

符雪艳, 张传健, 王灵果, 等. 3株猪丹毒丝菌流行株的分离鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57(4): 107-112.

FU X Y, ZHANG C J, WANG L G, et al. Isolation and identification of threefield strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* from pigs [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57(4): 107-112.

3株猪丹毒丝菌流行株的分离鉴定

符雪艳^{1,2,3,4,5#}, 张传健^{2,3,4,5,6#}, 王灵果^{2,3,4,5}, 陈赛赛^{2,3,4,5}, 宋建隆^{2,3,4,5},
郭容利^{3,4,5,7}, 熊富强^{1,6*}, 王继春^{2,3,4,5*}

1. 西藏农牧学院动物科学学院, 西藏 林芝 860000; 2. 江苏省农业科学院动物免疫工程研究所, 江苏 南京 210014;
3. 江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014;
4. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009;
5. 兽用生物制品(泰州)国泰技术创新中心, 江苏 泰州 225300;
6. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095; 7. 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 旨在探究猪丹毒丝菌流行株的耐药性、致病性以及传统疫苗株对其的免疫保护效力。从安徽、浙江、江苏南京等地的发病猪病料中分离出3株细菌, 显微镜下观察菌株的形态特征, 可见革兰阳性短杆菌, 结合16S rDNA基因序列, 确定3株细菌均为猪丹毒丝菌, 分别命名为AH-6、ZJ-JX和NJ-2。SpaA基因分析发现, AH-6株存在195和257两个氨基酸位点的替换, ZJ-JX和NJ-2株存在203和257两个氨基酸位点的替换, 表明3个分离株可分为2个SpaA型。药敏试验发现, 菌株AH-6、ZJ-JX和NJ-2均对氨苄西林敏感, 对庆大霉素、环丙沙星、诺氟沙星、四环素、氯霉素等抗生素耐药。小鼠致病性试验表明, 分离菌株均对小鼠具有较强致病力, AH-6、ZJ-JX和NJ-2株对小鼠的最小致死量(MLD)分别为 4×10^1 、 1×10^3 和 6×10^1 CFU/mL。免疫效力试验表明, 弱毒疫苗G₄T₁₀可对3株流行株提供有效的保护。本研究可为猪丹毒的防控提供参考。

关键词: 猪丹毒丝菌; 分离鉴定; 免疫保护; 猪

中图分类号: S852.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)04-0107-06

Isolation and identification of threefield strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* from pigs

FU Xueyan^{1,2,3,4,5#}, ZHANG Chuanjian^{2,3,4,5,6#}, WANG Lingguo^{2,3,4,5}, CHEN Saisai^{2,3,4,5}, SONG Jianlong^{2,3,4,5},
GUO Rongli^{3,4,5,7}, XIONG Fuqiang^{1,6*}, WANG Jichun^{2,3,4,5*}

1. College of Animal Sciences, Xizang Agricultural and Animal Husbandry University, Nyingchi 860000, China;
2. Institute of Veterinary Immunology & Engineering, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;
3. National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;
4. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, China;
5. Guotai (Taizhou) Center of Technology Innovation for Veterinary Biologicals, Taizhou 225300, China;
6. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
7. Institute of Veterinary Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: To explore drug resistance, pathogenicity of the epidemic strains of *Erythrombothus rhusiopathiae*, and the immune protective efficacy of traditional vaccine strains against them, we isolated three bacterial strains from diseased pigs in the herds in Anhui Province, Zhe-

收稿日期: 2024-04-16; 修回日期: 2025-01-21

第一作者: 符雪艳, 女, 硕士研究生; 张传健, 男, 副研究员。#共同第一作者

*通信作者: 熊富强, 副教授, 研究方向: 动物传染病防控, E-mail: xiongfurqiang@njau.edu.cn; 王继春, 研究员, 研究方向: 活载体疫苗和基因工程疫苗研究, E-mail: jcwang@263.net。

jiang Province, and Nanjing City. All three bacterial strains belonged to *Erythromobthos rhusiopathiae*, according to the morphological characteristics (Gram positive short rods visible under a microscope) and the 16S rDNA gene sequence; and they were named AH-6, ZJ-JX, and NJ-2, respectively. The SpaA gene of the AH-6 strain contained 2 non-synonymous substitutions of amino acid at positions 195 and 257, while the ZJ-JX and NJ-2 strains had 2 non-synonymous substitutions of 203 and 257 amino acid sites. Therefore, the three isolates could be divided into two SpaA types. The drug sensitivity testing showed that AH-6, ZJ-JX, and NJ-2 were all sensitive to ampicillin, and resistant to antibiotics such as gentamicin, ciprofloxacin, norfloxacin, tetracycline, and chloramphenicol. The MLD of AH-6, ZJ-JX, and NJ-2 to mice were 4×10^1 CFU/mL, 1×10^3 CFU/mL, and 6×10^1 CFU/mL, respectively. The immune efficacy tests showed that vaccine G_4T_{10} was able to provide effective protection against the three wild-type strains. This study provided reference for the prevention and control of swine erysipelas.

