

黄树武,王静,潘金春,等. 兔源多杀巴斯德杆菌基因分型研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(2): 71-76.

Huang SW, Wang J, Pan JC, et al. Genotyping of *Pasteurella multocida* isolated from laboratory rabbits [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(2): 71-76.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.02.011

兔源多杀巴斯德杆菌基因分型研究

黄树武,王 静,潘金春,陈梅玲,张 钰,闵凡贵*

(广东省实验动物监测所,广东省实验动物重点实验室,广州 510663)

【摘要】 目的 对实验动物设施普通级新西兰兔分离的多杀巴斯德杆菌分离菌株进行基因分型研究。**方法** 2000-2018年期间,基于分离培养和生化鉴定获得兔源多杀巴斯德杆菌14株,采用荚膜多重PCR方法和多位点序列分型方法对其进行荚膜血清型和基因型鉴定。**结果** 荚膜多重PCR分型结果显示,兔源多杀巴斯德杆菌存在荚膜血清型A型,占比71.4%(10/14),B型占比28.6%(4/14);多位点序列分型分为ST12、ST35、ST72、ST73、ST76和ST77共6种ST型,且首次发现了新ST76型和ST77型。**结论** 兔源多杀巴斯德杆菌基因分型存在复杂多样性,荚膜血清型以A型为主,与呼吸道疾病相关,在生产繁育过程中应做好质量控制。

【关键词】 兔;多杀巴斯德杆菌;基因分型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)02-0071-06

Genotyping of *Pasteurella multocida* isolated from laboratory rabbits

HUANG Shuwu, WANG Jing, PAN Jinchun, CHEN Meiling, ZHANG Yu, MIN Fangui*
(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

【Abstract】 Objective To genotype clinical strains of *Pasteurella multocida* isolated from conventional rabbits bred in different laboratory animal facilities. **Methods** From 2000 to 2018, 14 strains of *P. multocida* were isolated from laboratory rabbits obtained from different laboratory animal facilities; these were then cultured and identified using biochemical testing. Using capsular multiplex PCR and multilocus sequence typing, serotypes and genotypes of the clinical strains of *P. multocida* were identified. **Results** Capsular multiplex PCR revealed capsular serotypes A and B among the 14 clinical strains of *P. multocida*, which comprised 71.4% (10/14) and 28.6% (4/14), respectively. Six sequence types (STs) were detected by multilocus sequence typing: ST12, ST35, ST72 and ST73, and two new types, ST76 and ST77, described for the first time here. **Conclusions** Genotype diversity was observed in *P. multocida* isolated from laboratory rabbits, and the capsular serotype A, which is associated with respiratory disease, accounted for a relatively high proportion of isolates. This study reinforces the importance of quality control for rabbit breeding.

【Keywords】 rabbits; *Pasteurella multocida*; genotyping

多杀巴斯德杆菌 (*Pasteurella multocida*, *P. multocida*) 是一种重要的人兽共患病原菌,其感染宿主十分广泛,能感染多种家禽、家畜、野生动物和人

等,其中可引起兔鼻炎、肺炎、中耳炎和出血性败血症等疾病,导致兔急性或亚急性死亡,严重威胁兔的生命健康^[1-2]。

【基金项目】 广东省科技计划项目(2018B070714012, 2017A070702001, 2017B030314171)。

【作者简介】 黄树武(1990—),男,医学学士,研究方向:实验动物质量监测和微生物学研究。E-mail: hsw2015@gdliami.com

【通信作者】 闵凡贵(1980—),男,硕士,副研究员,研究方向:实验动物与比较医学研究。E-mail: minfangui@aliyun.com

细菌分型是了解细菌性传染病流行特征的重要技术之一,对研究感染源、感染途径以及地方性菌株和流行菌株之间的鉴别有着非常重要的作用^[3]。随着分子生物学技术的发展,相较于生化分型、血清学分型、噬菌体分型等传统分型技术,基因分型技术以其快速、简便、灵敏、灵活等特点日渐受到青睐。目前,临床上用于多杀巴斯德杆菌诊断的基因分型方法主要包括基于荚膜编码区的多重 PCR 方法和多位点序列分型法(multi-locus sequence typing, MLST)^[4-5]。近年来,有意大利^[6]、西班牙^[7]和捷克共和国^[8]等国家对兔源 *P. multocida* 进行基因分型的报道,而我国仅有少量关于禽源、猪源等多杀巴斯德杆菌基因分型的研究^[9-11]。

