

## 研究报告

## 一株兔源 A 型多杀性巴氏杆菌的分离鉴定和全基因组测序及分析

罗逊, 丁碧荷, 王印, 罗燕, 姚学萍, 任梅渗, 杨泽晓\*

四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130

罗逊, 丁碧荷, 王印, 罗燕, 姚学萍, 任梅渗, 杨泽晓. 一株兔源 A 型多杀性巴氏杆菌的分离鉴定和全基因组测序及分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 582-598.

LUO Xun, DING Bihe, WANG Yin, LUO Yan, YAO Xueping, REN Meishen, YANG Zexiao. Isolation, identification, and whole genome sequencing of a rabbit-derived type A *Pasteurella multocida* strain[J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 582-598.

**摘要:** 【背景】多杀性巴氏杆菌可导致猪肺疫、牛出血性败血症和兔出血性败血症等多种疾病, 严重威胁多种动物畜牧养殖业的健康发展。【目的】重庆某兔场送检一批病死兔, 为研究其病原和治疗方法, 对病原进行了微生物分离和全基因组测序分析。【方法】从 2022 年重庆某兔场送检兔病料中进行细菌分离纯化、生化试验、16S rRNA 基因鉴定、荚膜血清型分型、药敏试验和毒力基因检测, 同时通过全基因组测序结果进行毒力、耐药基因注释和遗传进化等分子生物学信息分析。【结果】该菌为兔源 A:ST74 多杀性巴氏杆菌, 命名为 LXSS001, 基因组序列上传到 NCBI 数据库(登录号为 CP119523.1), 药敏试验显示该菌对四环素、杆菌肽、复方新诺明和磺胺异恶唑耐药, 对头孢噻肟、头孢哌酮和丁胺卡那等药物敏感。全基因组长度为 2 480 671 bp, 并注释到了 58 个毒力基因和 9 类药物的靶向抗药基因。通过联合建树表明其与 3480 株一致性最高。【结论】本研究完成了一株 A 型多杀性巴氏杆菌的分离鉴定和全基因组测序, 并揭示了其与国内外其他分离株的进化关系, 为多杀性巴氏杆菌的后续研究提供了参考依据。

**关键词:** 兔; 多杀性巴氏杆菌; 全基因组测序; 致病性; 耐药性

资助项目: 四川省科技计划(2023ZHYZ0006)

This work was supported by the Science and Technology Project of Sichuan Province (2023ZHYZ0006).

\*Corresponding author. E-mail: yzxyang2003@126.com

Received: 2023-08-08; Accepted: 2023-09-07; Published online: 2023-10-08

## Isolation, identification, and whole genome sequencing of a rabbit-derived type A *Pasteurella multocida* strain

LUO Xun, DING Bihe, WANG Yin, LUO Yan, YAO Xueping, REN Meishen, YANG Zexiao\*

College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

**Abstract:** [Background] *Pasteurella multocida* can cause various diseases such as porcine pulmonary disease, bovine hemorrhagic sepsis, and rabbit hemorrhagic sepsis, posing a serious threat to the healthy development of the animal husbandry in China. [Objective] A rabbit farm in Chongqing sent a batch of sick and dead rabbits for examination. To study their pathogens and treatment methods, we carried out microbial isolation and whole genome sequencing for the pathogens. [Methods] The bacterial isolation and purification, biochemical testing, 16S rRNA gene identification, capsule serotyping, drug susceptibility testing, and virulence gene testing were conducted with the diseased rabbit samples from a rabbit farm in Chongqing, 2022. The whole genome sequencing results were employed to annotate the virulence genes and drug resistance genes and build the phylogenetic tree. [Results] The isolate was identified as a rabbit-derived type A *Pasteurella multocida* strain belonged to the sequence type ST74 and named LXSS001. The genome sequence was uploaded to NCBI (collection number: CP119523.1). The strain was resistant to tetracycline, compound sulfamethoxazole, and sulfamethoxazole, while it was sensitive to cefotaxime, cefoperazone, and amikacin and so on. The strain had the whole genome length of 2 480 671 bp and carried 58 virulence genes and resistance genes for 9 classes of antibiotics. The phylogenetic tree showed that LXSS001 had the highest homology with the 3480 strain. [Conclusion] This study completed the isolation, identification, and whole genome sequencing of a type A *P. multocida* strain and revealed its phylogenetic relationship with other isolates, providing a basis for the subsequent research on *P. multocida*.

**Keywords:** rabbit; *Pasteurella multocida*; whole genome sequencing; pathogenicity; drug resistance

1881 年, Louis Pasteur 首次分离出了多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, *Pm*)并证明多杀性巴氏杆菌是引起禽霍乱的病原体, 且该菌可导致多种畜禽发病, 如兔出血性败血症、牛出血性败血症、禽巴氏杆菌病和猪萎缩性鼻炎<sup>[1-2]</sup>, 甚至还会感染到人类<sup>[3-4]</sup>。多杀性巴氏杆菌的致病性主要来自脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)<sup>[5]</sup>和荚膜<sup>[6]</sup>, Carter<sup>[7]</sup>和 Rimler 等<sup>[8]</sup>根据荚膜抗原将多杀性巴氏杆菌分为 A、B、D、E 和 F

共 5 个血清型。引起慢性鼻甲骨萎缩的 A 型和 F 型还会产生多杀性巴氏杆菌毒素(*Pasteurella multocida* toxin, PMT)<sup>[9]</sup>。

利用重庆某发病兔场送检病死兔样开展细菌学检查, 通过分离纯化、生化试验、16S rRNA 基因鉴定和荚膜血清学分型, 分离出一株多杀性巴氏杆菌毒株, 并进行药敏试验、毒力基因检测和全基因组测序分析。以期有多杀性巴氏杆菌后续研究提供参考基础。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

麦康凯培养基、营养琼脂(nutrient agar, NA) 固体培养基(含 5%新西兰新生牛血清), 爱必信(上海)生物科技有限公司; 2×SanTaq PCR Mix (with blue dye)、DL2000 DNA Marker, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS), 北京索莱宝科技有限公司; 药敏纸片、微量生化反应管, 杭州微生物试剂有限公司; Fast Pure Gel DNA Extraction Mini Kit, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

立式蒸汽压力灭菌器, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 水浴恒温摇床, 常州市金坛友联仪器研究所; 生物显微镜, Olympus 公司; 台式冷冻高速离心机, Eppendorf 公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 电泳仪, 北京六一生物科技股份有限公司; Quantity One 凝胶成像仪, Omega 公司。

病死家兔由重庆某养兔场送检。昆明小鼠购自成都达硕实验动物有限公司。实验动物由四川农业大学动物福利委员会审查通过(编号为 20230239)。

## 1.2 病原菌的分离纯化与染色镜检

无菌剖开病死兔胸腔和腹腔, 取病死兔肺脏、肝脏划线接种于 NA 营养琼脂固体培养基上(含 5%新西兰新生牛血清), 37 °C 培养 24 h, 观察并记录结果。从培养基上挑取单菌落, 使用平板划线法进行纯化接种于 NA 营养琼脂固体培养基上(含 5%新西兰新生牛血清), 挑纯化后单菌落进行革兰氏染色。

## 1.3 生化试验

将细菌接种到生化发酵管, 37 °C 培养 24 h, 观察记录结果。

## 1.4 16S rRNA 基因引物设计与扩增

参照 GenBank 中多杀性巴氏杆菌的 16S rRNA

基因序列设计引物, 引物序列见表 1。PCR 反应体系(50 μL): 模板 2 μL, 上、下游引物(10 μmol/L) 各 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 19 μL, 2×SanTaq PCR Mix 25 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 55 °C 15 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物经胶回收后由北京擎科生物科技股份有限公司进行测序。

## 1.5 荚膜血清型鉴定

根据 Townsend 等<sup>[10]</sup>的报道设计荚膜血清型鉴定 PCR 引物, 引物序列见表 1。PCR 反应体系(50 μL): 模板 2 μL, 上、下游引物(10 μmol/L) 各 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 19 μL, 2×SanTaq PCR Mix 25 μL。PCR 反应条件同 1.4。

## 1.6 药敏试验和小鼠致病性试验

采用 Kirby-Barer 纸片扩散法, 参照 CLSI 鉴定手册(2021 版)筛选分离菌的药物敏感性<sup>[11]</sup>。将多杀性巴氏杆菌涂布于 NA (含 5%新西兰新生牛血清)平板上, 37 °C 培养过夜后用 PBS 冲洗, 用稀释涂布平板计数法确定菌液浓度。取 10 只昆明小鼠, 雌雄各半, 分别注射 0.2 mL 1×10<sup>10</sup> CFU/mL、1×10<sup>9</sup> CFU/mL、1×10<sup>8</sup> CFU/mL、1×10<sup>7</sup> CFU/mL 菌液和 0.2 mL PBS, 并观察 72 h。

## 1.7 毒力基因检测

根据 Khamesipour 等<sup>[12]</sup>的报道设计毒力基因 PCR 引物, 引物序列见表 1。PCR 反应体系(50 μL): 模板 2 μL, 上、下游引物(10 μmol/L) 各 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 19 μL, 2×SanTaq PCR Mix 25 μL。PCR 反应条件同 1.4。

