

华利忠,冯志新,李玉峰,等.猪巴氏杆菌 Lh-4 株单因子发病模型的建立[J].江苏农业科学,2021,49(12):129-134.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.12.021

# 猪巴氏杆菌 Lh-4 株单因子发病模型的建立

华利忠<sup>1</sup>,冯志新<sup>1</sup>,李玉峰<sup>2</sup>,袁 厅<sup>1</sup>,刘蓓蓓<sup>1</sup>,张 磊<sup>1</sup>,邵国青<sup>1</sup>

(1.江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程重点实验室,江苏南京 210014;2.南京农业大学,江苏南京 210095)

**摘要:**人工接种猪巴氏杆菌 Lh-4 株于 SPF 仔猪,以复制猪肺疫发病模型,并探讨其发生发展的规律,为今后研究该病的防治提供依据。选取 5 头 30 日龄 SPF 仔猪,随机分为攻毒组 3 头 and 对照组 2 头。联合采用滴鼻和皮下注射攻毒( $10^9$  CFU/头),攻毒后每天观察临床症状和测定直肠温度,并分别于 0、4、10、16 d 采集鼻拭子和抗凝血,进行细菌 PCR 检测。死亡和 16 d 时剖检,进行组织学观察,同时进行巴氏杆菌在各组织中的分布测定及细菌再分离,最后对具有类似临床症状的病原进行检测。结果发现,攻毒组有 2 头出现包括发烧、败血症、支气管肺炎、胸膜炎、心包炎等典型的猪肺疫临床症状和病理变化,1 头出现了轻微临床症状。所有攻毒猪均能再分离到巴氏杆菌,其中典型发病猪各组织脏器中均有巴氏杆菌的分布,但轻微发病猪仅在心、肺、扁桃体和淋巴结中检测出。发病猪其他有类似临床症状的相关病原检测均为阴性。成功建立了猪肺疫发病模型,为巴氏杆菌病的发生发展规律,致病机制及其他巴氏杆菌临床分离株致病性的确定提供依据。

**关键词:**猪巴氏杆菌;猪肺疫;SPF 猪;发病模型;病理变化

**中图分类号:** S858.28 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)12-0129-06

多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)是存在于口腔、鼻咽及上呼吸道的条件致病菌<sup>[1]</sup>。在猪中 *P. multocida* 主要引起急性死亡及波氏杆菌混合感染引起猪萎缩性鼻炎(atrophic rhinitis, AR)<sup>[2]</sup>。此外,*P. multocida* 在猪呼吸道疾病综合征(porcine respiratory disease complex, PRDC)中也起着重要的作用<sup>[3-4]</sup>。有报道显示,在中国发生肺炎和 AR 的病例中,*P. multocida* 的检出率为 8.0%<sup>[5]</sup>,而韩国检出率为 15.6%<sup>[6]</sup>。在 Kim 等的另一个报道中显示,从 2008 年到 2016 年韩国巴氏杆菌的患病率更高达 16.8%,且 85% 病例是与其他病原混合感染<sup>[7]</sup>。可见 *P. multocida* 在猪病中的重要性。*P. multocida* 具有很多血清型,多项流行病学调查均显示血清型 A 是我国最为流行的血清型之一<sup>[8-9]</sup>,所以针对 *P. multocida* 血清型 A 的研究和防控显得尤为重要。由于 *P. multocida* 为条件致病菌,常为内源性感染,且通常表现为混合感染或由某些因素诱发,故临床上在预防给药的用药时间上把控难度较

大。疫苗免疫是预防猪巴氏杆菌病的重要措施,但由于感染剂量的标准化难以确定,单因子动物发病模型往往出现全部急性死亡或不发病的情况,较难建立<sup>[10]</sup>,其单因子发病的特点、病理变化以及排菌规律等的研究报道也很少,阻碍了疫苗研发的进程。本研究以 SPF 二元猪为基础试验动物,利用普遍流行的 A 血清型 *P. multocida* 强毒株 Lh-4 建立发病模型,并对发病的过程进行监测和各项指标的检测,探讨其单因子发病规律和特点。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物及试验用菌株