本研究对实验室分离的兔源 *P. multocida* 在生化表型特征的基础上,运用分子分型方法分析分离菌株的基因型特征和菌株间的同源性,揭示菌株间基因多态性和群体遗传结构,获得广东地区实验兔感染 *P. multocida* 分型数据,了解广东地区实验兔感染 *P. multocida* 的流行特点,有利于更好地指导广东本地实验动物质量控制与监测。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验菌株来源于 2000 年至 2018 年期间广东地区不同实验动物设施,从普通级急性发病死亡的新西兰兔呼吸道分离到的 14 株多杀巴斯德杆菌。实验操作在实验动物使用设施[SYXK(粤)2016-0122]进行,所有操作遵循动物福利和伦理要求,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。多杀巴斯德杆菌阳性对照菌株(ATCC43137)来自中国医学科学院医学实验动物研究所馈赠。

1.2 主要试剂与仪器

血琼脂平板(批号:ZBAP-180715D)和 DHL 平板(批号:H1038Y)购自广东环凯微生物科技有限公司;三糖铁(批号:180828)、半固体琼脂(批号:170817)和无菌生理盐水(批号:H0993Y)购自北京陆桥技术股份有限公司;糖(苷或盐)类等微量生化管购自杭州滨和微生物试剂有限公司;触酶试剂盒(批号:1005440900)、氧化酶试剂盒(批号:19540501)、ID 32E(批号:1006416960)和 API 20NE(批号:1006405070)生化试剂盒购自法国生物梅里埃股份有限公司;革兰染色液试剂盒(批号:418082)购自珠海贝索生物科技有限公司;PCR 试

剂包括细菌基因组 DNA 提取试剂盒(批号:R6717)、DNA 纯化回收试剂盒(批号:Q5601)购自天根生化科技有限公司;Premix Taq(批号:A4701A)、DL-2000 Marker(批号:A1801A)、琼脂糖(批号:172175)等购自宝生物工程(大连)有限公司,各种试剂均在有效期内使用。

生物安全柜(德国, Biometra 型);生化培养箱(宁波江南仪器厂, SPX-288 型);生物显微镜(德国, Leica DM500 型);ATB 梅里埃鉴定仪(法国, ATB NEW 型);PCR 超净工作台(上海市金鹏科技有限公司, BHC-1300II A/B3 型);PCR 仪(德国, Biometra);离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司, TG16-W 型);电泳仪(北京六一仪器厂, DYY-6C 型);全自动凝胶成像系统(美国, Bio-Rad PowerPac Basic 164-5050 型)。

1.3 实验方法

1.3.1 分离培养与生化鉴定

依据实验动物国家标准 GB/T 14926.5-2001 实验动物多杀巴斯德杆菌检测方法对临床分离的可疑多杀巴斯德杆菌进行系统生化鉴定分析。同时使用法国梅里埃生化鉴定条 ID 32E 和 API 20 NE 进行生化鉴定,并按照试剂盒说明书进行鉴定结果的判定。

1.3.2 分子分型分析

(1) 菌株 DNA 提取

按照试剂盒说明书,将所有临床分离菌株使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行基因提取,提取的核酸作为分子分型的 DNA 模板。

(2) 荚膜分型

按照 Townsend 等^[12]建立的荚膜多重 PCR 方法对分离菌株进行 *kmt* 基因定种鉴定,再使用荚膜特异基因 *hyaD-hyaC*、*bcbD*、*dcbF*、*ecbJ*、*febD* 设计引物进行 A、B、D、E 和 F 分型,分型引物序列(见表 1)。反应体系为 2 μ L 基因组 DNA 加入 2 μ L 引物(10 μ mol/L), 25 μ L Premix Ex Taq, 加灭菌蒸馏水到反应总体积为 50 μ L。反应条件按 95 $^{\circ}$ C 预变性 12 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 反应进行 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。最后吸取 10 μ L PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