Keywords: *Erysipelothrix rhusiopathiae*; isolation and identification; immune protection; pig

猪丹毒是由猪丹毒杆菌, 又称猪丹毒丝菌或红斑丹毒丝菌, 引起的一种急性、热性传染病, 具有传播迅速、死亡率高等特点, 是一种人畜共患传染病。猪丹毒丝菌是无荚膜、无芽孢、无鞭毛的革兰染色阳性杆菌, 1a、1b 和 2 型是该菌主要致病力血清型^[1-2], 具有自然疫源性。猪丹毒广泛分布于世界各地, 给养殖业造成极大的经济损失。近年来, 关于猪丹毒暴发的相关报道主要在日本、美国、英国等国家^[3-5]。猪丹毒也曾我国的多个省份出现过流行, 在上世纪 80 年代与猪瘟和猪肺疫合称为猪的“三大传染病”, 但随着行业的集约化以及疫苗和抗生素的广泛使用发病率逐渐降低。然而近年来, 猪丹毒从病猪中分离出的概率逐渐增加, 且在我国多个省份存在零星暴发, 主要集中在中南部, 其中四川、重庆和湖南受影响最严重, 存在较大的局部暴发风险^[6]。

随着饲料全面禁抗, 增加了猪丹毒小范围流行的可能。疫苗是控制疫病有效方式。探究当前猪群中猪丹毒丝菌流行情况, 以及传统疫苗株对流行毒株的保护效力有重要意义。本研究从安徽、浙江、江苏南京等猪场的发病猪病料中分离到 3 株猪丹毒丝菌, 分别进行体内外试验, 测定耐药性、致病性以及传统疫苗株对其的免疫保护效力, 以期猪丹毒的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与试验动物

细菌基因组提取试剂盒购自天根生化科技有限公司, 胰酪大豆胨肉汤培养基购自碧迪医疗器械(上海)有限公司, 马丁琼脂购自中海生物技术(枣庄)有限公司, 胎牛血清(FBS)购自浙江天杭生物科技股份有限公司, 细菌革兰染色试剂盒购自珠海贝索生物技术有限公司, 药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司。SPF 雌性小鼠购自南京市江宁区青山动物繁殖场。

1.2 细菌的分离培养与纯化

将从安徽、浙江、江苏南京等猪场的发病猪病料

中分离的 3 株疑似猪丹毒丝菌菌株分别划线接种于马丁琼脂平板, 37 °C 放置 24~48 h, 取单菌落进行培养, 制作涂片, 进行革兰染色镜检, 观察菌体形态^[7]。

1.3 药物敏感性试验

对分离到的菌株进行药物敏感性试验。使用药敏纸片琼脂扩散法, 将菌株纯培养液调至合适浓度后涂布于含 10% 血清的琼脂平板上, 将纸片均匀贴在平板表面, 4 °C 放置 2 h, 37 °C 培养 24 h 后测量抑菌圈直径, 根据相关标准和试剂公司提供的指导判定方法判断该菌对各种药物的敏感性^[7-8]。

1.4 引物设计

参考文献 [9] 设计细菌 16S rDNA 通用引物序列信息, F1: 5' - AGAGTTTGATCATGGCTCAG - 3'; R1: 5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3'。参考文献 [10] 设计表面保护性抗原 A (SpaA) 基因引物序列信息, F2: 5' - GTGAAACACCGTATTTTAGTA - 3', 位于整个 *spaA* 基因的第 502~522 位; R2: 5' - TTCAA-GAAGTTCCTGTAGTTT - 3', 位于整个 *spaA* 基因的第 933~913 位。

1.5 16S rDNA 基因和 *spaA* 基因高突变区的扩增

提取 3 株分离菌株的基因组 DNA, 采用通用引物 F1 和 R1 PCR 扩增 16S rDNA 基因, 反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 49 °C 30 s, 72 °C 1 min 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。采用引物 F2 和 R2 扩增 *spaA* 基因, 反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 鉴定正确后送生工生物工程有限公司南京分公司测序。