试验用 30 日龄 SPF 长大二元猪 5 头,于 2019 年 9 月由江苏省农业科学院兽医研究所根据 Huang 等的方法<sup>[11]</sup>经人工培育获得,经检测符合 GB/T 22914—2008 SPF 猪病原的控制与监测的国家标准。猪多杀性巴氏杆菌 A 血清型 Lh-4 株,由南京农业大学李玉峰教授惠赠。该菌株于 2016 年分离于江苏某规模化猪场猪肺疫急性病例,前期小鼠和仔猪攻毒试验证明为强毒株。

### 1.2 主要试剂和仪器

**主要试剂:**试验用核酸提取试剂盒购自爱思进生物技术有限公司;PCR 试剂购自天根生物技术有限公司;非洲猪瘟病毒荧光 PCR 检测试剂盒购自北

收稿日期:2020-09-01

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFD0501600)。

作者简介:华利忠(1982—),男,江苏无锡人,博士,副研究员,从事猪病临床防控技术及实验动物研究。E-mail: steven828@126.com。

通信作者:邵国青,博士,研究员,主要从事动物传染病学研究。

E-mail: gqshao@163.com。

京世纪元亨动物防疫技术有限公司,其他在实验中所用试剂均为国产分析纯试剂。

主要仪器:组织切片机(德国 Leica 公司),PCR 仪(美国 PE 公司),Kodak 凝胶成像系统(美国 Kodak 公司),荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),BH-2 光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 试验设计及处理

试验用 30 日龄 SPF 猪 5 头,饲养于江苏省农业科学院实验动物房,于 2019 年 10 月随机分为 2 组,其中 G1 攻毒组 3 头(编号:CC-1、CC-2 和 CC-3),接种  $1.67 \times 10^8$  CFU/mL 巴氏杆菌 Lh-4 株悬液 6 mL(共  $10^9$  CFU/头),其中皮下注射 4 mL,左右鼻孔滴鼻各 1 mL。G2 对照组猪 2 头(编号:NC-1 和 NC-2),采用同样的方式接种等体积的灭菌 PBS。试验猪饲喂方式为自由采食,自由饮水。所有猪每天观察临床症状并于 08:00—09:00 间测定直肠温度。临床观察按 Fuller 等制定的标准<sup>[12]</sup>稍作修改进行临床指数的计算。即食欲:0-正常采食,1-采食量减少,2-不采食;呼吸困难:0-正常,1-轻微,2-中等程度,3-严重呼吸困难;精神沉郁:0-正常,1-不爱动,2-抑郁,3-深度沉郁。试验观察期 16 d,期间分别于攻毒后 0、4、10、16 d 称质量,计算称质量当天各试验组的平均体质量,并对死亡猪进行及时剖检,16 d 后对所有剩余猪进行剖检。

1.4 血象分析

分别于攻毒后 0、4、10、16 d 采集肝素抗凝血,分析血象。如动物死亡,则在濒死前采血进行检测。

1.5 菌血症和鼻腔排菌规律检测

分别于攻毒后 0、4、10、16 d 采集肝素抗凝血和鼻拭子,采用 PCR 方法进行巴氏杆菌病原检测。如动物死亡,则在濒死前进行样本采集。其中鼻拭子采集方法:每头猪左右鼻孔各用 1 个鼻拭子棉签采集,采集后放入准备好的 EP 管中(1.5 mL EP 管中加入 1 mL PBS)。4 ℃ 2 h 后取出棉签,10 000 r/min 离心 20 min,弃鼻拭子浸液,留沉淀保存于 -70 ℃,待所有时间点结束后统一提取细菌 DNA 后进行猪巴氏杆菌的 PCR 检测。巴氏杆菌的 PCR 引物序列见表 1。

1.6 剖检及病理变化

动物濒死状态或死后及试验 16 d 后,对死亡猪和剩余猪进行剖检,查看各组织脏器的剖检变化,进行拍照和记录。采集心、肝、脾、肺、肾、淋巴结及扁桃体等组织脏器,中性福尔马林固定,制作常规

