

邢进,岳秉飞,赵德明. 利用 AFLP 方法研究嗜肺巴斯德杆菌的遗传多态性[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(6): 92 - 98.
Xing J, Yue BF, Zhao DM. Study of genetic polymorphism of *Pasteurella pneumotropica* using an AFLP method [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(6): 92 - 98.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.06.015

利用 AFLP 方法研究嗜肺巴斯德杆菌的遗传多态性

邢进^{1,2},岳秉飞^{2*},赵德明^{1*}

(1. 中国农业大学动物医学院,北京 100193;2. 中国食品药品检定研究院 实验动物资源研究所,北京 102629)

【摘要】 目的 针对嗜肺巴斯德杆菌分类变更及其在实验动物中感染率高的问题,建立该菌的快速基因分型方法,为其检测方法的修订及有效控制提供支撑。**方法** 利用扩增片段长度多态性方法(AFLP),对实验动物中分离的314株嗜肺巴斯德杆菌及2株标准菌株进行遗传多态性及分子流行病学分析。**结果** AFLP方法将受试分离株共分为了11个基因簇、190个基因型,多态性条带主要有31~36条,辛普森多样性指数0.992。基因簇AC7为北京地区的主要流行群。**结论** 本研究表明北京地区实验动物中的嗜肺巴斯德杆菌基因型丰富,2株标准菌株所在的基因簇在多态性上有明显区别。某些不同来源动物存在交叉污染、污染源多,以及长期污染的情况。

【关键词】 嗜肺巴斯德杆菌;扩增片段长度多态性分析;遗传多态性;实验动物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 06-0092-07

Study of genetic polymorphism of *Pasteurella pneumotropica* using an AFLP method

XING Jin^{1,2}, YUE Bingfei^{2*}, ZHAO Deming^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China.
2. National Institutes for Food and Drug Control, Department of Laboratory Animal Quality Testing, Beijing 102629)

【Abstract】 Objective To establish a rapid genotyping method for detection of *Pasteurella pneumotropica* as a standard revision and effective control, in view of problems with classification of *P. pneumotropica* and its high infection rate in laboratory animals. **Methods** Genetic polymorphism and molecular epidemiological analyses of 314 isolates and two standard strains of *P. pneumotropica* from laboratory animals were performed using an amplified fragment length polymorphism (AFLP) method. **Results** The AFLP method divided tested isolates into 11 gene clusters and 190 genotypes; gene cluster AC7 was the main epidemic group. Polymorphic bands mainly occurred between 31~36, and the Simpson diversity index was 0.992. **Conclusions** This study shows that *P. pneumotropica* genotypes are abundant in laboratory animals in Beijing area, and different strains represented by the two standard strains have significantly different polymorphisms. Our results indicate the characteristics of cross contamination, abundant sources, and long-term contamination in some laboratory animals of different sources.

【Keywords】 *Pasteurella pneumotropica*; AFLP; genetic polymorphism; laboratory animal

[作者简介]邢进(1979—),男,在职博士研究生,研究方向:实验动物微生物学。E-mail: xjvet@nifdc.org.cn
[通信作者]赵德明(1958—),男,教授,博士生导师,E-mail: zhaodm@cau.edu.cn。
岳秉飞(1960—),男,博士,研究员,E-mail: y6784@126.com。*共同通信作者

嗜肺巴斯德杆菌 (*Pasteurella pneumotropica*, Pp) 是一种革兰氏阴性球杆菌, 主要引起啮齿类实验动物及兔的肺炎、中耳炎、结膜炎等炎症, 以及局部化脓性病变^[1]。常与其他病原微生物, 如仙台病毒、支原体等合并感染导致动物死亡。实验动物及其设施内污染后很难去除, 给饲养管理和动物实验带来了非常多的干扰。我国实验动物国家标准中要求无特定病原体 (SPF) 以上级别的动物必须要排除 Pp^[2], 规定采用分离培养和生化鉴定的方法检测 Pp, 但并未要求区分不同基因型的菌株^[3]。目前美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 的数据库中, Pp 标准菌株 ATCC 35149 和 ATCC 12555, 即 Jawetz 和 Heyl 生物型已经分别重新分类为 *Rodentibacter pneumotropicus* 和 *Rodentibacter heylii*^[4]。据此, 原 Pp 被分为了两个完全不同的菌, 根据现有国家标准无法将二者进行区分。因此应根据实际的致病力及危害重新评估 Pp 菌株的检测范围, 对 Pp 的检测方法做出相应的修改。

