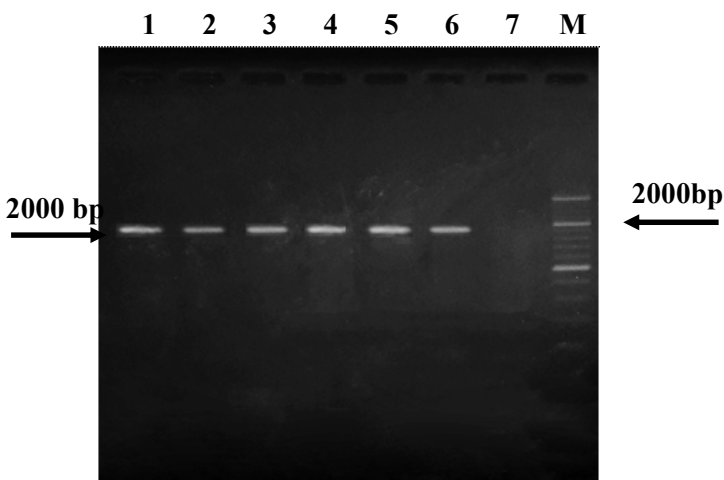
Kết quả định danh vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được tại tỉnh Kiên Giang cho thấy có 2 nhóm serotype chính. Nhóm 1 với kích thước 1600 bp (Hình 1) có các serotype 4, 9, 11 lưu hành chủ yếu tại 2 huyện Giồng Riềng (7/7 mẫu) và Tân Hiệp (6/6 mẫu). Nhóm 2 tại huyện Hòn Đất với kích thước 2000 bp (Hình 2) có serotype 6 với 5/5 mẫu.

Bảng 6: Kết quả định danh các chủng *A. pleuropneumoniae* theo nhóm serotype gây bệnh viêm phổi, màng phổi trên heo tại tỉnh Kiên Giang

Địa điểm	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính	Kích thước sản phẩm PCR (bp)	Serotype
Huyện Giồng Riềng	7	7	1600	4, 9, 11
Huyện Tân Hiệp	6	6	1600	4, 9, 11
Huyện Hòn Đất	5	5	2000	6
Tổng	18	18		



Hình 1: Gel agarose điện di thể hiện gene độc lực *apxIVA* của *A. pleuropneumoniae* có kích thước sản phẩm PCR là 1600 bp



Hình 2: Gel agarose điện di thể hiện gene độc lực *apxIVA* của *A. pleuropneumoniae* có kích thước sản phẩm PCR là 2000 bp

Kết quả nghiên cứu của một số tác giả trên thế giới cho thấy các serotype 4, 6, 9, 11 thường được tìm thấy ở một số quốc gia như Hàn Quốc (Min and Chae, 1999; Kim *et al.*, 2012), Bỉ (Dubreuil *et al.*, 2000; Dom *et al.*, 2011), Cộng hòa Séc (Kucerova *et al.*, 2005), Nhật Bản (Ito, 2010), Thái Lan (Tonpitak, 2010) và Brazil (Gottschalk, 2012). Như vậy, các chủng *A. pleuropneumoniae* gây bệnh trên heo tại tỉnh Kiên Giang cũng là các chủng phổ biến thường gặp gây bệnh ở heo trên thế giới.

Kết quả xác định tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* theo hình thức chăn nuôi trang trại là 18/59 mẫu chiếm tỷ lệ 30,51% và không có bệnh viêm phổi, màng phổi tại các hộ chăn nuôi gia đình. Bệnh viêm phổi, màng phổi thường xuất hiện ở các trang trại chăn nuôi (Gottschalk *et al.*, 2006) và đối với các nước có khí hậu nhiệt đới, nóng ẩm bệnh thường xuyên xảy ra hơn (Nicolet, 1992). Các trang trại thường nuôi nhốt chặt chẽ, nền chuồng ẩm ướt làm heo dễ bị stress và giảm sức đề kháng nên tăng nguy cơ bệnh.