表 1 攻毒后试验猪临床症状最为严重时的分值统计

编号	得分(分)			
	食欲	呼吸状况	精神状况	总分
CC-1	2	3	3	8
CC-2	2	3	3	8
CC-3	1	2	1	4
NC-1	0	0	0	0
NC-2	0	0	0	0

石蜡切片,HE 染色后进行组织病理学观察。

1.7 巴氏杆菌在各组织脏器内的分布及再分离

剖检时采集心、肝、脾、肺、肾、淋巴结以及扁桃体, -20 ℃ 保存,待所有时间点结束后统一提取 DNA 后进行 *P. multocida* 的 PCR 检测。同时,无菌采集肺脏和肝脏,接种 TSB 培养板,37 ℃ 培养,进行细菌再分离。随后进行纯化培养和 *P. multocida* 的 PCR 鉴定。

1.8 其他病原的检测

为进一步排除在整个试验过程中试验猪是否有其他类似临床症状和病理变化的病原感染,剖检时采集每头猪的肺脏、淋巴结和脾脏,采用 RT-PCR/PCR 进行猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)、非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪伪狂犬病毒(Porcine pseudorabies virus, PRV)、猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)、副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)、胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pneumoniae pleuropneumoniae*, APP)及猪鼻支原体(*Mycoplasma hyorhinis*, Mhr)的病原检测,其中,ASFV 检测采用北京世纪元亨非洲猪瘟病毒荧光 PCR 检测试剂盒检测。

2 结果与分析

2.1 临床表现及剖检变化

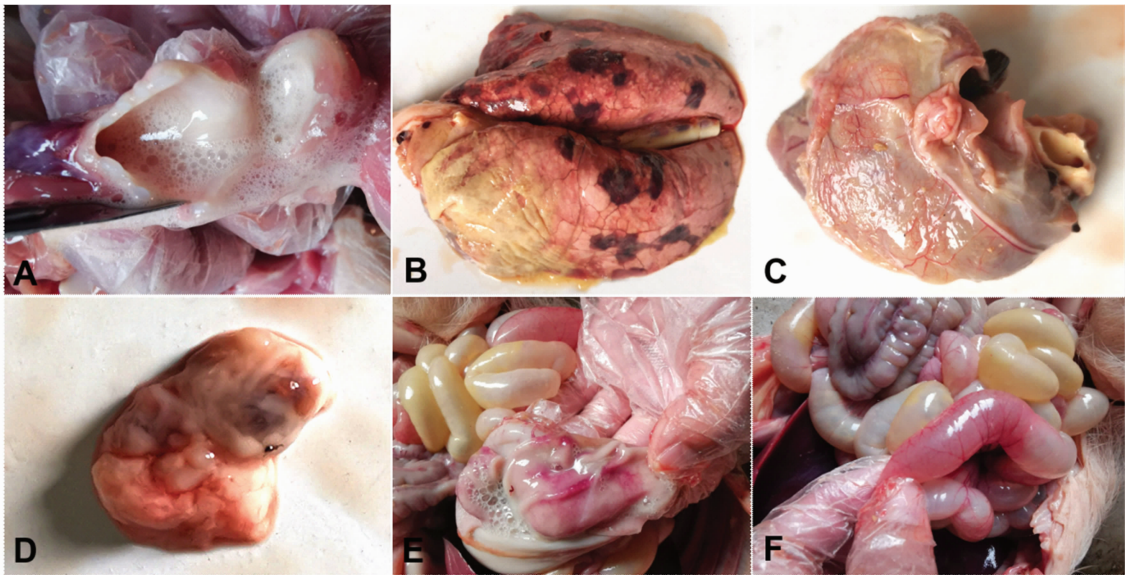
试验组在攻毒后体温升高,部分高热稽留,采食量下降、消瘦、精神不振、呼吸困难、腹式呼吸。2 头猪皮肤发红,其中,耳朵、鼻镜、四肢末梢和臀部发红严重(图 1)。濒死前食欲废绝,衰弱无力,卧地不起。将试验期间临床症状记分最严重时的分值统计,由表 1 可知,攻毒后死亡猪的临床表现最为严重,未死猪轻微。攻毒组分别于攻毒后 6 d(CC-2)和 8 d(CC-1)各死亡 1 头。