## 1.8 分离菌的全基因组测序

将分离菌用平板划线法连续在 NA (含 5%新西兰新生牛血清)培养基上纯化培养 3 代后, 再用涂布平板法涂布于 NA (含 5%新西兰新生牛血清)培养基上 37 °C 培养 24 h, 之后用灭菌后的 PBS 冲下菌苔并 6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 送上海派森诺生物科技股份有限公司提取细菌基因组 DNA 并进行全基因组测序。

表 1 PCR 引物信息

Table 1 Information of PCR primers

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物大小 Product length (bp)
16S rRNA	GGTTACCTTGTTACGACTT/AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1 500
<i>hyaD-hyaC</i>	GATGCCAAAATCGCAGTCAG/TGTTGCCATCATTGTCAGTG	1 048
<i>dcbF</i>	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC/CATCTACCCACTCAACCATATCAG	647
<i>bcbD</i>	CATTATCCAAGCTCCACC/GCCCGAGAGTTTCAATCC	758
<i>ecbJ</i>	TCCGCAGAAAATTATTGACTC/GCTTGCTGCTTGATTTTGTC	512
<i>fc bD</i>	TCGGAGAACGCAGAAATCAG/TTCCGCCGTCAATTACTCTG	852
<i>ptfA</i>	TGTGGAATTCAGCATTTTAGTGTGTC/TCATGAATTCTATGCGCAAAATCCTGCTGG	488
<i>fimA</i>	CCATCGGATCTAAACGACCTA/AGTATTAGTTCCTGCGGGTG	866
<i>hsf-1</i>	TTGAGTCGGCTGTAGAGTTCG/ACTCTTTAGCAGTGGGGACAACCTC	654
<i>hsf-2</i>	ACCGCAACCATGCTCTTAC/TGACTGACATCGGCGGTAC	433
<i>pflhA</i>	TTCAGAGGGATCAATCTTCG/AACTCCAGTTGGTTTGTCG	286
<i>tadD</i>	TCTACCCATTCTCAGCAAGGC/ATCATTTCGGGCATTACCC	416
<i>toxA</i>	CTTAGATGAGCGACAAGG/GAATGCCACACCTCTATAG	864
<i>sodA</i>	TACCAGAATTAGGCTACGC/GAAACGGGTTGCTGCCGCT	361
<i>tbpA</i>	TTGGTTGGAAACGGTAAAGC/TAACGTGTACGGAAAAGCCC	728
<i>sodC</i>	AGTTAGTAGCGGGGTTGGCA/TGGTGCTGGGTGATCATCATG	235
<i>nanB</i>	CATTGCACCTAACACCTCT/GGACACTGATTGCCCTGAA	555
<i>nanH</i>	GTGGGAACGGGAATTGTGA/ACATGCCAAGTTTGCCCTA	287
<i>ompA</i>	CGCATAGCACTCAAGTTTCTCC/CATAAACAGATTGACCGAAACG	201
<i>ompH</i>	CGCGTATGAAGGTTTAGGT/TTAGATTGTGCGTAGTCAAC	438
<i>oma87</i>	GGCAGCGAGCAACAGATAACG/TGTTTCGTCAAATGTCGGGTGA	838
<i>plpB</i>	TTTGGTGGTGCATGTCTTCT/AGTCACTTAGATTGTGCGTAG	282
<i>pmHAS</i>	TCAATGTTTGCGATAGTCCGTTAG/TGGCGAATGATCGGTGATAGA	430
<i>exbB</i>	TTGGCTTGTGATTGAACGC/TGCAGGAATGGCGACTAAA	283
<i>exbD</i>	CGTTCTGATTACAGCCTCTT/AACGAAATCTTGAAACTGG	247
<i>tonB</i>	CGACGGTGAAACCTGAGCCA/CCGAGCGATAAGCATTGACT	261
<i>hgbA</i>	TCAACGGCAGATAATCAGGG/GCGGGAATGCTGAAGATAAG	267
<i>Fur</i>	GTTTACCGTGTATTAGACCA/CATTACTACATTTGCCATAC	244
<i>hgbB</i>	ACCGCGTTGGAATTATGATTG/CATTGAGTACGGCTTGACAT	788

## 1.9 分离菌的全基因组分析

利用 OAT (<https://www.ezbiocloud.net/tools/orthoani>) 比对工具将分离菌株同其他多杀性巴氏杆菌的具有代表性的菌株进行平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)比对。蛋白编码基因的序列比对采用 diamond 软件来完成<sup>[13]</sup>, 与 non-redundant protein database (NR)<sup>[14]</sup>、cluster of orthologous groups of proteins (COG)<sup>[15]</sup>、

Swiss-Prot、gene ontology (GO)<sup>[16]</sup> 和 Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG)<sup>[17]</sup> 以上 5 个数据库进行 BLAST ( $E\text{-value} \leq 1e-6$ ) 选取一个最佳的结果进行功能的判别。运用毒力因子数据库 Virulence Factor Database (VFDB)<sup>[18]</sup> ([www.mgc.ac.cn/VFs/](http://www.mgc.ac.cn/VFs/)) 对分离菌的毒力基因进行注释。采用综合抗生素耐药性数据库 The Comprehensive Antibiotic Resistance Database

(CARD)<sup>[19]</sup> (<https://card.mcmaster.ca>) 注释分离菌所具有的耐药基因。分离菌序列类型用 PubMLST 数据库(<https://pubmlst.org>)测算,同时基于分离菌的管家基因,利用 MEGA 7.0<sup>[20]</sup> 软件与 NCBI 中的关联菌株进行多基因联合建树分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 分离菌菌落及形态特征

分离菌在麦康凯培养基上不生长;在 NA 固体培养基(含 5%新西兰新生牛血清)上形成露滴状、光滑、半透明的菌落(图 1)。经革兰氏染色显微镜下观察,可见短杆状的革兰阴性菌体(图 2)。

### 2.2 生化试验结果

生化试验结果显示,分离菌对山梨醇、乳酸、木糖、麦芽糖和七叶苷呈阳性;对氰化钾对照、 $\beta$ -半乳糖苷、丙三酸盐、硫化氢和硝酸盐对照呈阴性,符合多杀性巴氏杆菌的特性。

### 2.3 16S rRNA 基因的 PCR 鉴定

将分离菌的 16S rRNA 基因 PCR 产物进行 1%的琼脂糖凝胶电泳,出现一条与预期结果一

样的大小为 1 500 bp 左右的条带,如图 3 所示。将测序结果在 NCBI 进行 BLAST 比对,一致性最高的序列为多杀性巴氏杆菌的序列。结合菌落菌体特征和生化试验结果,鉴定分离细菌为多杀性巴氏杆菌。

### 2.4 药敏试验和小鼠致病性试验结果

药敏试验结果显示,分离菌对头孢噻肟、头孢哌酮、丁胺卡那、诺氟沙星、阿莫西林、多西环素、青霉素、红霉素、氟苯尼考和恩诺沙星敏感;对万古霉素、链霉素、麦迪霉素和

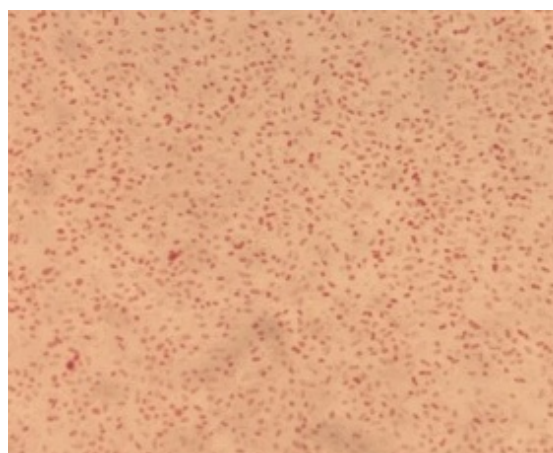


图 2 分离菌革兰氏染色镜检图(1 000 $\times$ )

Figure 2 The result of Gram staining microscopy of isolated bacteria (1 000 $\times$ ).

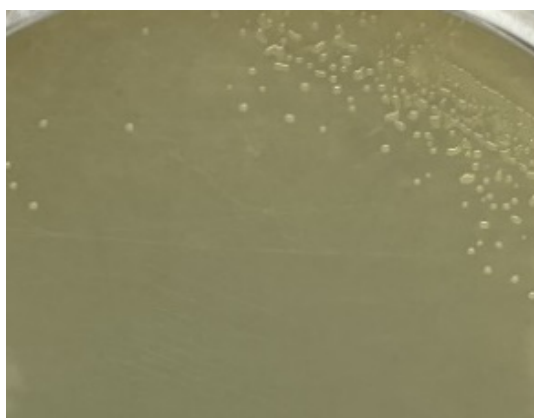


图 1 分离菌在 NA (含 5%新西兰新生牛血清)固体培养基上的菌落形态

Figure 1 The colony morphology of isolated bacteria on NA agar medium.