为提高检测的准确率, 本实验室此前对北京地区实验动物 Pp 分离株进行过表型分析^[5], 在实际检测中, PCR 及荧光定量 PCR 检测方法也得到了较多的研究和应用^[6]。由于分类的改变, 原有概念下的 Pp 需要重新定义和鉴别。了解动物种群中 Pp 新的菌株感染分布将有助于对 *R. pneumotropicus* 和 *R. heylii* 的准确检测。目前国内尚无对 Pp 感染菌株的多态性研究。扩增片段长度多态性分析 (Amplified length polymorphism PCR, AFLP) 是在 PCR 的基础上扩增限制性酶切后的基因组 DNA 限制性片段, 形成特定的 DNA 谱带^[7]。Nattawooti 等^[8]成功的采用单酶切 AFLP (SE-AFLP) 方法对多杀巴斯德杆菌进行了分子流行病学分析, 显示 AFLP 的区别能力略高脉冲场凝胶电泳 (PFGE)。本文借助双酶切 AFLP 方法, 对北京地区为主的实验动物中的 Pp 分离株进行遗传多态性分析, 旨在帮助追溯污染源, 为实验动物质量控制提供依据, 同时为 Pp 检测方法的修订及细菌分类研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 菌种

Pp 标准菌株 ATCC 12555, ATCC 35149, 购自美国标准物质保藏中心 (ATCC)。Pp 分离株 314 株, 分离自 2005 年~2017 年, 23 个生产或使用单位 (S1~S23) 的小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠、沙鼠和犬。

1.2 主要试剂与仪器

限制性内切酶 *EcoR* I、*Mse* I 和 Cutsmart 缓冲液 (NEB); PCR 试剂 (TAKARA); T4 DNA 连接酶 (TAKARA)。

A2 级生物安全柜 (NUAIR-NU-437-400S)、核酸提取仪 (Qiagen QIAcubeHT)、超微量紫外分光光度计 (Implen NanoPhotometer)、恒温培养箱 (Thermo IGS180)、PCR 仪 (ABI Veriti96)。

1.3 实验方法

1.3.1 接头和选择性引物

通过网上数据库^[9]模拟筛选, 选择 4 碱基的高频内切酶 *Mse* I 和 6 碱基的低频内切酶 *EcoR* I 对 Pp 菌株进行双酶切的 AFLP 遗传多态性分析。对选择性引物进行配对, *EcoR* I + (A\T\C\G) 与 *Mse* I + (A\T\C\G) 两两配对, 共 16 中配对方式, 筛选出效果最佳的引物组合。

EcoR I 接头 1: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'、*EcoR* I 接头 2: 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'; *Mse* I 接头 1: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'、*Mse* I 接头 2: 5'-TACTCAGGACTCAT-3'; 选择性引物 *EcoR* I: [FAM]-5'-GACTGCGTACC AATTCC-3', *Mse* I: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3' 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成^[10]。

1.3.2 接头制备

(一) 反应体系

200 μ L 50 μ mol/L *Mse* I 接头连接: 100 μ L 100 μ mol/L *Mse* I 接头 1, 100 μ L 100 μ mol/L *Mse* I 接头 2, Tris-HCL (pH 8.0), 2 μ L 5 mol/L NaCl, 0.4 μ L 0.5 mol/L EDTA; 200 μ L 5 μ mol/L *EcoR* I 接头连接: 10 μ L 100 μ mol/L *EcoR* I 接头 1, 10 μ L 100 μ mol/L *EcoR* I 接头 2, 2 μ L 1 mol/L Tris-HCL (pH 8.0), 2 μ L 5 mol/L NaCl, 0.4 μ L 0.5 M EDTA, 175.6 μ L 灭菌去离子水。