Bảng 7: Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* theo phương thức chăn nuôi

Hình thức chăn nuôi	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Hộ gia đình	6	0	0,00
Trang trại	59	18	30,51
Tổng	65	18	27,69

Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* đối với heo từ sau cai sữa khoảng 2 tháng đến 3 tháng tuổi là 6/22 mẫu chiếm tỷ lệ 27,27% và heo từ sau 3 tháng đến giết thịt là 27,91% (12/43 mẫu). Kết quả nghiên cứu tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* đối với heo từ sau cai sữa khoảng 2 tháng đến 3 tháng tuổi tại tỉnh Kiên Giang cao hơn kết quả nghiên cứu của Lê Văn Dương (2013) tại tỉnh Bắc Giang là 26,67% và thấp hơn của Nguyễn Thị Thu Hằng (2010) tại một tỉnh phía Bắc là 58,49%. Còn đối với heo từ sau 3 tháng đến giết thịt của nghiên cứu này cao hơn kết quả nghiên cứu tại tỉnh Bắc Giang và một số tỉnh phía Bắc lần lượt là 17,57% và 42,31%.

Theo Carter *et al.* (2004), bệnh viêm phổi, màng phổi xảy ra ở mọi lứa tuổi, đặc biệt là heo sau cai sữa dễ cảm nhiễm nhất, tỷ lệ bệnh cao nhưng tỷ lệ chết thấp. Bệnh sẽ trầm trọng và tử vong cao khi heo nhiễm ghép với các bệnh khác như bệnh giả dại, hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản (PRRS). Ngoài ra, việc luân chuyển đàn hay ghép bày giữa các lứa heo trong nhiều đợt nuôi, chim và những động vật gặm nhấm nhỏ cũng là

những yếu tố truyền lây bệnh. Việc trao đổi, mua bán con giống, tinh dịch giữa các vùng với nhau cũng là điều kiện để *A. pleuropneumoniae* lưu hành và lây lan trên diện rộng (Nicolet, 1992; Gucht *et al.*, 2004).

Bảng 8: Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* theo lứa tuổi

Lứa tuổi	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
2 – 3 tháng tuổi	22	6	27,27
>3 – 6 tháng tuổi	43	12	27,91
Tổng	65	18	27,69

Bảng 9: Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* trên heo từ bệnh phẩm và dịch xoang mũi

Bệnh phẩm	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Dịch mũi	35	12	34,29
Hạch hạnh nhân và phổi	30	6	20,00
			P>0,05
Tổng	65	18	27,69

Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được từ 35 mẫu dịch xoang mũi trên heo có 12 mẫu dương tính chiếm tỷ lệ là 34,29% và bệnh phẩm hạch hạnh nhân và phổi heo có 6/30 mẫu dương tính chiếm 20,00%, không có sự khác biệt giữa tỷ lệ nhiễm từ bệnh phẩm hạch hạnh nhân và phổi và dịch xoang mũi ($p > 0,05$). *A. pleuropneumoniae* chỉ lây nhiễm qua đường hô hấp của heo. Khi heo nhiễm trùng quá cấp hoặc cấp tính, *A. pleuropneumoniae* không những được phân lập ở phổi mà còn được phân lập với tỷ lệ cao trong dịch mũi (Gottschalk *et al.*, 2006).

Kết quả nghiên cứu này cao hơn kết quả nghiên cứu của Nguyễn Lương Trường Giang và *ctv.*, 2015 tại thành phố Cần Thơ về tỷ lệ nhiễm *A. pleuropneumoniae* trên heo từ dịch xoang mũi là 30,43% và thấp hơn tỷ lệ nhiễm *A. pleuropneumoniae* trên heo từ hạch hạnh nhân và phổi heo là 23,08%. Điều này có thể do sự khác biệt về phương thức chăn nuôi của từng vùng. Bệnh được truyền trực tiếp từ heo bệnh sang heo khỏe hoặc qua không khí ở khoảng cách gần. Sự lan truyền bệnh giữa các đàn thường xảy ra qua việc nhập động vật mới vào đàn. Sự vận chuyển và nhập đàn làm tăng số lượng heo mắc bệnh viêm phổi, màng phổi. Các yếu tố khác như mật độ đàn quá đông, điều kiện khí hậu thay đổi đột ngột nhất

là khi có sự thay đổi nhiệt độ, độ ẩm không khí cao và thông thoáng kém làm sự phát triển và lan truyền bệnh nhanh có ảnh hưởng lớn đến số lượng heo mắc bệnh và chết.