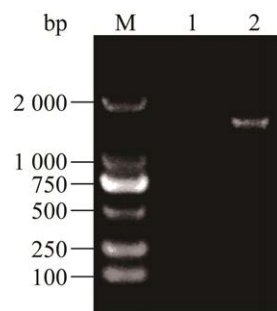


图 3 16S rRNA 基因的 PCR 产物凝胶电泳图

M: DL2000 DNA Marker; 1: 阴性对照; 2: 分离菌  
Figure 3 Gel electrophoresis of 16S rRNA gene PCR product. M: DL2000 DNA Marker; 1: Negative control; 2: Isolated bacteria.

多粘菌素 B 的耐药性为中度敏感；对杆菌肽、磺胺异恶唑、复方新诺明和四环素耐药，具体结果见表 2。小鼠致病性试验结果显示，注射  $1 \times 10^{10}$  CFU/mL、 $1 \times 10^9$  CFU/mL 菌液的小鼠在 24 h 内死亡，注射  $1 \times 10^8$  CFU/mL 菌液的小鼠在 48 h 内死亡，注射  $1 \times 10^7$  CFU/mL 菌液的小鼠在 72 h 内死亡，注射 PBS 的小鼠未死亡。

## 2.5 荚膜血清型鉴定结果

荚膜血清型 PCR 产物电泳结果如图 4 所示，分离菌荚膜血清型鉴定为 A 型。

## 2.6 毒力基因检测结果

毒力基因 PCR 产物电泳结果如图 5 所示，在分离菌株中检出了 *ptfA*、*fimA*、*hsf-2*、*tadD*、

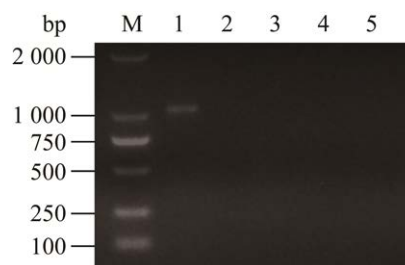


图 4 分离菌荚膜血清型鉴定结果

Figure 4 Identification results of capsule serotype of isolated bacteria. M: DL2000 DNA Marker; 1: *hyaD-hyaC*; 2: *bcbD*; 3: *dcbF*; 4: *ecbJ*; 5: *fcbD*.

*sodA*、*tbpA*、*pfhA*、*nanB*、*nanH*、*ompA*、*ompH*、*oma87*、*plpB*、*pmHAS*、*exbB*、*exbD*、*tonB*、*Fur* 和 *hgbB* 基因，*hsf-1*、*sodC*、*toxA* 和 *hgbA* 基因未检出。

## 2.7 分离菌的全基因组测序结果

测序得到分离菌全基因组大小为 2 480 671 bp，G+C 含量为 40.27%，含有 2 366 个开放阅读框 (open reading framework, ORF)，平均长度为 930.3 bp，ORF 序列占基因组总长度的 88.7%；含有 58 个 tRNA、19 个 rRNA (7 个 5S rRNA、6 个 16S rRNA、6 个 23S rRNA) 和 27 个 ncRNA；含有 3 条 CRISPRs 序列。菌株拼接序列以 FASTA 文件上传至 Genome 数据库获得登录号为 SAMN33607990，并将该菌株编号为 LXSS001。

## 2.8 平均核苷酸一致性分析结果

物种划分的界限为 95% ANI 值<sup>[21]</sup>，如图 6 所示。菌株 LXSS001 与 GenBank 中登录的各地区各血清型的多杀性巴氏杆菌的 ANI 值均在 95% 以上，与兔多发的支气管败血波氏杆菌的 ANI 值小于 75%，说明菌株 LXSS001 为多杀性巴氏杆菌。

## 2.9 蛋白编码基因与功能注释结果

### 2.9.1 蛋白编码基因的 NR 注释

菌株 LXSS001 中有 2 366 个基因在 NR 数据库中 得到注释。

表 2 药敏试验结果

Table 2 The results of antibiotic sensitivity tests

药物名称 Drug names	抑菌圈直径 Inhibition zone diameters (mm)	结果 Results
头孢噻肟 Cefotaxime	50	S
头孢哌酮 Cefoperazone	38	S
万古霉素 Vancomycin	19	I
丁胺卡那 Amikacin	23	S
杆菌肽 Bacitracin	0	R
诺氟沙星 Norfloxacin	31	S
阿莫西林 Amoxicillin	36	S
多西环素 Doxycycline	30	S
链霉素 Streptomycin	18	I
青霉素 Penicillin	28	S
红霉素 Erythromycin	21	S
麦迪霉素 Midecamycin	14	I
多粘菌素 B Polymyxin B	20	I
磺胺异恶唑 Sulfafurazole	10	R
氟苯尼考 Florfenicol	38	S
恩诺沙星 Enrofloxacin	32	S
复方新诺明	10	R
Compound sulfamethoxazole		
四环素 Tetracycline	8	R

R: 耐药; I: 中介; S: 敏感

R: Resistance; I: Intermediary; S: Sensitive.



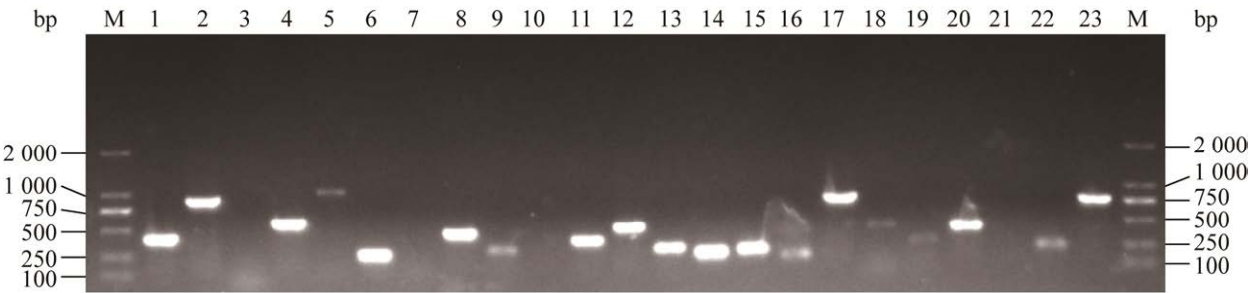


图 5 毒力基因检测结果电泳图  
Figure 5 Test results gel electrophoresis of toxicity gene. M: DL2000 DNA Marker; 1: *ptfA*; 2: *fimA*; 3: *hsf-1*; 4: *hsf-2*; 5: *pfhA*; 6: *tadD*; 7: *toxA*; 8: *sodA*; 9: *tbpA*; 10: *sodC*; 11: *nanB*; 12: *nanH*; 13: *ompA*; 14: *ompH*; 15: *oma87*; 16: *plpB*; 17: *pmHAS*; 18: *exbB*; 19: *exbD*; 20: *tonB*; 21: *hgbA*; 22: *Fur*; 23: *hgbB*.