(二) 反应条件

95°C 2 min; 95°C 降至 25°C, 每分钟降低 1°C; 反应结束后置于 -20°C 冻存备用。

1.3.3 基因组 DNA 的提取

使用 DNA 提取试剂盒提取所有菌株基因组 DNA, 用超微量紫外分光光度计测定 DNA 浓度, 要求浓度不低于 20 ng/ μ L。

1.3.4 限制性酶切

EcoR I 5 U, *Mse* I 5 U, 酶切缓冲液 4.4 μ L, DNA 5 μ L, 加灭菌去离子水至 40 μ L, 置 37°C 水浴 1 h。

1.3.5 接头与酶切产物的连接

10×T4 连接缓冲液 1 μL, *EcoR* I 接头 (5 μmol/L) 1 μL, *Mse* I 接头 (50 μmol/L) 1 μL, T4 连接酶 2 U, 灭菌去离子水 7 μL, 上步酶切产物 40 μL, 37℃ 连接 3 h。

1.3.6 选择性扩增

(一) 反应体系

10 × PCR buffer (含 Mg^{2+}) 2 μL, 5 mmol/L dNTPs 1 6 μL, *Mse* I + C (10 μmol/L) 0.5 μL, *EcoR* I + C (10 μmol/L) 0.5 μL, TaqHS DNA 聚合酶 1 U, 20 倍稀释酶切连接产物 2 μL, 补水至 20 μL。

(二) 扩增条件

94℃ 变性 2 min; 第一阶段循环 94℃ 20 s, 66℃ 30 s (下降 1℃/循环), 72℃ 1 min, 10 个循环; 第二阶段循环 94℃ 20 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 20 个循环; 60℃ 延伸 30 min^[11-12]。

1.4 多态性分析

选择性引物 *EcoR* I 经 FAM 荧光素标记后, AFLP 扩增产物可经毛细管电泳扫描条带大小, 1200 LIZ (ABI GeneScan) 作为标准参考, 形成峰图和虚拟条带图谱。将峰图导入 Bionumerics 7.5 分析软件进行分析, 采用 Dice 相关系数分析方法和非加权组平均法 (UPGMA) 绘制系统进化树, Band matching Tolerance 和 Optimization 设置为 1%。对相似度 ≥ 75% 的指纹图谱定义为相同基因簇 (Clusters); 相似度 ≥ 99% 的为相同基因型。AFLP 方法的分辨力用辛普森多样性指数 D (Simpson's index of diversity) 表示^[13]。

2 结果

2.1 Pp 分离株的多态性

EcoR I 和 *Mse* I 的双酶切 AFLP 后, 经毛细管电泳分析, 获得 314 株分离株及 2 株标准菌株的毛细管电泳峰图 (如图 1a, b), 形成的多态性条带数量在 2~80 之间, 大部分集中在 31~36 条, 共有 210 株 (见图 2)。使用 Bionumerics 软件绘制出系统进化树, 为缩小篇幅, 将分型相同的菌株合并, 不同分型的菌株仅保留 1 株 (见图 3)。所有菌株被分为了 11 个基因簇 (AC1~AC11), 基因簇 AC7 所占比例最高, 有 284 株, 占比 90.4%, 涵盖 23 个单位和所有 6 种宿主动物。其他基因簇菌株为 30 株, 占比 9.6%, 涵盖 11 个单位的小鼠和大鼠 (见表 1)。

在 11 个基因簇中共存在 190 个基因型 (A1~

A190), 辛普森多样性指数 D 为 0.992。基因型最多的为 A76 (14 株), 分离自 6 个单位的小鼠、大鼠和豚鼠; 其次为 A68 (11 株), 分离自 2 个单位的小鼠; A78 和 A88 均有 10 株, 前者分离自 4 个单位的小鼠, 后者分离自 7 个单位的小鼠、大鼠和犬, 以上菌株均属于基因簇 AC7。

2.2 标准菌株

标准菌株 ATCC 12555 和 ATCC 35149 的多态性条带分别为 25 和 27 (见图 1b), 分属于基因簇 AC7 和 AC8, 两个基因簇的相似度为 71%。2015 年的小鼠分离株 PP326 与 ATCC 12555 相似度最高, 达到 94.5%; 2009 年的小鼠分离株 PP043 与 ATCC 35149 相似度最高, 为 92.3%。