3.5 Kết quả khảo sát sự đề kháng kháng sinh của vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* đối với một số kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán trên thạch

Sau khi xác định vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* tiến hành kiểm tra sự đề kháng

Bảng 10: Tỷ lệ đề kháng của vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được đối với một số loại kháng sinh (n = 18)

Kháng sinh	Nhạy		Kháng	
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Ampicillin	9	50,00	9	50,00
Amoxicillin	2	11,11	16	88,89
Amox./clav. Acid*	16	88,89	2	11,11
Bactrim**	14	77,78	4	22,22
Ceftriaxone	14	77,78	4	22,22
Ciprofloxacin	14	77,78	4	22,22
Colistin	9	50,00	9	50,00
Florfenicol	14	77,78	4	22,22
Gentamicin	6	33,33	12	66,67
Norfloxacin	14	77,78	4	22,22
Nalidixic acid	13	72,22	5	27,78
Neomycin	13	72,22	5	27,78
Streptomycin	5	27,78	13	72,22
Tetracycline	14	77,78	4	22,22

*Amoxicillin/clav.acid: amoxicillin/clavulanic acid **Bactrim: trimethoprim/Sulfamethoxazol

Vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* đề kháng với colistin, gentamicin, ampicillin, streptomycin (Tiêu Quang An và Nguyễn Hữu Nam, 2010); đề kháng gentamicin (Nguyễn Thị Thu Hằng, 2010); đề kháng với gentamicin và colistin (Nguyễn Lương Trường Giang và ctv. 2015) và các kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu sự đề kháng kháng sinh của vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* được phân lập từ heo nuôi tại Kiên Giang. Hầu hết, các kháng sinh đề kháng đều là những kháng sinh phổ biến, được người chăn nuôi sử dụng trong điều trị bệnh trên heo.

Vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được trên heo ở tỉnh Kiên Giang đa kháng với ít nhất từ 2 – 13 loại kháng sinh. Nguyên nhân làm cho vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* đa kháng với kháng sinh có thể do kháng sinh được sử dụng rộng rãi trong chăn nuôi heo như bổ sung vào thức ăn để ngăn chặn những bệnh do vi khuẩn gây ra, kháng sinh được người chăn nuôi hoặc cán bộ thú y sử dụng tiêm cho heo ngay khi heo có dấu hiệu bệnh và sử dụng trong thời gian lâu dài.

của vi khuẩn với một số kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán trên thạch, kết quả được trình bày qua Bảng 10.

Kết quả kiểm tra sự đề kháng kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán trên thạch cho thấy vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được trên heo ở tỉnh Kiên Giang đề kháng với các loại kháng sinh sau: amoxicillin (88,89%), streptomycin (72,22%), gentamicin (66,67%), ampicillin (50,00%) và colistin (50,00%).

Bảng 11: Tỷ lệ đa kháng của vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được đối với một số loại kháng sinh (n = 18)

Số kháng sinh bị kháng	Số chủng vi khuẩn đề kháng	Tỷ lệ (%)
2	2	11,11
3	2	11,11
4	2	11,11
5	3	16,67
7	3	16,67
8	1	5,56
10	2	11,11
13	1	5,56

Như vậy, với tình trạng đa kháng kháng sinh như hiện nay, một số kháng sinh còn hữu ích trong việc điều trị bệnh viêm phổi, màng phổi do *A. pleuropneumoniae* gây ra là amoxicillin/clavulanic acid, bactrim, ceftriaxone, ciprofloxacin, florfenicol, norfloxacin và tetracycline.