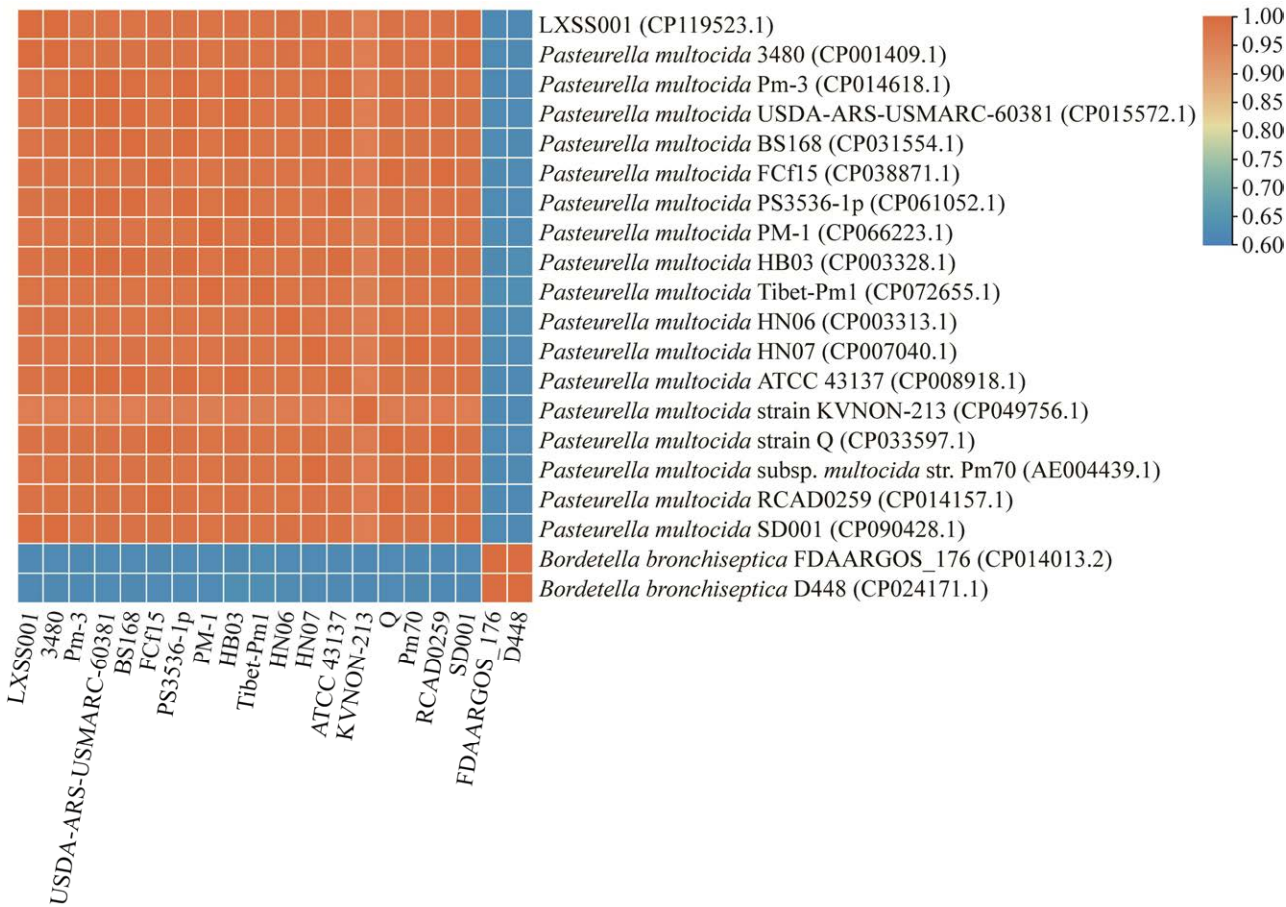


图 6 菌株 LXSS001 与多杀性巴氏杆菌代表菌株的 ANI 比对  
Figure 6 ANI results among strain LXSS001 and representative of *Pasteurella multocida*. The NCBI accession number of the strain is shown in brackets.

### 2.9.2 蛋白编码基因的 COG 注释

将菌株 LXSS001 的基因编码蛋白序列与 COG 数据库进行比对, 总共注释有 21 种功能的 2 125 个基因, 其中包括 483 个未知功能的基因。编码碳水化合物的运输和代谢(carbohydrate transport and metabolism)相关功能基因最多, 有 163 个; 编码翻译、核糖体结构和生物合成(translation, ribosomal structure and biogenesis)相关功能基因有 162 个; 编码细胞壁/膜/包膜合成(cell wall/membrane/envelope biogenesis)相关功能基因有 161 个, 这些富集较多的代谢途径均为细菌新陈代谢的必需途径, 具体结果如图 7 所示。

### 2.9.3 蛋白编码基因的 KEGG 注释

将菌株 LXSS001 的基因编码蛋白序列与 KEGG 数据库进行比对, 总共有 2 951 个编码基因得到注释, 其中参与 Brite hierarchies 层次遗传信息加工(genetic information processing)的基因是最多的, 有 540 个相关基因; 其次是信号传递和细胞过程(signaling and cellular processes), 有 389 个相关基因; 然后是碳水化合物代谢

(carbohydrate metabolism), 有 257 个相关基因, 具体结果如图 8 所示。

### 2.9.4 蛋白编码基因的 GO 注释

将菌株 LXSS001 的基因编码蛋白序列与 GO 数据库进行比对, 菌株 LXSS001 中共有 1 651 个基因得到注释, 其中分子功能中的离子结合(ion binding)和 DNA 结合(DNA binding)是基因富集程度最高的 2 个途径; 细胞组成中细胞(cell)和细胞组件(cellular component)是基因富集程度最高的 2 个途径; 生物过程中生物过程(biological process)和细胞氮化合物代谢过程(cellular nitrogen compound metabolic process)是基因富集程度最高的 2 个途径, 具体结果如图 9 所示。

### 2.9.5 蛋白编码基因的 Swiss-Prot 注释

将菌株 LXSS001 的基因编码蛋白序列与 Swiss-Prot 数据库比对, 共有 1 993 个基因的蛋白序列功能得到了 Swiss-Prot 的注释。

### 2.9.6 转运蛋白分类数据库注释

转运蛋白分类数据库(transporter classification database, TCDB)是膜转运蛋白, 包括离子通道

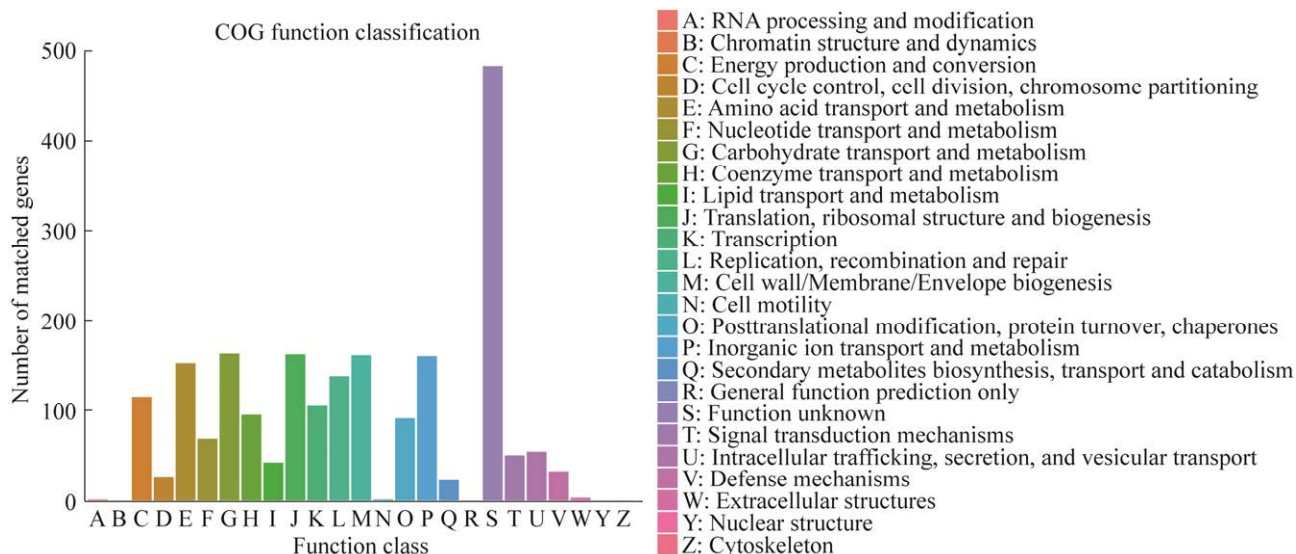


图 7 菌株 LXSS001 基因组的 COG 功能分类图

Figure 7 COG function classification diagram of strain LXSS001 genome.