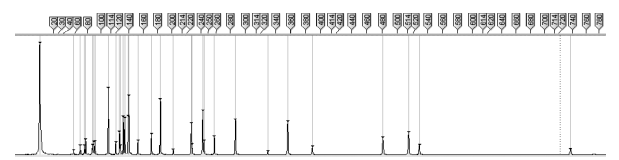


图 1a 毛细管电泳峰图 (分离株 PP005)

Figure 1a Capillary electrophoresis profiles (isolate PP005 AFLP)

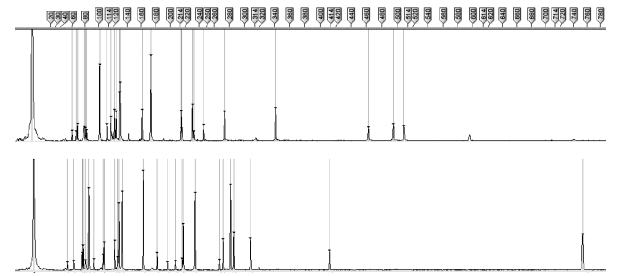


图 1b 标准菌株 ATCC 12555 和 ATCC 35149 AFLP 的毛细管电泳峰图

Figure 1b Capillary electrophoresis profiles of the reference strains ATCC 12555 and ATCC 35149 AFLP

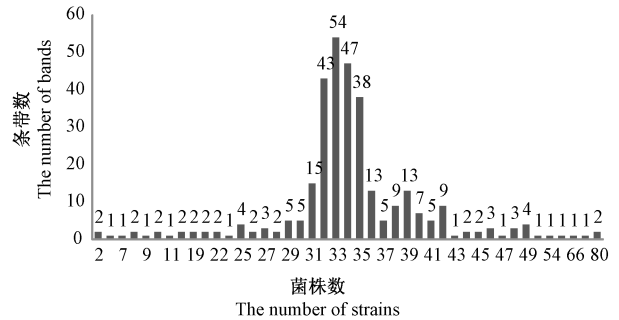


图 2 菌株条带数分布图

Figure 2 Distribution of Pp isolates fragments.

表 1 嗜肺巴斯德杆菌分离株 AFLP 分型结果统计
Table 1 Results of AFLP genotyping of Pp isolates

基因簇 Gene clusters	基因型 Genotypes	菌株数量 Strains quantity	条带数量 Number of fragments	分离来源 Isolate sources	动物种类 Animal species	分离年份 Years
AC1	A1	1	2	S15	小鼠 Mouse	2011
AC2	A2	1	2	S1	小鼠 Mouse	2013
AC3	A3~A5	3	8~11	S1、S16	小鼠 Mouse	2012
AC4	A6~A7	2	6~7	S1、S3	小鼠 Mouse	2012
AC5	A8~A9	2	8~10	S3、S7	小鼠 Mouse	2016
AC6	A10	1	22	S8	小鼠 Mouse	2016
AC7	A11~A131, A133~A170	284	25~59	S1~S15、S17~S23	小鼠 Mouse、大鼠 Rat、 豚鼠 Guinea pig、 地鼠 Hamster、 沙鼠 Gerbil、犬 Dog	2005、2006、 2008~2013、 2015~2017
AC8	A171~A176, A178~A179	9	22~35	S2、S6、S8、S9、 S10、S14	小鼠 Mouse、大鼠 Rat	2009、2011、 2015、2016
AC9	A180~A183	4	66~80	S1、S7、S8	小鼠 Mouse	2010、2011
AC10	A184~A186	3	19~26	S1、S3	小鼠 Mouse	2010、2012
AC11	A187~A190	4	17~20	S1	小鼠 Mouse	2012

注:S1~S23 代表 23 个动物来源单位。
Note. S1 - S23 represent 23 animal sources.