3.6 Kết quả khảo sát gene đề kháng kháng sinh của vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* bằng PCR

Gene kháng kháng sinh *rob-1* thuộc nhóm β – lactam: kháng sinh thuộc nhóm β – lactam có khả năng diệt khuẩn nhờ vòng β – lactam kết hợp bền vững với enzyme transpeptidase tham gia quá trình tổng hợp peptidoglycan của thành tế bào vi khuẩn, do đó ức chế quá trình tạo thành tế bào làm ly giải hoặc biến dạng vi khuẩn. Vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* có thể đề kháng lại gene *rob-1* là do vi khuẩn này tự sản sinh ra enzyme β – lactamase (Ahmed *et al.*, 2009).

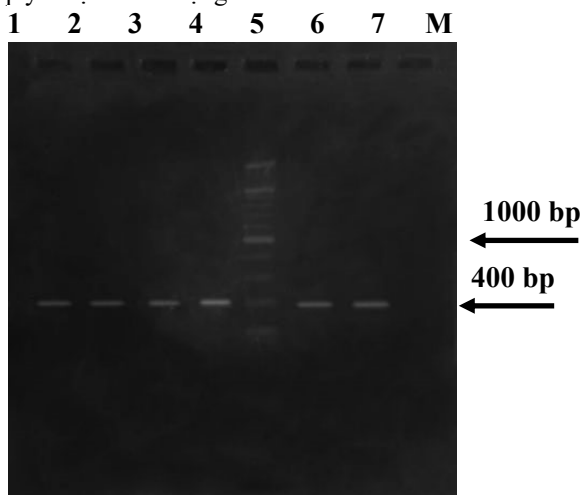
Các gene kháng kháng sinh *pmrA* và *pmrB* thuộc nhóm polypeptide: sự đề kháng kháng sinh colistin có thể xuất hiện bởi cơ chế thích nghi hoặc đột biến và hầu hết có sự đề kháng chéo giữa colistin và những polymyxin khác. Sự đa dạng trong biến đổi gen nhằm thay đổi lớp màng ngoài của vi khuẩn *A. pleuropneumoniae*, vốn là vị trí hoạt động của colistin đã dẫn đến sự kháng thuốc (Falagas and Kasaikou, 2005). Sự hoạt hóa hệ thống của gene *pmrA* và *pmrB* làm thay đổi cấu trúc của lớp lipid A về lipopolysaccharide tích điện âm trên bề mặt của vi khuẩn. Khi được hoạt hóa, hệ thống *pmrA* và *pmrB* sẽ gắn thêm ethanolamine vào nhóm phosphate của lipopolysaccharide và lipid A, đồng thời cũng chèn thêm aminoarabinose tại vị trí 4' phosphate của lipid A. Sự thay đổi này sẽ làm giảm tổng điện tích của lipopolysaccharide vì vậy sẽ làm giảm ái lực gắn kết với những polymyxin mang điện tích dương, đóng vai trò quan trọng trong cơ chế kháng polymyxin và gây ra những thay đổi đa dạng hơn (Gunn *et al.*, 2000).

Các gene kháng kháng sinh *aadB*, *strA* và *strB* thuộc nhóm aminoglycosid: sự đề kháng với các kháng sinh thuộc nhóm aminoglycoside được gây ra bởi Plasmid R. Plasmid R gồm hai thành phần: RTF (R transfer factor) và R quyết định tính trạng