(3) MLST 分型

针对多杀巴斯德杆菌 *adk*、*aroA*、*deoD*、*gdhA*、*g6pd*、*mdh*、*pgi* 7 个特异基因序列设计引物,分型引

物序列及反应条件(见表 1),对临床分离菌株进行 PCR 扩增和测序,测序后经过组装分析确认的序列提交 MLST 数据库(<http://pubmlst.org/>)进行比对,得出每个菌株各位点的等位基因数目,然后进行等位基因序列类型(sequence type, ST)鉴定,使用 MLST 数据库在线分析软件进行聚类分析,构建系统发育树,分析其遗传进化关系。

2 结果

2.1 分离培养与生化鉴定结果

所有分离菌株在血琼脂平板上,于 37℃ 生化培养箱中培养 18~24 h 后形成 1 mm 左右,光滑露滴样或灰白色、不溶血的菌落。在 DHL 琼脂平板上不生长。革兰氏染色为阴性小杆菌,两端钝圆并浓染。生化反应为触酶试验阳性,氧化酶阳性,三糖铁试验为斜面及底层产酸不产气、乙酸铅纸条法显示硫化氢阳性,半固体动力阴性,乳糖阳性,尿素酶阴性,靛基质试验阳性,硝酸盐还原试验阳性,枸橼酸盐利用试验阴性,赖氨酸脱羧酶为阴性,不液化

明胶;而鸟氨酸脱羧酶结果为阳性其菌株所占比例为 79% (11/14),葡萄糖阳性比例为 57% (8/14),蔗糖阳性比例为 79% (11/14),麦芽糖阳性比例为 14% (2/14)。

使用法国梅里埃生化鉴定条 ID 32E 和 API 20 NE 都能鉴定所有临床分离菌株为多杀巴斯德杆菌,鉴定 ID 值都为 99.3% 以上,鉴定评价为好的鉴定。

2.2 分子分型结果

2.2.1 荚膜分型结果

将所有分离菌株进行 *kmt* 基因定种鉴定,均出现约 460 bp 的目的条带(见图 1A)。使用荚膜分型多重 PCR 方法扩增后产物进行琼脂糖凝胶电泳,出现约 1044 bp 与 760 bp 两种目的条带(见图 1B),据此将菌株分为 A 型与 B 型两种荚膜血清型,A 型为主,占比 71.4% (10/14)。