2.3 不同来源菌株的多态性

在 23 个动物来源中,S1 所含基因簇和基因型最多,共 6 个基因簇,104 个基因型;其次是 S3,有 4 分基因簇,29 个基因型。相反,S16、S19、S21 和 S22 都只存在 1 个基因型的菌株。基因型 A59 存在于 7 个分离地中,感染范围最广;其次是基因型 A71,存在于 6 个分离地;基因型 A65、A66、A89 和 A111 分离自三个单位,A23、A30、A33、A61、A68、A85、A89、A98、A117 和 A171 等均分离自两个单位(见图 3)。

2.4 不同时间、不同动物间菌株的多态性

在所有菌株中,共有 278 株分离自小鼠,包含了所有 11 个基因簇 AC1~AC11;有 23 株分离自大鼠,包含基因簇 AC3、AC7 和 AC8;5 株豚鼠分离株、2 株地鼠分离株、4 株沙鼠分离株及 2 株犬分离株,均属基因簇 AC7。有 15 株分离自免疫缺陷小鼠(BALB/c-nu、SCID),基因簇为 AC7。

在 2005 年~2017 年近 11 年中,分离到的 Pp 基因型数量在 5~49 个之间。以 2011 年最多,其次为 2016 年的 43 个基因型(见表 2)。

3 讨论

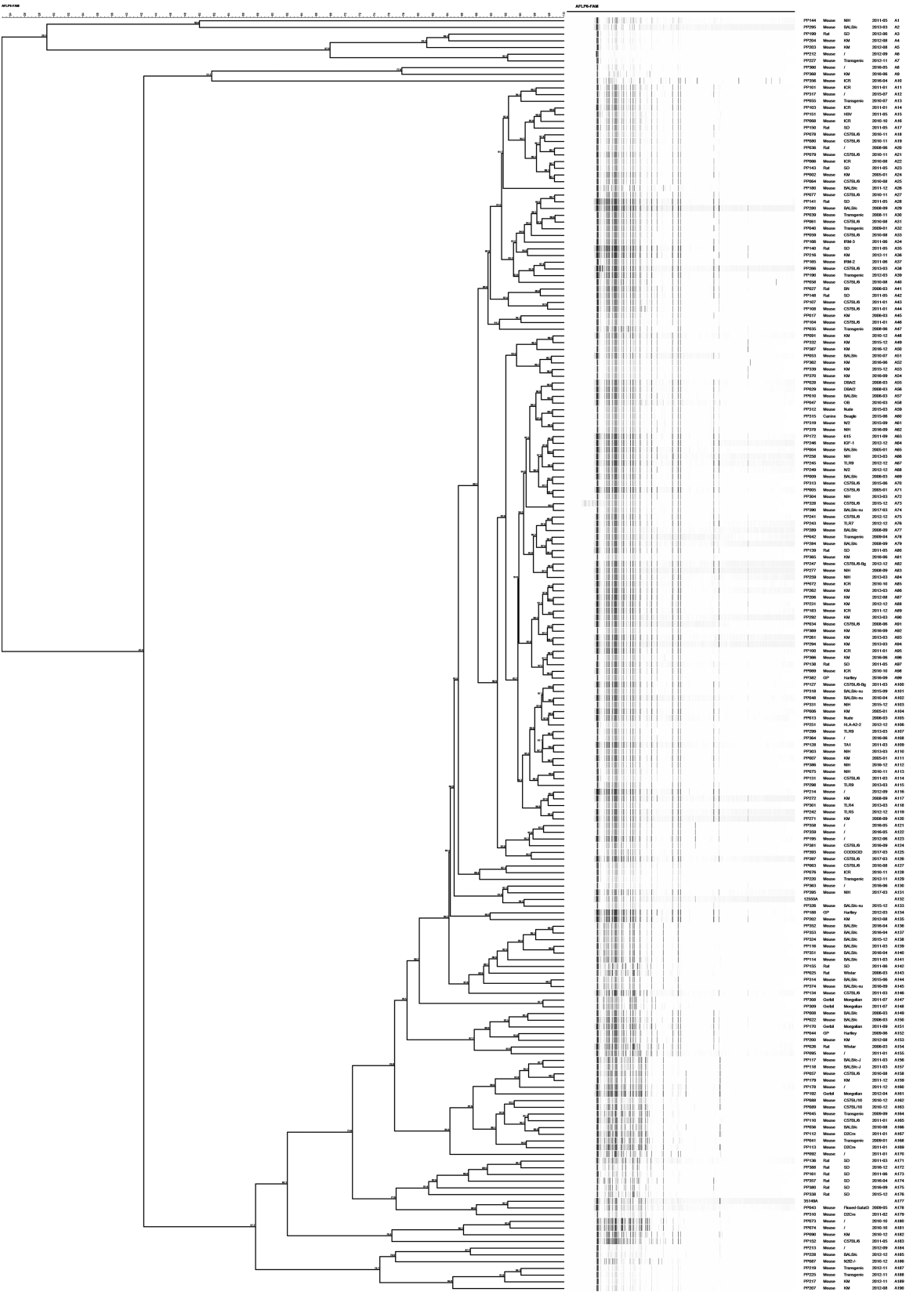
本研究建立的 Pp-AFLP 方法,经酶切、接头连接和选择性扩增,产物在 100~800 bp 范围内产生的多态性条带可通过毛细管电泳分析,可快速获得 Pp 的多态性图谱。获得实验动物中 Pp 感染的遗传多态性有助于了解 Pp 在实验动物及其设施间的流行特征,据此制定有效的防控措施控制污染的发生。