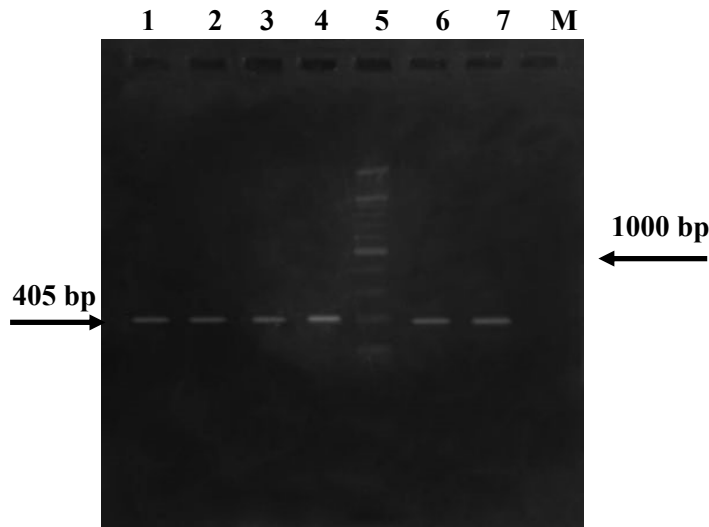
(R determinant). RTF mang gene quyết định sự truyền yếu tố R, còn R determinant mang gene quyết định tính kháng thuốc. Vì vậy, vi khuẩn mang R có RTF thì có thể truyền tính kháng thuốc cho vi khuẩn khác làm cho vi khuẩn này trở nên kháng thuốc và đến lượt nó lại truyền được tính kháng thuốc cho vi khuẩn khác. Đó là nguồn gốc sự lây lan tính kháng thuốc hiện nay của vi khuẩn. Một vấn đề đáng đề ý trong sự truyền tính kháng thuốc qua R là tính kháng thuốc do R quy định thường là kháng đa kháng sinh (Quinn *et al.*, 2004). Chính sự truyền tính kháng thuốc cũng là cho vi khuẩn đề kháng đa kháng sinh và lây lan tính đa kháng sinh. Vấn đề này rất quan trọng trong lâm sàng. Archambault *et al.*, (2012) cũng kết luận là vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* chứa gene *strA* (18,6%) và *strB* (2,3%) khi phân lập và kiểm tra sự đề kháng kháng sinh của vi khuẩn trên những đàn heo có triệu chứng lâm sàng của bệnh viêm phổi, màng phổi từ vùng Saskatchewan, Ontario và Québec – Canada. Tại Hàn Quốc, Kim *et al.*, (2016) cũng nghiên cứu và kết luận được vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* chứa gene *aadB* chiếm 92 %.

Bảng 12: Tỷ lệ các gene đề kháng kháng sinh của vi khuẩn *A. pleuropneumoniae* phân lập được trên heo tại tỉnh Kiên Giang

Gene kháng kháng sinh	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
<i>rob-1</i>	18	6	33,33
<i>strA</i>	18	5	27,78
<i>strB</i>	18	13	72,22
<i>aadB</i>	18	7	38,89
<i>pmrA</i>	18	6	33,33
<i>pmrB</i>	18	6	33,33



Hình 3: Gel agarose điện di thể hiện gene *rob-1* mã hóa kháng sinh β – lactam của *A. pleuropneumoniae* có kích thước sản phẩm PCR là 400 bp



Hình 4: Gel agarose điện di thể hiện gene *strA* mã hóa kháng sinh streptomycin của *A. pleuropneumoniae* có kích thước sản phẩm PCR là 405 bp

4 KẾT LUẬN

Độc tố ApxIV là đặc trưng của loài do đó có thể dựa trên gene độc tố *apxIVA* để xác định *A. pleuropneumoniae* và phân nhóm serotype của vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR.

Tất cả các chủng *A. pleuropneumoniae* được phân lập từ heo nuôi tại Kiên Giang đều có kiểu hình đề kháng với amoxicillin, ampicillin, streptomycin, gentamicin, colistin và có kiểu hình đa kháng với ít nhất từ 2 – 13 loại kháng sinh. Các chủng vi khuẩn đề kháng kháng sinh đều mang kiểu gene với *rob-1*, *aadB*, *strA*, *strB*, *pmrA* và *pmrB*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahmed, A.M., E.E.A. Younis, S.A. Osman, Y. Ishida, S.A. El-khodery and T. Shimamoto, 2009. Genetic analysis of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from diarrheic neonatal calves. *Veterinary Microbiology*. 136: 397-402.