2.2.2 MLST 分型结果

将所有分离菌株经 7 个管家基因的扩增和测序,测序后序列提交 MLST 数据库上进行比对分

表 1 多杀巴斯德杆菌株基因分型引物

Table 1 Primer for genotyping of *Pasteurella multocida*

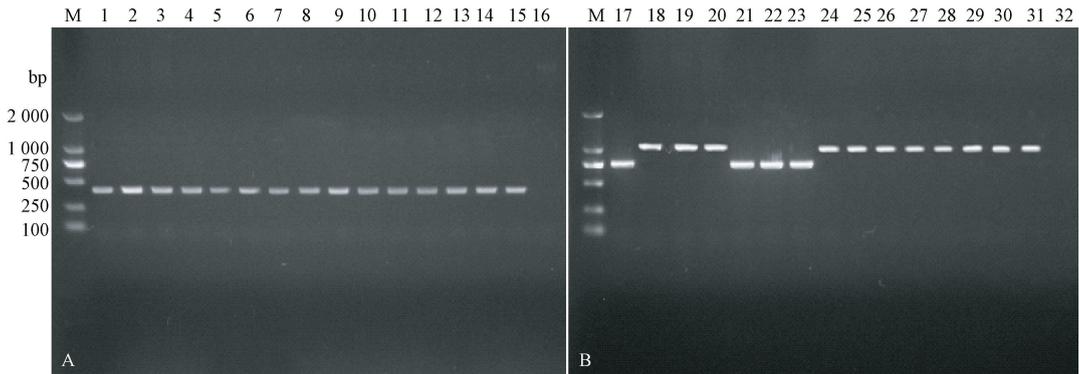
检测目的 Description	基因 Gene	引物序列(5'-3') Sequence	退火温度(℃) Annealing temperature	产物大小(bp) Length
基因定种 Identification of all <i>P. multocida</i>	<i>Kmt</i>	ATCCGCTATTTACCCAGTGG	55	460
		GCTGTAAACGAACCTCGCCAC		
	<i>hyaD-hyaC</i>	TGCCAAAATCGCAGTCAG	55	1044
TTGCCATCATGTTCAGTG				
荚膜分型 Capsular genotypes	<i>bcbD</i>	CATTTATCCAAGCTCCACC	55	760
		GCCCCAGAGTTTCAATCC		
	<i>dcbF</i>	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC	55	657
CATCTACCCACTCAACAATATCAG				
MLST 分型 MLST genotypes	<i>ecbJ</i>	TCCGCAGAAAATTATTGACTC	55	511
		GCTFGCTGCTTGATTTTGTGTC		
	<i>fcbD</i>	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG	55	851
TTCCGCCGTCAATTACTCTG				
MLST 分型 MLST genotypes	<i>Adk</i>	AAGBACWCAAGCVCAAT	57	533
		CACTTTTTKYGTMCCGTC		
	<i>aroA</i>	TTTACCDGGYTCYAAAAG	56	561
CTTTYACVCGCCAGTTAT				
MLST 分型 MLST genotypes	<i>deoD</i>	GTGCATTGCGYATGTTG	60	578
		TGSYGTGTTTGTTCGTG		
	<i>gdhA</i>	YTTAGTTGARCTGAACG	57	652
CTTGACCTTCAATYGTGC				
MLST 分型 MLST genotypes	<i>g6pd</i>	CHGGYGAYYTMACTYATCG	56	514
		TTTBCCGATBARTTTRTCRGC		
	<i>Mdh</i>	AAGTTGCWGTWYTAGGTG	57	552
CCTAATTCAATATCYGCACG				
MLST 分型 MLST genotypes	<i>Pgi</i>	GCCWGTGYTKGTTGATGG	60	613
		TTGKGCTGGCCRATRAA		

析,结果显示有 ST12、ST35 型、ST72 型、ST73 型、ST76 型、ST77 型共 6 种 ST 型,并且首次发现了新 ST76 型,ST77 型(见表 2)。然后对分离菌株进行聚类进化分析,构建广东兔源多杀巴斯德菌株遗传进化树与最小生成树(见图 2);并将本研究菌株与 MLST 数据库中多个国家兔源多杀巴斯德菌株进行比对进化分析,结果表明,本研究中兔源多杀巴斯德杆菌与意大利、西班牙、捷克共和国、丹麦等国家的菌株存在复杂的遗传交叉进化关系(见图 3)。

3 讨论

据多个国家流行病学调查资料显示,多杀巴斯德杆菌感染是一种全球性的现象^[6-8,11,13-15]。鉴于多杀巴斯德杆菌感染宿主的多样性与所导致疾病的危害性,临床上针对分离菌株开展分型鉴定,对于了解其感染和致病规律,建立细菌流行病学资料具有重要的意义。

本研究在分离菌株培养特性与生理生化特性基础上,应用分子分型方法对其进行分型研究。在



注:A: *kmt* 基因定种鉴定, M: DL2000 DNA Marker; 1~14 号: 样本; 15: 多杀巴斯德杆菌株(ATCC43137)阳性对照; 16: 空白对照。B: 荚膜分型多重 PCR 方法鉴定, M: DL2000 DNA Marker; 17~30: 样本; 31: 多杀巴斯德杆菌株(ATCC43137)阳性对照; 32: 空白对照。

图 1 广东地区兔源多杀巴斯德杆菌荚膜分型结果电泳图

Note. A: Identification of *kmt* gene species. M, DL2000 DNA Marker; 1~14, Sample; 15, *Pasteurella multocida* strain (ATCC43137) positive control; 16, Blank control. B: Capsule typing multiplex PCR method was identified. M, DL2000 DNA Marker; 17~30, Sample; 31, *Pasteurella multocida* strain (ATCC43137) positive control; 32, Blank control.