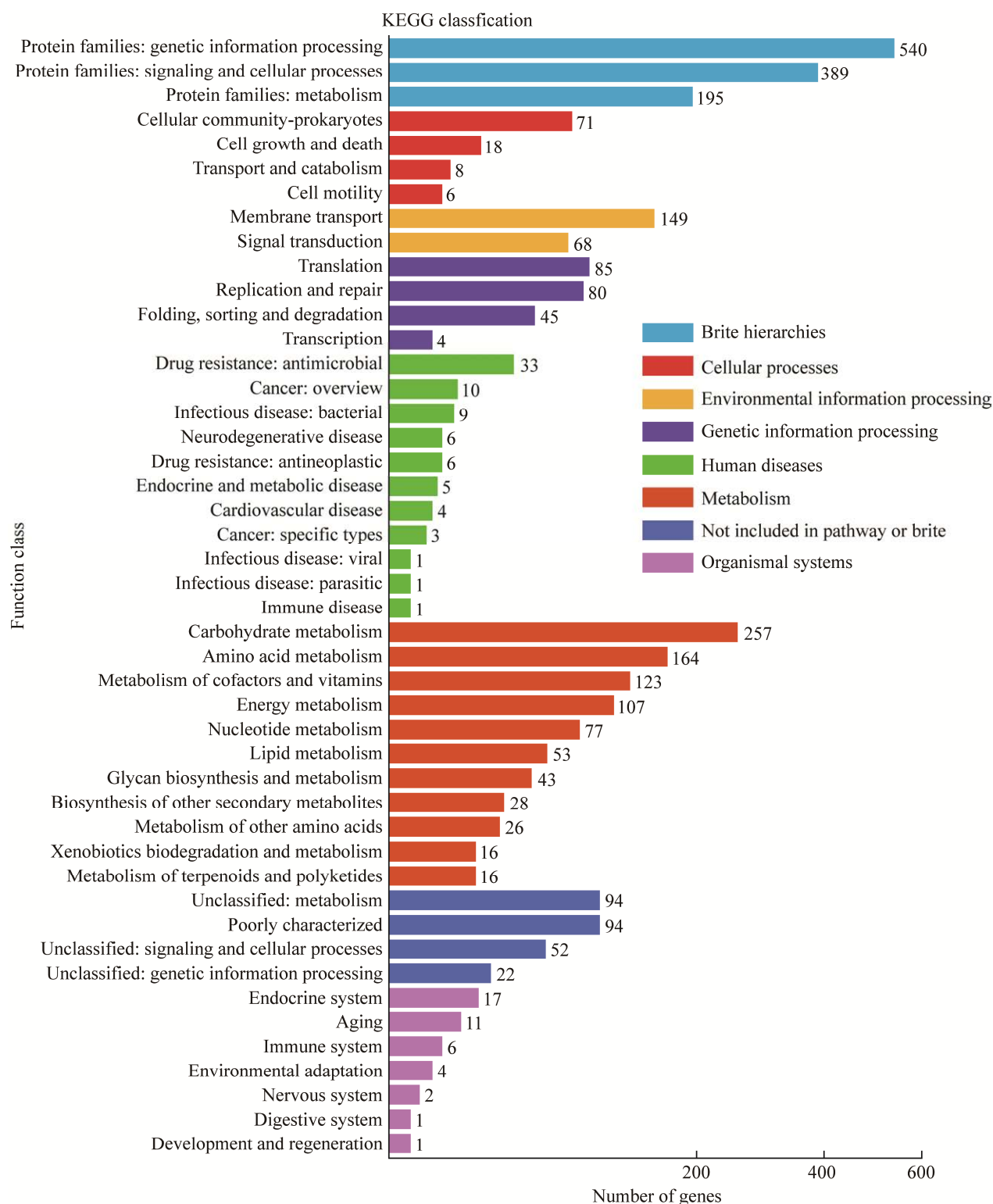


图 8 菌株 LXSS001 基因组的 KEGG 代谢通路分类图

Figure 8 Classification diagram of KEGG metabolic pathway of strain LXSS001 genome.

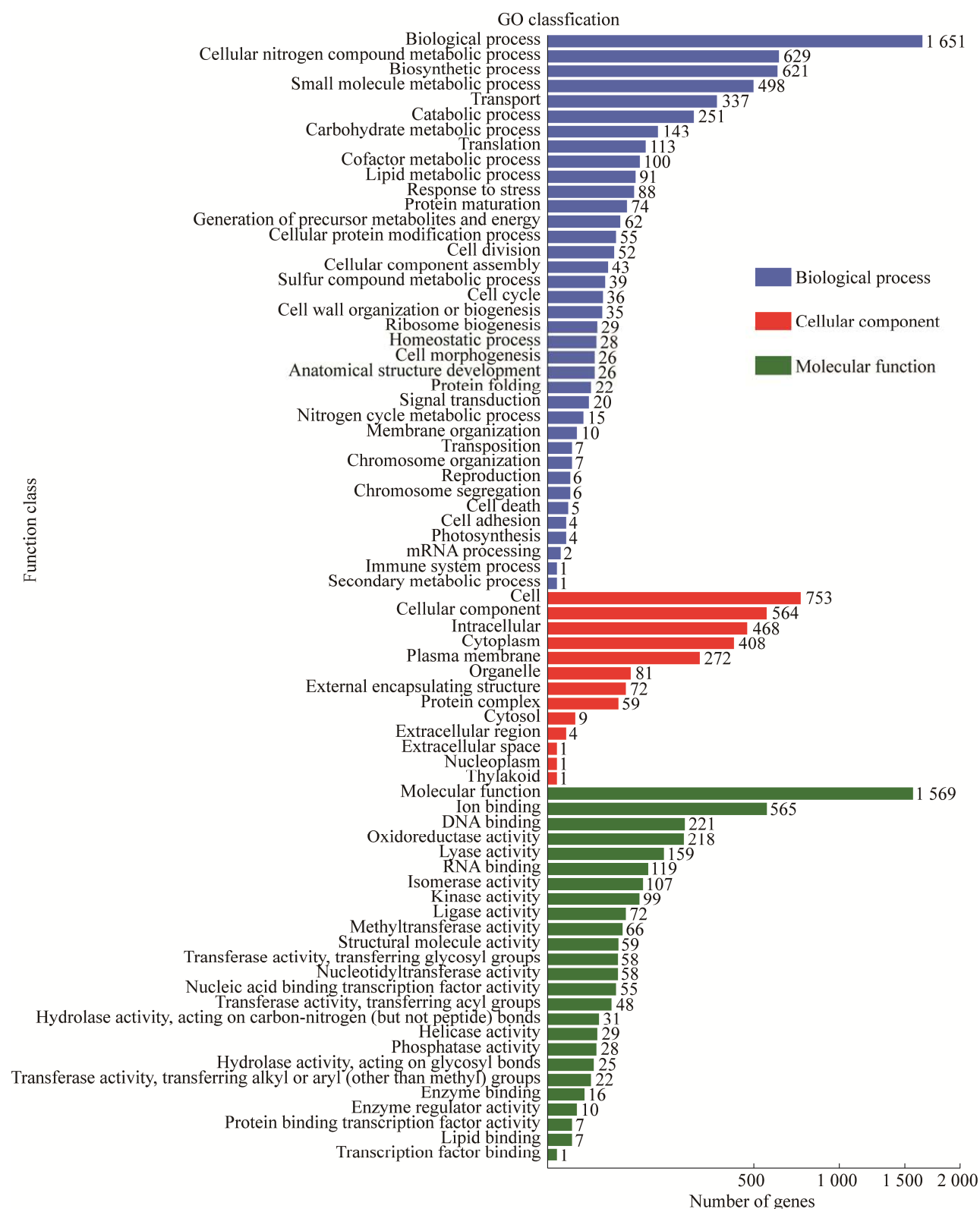


图 9 菌株 LXSS001 基因组的 GO 功能分类图

Figure 9 GO function classification map of strain LXSS001 genome.

(ion channels)的分类系统(TC system)。TCDB 数据库转移系统以 5 个级别进行分类,第一级统计结果如图 10 所示,共有 541 个基因在 TCDB 中得到注释。数量位于前三的分别是初级活性转运蛋白(primary active transporter) (220 个基因)、电化学电位驱动转运蛋白(electrochemical potential-driven transporters) (133 个基因)和通道蛋白(channels/pores) (76 个基因)。

### 2.9.7 碳水化合物活性酶(CAZy)分析

碳水化合物活性酶(carbohydrate-active enZymes, CAZy)数据库<sup>[22]</sup>主要包含与糖苷键降解、修饰及生成相关的酶类家族。主要包含五大分类:糖苷水解酶(glycoside hydrolase, GH)、糖基转

移酶(glycosyl transferase, GT)、多糖裂解酶(polysaccharide lyase, PL)、碳水化合物酯酶(carbohydrate esterase, CE)和辅助活性酶(auxiliary activity, AA)。此外,该数据库还包含与碳水化合物结合相关的酶(carbohydrate-binding module, CBM)。

采用 hmmscan<sup>[23]</sup>软件来预测在基因组序列中存在的 CAZy 酶类基因。比对结果选取 ORF 序列长度>80 个氨基酸, *E*-value 临界值设置为  $1e-5$ ; 氨基酸序列比对长度大于数据库当中氨基酸序列的 30%; 若序列比对长度<80 个氨基酸, *E*-value 临界值设置为  $1e-3$ , 氨基酸序列比对长度大于数据库当中氨基酸序列的 30%也作为选取对象。CAZy 分析的结果统计如表 3 所示。

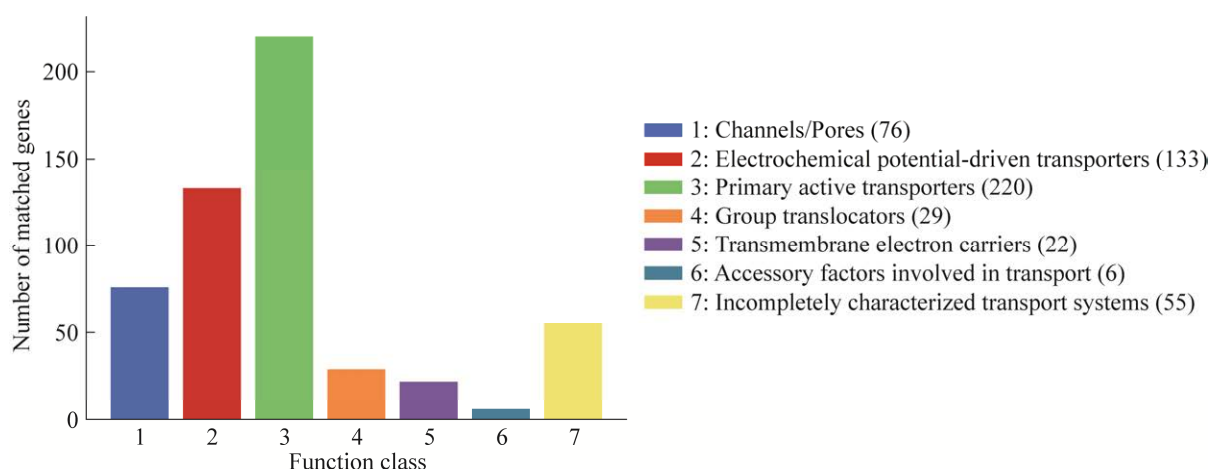


图 10 菌株 LXSS001 的 TCDB 数据库注释统计图

Figure 10 TCDB database annotation statistics for strain LXSS001.