Archambault M., Harel J., Goure J., Tremblay Y. D. N., and Jacques M. 2012. Antimicrobial Susceptibilities and Resistance Genes of Canadian Isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology*. 18: 198 – 206.

Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris and M. Turck, 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.

Chang, C. F., T. M. Yeh, C. C. Chou, Y. F. Chang and T. S. Chiang, 2002. Antimicrobial susceptibility and plasmid analysis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated in Taiwan. *Veterinary Microbiology*. 84: 169-177.

Clinical and Laboratory Standards Institute, M100S, 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Six Informational Supplement. New York, 256 pages.

Chuanchuen Rungtip and Pawin Padungtod, 2009. Antimicrobial Resistance Genes in *Salmonella enterica* Isolates from Poultry and Swine in Thailand. *J. Vet.Med.Sci.* 71(10): 1349-1355.

Dom P., Hommez J., Castryck F., Devriese L. A., Haesebrouck F., 2011. Serotyping and quantitative determination of *in vitro* antibiotic susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated in Belgium (July 1991-August 1992). *The Veterinary Quarterly*. 16: 10-13.

Dubreuil JD, Jacques M, Mittal KR, Gottschalk M., 2000. *A. pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Anim Health Res Rev.* 1(2):73-93.

Falagas M. E., Kasiakou S. K., 2005. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug – resistant gram – negative bacterial infections. *Clin Infect Dis.* 40:1333 – 1341.

Frey Joachim, Marianne Beck, Johannes F. van den Bosch, Ruud P.A.M. Segers and Jacques Nioclet, 1995. Development of an efficient PCR method for toxin typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Molecular and Cellular Probes.* 9: 277-282.

Gottschalk, Marcelo and Taylor David J., 2012. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Straw B. E., Zimmerman J. J., D’Allaire S., Taylor D. J. (eds). *Diseases of Swine* (10th edition). Blackwell Publishing Company, Ames, Iowa, pp. 653-669.

Gucht, S.V., Labarque, G., Reeth, K.V., 2004. The combination of PRRS virus and bacterial endotoxin as a model for multifactorial respiratory disease in pigs. *Immun.* 102: 165 – 178.

Gunn J. S., Ryan S. S., Van Velkinburgh J. C., Ernst R. K., Miller S. I., 2000. Genetic and