同时根据多态性条带,AFLP 能够作为分离菌株的辅助鉴别方法。当基因型差别较大时,需重新对检测结果进行考量。

研究中涉及的 Pp 菌株绝大部分只引起宿主的隐性感染,个别菌株合并感染仙台病毒、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌或支原体时才出现临床症状,符合以往对该菌的认知。

部分菌株分离自不同的时间、不同的来源、不同的动物及品系,但所获得的多态性图谱完全相同(如图 4)。其中最早的菌株在 2005 年收集,最晚的菌株在 2016 年,时间跨度长,表明 Pp 基因可能非常稳定,不易变异。此外,基因型 A71 可能是本地流行较为广泛的基因型,可同时感染小鼠、大鼠和豚鼠,又或者不同来源的动物之间发生了交叉污染。S1 存在多种 Pp 基因型菌株,表明不同年份的菌株型别不同,提示该动物来源设施内存在多种 Pp 污染源。

本次受试的大部分菌株对啮齿动物的感染没有明显选择性,少数菌株显示出感染的专一性。基因簇 AC8 中的大鼠分离株就表现出亲大鼠的特性(见图 5),证明某些 Pp 菌株对不同动物的选择性,即在大鼠体内的小鼠源菌株会被大鼠源的菌株竞争性去除,在大鼠体内只会存在大鼠源菌株^[14]。两株犬的分离株与一些小鼠、大鼠分离株的基因型相同,这些菌株分离自不同的来源单位,分离时间在 2015 年至 2016 年前后,可能此时北京地区存在该菌型的普遍流行,或这些单位受到了外界的污染。



注:标准菌株 ATCC 12555 和 ATCC 35149 在图中基因型分别为 A132 和 A177。

图 3 Pp 分离株 188 个基因型的 AFLP 系统进化树

Note. The genotypes of the reference strains ATCC 12555 and ATCC 35149 were A132 and A177 respectively.

Figure 3 Phylogenetic tree and AFLP profiles of 188 genotypes of Pp isolates.

表 2 不同年份、不同动物 Pp 基因型和基因簇分布表
Table 2 Distribution of genotypes and gene clusters across different ages and animals