表 3 碳水化合物活性酶统计结果

Table 3 Statistical results of CAZy

碳水化合物酶类型 CAZy property	注释到的 ORF 数量 Number of ORF annotated	注释到的 ORF 数量占总预测的比例 Percentage of ORF annotated (%)
糖基转移酶 Glycosyl transferase (GT)	35	0.014 8
多糖裂解酶 Polysaccharide lyase (PL)	1	0.000 4
碳水化合物酯酶 Carbohydrate esterase (CE)	9	0.003 8
辅助活性酶 Auxiliary activity (AA)	4	0.001 7
碳水化合物结合相关的酶 Carbohydrate-binding module (CBM)	3	0.001 3
糖苷水解酶 Glycoside hydrolase (GH)	17	0.007 2

### 2.9.8 病原与宿主互作数据库注释

病原与宿主互作数据库(pathogen host interactions database, PHI)主要来源于真菌、卵菌和细菌,感染的宿主包括动物、植物、真菌以及昆虫。该数据库对寻找药物干预的靶基因研究有重要作用,同时该数据库还包括抗真菌化合物和相应的靶基因。数据库中的每个基因都包含核酸和氨基酸序列,以及感染宿主过程中预测的蛋白功能的详细描述。

在菌株 LXSS001 中共有 579 个基因在 PHI 数据库中得到注释,其中,有 344 个基因突变后毒力减弱,8 个突变后致死,43 个基因突变后丧失致病性,137 个基因突变后不受影响,4 个突变成效应子,3 个突变后有化学耐药性,2 个突变后有化学敏感性,另有 38 个基因突变后可能会增加毒力。统计结果如图 11 所示。

## 2.10 毒力及耐药分析结果

### 2.10.1 毒力基因注释

下载 VFDB 最新数据库注释,经 BLAST 比对,选取得分最高且  $E\text{-value} \leq 1e-5$  的结果。在菌株 LXSS001 基因组中共检测到了 58 个毒力基因,包括介导黏附、侵入、铁摄取以及抗

吞噬能力的蛋白。其中注释到的毒力因子寡聚糖(lipooligosaccharide, LOS)和荚膜(capsule)相关基因最多。现已报道过的多杀性巴氏杆菌与毒力因子相关的基因诸如 *fur*、*ompP5*、*tufA* 等均被检测到。相关结果如表 4 所示。

### 2.10.2 抗生素抗性(CARD)分析结果

在菌株 LXSS001 基因组中检测到了多种耐药基因,包括  $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类、磺胺类、香豆素类抗生素、利福霉素类、氟喹诺酮类和多肽类抗生素类这 9 类药物的靶向抗性,还有与多种耐药外排泵相关的基因,具体如表 5 所示。

## 2.11 基于 RIRDC MLST 管家基因系统发育树的构建

根据 pubmlst.org 网站上的多杀性巴氏杆菌的 RIRDC MLST 七个管家基因(*adk*、*est*、*pml*、*zwf1*、*mdh*、*gdh* 和 *pgi*)的引物,找到菌株 LXSS001 的管家基因序列,得到菌株 LXSS001 的 ST 为 302,谱系组(clonal complex)为 ST74。

同时与 GenBank 中所提交的其他从不同地区和宿主分离到的多杀性巴氏杆菌(全基因组序列信息见表 6),共同构建系统发育树,如图 12

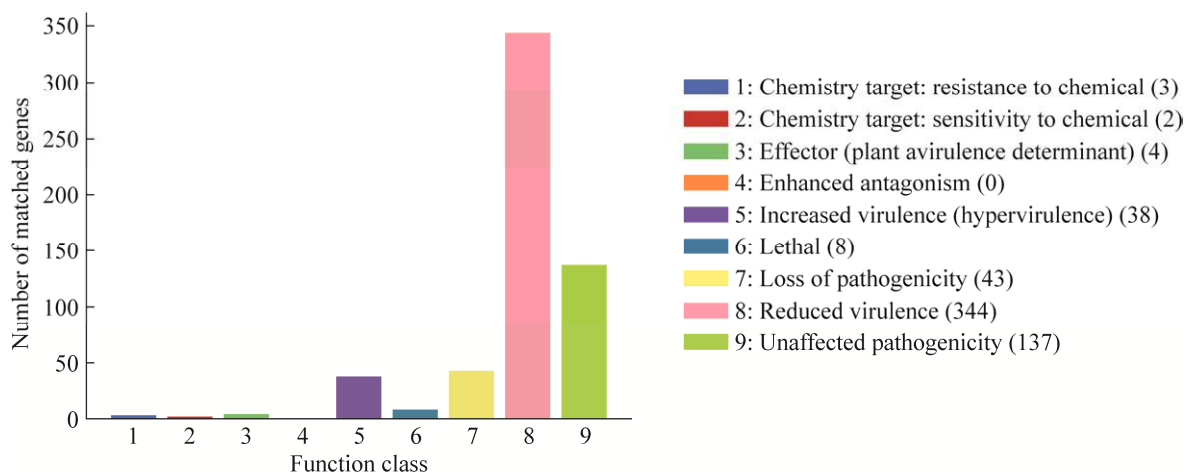


图 11 菌株 LXSS001 的 PHI 数据库注释统计图

Figure 11 PHI database annotation results of strain LXSS001.

表 4 菌株 LXSS001 中的毒力因子

Table 4 Virulence factors in strain LXSS001

Function	Virulence factors	Related genes
Adherence	Type IV pili	<i>vfr</i>
	Heat shock protein	<i>htpB</i>
	GroEL	<i>groEL</i>
	Outer membrane protein	<i>OmpP5</i>
	EF-Tu	<i>tufA</i>
	Biofilm	<i>algU</i>
	S-ribosylhomocysteinase	<i>luxS</i>
	Stress survival	<i>ClpP</i> , <i>katA</i>
Invasion	LPS	<i>acpXL</i>
Immune modulation	LOS	<i>galE</i> , <i>galU</i> , <i>gmhA</i> , <i>htrB</i> , <i>kdsA</i> , <i>KdsB</i> , <i>kdtA</i> , <i>kpsF</i> , <i>lgtF</i> , <i>lpxA</i> , <i>lpxB</i> , <i>lpxC</i> , <i>lpxD</i> , <i>lpxH</i> , <i>lpxK</i> , <i>lsgA</i> , <i>lsgE</i> , <i>lsgF</i> , <i>manB</i> , <i>msbA</i> , <i>msbB</i> , <i>neuA</i> , <i>opsX</i> , <i>orfM</i> , <i>rfaD</i> , <i>rfaE</i> , <i>rfaF</i> , <i>rffG</i> , <i>rpe</i> , <i>waaQ</i> , <i>wecA</i>
Motility	Polar flagella	<i>flmH</i> , <i>nueA</i>
Antiphagocytosis	Capsule	<i>bexA</i> , <i>bexB'</i> , <i>bexC'</i> , <i>ctrB</i> , <i>ctrC</i> , <i>ctrD</i> , <i>hcsB'</i> , <i>tvbB</i> , <i>rpe</i> , <i>ugd</i>
Iron uptake	Ferric uptake regulator	<i>fur</i>

表 5 菌株 LXSS001 的耐药基因预测

Table 5 Prediction of antibiotic resistance genes in strain LXSS001

Resistant genes category	Resistant genes
$\beta$ -lactam antibiotics	<i>CpxA</i> , <i>Hns</i>
Aminoglycosides	<i>APH(3'')-Ib</i> , <i>CpxR</i>
Macrolides	<i>Hns</i> , <i>CpxR</i> , <i>macB</i> , <i>CPR</i> , <i>CpxR</i>
Tetracyclines	<i>tet35</i> , <i>Hns</i> , <i>tet34</i>
Sulfonamides	<i>CpxA</i> , <i>folP</i>
Rifamycins	<i>rpoB</i>
Fluoroquinolones	<i>CpxR</i> , <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> , <i>parE</i> , <i>CPR</i> , <i>mdtK</i>
Elfamycin	<i>EF-Tu</i>
Polypeptide antibiotic	<i>basR</i> , <i>CpxR</i> , <i>rpoC</i> , <i>ugd</i>
Efflux pump conferring antibiotic resistance	<i>antibiotic sensitive signal peptidase I</i> , <i>dxr</i> , <i>elongation factor G</i> , <i>EF-G</i> , <i>cycloserine sensitive alanine racemase</i> , <i>rho</i>

所示。根据发育树可知,本文分离的菌株 LXSS001 与 2014 年美国分离的猪源 3480 株一致性最高。

### 3 讨论

多杀性巴氏杆菌虽然在各血清型之间有一定程度的交叉保护能力<sup>[24]</sup>,但是该菌的防治依然比较困难。与传统的 DNA-DNA 杂交和 16S

rRNA 基因等物种鉴定方法相比,本研究运用了 ANI 分析进行菌种鉴定,准确性更高。

多杀性巴氏杆菌严重威胁多种动物畜牧养殖业的健康发展,郭伟娜等<sup>[25]</sup>在安徽省凤阳县分离到一株兔源 A 型多杀性巴氏杆菌;赵猛等在青海省分离到一株牦牛源 A 型多杀性巴氏杆菌<sup>[26]</sup>;张召兴等<sup>[27]</sup>在河北地区的貉中分离