由图 2 可知,剖检攻毒组发病死亡猪,发现气管



A. 耳朵和鼻镜发红; B. 四肢末梢和臀部皮肤发红

图1 攻毒猪表现症状



A. 气管内充满白色泡沫; B. 肺脏有出血斑, 呈大理石样病变, 表面有纤维素性渗出; C. 心内膜增厚, 绒毛心; D. 腹股沟淋巴结出血; E. 胃黏膜出血; F. 肠道出血

图2 攻毒发病猪剖检变化

内大量白色泡沫、胸腔积液、肺脏出血水肿, 肺叶一侧出现纤维素性渗出物, 并与胸壁黏连; 心包积液, 呈淡黄色, 心包膜增厚, 绒毛心; 全身淋巴结出血, 脾脏边缘梗死, 肝脏水肿, 一侧肾脏有化脓灶; 胃底出血, 小肠壁变薄, 结肠出血。

## 2.2 体温和体质量变化

攻毒组与对照组体温和体质量变化见图 3。由图 3 可知, 攻毒组攻毒后出现高热稽留现象。其中, CC-1 和 CC-2 号平均体温为 40.5 ℃ 和 40.8 ℃, 直至死亡; CC-3 号猪平均体温 40.1 ℃。在整个试验过程中, 对照组体温变化不大(图 3-A)。由图 3-B 可知, 对照组平均体质量在整个试验阶段一直高于攻毒组。但由于 10 d 和 16 d 攻毒组仅剩下 1 头存活, 故在本试验中攻毒组和对照组的体质量变化未做统计学分析, 仅作为参考。

## 2.3 血象分析结果

在攻毒后 4 d 内, 所有试验猪血象分析各指标均在正常范围内, 在 6 d CC-2 号濒死猪血象分析发现单核细胞数量和比例升高, 8 d CC-1 号濒死猪嗜中性粒细胞和单核细胞的数量和比例均有所升高。攻毒组 CC-3 未死亡猪 10 d 和 16 d 时, 嗜中性粒细胞和单核细胞的数量和比例均升高。对照组在整个试验过程中各指标均在正常范围内。

## 2.4 组织病理学变化

由图 4 可知, 组织病理学变化显示肺脏间质增宽、出血、肺泡上皮细胞肿胀坏死脱落, 肺泡中有嗜中性粒细胞和巨噬细胞浸润, 并可见少量纤维素性渗出, 部分肺泡内可见蓝染的菌丝; 脾脏脾小体坏死, 中央动脉周围淋巴鞘淋巴细胞减少。肾脏充血; 肝脏肝血窦瘀血, 肝细胞变性坏死, 枯否石细胞