年份 Years	基因型和基因簇 Gene genotypes and clusters					
	小鼠 Mouse	大鼠 Rat	豚鼠 Guinea pig	地鼠 Hamster	沙鼠 Gerbil	犬 Dog
	AC1 ~ AC11	AC3, AC7, AC8	AC7	AC7	AC7	AC7
2005	A24, A65, A71, A104, A111	/	/	/	/	/
2006	A45, A57, A65, A69, A71, A104 ~ A105, A111, A149-A150	A41, A71, A143, A154	/	/	/	/
2008	A29 ~ A30, A47, A55 ~ A57, A65 ~ A66, A71, A77, A79, A83, A91, A117, A120	A20	/	/	/	/
2009	A32, A78, A164, A168, A178	/	A152	/	/	/
2010	I3, A16, A18 ~ A19, A21 ~ A22, A24 ~ A25, A27, A31, A33, A40, A48, A51, A57 ~ A58, A65, A71, A85, A98, A102, A113, A127 ~ A128, A158, A162 ~ A163, A180 ~ A182, A186	/	/	/	/	/
2011	A1, A11, A14 ~ A15, A23 ~ A24, A26, A30, A34, A37, A43 ~ A44, A46, A63, A65, A71, A89, A95, A100, A104, A109, A111, A114, A139, A141, A146, A155-A157, A159, A160, A165, A167, A169 ~ A170, A179, A183	A17, A23, A28, A35, A42, A80, A97, A109, A142, A171, A173	/	/	A147 ~ A148, A151	/
2012	A4 ~ A7, A36, A39, A51, A55, A63 ~ A65, A67 ~ A69, A71, A75-A76, A82, A85, A87-A88, A91, A100, A106, A116, A119, A123, A129, A135, A153, A184 ~ A185, A187 ~ A190	A3	A71, A134	/	A161	/
2013	A2, A38, A55 ~ A56, A64, A66 ~ A67, A72, A84, A86 ~ A87, A90, A93-A94, A107, A110, A115, A118	/	/	/	/	/
2015	A12, A49, A53, A55, A59, A61, A70, A101, A103, A107, A133, A138, A144	A59, A176	/	/	/	A59 ~ A60
2016	A8 ~ A10, A50, A52 ~ A54, A57, A59, A61 ~ A62, A65 ~ A66, A68, A70 ~ A72, A77, A81, A91 ~ A92, A96, A101 ~ A102, A108 ~ A109, A112, A117, A121 ~ A122, A124, A130, A136 ~ A137, A140, A145	A172, A174-A175	A99, A108	A97 ~ A98	/	/
2017	A57, A74, A104, A107, A125 ~ A126, A131, A145	/	/	A73 ~ A74	/	/

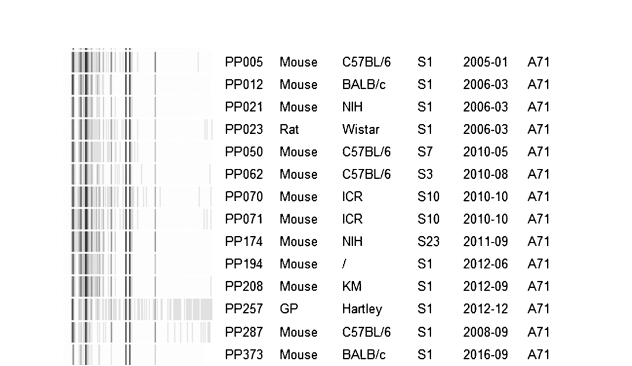


图 4 基因型 A71 的感染特点

Figure 4 Infection characteristics of genotype A71

根据本研究中菌株间的相似度高低,其他基因簇很可能属于不同的种类。从多态性结果分析, AC7 基因簇簇是目前北京地区 Pp 的主要流行群, 其次是基因簇 AC8, 根据最新的细菌分类, 本地区感染较多的应为 *R.heylii*, 其次是 *R.pneumotropicus*。分离株 PP144 和 PP295 的 AFLP 多态性条带仅有 2 条, 相反 PP073 和 PP152 的多态性条带有 80 条, 两对菌株都与其他菌株差异很大。4 株菌的生化鉴定结果以及 16SrDNA 测序结果均证实为 Pp, 却又不同于 *R.pneumotropicus* 或 *R.heylii*。可见, 原有 Pp 分类中还包含有更多菌株^[15], 这些菌株的差异和致病力有待进一步确认。

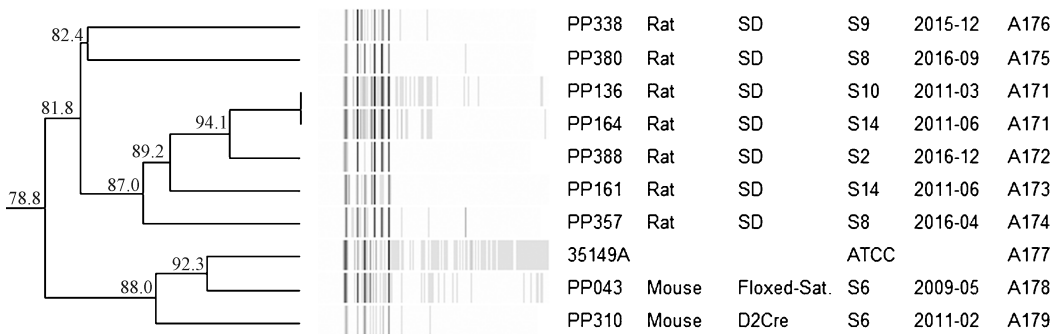


图 5 基因簇 AC8 系统进化树

Figure 5 Gene cluster AC8 phylogenetic tree

此前的研究表明 Jawetz 和 Heyl 的宿主范围有所不同,前者只感染小鼠、大鼠,后者感染的范围更广,这与本研究的结果相符。根据现行国家标准,检出任何一种都将判为 Pp 阳性,既不符合 SPF 级实验动物标准。由于二者之间存在的诸多差异^[4],加上其有限的致病作用^[16-17],分类变更后,是否有必要对小鼠、大鼠以外的动物同时检测两种细菌,需要更多实验数据的支撑。