- functional analysis of a PmrA – PmrB – regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infect Immun.* 68: 6139-6146.
- Ito, H., 2010. *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotypes and serotypes. *All about SWINE.* 36, 2-9 (Nhật ngữ).
- John Carr, 2001. Hội chứng bệnh hô hấp của lợn. Người dịch: Nguyễn Tiến Dũng. *Tạp chí khoa học kỹ thuật thú y* (2001). 8 (4): 89-93.
- Kim A., Lee J. Y., Lim C. T., Jung S. C., Joo Y. S. 2012. Serodiversity and genomic relatedness of *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates in Korea. *Proc Congr Int Pig Vet Soc 22nd*, 610-615.
- Kucerova, Z., Z. Jaglic, R. Ondriasova and K. Nedbalcova, 2005. Serotype distribution of *A. pleuropneumoniae* isolated from porcine *pleuropneumoniae* in the Czech Republic during period 2003-2004. *Vet. Med.* 50 (8): 355-360.
- Lê Văn Dương, 2013. Nghiên cứu một số đặc tính sinh học của vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida* gây viêm phổi trong hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn tại Bắc Giang, biện pháp điều trị. Luận án tiến sĩ Nông nghiệp. Đại học Thái Nguyên.
- Loera-Muro, A., Francisco J. Avelar-Gozález, Victor M. Loera-Muro, Mario Jacques, and Alma L. Guerrero-Barrera, 2013. Presence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis* and *Mycoplasma hyopneumoniae* in upper respiratory tract of swine in farms from Aguascalientes, Mexico. *Open Journal of Animal Sciences.* 3 (2): 132-137.
- Matter, D., Rossano, A., Limat, S., Lorianne Vorlet-Fawer, Isabelle Brodard, Vincent Perreten, 2007. Antimicrobial resistance profile of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus porcitonisillarum*. *Veterinary Microbiology.* 122: 146-156.
- Min K., Chae C., 1999. Serotype and apx genotype profiles of *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates in Korea. *Vet Rec.* 145, 251-254.
- Mousing, J., S. Jorsal and S. Vibeke, 2006. Disease of respiratory system. In: Straw, B. E., Zimmerman J. J., D'Allaire S., Taylor D. J. (eds). *Diseases of Swine* (9th edition). Blackwell Publishing Company, Ames Iowa, pp.149-170.
- Nguyễn Lương Trường Giang, Phan Kim Thanh, Lý Thị Liên Khai, 2015. Sự lưu hành của vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* trên heo tại thành phố Cần Thơ. *Kỷ yếu Hội nghị khoa học, Chăn nuôi – Thú y toàn quốc. Nhà xuất bản Nông nghiệp*, trang 577-582.
- Nguyễn Thị Thu Hằng, 2010. Nghiên cứu một số đặc tính sinh học và tính sinh miễn dịch của *Actinobacillus pleuropneumoniae* phân lập từ lợn làm cơ sở cho việc chế tạo vaccin. Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp. Viện Thú y Quốc gia, Hà Nội.
- Nguyễn Thu Tâm, 2012. Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *Actinobacillus pleuropneumoniae* trên phổi heo và tính nhạy cảm của vi khuẩn với một số kháng sinh. Hội nghị Khoa học Nông nghiệp CAAB năm 2012. Đại học Cần Thơ, trang 323-329.
- Nicolet J., 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: In: Leman AD, Straw B, Mengeling WL, D'Allaire S, Taylor DJ (eds). *Diseases of Swine* (7th edition). Iowa State University Press, Ames, pp. 401- 408.
- Pozzi, S.P., Dolgkov.I., Rabl-Avidor, M., Hadani, Y. and Aborali, G.L, 2011. Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from pigs in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, Vol. 66 (2), 29-33.
- Quesada Alberto, M. Concepción Porrero, Sonia Téllez, Gonzalo Palomo, María García and Lucas Domínguez, 2014. Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strain of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 10.1093, 1-4.
- Quinn, P. J., B. K. Markey, M. E. Carter, W. J. Donnelly and F. C. Leonard, 2004. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease.* Black-Well Science. 131-136.
- Rayamajhi N., Shin S. J., Kang S. G., Lee D. Y., Ahn J. M., Yoo H. S., 2005. Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *J Vet Diagn Invest.* Jul: 17(4): 359-62.
- Rossi C. C., Pereira Monalesa F., Langford, Paul R., Bazzolli, Denise M. S. 2014. A BOX-SCAR fragment for the identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology Letters.* 352: 32-37.
- Schaller, Alain, P. D. Steven, J. E. Graeme, A. F. Wendy, K. Rolf, K. Peter, G. Marcelo, N. Jacques, and J. Frey, 2001. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR base on the gene apxIVA. *Veterinary Microbiology.* 79: 42-62.
- Shin Min-Kyoung, Cha Seung-Bin, Lee Won-Jung and Yoo Han Sang, 2011. Predicting Genetic Traits and Epitope Analysis of apxIVA in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *The Journal of Microbiology.* Vol. 49, No. 3, 462-468.
- Tiêu Quang An, Nguyễn Hữu Nam, 2010. Xác định một số vi khuẩn kế phát gây chết lợn trong vùng dịch tai xanh ở huyện Văn Lâm, tỉnh Hưng Yên. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y.* 18(3): 53-60.
- Tonpitak, W., 2010. Isolation of *A. pleuropneumoniae* serotype 15-like strain from a porcine tonsil in Thailand: A case report. *Thai J. Vet. Med.* 40(3): 343-348.
- OIE, 2009. In Mia Kim (FAO), Jan Pedersen (USDA-APHIS). Collection of Specimens for Detection of Influenza from Swine. Available from <http://www.offlu.net/index.php?id=184>