表 6 共同建树菌株信息

Table 6 Collaborating strain information

Strain (GenBank accession No.)	ANI (%)	Host	Year	Country	ST
<i>Pasteurella multocida</i> FCf15 (CP038871.1)	98.76	Duck	2019	China	129
<i>Pasteurella multocida</i> strain Q (CP033597.1)	98.80	Anatidae	2010	China	129
<i>Pasteurella multocida</i> RCAD0259 (CP014157.1)	98.80	Duck	2015	China	129
<i>Pasteurella multocida</i> SD001 (CP090428.1)	99.84	Pig	2019	China	129
<i>Pasteurella multocida</i> HN06 (CP003313.1)	99.00	Pig	2012	China	50
<i>Pasteurella multocida</i> 3480 (CP001409.1)	99.92	Pig	2014	USA	74
LXSS001 (CP119523.1)	100	Rabbit	2022	China	302
<i>Pasteurella multocida</i> HN07 (CP007040.1)	98.68	Unknown	2014	China	9
<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>multocida</i> str. Pm70 (AE004439.1)	98.66	Bird	2004	USA	9
<i>Pasteurella multocida</i> PM-1 (CP066223.1)	98.42	Yak	2020	China	122
<i>Pasteurella multocida</i> Tibet-Pm1 (CP072655.1)	98.45	Yak	2018	China	122
<i>Pasteurella multocida</i> BS168 (CP031554.1)	98.64	Unknown	2017	China	13
<i>Pasteurella multocida</i> HB03 (CP003328.1)	98.77	Pig	2012	China	13
<i>Pasteurella multocida</i> ATCC 43137 (CP008918.1)	98.78	Pig	2013	USA	13
<i>Pasteurella multocida</i> Pm-3 (CP014618.1)	98.32	Cattle	2013	China	79
<i>Pasteurella multocida</i> USDA-ARS-USMARC-60381 (CP015572.1)	98.63	Bos taurus	2013	USA	79
<i>Pasteurella multocida</i> PS3536-1p (CP061052.1)	98.73	Bos taurus	2017	Switzerland	79
<i>Pasteurella multocida</i> strain KVNON-213 (CP049756.1)	96.51	Cat	2018	Korea	67

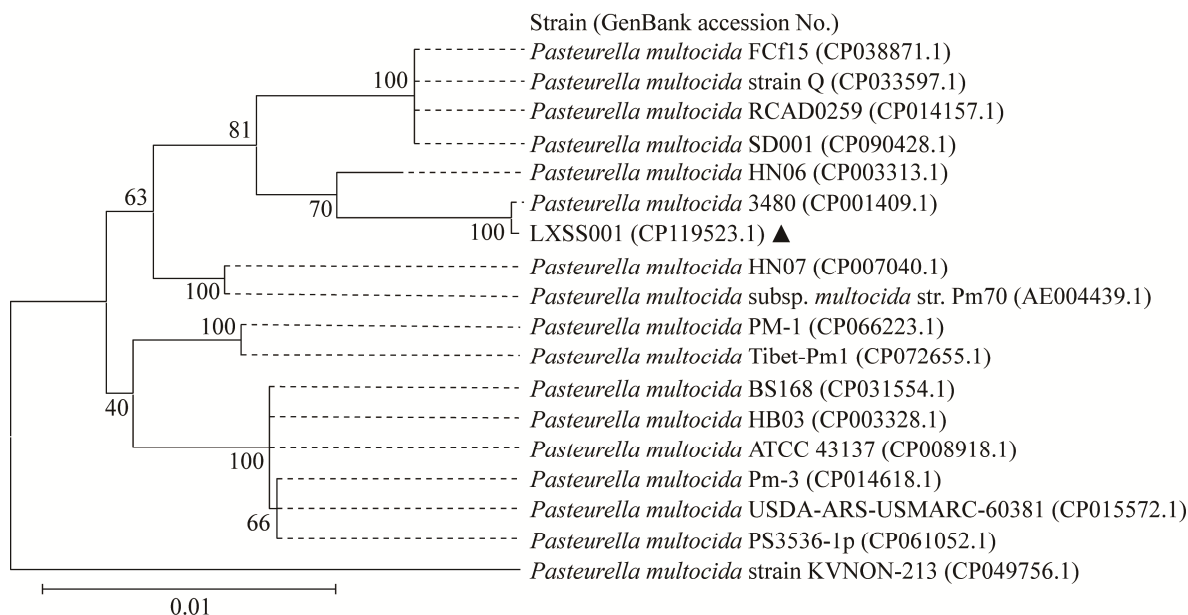


图 12 基于管家基因序列构建的菌株 LXSS001 系统发育树 ▲：本研究分离的 LXSS001 菌株；比例尺“0.01”代表遗传距离的单位；每一分支上的数字表示 500 次重复抽样检测的自举分析置信度值

Figure 12 Phylogenetic tree of strain LXSS001 based on housekeeping genes sequences. ▲: The LXSS001 strain isolated in this study; Scale “0.01” represents the unit of genetic distance; The number on each branch represents the bootstrap analysis confidence value of the 500 repeated sampling test.

到 94 株多杀性巴氏杆菌。从流行病学角度来看,多杀性巴氏杆菌在中国的传染情况为地区流行<sup>[28-29]</sup>。

菌株 LXSS001 的基因组是由一条 2 480 671 bp 的染色体组成, G+C 含量为 40.27%, 有 2 366 个蛋白编码基因, 与其他 *Pm* 菌株基因组结构类似。经过 ANI 比对, 与不同国家或地区及不同宿主所分离的多杀性巴氏杆菌的 ANI 均大于 95%, 同时跟多发于兔的波氏杆菌病(*Bordetella bronchiseptica*) ANI 小于 95%。

在 GO 分析中共有 1 651 个基因得到注释, 其中分子功能中的离子结合和 DNA 结合, 是基因富集程度最高的 2 个途径; 细胞组成中细胞和细胞内是基因富集程度最高的 2 个途径; 生物过程中生化过程和细胞氮化合物代谢过程是基因富集程度最高的 2 个途径。在 KEGG 分析中, 富集程度前三的基因分别是参与 Brite 层次遗传信息加工的基因、信号传导和细胞转化、与碳水化合物代谢相关基因。COG 分析中, 总共注释有 21 种功能的 2 125 个基因, 其中包括 483 个未知功能的基因。数量较多的基因为编码氨基酸转运和代谢相关功能基因; 编码翻译、核糖体结构和生物合成相关功能基因、编码细胞壁/膜/包膜合成相关功能基因。三种分析结果较为一致, 并且通过 CAZy 分析得出了各种碳水化合物活性酶的具体占比。此外, 还对菌株 LXSS001 基因组在 TCDB 数据库中进行了注释, 找出了通道蛋白中占比较多的部分。

细菌研究课题的一个重要部分是细菌致病性。本研究对菌株 LXSS001 进行了 PCR 毒力基因检测和 VFDB 分析。PCR 鉴定和 VFDB 分析表明, 在菌株 LXSS001 中, 主要毒力基因是寡多糖(LOS)、脂多糖(LPS)、荚膜和黏附因子相关基因, 还有菌毛基因(*ptfA* 等)、铁摄取基因

(*fur*、*hgbB* 等)以及外膜蛋白基因(*OmpP5* 等), 其中 *ptfA* 基因在 A、B 和 D 型菌株中已被发现<sup>[30]</sup>, 并且其编码的假定蛋白与菌毛可以帮助菌株 *Pm* 黏附到宿主细胞上, 与其他细菌的黏附素结构相似<sup>[31]</sup>, 致病性分析与张亚楠等<sup>[32]</sup>的结果较为一致。细菌研究课题的另一个重要部分是细菌耐药性, 经过 CARD 分析, 菌株 LXSS001 中携带了多种耐药基因, 包括四环素耐药基因(*tet34*、*tet35*、*Hns*)和氨基糖苷类耐药基因(*APH(3'')-Ib*、*CpxR*)等, 与耐药性试验结果一致。并且, 耐药性试验和 CARD 分析的结果与张亚楠等<sup>[32]</sup>和邹本革等<sup>[33]</sup>的结果相似, 与张小波等<sup>[34]</sup>的结果有些微差异, 主要差异在于丁胺卡那和四环素。鉴于研究结果, 目前对该病治疗的建议是以灭活疫苗免疫为主, 同时兼顾抗生素治疗。

## 4 结论

本研究从重庆发病家兔中分离到一株多杀性巴氏杆菌命名为 LXSS001, 并对其进行了血清型分型、生化试验、药敏试验、小鼠致病性试验和全基因组测序和后续分子生物学分析, 扩充了多杀性巴氏杆菌的基因数据库, 揭示了 LXSS001 与国内外 *Pm* 分离株的进化亲缘关系, 并讨论了与其他 *Pm* 分离菌株的差异, 为后续 *Pm* 致病机制的研究和疾病的防治提供参考依据。