参考文献:

[1] 田克恭,贺争鸣,刘群等.实验动物疫病学 [M].北京:中国农业出版社,2015:621-623.

[2] GB 14922. 2-2011 实验动物微生物学等级及监测 [S].北京:中国标准出版社,2002:2.

[3] GB/T 14926. 12-2001 实验动物嗜肺巴斯德杆菌检测方法 [S].北京:中国标准出版社,2011.

[4] Adhikary S, Nicklas W, Bisgaard M, et al. Rodentibacter gen. nov. including Rodentibacter pneumotropicus comb. nov., Rodentibacter heylii sp. nov., Rodentibacter myodis sp. nov., Rodentibacter ratti sp. nov., Rodentibacter heidelbergensis sp. nov., Rodentibacter trehalosifermentans sp. nov., Rodentibacter rarus sp. nov., Rodentibacter mrazii and two genomospecies[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2017, 67(6):1793-1806.

[5] 邢进,冯育芳,岳秉飞等.北京地区实验动物中嗜肺巴斯德杆菌的表型分析 [J].中国比较医学杂志, 2014, 24(6): 54-57.

[6] 邢进,冯育芳,岳秉飞等.嗜肺巴斯德杆菌研究进展 [J].中国实验动物学报, 2014, 22(2):90-94.

[7] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4407-4414.

[8] Sthitmatee N, Kataoka Y, Sawada T. Molecular epidemiology of Japanese avian Pasteurella multocida strains by the single-enzyme amplified fragment length polymorphism and pulsed-field gel

electrophoresis [J]. J Vet Med Sci, 2010, 72(11):1465-1470.

[9] Sasaki H, Kawamoto E, Okiyama E, et al. Molecular typing of Pasteurella pneumotropica isolated from rodents by amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis and pulsed-field gel electrophoresis [J]. Microbiol Immunol, 2006, 50(4): 265-272.

[10] In silico AFLP-PCR amplification [DB/OL], <http://insilico.ehu.es/AFLP/index.php?mo=Pasteurella>, 2015-5-18.

[11] Protocol: AFLP Microbial Fingerprinting (English) [DB/OL], <https://www.thermofisher.com/search/results?query=AFLP%20Microbial%20Fingerprinting&focusarea>, 2010-7-23/2015-5-18.

[12] Hazen SP, Leroy P, Ward R. AFLP in Triticum aestivum L.: patterns of genetic diversity and genome distribution [J]. Euphytica, 2002, 125(1): 89-102.

[13] Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of simpson's index of diversity [J]. J Clin Microbiol, 1988, 26(11): 2465-2466.

[14] Boot R. A Pasteurella pneumotropica strain of mouse origin colonizes rats but is out competed by a P. pneumotropica strain of rat origin [J]. Scand J Lab Anim Sci, 2010, 37(4): 261-265.

[15] Hayashimoto N, Takakura A, Itoh T. Genetic diversity on 16S rDNA sequence and phylogenic tree analysis in Pasteurella pneumotropica strains isolated from laboratory animals [J]. Curr Microbiol, 2005, 51(4):239-243.

[16] Kawamoto E, Sasaki H, Okiyama E, et al. Pathogenicity of Pasteurella pneumotropica in immunodeficient NOD/ShiJic-scid/Jel and immunocompetent Crlj: CD1 (ICR) mice [J]. Exp Anim, 2011, 60(5): 463-470.

[17] Hayashimoto N, Yasuda M, Ueno M, et al. Experimental infection studies of Pasteurella pneumotropica and V-factor dependent Pasteurellaceae for F344-rnu rats [J]. Exp Anim, 2008, 57(1):57-63.