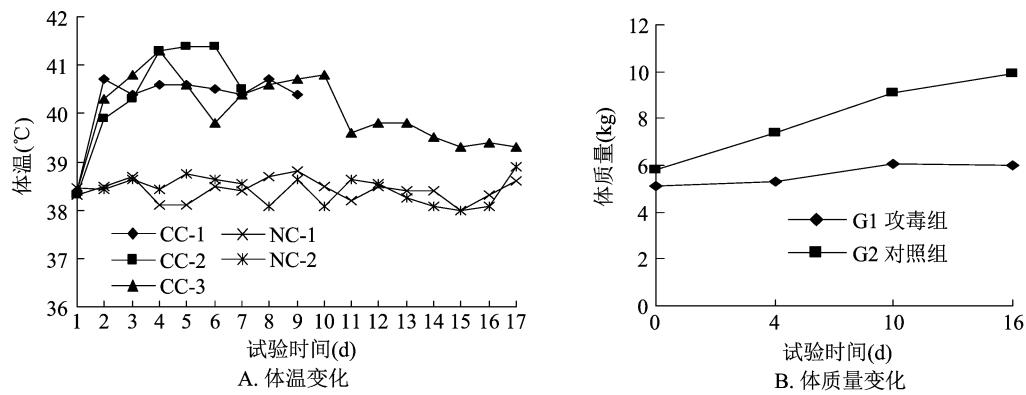
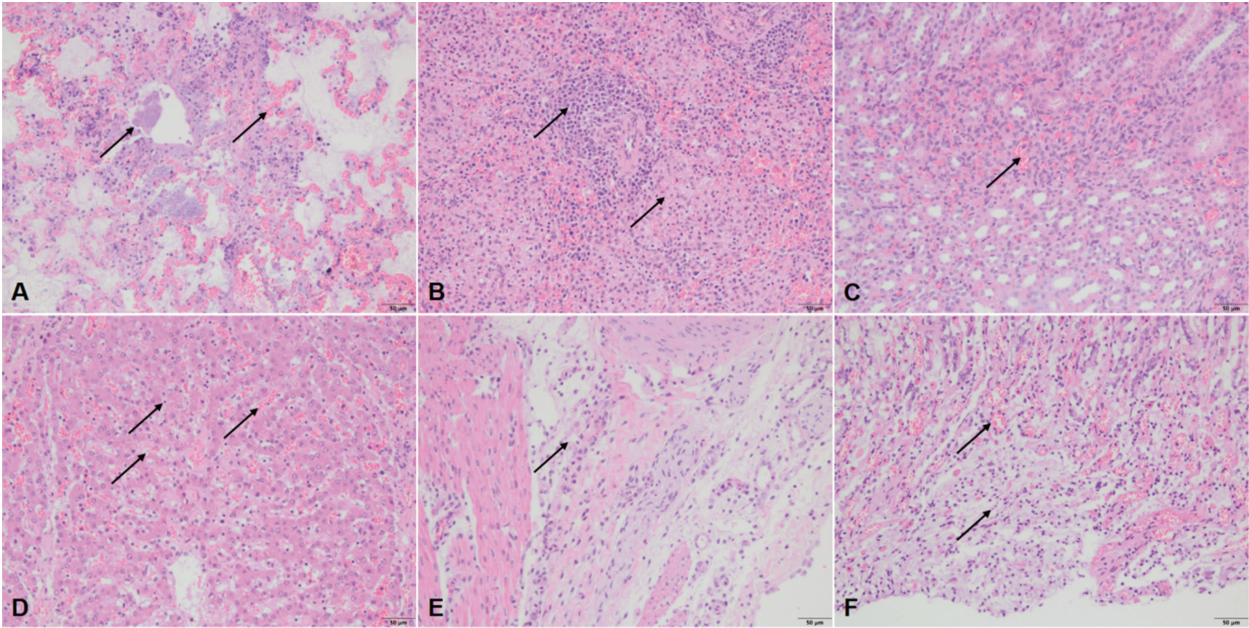


图3 攻毒组和对照组体温和体重变化



A. 肺间质增宽，出血，肺泡上皮细胞肿胀坏死脱落，肺泡中有嗜中性粒细胞和巨噬细胞浸润，并可见少量纤维索性渗出，部分肺泡内可见蓝染的菌丝；B. 脾脏脾小体坏死，中央动脉周围淋巴鞘淋巴细胞减少；C. 肾脏充血；D. 肝脏肝血窦淤血，肝细胞变性坏死，枯否石细胞增多；E. 心内膜增厚，有嗜中性粒细胞和巨噬细胞浸润；F. 胃黏膜出现坏死灶，黏膜下层充血

图4 攻毒组病理组织观察

增多；心内膜增厚，有嗜中性粒细胞和巨噬细胞浸润；胃黏膜出现坏死灶，黏膜下层充血；腹股沟淋巴结出血和瘀血，淋巴细胞减少，但浆细胞增多；扁桃体淋巴细胞减少，但浆细胞增多。

2.5 鼻拭子和抗凝血中 *P. multocida* 检测

不同攻毒时间内鼻拭子和血液中巴氏杆菌检测结果见表 2。由表 2 可知，攻毒后 CC-2 猪 4 d 时即能在鼻拭子和血液中检测到巴氏杆菌，该猪也是第 1 头死亡的猪。CC-1 猪在 4 d 时鼻拭子和血液中未检测到巴氏杆菌，但 8 d 濒死前已经转阳。CC-3 猪在 10 d 鼻拭子和血液中也首次检测到巴氏杆菌，直到试验结束。在整个试验过程中，对照组未检测到巴氏杆菌。