## REFERENCES

- [1] HARPER M, BOYCE JD, ADLER B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 265(1): 1-10.
- [2] WOO YK, KIM JH. Fowl cholera outbreak in domestic poultry and epidemiological properties of *Pasteurella multocida* isolate[J]. Journal of Microbiology (Seoul, Korea), 2006, 44(3): 344-353.
- [3] HONNORAT E, SENG P, SAVINI H, PINELLI PO, SIMON F, STEIN A. Prosthetic joint infection caused

- by *Pasteurella multocida*: a case series and review of literature[J]. BMC Infectious Diseases, 2016, 16(1): 1-7.
- [4] RYAN JM, FEDER HM Jr. Dog licks baby. Baby gets *Pasteurella multocida* meningitis[J]. The Lancet, 2019, 393(10186): e41.
- [5] HARPER M, COX AD, ST MICHAEL F, WILKIE IW, BOYCE JD, ADLER B. A heptosyltransferase mutant of *Pasteurella multocida* produces a truncated lipopolysaccharide structure and is attenuated in virulence[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(6): 3436-3443.
- [6] BORRATHYBAY E, SAWADA T, KATAOKA Y, OKIYAMA E, KAWAMOTO E, AMAO H. Capsule thickness and amounts of a 39 kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* type A strains correlate with their pathogenicity for chickens[J]. Veterinary Microbiology, 2003, 97(3/4): 215-227.
- [7] CARTER GR. The type specific capsular antigen of *Pasteurella multocida*[J]. Canadian Journal of Medical Sciences, 1952, 30(1): 48-53.
- [8] RIMLER RB, RHOADES KR. Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1987, 25(4): 615-618.
- [9] WILSON BA, HO M. *Pasteurella multocida* toxin interaction with host cells: entry and cellular effects[M]//Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012: 93-111.
- [10] TOWNSEND KM, BOYCE JD, CHUNG JY, FROST AJ, ADLER B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(3): 924-929.
- [11] HUMPHRIES R, BOBENCHIK AM, HINDLER JA, SCHUETZ AN. Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, M100, 31st edition[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2021, 59(12): e0021321.
- [12] KHAMESIPOUR F, MOMTAZ H, AZHDARY MAMOREH M. Occurrence of virulence factors and antimicrobial resistance in *Pasteurella multocida* strains isolated from slaughter cattle in Iran[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 536.
- [13] BUCHFINK B, XIE C, HUSON DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND[J]. Nature Methods, 2015, 12(1): 59-60.
- [14] LI WZ, JAROSZEWSKI L, GODZIK A. Tolerating some redundancy significantly speeds up clustering of large protein databases[J]. Bioinformatics (Oxford, England), 2002, 18(1): 77-82.
- [15] GALPERIN MY, MAKAROVA KS, WOLF YI, KOONIN EV. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(Database issue): D261-D269.
- [16] ASHBURNER M, BALL CA, BLAKE JA, BOTSTEIN D, BUTLER H, CHERRY JM, DAVIS AP, DOLINSKI K, DWIGHT SS, EPPIG JT, HARRIS MA, HILL DP, ISSEL-TARVER L, KASARSKIS A, LEWIS S, MATESE JC, RICHARDSON JE, RINGWALD M, RUBIN GM, SHERLOCK G. Gene ontology: tool for the unification of biology[J]. Nature Genetics, 2000, 25(1): 25-29.
- [17] KANEHISA M, GOTO S, HATTORI M, AOKI-KINOSHITA KF, ITOH M, KAWASHIMA S, KATAYAMA T, ARAKI M, HIRAKAWA M. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(suppl\_1): D354-D357.
- [18] CHEN LH, ZHENG DD, LIU B, YANG J, JIN Q. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(D1): D694-D697.
- [19] JIA BF, RAPHENYA AR, ALCOCK B, WAGLECHNER N, GUO PY, TSANG KK, LAGO BA, DAVE BM, PEREIRA S, SHARMA AN, DOSHI S, COURTOT M, LO R, WILLIAMS LE, FRYE JG, ELSAYEGH T, SARDAR D, WESTMAN EL, PAWLOWSKI AC, JOHNSON TA, BRINKMAN FSL, WRIGHT GD, McARTHUR AG. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(D1): D566-D573.
- [20] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [21] JAIN C, RODRIGUEZ-R LM, PHILLIPPY AM, KONSTANTINIDIS KT, ALURU S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries[J]. Nature Communications, 2018, 9: 5114.
- [22] LOMBARD V, GOLACONDA RAMULU H, DRULA E, COUTINHO PM, HENRISSAT B. The

- carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(D1): D490-D495.
- [23] KROGH A, BROWN M, MIAN IS, SJÖLANDER K, HAUSSLER D. Hidden Markov models in computational biology: applications to protein modeling[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1994, 235(5): 1501-1531.
- [24] 贾英民, 富润福. 禽霍乱多杀性巴氏杆菌不同 Heddlestone 血清型交叉免疫研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1989(8): 2-4.
- JIA YM, FU RF. Cross immunization study on different heddlestone serotypes of *Pasteurella multocida* in avian cholera[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary*, 1989(8): 2-4 (in Chinese).
- [25] 郭伟娜, 赵霞, 路振香. 兔源多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国兽医杂志, 2023, 59(4): 59-62.
- GUO WN, ZHAO X, LU ZX. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Pasteurella multocida* from rabbits[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2023, 59(4): 59-62 (in Chinese).
- [26] 赵猛, 马凯茹, 王守政, 韩学燕, 冯宏恩, 王传洋, 武学峰, 赵静, 张红见. 牦牛源 A 型多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 动物医学进展, 2023, 44(3): 132-135.
- ZHAO M, MA KR, WANG SZ, HAN XY, FENG HE, WANG CY, WU XF, ZHAO J, ZHANG HJ. Isolation, identification and drug sensitivity test of serotype A *Pasteurella multocida* in calves of yaks[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2023, 44(3): 132-135 (in Chinese).
- [27] 张召兴, 高桂生, 史秋梅. 貉源多杀性巴氏杆菌分离、鉴定及特征分析[J]. 中国兽医学报, 2023, 43(3): 497-503.
- ZHANG ZX, GAO GS, SHI QM. Isolation, identification and characteristic analysis of *Pasteurella multocida* from raccoon dog[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2023, 43(3): 497-503 (in Chinese).
- [28] 张浩钿, 陶育和, 文智举, 覃杰. 新疆巴州地区绵羊肺炎流行病学调查[J]. 中国畜禽种业, 2022, 18(11): 65-67.
- ZHANG HD, TAO YH, WEN ZJ, QIN J. Epidemiological investigation of sheep pneumonia in Bazhou area, Xinjiang[J]. *The Chinese Livestock and Poultry Breeding*, 2022, 18(11): 65-67 (in Chinese).
- [29] 朱慧. 羊巴氏杆菌病的流行病学、临床特征、实验室诊断和防控措施[J]. 农家参谋, 2021(29): 98-100.
- ZHU H. Epidemiology, clinical characteristics, laboratory diagnosis and control measures of pasteurellosis in sheep[J]. *Adviser of Peasant Families*, 2021(29): 98-100 (in Chinese).
- [30] RUFFOLO CG, TENNENT JM, MICHALSKI WP, ADLER B. Identification, purification, and characterization of the type 4 fimbriae of *Pasteurella multocida*[J]. *Infection and Immunity*, 1997, 65(1): 339-343.
- [31] HATFALUDI T, AL-HASANI K, BOYCE JD, ADLER B. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 144(1/2): 1-17.
- [32] 张亚楠, 李亚菲, 陈汝佳, 余波, 彭珊, 李婷, 蒲龄, 徐景峨. A:L1 ST128 型鸭源多杀性巴氏杆菌的耐药性及毒力分析[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(10): 2852-2863.
- ZHANG YN, LI YF, CHEN RJ, YU B, PENG S, LI T, PU L, XU JE. Resistance and virulence analysis of type A:L1 ST128 *Pasteurella multocida* from ducks[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2021, 52(10): 2852-2863 (in Chinese).
- [33] 邹本草, 张伟, 张瑞华, 刘伟, 田伟. 猪源多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国兽医杂志, 2022, 58(7): 90-96.
- ZOU BG, ZHANG W, ZHANG RH, LIU W, TIAN W. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Pasteurella multocida* from swine[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2022, 58(7): 90-96 (in Chinese).
- [34] 张小波, 蔡平, 李红婷, 温贵兰, 张喜懿, 陈广. 花边鸭源 A 型多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及主要毒力基因检测[J]. 家畜生态学报, 2022, 43(3): 56-61.
- ZHANG XB, CAI P, LI HT, WEN GL, ZHANG XY, CHEN G. Isolation and identification of type A *Pasteurella multocida* from lace duck and its main virulence genes[J]. *Journal of Domestic Animal Ecology*, 2022, 43(3): 56-61 (in Chinese).