Figure 1 Electrogram of capsule typing of *Pasteurella multocida* from rabbits in Guangdong

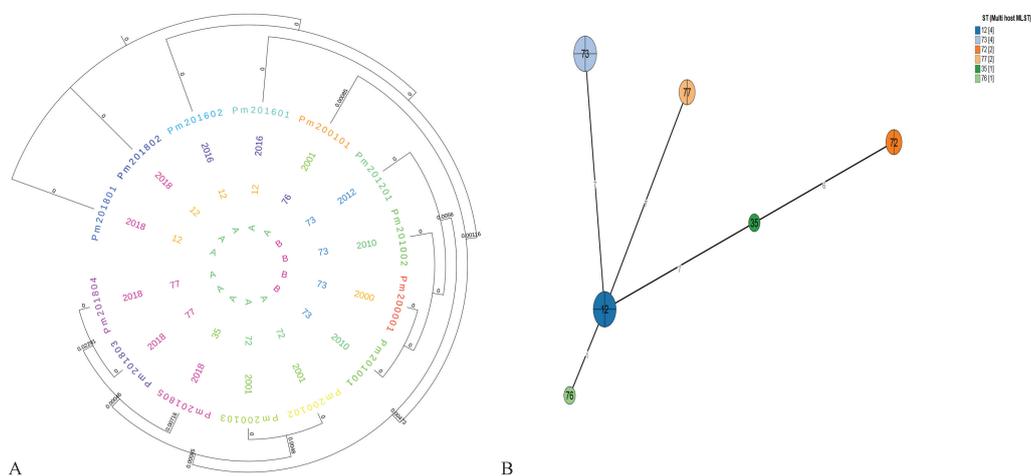
表 2 广东地区兔源多杀巴斯德杆菌分离株荚膜分型和 MLST 分型结果

Table 2 Capsule genotypes and MLST genotypes of *Pasteurella multocida* isolates from rabbits in Guangdong

菌株 Strains	分离时间 Isolation time	实验动物设施 Laboratory animal facility	分离 来源 Host	<i>kmt</i> 基因定种 <i>kmt</i> gene identification	荚膜型 Capsular genotypes	ST 型 ST genotypes
Pm200001	2000. 07	A	兔 rabbit	+	B	73
Pm200101	2001. 01	B	兔 rabbit	+	A	76
Pm200102	2001. 04	C	兔 rabbit	+	A	72
Pm200103	2001. 04	C	兔 rabbit	+	A	72
Pm201001	2010. 10	D	兔 rabbit	+	B	73
Pm201002	2010. 10	D	兔 rabbit	+	B	73
Pm201201	2012. 12	E	兔 rabbit	+	B	73
Pm201601	2016. 11	F	兔 rabbit	+	A	12
Pm201602	2016. 11	F	兔 rabbit	+	A	12
Pm201801	2018. 06	F	兔 rabbit	+	A	12
Pm201802	2018. 06	F	兔 rabbit	+	A	12
Pm201803	2018. 08	F	兔 rabbit	+	A	77
Pm201804	2018. 08	F	兔 rabbit	+	A	77
Pm201805	2018. 09	G	兔 rabbit	+	A	35

注:“+”表示阳性。

Note. “+”: positive.



注:A:进化树圆圈从外到内为菌株编号,分离时间,ST型,荚膜型;B:圆圈内数字代表ST型。

图2 广东地区兔源多杀巴斯德杆菌遗传进化关系与最小生成树

Note. A, The sequence of evolutionary tree circle is strain numbers, isolation time, MLST genotypes, Capsular genotypes from outside to inside. B, The number in the circle represents the MLST genotypes.

Figure 2 Genetic evolution relationship and minimal spanning tree of *Pasteurella multocida* isolates from rabbits in Guangdong