2.6 *P. multocida* 在各组织的分布及再分离

剖检后采集各组织脏器，利用 PCR 方法进行 *P. multocida* 的病原检测，以了解巴氏杆菌在机体内的分布。由表 3 可知，攻毒后死亡猪在心、肝、脾、肺、肾、扁桃体和淋巴结中均能检出 *P. multocida* 的存在，说明 *P. multocida* 在发病猪中各实质组织脏器普遍存在。而攻毒后未死亡猪仅在心、肺、扁桃体和淋巴结中检测到。由图 5 可知，细菌再分离结果，所有攻毒组均分离到了灰白色、圆形、微隆起、湿润、表面光滑、边缘 整齐的露珠样小菌落。挑取单克隆后接种 TSA 培养液，继续培养 18 h 后，收集细菌悬液，提取 DNA，进行 *P. multocida* 的 PCR 鉴定。结果均为阳性。

表 2 攻毒前后不同时间鼻拭子和血液中巴氏杆菌的检测结果

编号	0 d		4 d		6 ~ 10 d		16 d	
	鼻拭子	血液	鼻拭子	血液	鼻拭子	血液	鼻拭子	血液
CC - 1	-	-	-	-	+(8 d)	+(8 d)	N	N
CC - 2	-	-	+	+	+(6 d)	+(6 d)	N	N
CC - 3	-	-	-	-	+(10 d)	+(10 d)	+	+
NC - 1	-	-	-	-	-(10 d)	-(10 d)	-	-
NC - 2	-	-	-	-	-(10 d)	-(10 d)	-	-

注：“-”代表巴氏杆菌 PCR 检测阴性；“+”代表巴氏杆菌 PCR 检测阳性；“N”代表动物死亡，未检测。

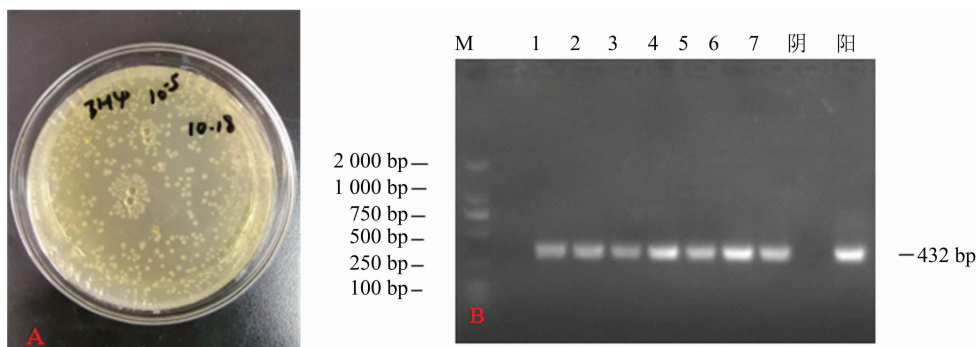
表 3 巴氏杆菌在各脏器中的分布

编号	心	肝	脾	肺	肾	淋巴结	扁桃体
CC - 1 和 CC - 2	+	+	+	+	+	+	+
CC - 3	+	-	-	+	-	+	+
NC - 1 和 NC - 2	-	-	-	-	-	-	-

注：“-”代表阴性；“+”代表阳性。

## 2.7 试验猪其他病原的检测结果

为排除在试验过程中其他病原的感染，本试验对可能会出现类似临床症状的病原进行了检测，结果所有实验猪 PRRSV、CSFV、RPV、ASFV、APP、HPS、SS、Mhr 均为阴性。