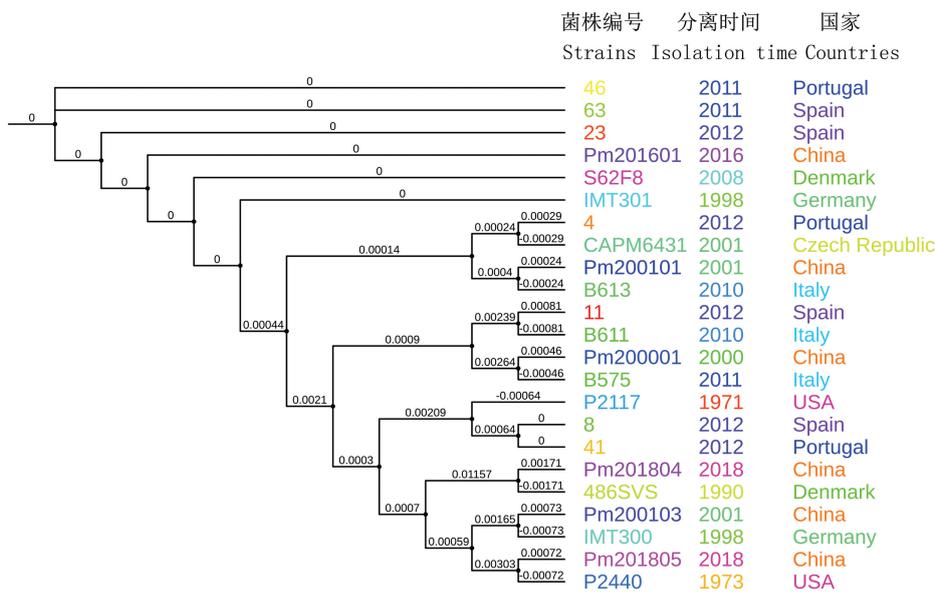


图3 广东地区兔源多杀巴斯德杆菌与多个国家菌株遗传进化分析

Figure 3 Genetic and evolutionary relationship between *Pasteurella multocida* isolated from rabbit and strains from several countries in Guangdong

菌株生化反应特征上,临床分离菌株大部分生化反应相同,但个别生化反应结果与实验动物现行国家标准不一致。国内亦有文献报道多杀巴斯德的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和鸟氨酸脱羧酶等生化反应结果阴阳性不一^[16-17]。倘若完全按照实验动物国家标准进行检测,可能会导致误判漏检。考虑通过PCR方法辅助诊断,或者借助商品化生化鉴定试剂盒方法验证结果的准确性,作为一种有益补充手段。多杀巴斯德杆菌根据荚膜抗原可分为5种血清

型,分别为A、B、D、E和F,不同血清型与其宿主和疾病之间有一定相关性,血清A和F与呼吸道疾病和家禽霍乱有关,血清B和E与出血性败血症有关,而D血清通常与猪萎缩性鼻炎相关^[1,11,18]。目前已报道兔源 *P. multocida* 有A、D和F型三种荚膜血清型^[6-8,11]。本研究中荚膜分型结果显示广东地区兔源 *P. multocida* 主要为A型,也发现兔源 *P. multocida* 荚膜血清B型。这与我国不同地区鸡,鸭,猪等来源的 *P. multocida* 其荚膜优势血清型为A

型一致^[9-11,17]。病原菌株分离至兔呼吸道,通过呼吸道传播感染,从而导致兔急性或亚急性死亡,应引起实验动物生产者与使用者的关注。

本研究将菌株 MLST 分型结果显示,广东地区兔源多杀巴斯德杆菌存在 ST12、ST35、ST72、ST73、ST76、ST77 共 6 种 ST 型,并且首次发现了新 ST76 (*Adk8-aroA4-deoD5-gdhA3-g6pd5-Mdh7-Pgi5*) 型和 ST77 (*Adk18-aroA21-deoD20-gdhA18-g6pd19-Mdh18-Pgi18*) 型,已提交 MLST 数据库确认并收录。此研究揭示了广东地区兔源多杀巴斯德杆菌菌株间的基因多态性,且动物设施 A, D, E 的兔子都存在 ST73 型的菌株污染,构成一个遗传群体结构,其他的 ST 型菌株感染存在散播性。另外,实验动物设施 F 从 2016 年分离到 ST12 型菌株,2018 年 6 月份再次分离到同种基因型菌株,后 8 月份分离到 ST77 型菌株,考虑此时有外来变异菌株污染设施。通过对广东地区菌株的进化分析,ST12 型菌株与 ST35 型、ST73 型、ST76 型和 ST77 型存在一定的进化同源关系,而与 ST72 型菌株亲缘关系相对较远,尤其新发现的 ST76 型和 ST77 型可由 ST12 型菌株各进化出一个分支而来。本研究将分型结果与 MLST 数据库中不同时间地理区域分离菌株进行横向与纵向比对分析。不同基因型的菌株流行存在地理区域性和偏向性,意大利以 ST9、ST50 和 ST74 为主,西班牙为 ST50,捷克共和国为 ST9,而本研究的兔源 *P. multocida* 以 ST12 和 ST73 为主;同源性比对分析发现本研究菌株与意大利、西班牙、捷克共和国等国家的菌株存在复杂的遗传交叉进化关系。