1~3: CC-1 号猪分离到的细菌；4~6: CC-2 号猪分离到的细菌；7: CC-3 号分离到的细菌

A. 细菌再分离菌落形态；B. 细菌再分离后巴氏杆菌PCR鉴定

图5 细菌再分离及 PCR 检测结果

## 3 讨论

猪巴氏杆菌的攻毒模型在其他动物上比较成熟，如 Pors 等利用 3 株猪源性巴氏杆菌，通过滴鼻的方式建立了小鼠发病模型，发现巴氏杆菌主要分布于肺脏和脾脏<sup>[13]</sup>。肺脏的主要病理变化主要表现为以嗜中性粒细胞为主的炎性细胞浸润，肺泡和细支气管内的纤维素性渗出，血管周围水肿，并出现化脓性坏死灶。脾脏也以嗜中性粒细胞为主的炎性细胞浸润。但在猪上建立人工发病模型有一定的难度。Peng 等通过气管内注射 8 周龄巴氏杆菌阴性商品猪 3 mL 巴氏杆菌 HN07 株建立巴氏杆菌发病模型，所用的菌液量达到  $7.86 \times 10^{10}$  CFU<sup>[14]</sup>。但其发病模型在接菌后 18 ~ 24 h 即出现死亡，为最急性病例，其主要病理变化为全身广泛性出血和肺组织的变性坏死，未出现明显的纤

维素性变化，在体质量变化上也凸显不出差异。赵海旭在做猪多杀性巴氏杆菌四组分亚单位疫苗免疫效果评估的时候采用了耳缘静脉注射  $4.5 \times 10^9$  CFU (2 mL) 的方法进行攻毒试验，结果也在 2 d 之内出现了猪巴氏杆菌病的临床症状和病理变化，且出现死亡<sup>[15]</sup>。但该研究的试验动物为商品猪，不能排除其他病原的协同作用。在本试验之前，笔者进行了预实验，发现静脉注射  $10^{10}$  CFU 的巴氏杆菌 Lh - 4 株同样能造成感染猪的最急性死亡。为复制具有典型全身败血症、纤维素性肺炎、肺组织变性坏死的发病模型，本试验采用 SPF 仔猪，联合滴鼻和皮下注射感染途径复制猪巴氏杆菌病，操作简便，又保证了巴氏杆菌的单因子作用，且每头猪所用的菌仅为  $10^9$  CFU。由于本研究首例死亡出现在 6 d，时间较长，所以不仅复制出除最急性病例会出现的典型的猪巴氏杆菌病临床症状和病理变化，同

时还出现了纤维素性肺炎的病理变化。出现这些不同可能与菌株、攻毒剂量和攻毒途径不同有关。

巴氏杆菌不同菌株的致病性有一定的差异, Oliveira - Filho 等通过滴鼻途径接种巴氏杆菌阴性猪,确定了 8 株 *P. multocida* 分离株的致病性,结果其中 5 株为高致病性菌株,能引起坏死性支气管肺炎、胸膜炎和心包炎<sup>[16]</sup>; 1 株为低致病性菌株,仅引起局灶性支气管肺炎; 2 株为无致病性菌株。本研究接种了巴氏杆菌 Lh - 4 株的猪,出现了支气管肺炎、胸膜炎和心包炎等典型的巴氏杆菌病的病变,与高致病性菌株所产生的病变一致。但从病程角度衡量,本试验复制的猪巴氏杆菌病不是最急性的形式,而是急性和慢性形式。在急性发病死亡猪的心、肝、脾、肺、肾、淋巴结和扁桃体均能检测到巴氏杆菌的存在,呈现全身性分布。而另外一头攻毒未死亡的猪,仅在心、肺、淋巴结和扁桃体中检测到巴氏杆菌,病原菌并未扩散到全身各个组织脏器,这也可能是该猪没有死亡,转成慢性病例的原因之一。

巴氏杆菌病主要在生长育肥猪和母猪中发生,因二元母猪和三元育肥猪为国内主要规模场的标配。本研究专门培育了 SPF 长大二元猪,作为试验动物,以减少品种之间的差异。另一方面,有很多病原能引起与猪巴氏杆菌病类似的临床症状和病理变化,其中 CSFV、ASFV、PRRSV、PRV、SS、APP 等会引起全身广泛性出血; HPS、SS、Mhr 和 APP 能引起支气管性肺炎,胸膜炎,腹膜炎,心包炎和关节炎; ASFV 和 APP 感染也能引起气管内的白色泡沫<sup>[17]</sup>。为进一步确认本试验所建立的发病模型为巴氏杆菌单因子发病模型,在动物试验后采集了所有试验猪的组织脏器,采用 PCR 检测了上述猪主要病原,结果全为阴性,说明本试验所建立的发病模型,确实由巴氏杆菌单因子感染造成。