实验动物国家标准中普通级兔不要求排除多杀巴斯德杆菌,导致实验动物生产机构放松了对该菌的控制,课题组曾对广东地区普通级兔感染多杀巴斯德杆菌的携带情况进行调查,显示阳性率为 2.5%(4/160)(数据暂未发表),鉴于多杀巴斯德杆菌对兔的危害性,且菌株主要通过呼吸道途径传播感染,在实验兔的生产繁育过程中需要高度重视。

参考文献:

[1] Wilkie IW, Harper M, Boyce JD, et al. *Pasteurella multocida*: diseases and pathogenesis [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2012, 361: 1-22.

[2] Lennox AM. Respiratory Disease and Pasteurellosis. In: Quesenberry KE, Carpenter JW (Eds.), *Ferrets, Rabbits, and Rodents* (third edition) [M]. Amsterdam: Elsevier Inc, 2012: 205-216.

[3] 周海健, 阚颀. 细菌基因组分型方法的应用研究进展 [J]. *疾病监测*, 2016, 31(8): 668-675.

[4] 祁鑫, 蒋桃珍, 李伟杰. 多杀性巴氏杆菌分型方法研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2018, 39(8): 89-92.

[5] Urwin R., Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology [J]. *Trends Microbiol*, 2003, 11(10): 479-487.

[6] Massacci FR, Magistrali CF, Cucco L, et al. Characterization of *Pasteurella multocida* involved in rabbit infections [J]. *Vet Microbiol*, 2018, 213: 66-72.

[7] Garcia-Alvarez A, Chaves F, Fernandez A, et al. An ST11 clone of *Pasteurella multocida*, widely spread among farmed rabbits in the Iberian Peninsula, demonstrates respiratory niche association [J]. *Infect Genet Evol*, 2015, 34: 81-87.

[8] Jaglic Z, Jeklova E, Christensen H, et al. Host response in rabbits to infection with *Pasteurella multocida* serogroup F strains originating from fowl cholera [J]. *Can J Vet Res*, 2011, 75(3): 200-208.

[9] Wang Y, Zhu J, Lu C, et al. Evidence of circulation of an epidemic strain of *Pasteurella multocida* in Jiangsu, China by multi-locus sequence typing (MLST) [J]. *Infect Genet Evol*, 2013, 20: 34-38.

[10] Peng Z, Wang H, Liang W, et al. A capsule/lipopolysaccharide/MLST genotype D/L6/ST11 of *Pasteurella multocida* is likely to be strongly associated with swine respiratory disease in China [J]. *Arch Microbiol*, 2018, 200(1): 107-118.

[11] 王林柏, 孙久鹤, 郭东春, 等. 国内部分地区多杀性巴氏杆菌荚膜血清型和基因型的研究 [J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(2): 116-119.

[12] Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, et al. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(3): 924-929.

[13] Oliveira Filho JX, Morés MAZ, Rebellato R, et al. Pathogenic variability among *Pasteurella multocida* type A isolates from Brazilian pig farms [J]. *BMC Vet Res*, 2018, 14(1): 244.

[14] Turni C, Singh R, Blackall PJ. Genotypic diversity of *Pasteurella multocida* isolates from pigs and poultry in Australia [J]. *Aust Vet J*, 2018, 96(10): 390-394.

[15] Sarangi LN, Thomas P, Gupta SK, et al. Molecular epidemiology of *Pasteurella multocida* circulating in India by multilocus sequence typing [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2016, 63(2): 286-292.

[16] 李海金, 曾睦宗, 陈天杰, 等. 广东省猪多杀性巴氏杆菌血清学分型研究-IV. 116 株猪多杀性巴氏杆菌的分离与鉴定 [J]. *广东农业科学*, 1985, (3): 33-36.

[17] 唐沙, 袁海文, 杨源, 等. 禽霍乱巴氏杆菌的分离鉴定及基因分型 [J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(9): 2724-2730.

[18] Ewers C, Lübke-Becker A, Bethe A, et al. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status [J]. *Vet Microbiol*, 2006, 114(3-4): 304-317.