以 1 月龄 SPF 二元猪为基础试验动物,联合滴鼻和皮下注射途径人工感染猪巴氏杆菌血清 A 型 Lh - 4 株,出现了高热稽留、出血、呼吸困难、采食下降甚至废绝、消瘦等典型临床症状以及大叶性肺炎、心包炎以及全身性败血症等病理变化,成功建立了猪巴氏杆菌病发病模型,为巴氏杆菌病的发生发展规律研究、临床分离株致病性鉴定及发病标准的建立提供依据。下一步将开展不同日龄、不同品种 SPF 猪对猪巴氏杆菌易感性与致病性的比较研究。

#### 参考文献:

[1] García N, Fernández - Garayzábal J F, Goyache J, et al. Associations

between biovar and virulence factor genes in *Pasteurella multocida* isolates from pigs in Spain [J]. *The Veterinary Record*, 2011, 169 (14): 362.

[2] Register K B, Dejong K D. Analytical verification of a multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine [J]. *Veterinary Microbiology*, 2006, 117 (2/3/4): 201 - 210.

[3] Da D Y, Gibson J S, Blackall P J, et al. Antimicrobial resistance in bacteria associated with porcine respiratory disease in Australia [J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 171 (1/2): 232 - 235.

[4] Harper M, Boyce J D. The myriad properties of *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide [J]. *Toxins*, 2017, 9 (8): 254.

[5] Tang X, Zhao Z, Hu J, et al. Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47 (4): 951 - 958.

[6] Lee K E, Choi H W, Jo H Y, et al. *Pasteurella multocida* isolation from pigs with respiratory disease in Korea [J]. *Korean J Vet Res*, 2016, 56: 37 - 40.

[7] Kim J, Kim J W, Oh S I, et al. Characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from pigs with pneumonia in Korea [J]. *BMC Veterinary Research*, 2019, 15 (1): 119.

[8] 林星宇, 胡 凌, 王 印, 等. 猪源多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及荚膜血清分型 [J]. *浙江农业学报*, 2016, 28 (4): 558 - 562.

[9] 胡星星, 郭 龙, 宋文博, 等. 2017 年我国猪源多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及耐药性分析 [J]. *中国兽药杂志*, 2019, 53 (3): 1 - 6.

[10] Ross R F. *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia [J]. *Animal Health Research Reviews*, 2006, 7 (1/2): 13 - 29.

[11] Huang Y, Haines D M, Harding J C. Snatch - farrowed, porcine - colostrum - deprived (SF - pCD) pigs as a model for swine infectious disease research [J]. *Canadian Journal of Veterinary Research - Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, 2013, 77 (2): 81 - 88.

[12] Fuller T E, Thacker B J, Duran C O, et al. A genetically - defined riboflavin auxotroph of *Actinobacillus pleuropneumoniae* as a live attenuated vaccine [J]. *Vaccine*, 2000, 18 (25): 2867 - 2877.

[13] Pors S E, Chadfield M S, Sørensen D B, et al. Pathology, tissue metalloproteinase transcription and haptoglobin responses in mice after experimental challenge with different isolates of *Pasteurella multocida* obtained from cases of porcine pneumonia [J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2011, 145 (2/3): 251 - 260.

[14] Peng Z, Liang W, Wang Y, et al. Experimental pathogenicity and complete genome characterization of a pig origin *Pasteurella multocida* serogroup F isolate HN07 [J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 198: 23 - 33.

[15] 赵海旭. 猪多杀性巴氏杆菌四组分亚单位疫苗的制备及免疫效果评估 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2019: 23 - 38.

[16] Oliveira - Filho J X, Morés M, Rebellato R, et al. Pathogenic variability among *Pasteurella multocida* type A isolates from Brazilian pig farms [J]. *BMC Veterinary Research*, 2018, 14 (1): 244.

[17] Zimmerman J J, Karriker L A, Ramirez A, et al. Diseases of swine (Eleventh Edition) [M]. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2019: 427 - 950.