1.6 最小致死量 (MLD) 测定

参考中华人民共和国兽用生物制品规程 (2000 年版), 将 3 个分离菌株的菌液浓度分别稀释至 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 CFU/mL (A1、B1、C1 组), 然后分 4 个梯度调整菌液浓度 (A2、B2、C2 组), 每组 5 只小鼠, 颈部皮下注射菌液 0.2 mL, 接种后观察 14 d, 记录死亡情况, 计算分离株对小鼠的 MLD。

1.7 免疫保护试验

参考中华人民共和国兽用生物制品规程，测定商品化的弱毒疫苗 G₄T₁₀对 3 株野毒株的免疫保护效力。选取 48 只体重 16~18 g SPF 雌性小鼠，随机分为 A、B、C 三组，每组 16 只。各组随机选取 10 只小鼠，皮下注射用生理盐水稀释的弱毒疫苗 G₄T₁₀活菌 10⁷ CFU，免疫后 14 d，分别皮下注射 1 000 MLD 的分离株菌液进行攻毒；每组另外 6 只小鼠作为攻毒对照，其中 3 只小鼠皮下注射 1 000 MLD 的分离株菌液，另 3 只小鼠皮下注射 1 MLD 的分离株菌液，攻毒后观察

14 d，记录死亡情况，分析疫苗株对流行株的保护效果。

2 结果

2.1 细菌的分离培养

经过培养，分离株在平板上形成表面凸起有光泽的半透明小菌落。染色结果显示分离株均为蓝紫色革兰阳性多形杆菌（图 1），分别命名为 AH-6，ZJ-JX 和 NJ-2。

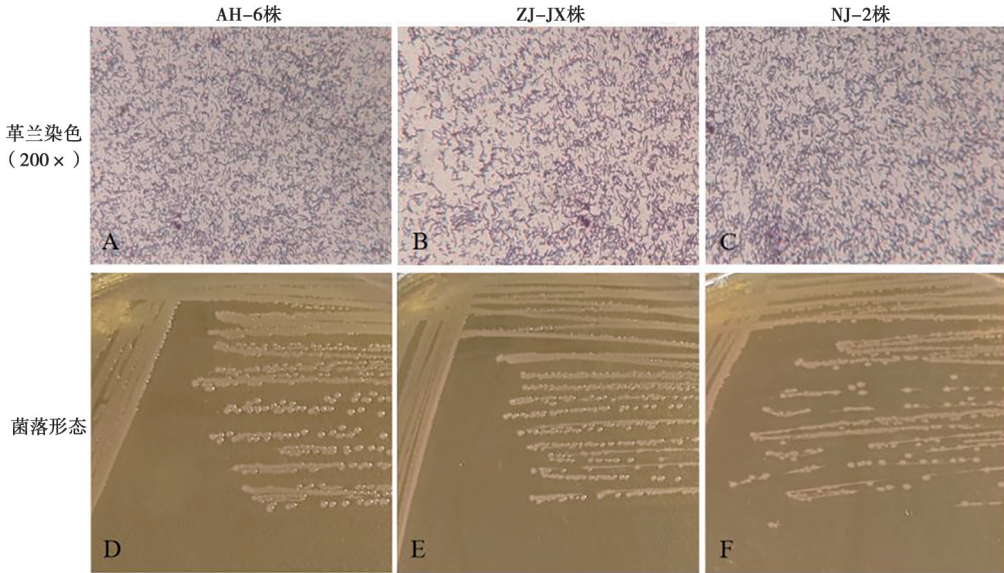


图 1 分离菌株的革兰染色与菌落形态

2.2 药物敏感性试验

如表 1 所示，菌株 AH-6、ZJ-JX 和 NJ-2 均对氨苄西林敏感，对头孢哌酮、头孢唑林、头孢拉定等

抗生素中敏，对庆大霉素、环丙沙星、诺氟沙星、四环素、氯霉素等抗生素耐药。

表 1 药敏试验结果

抗生素	AH-6 株	ZJ-JX 株	NJ-2 株	抗生素	AH-6 株	ZJ-JX 株	NJ-2 株
氨苄西林	S	S	S	氧氟沙星	I	R	R
头孢哌酮	I	I	I	庆大霉素	R	R	R
头孢唑林	I	I	I	多西环素	S	S	R
头孢氨苄	S	S	R	氯霉素	R	R	R
头孢拉定	I	I	I	卡那霉素	R	S	R
头孢呋辛	R	I	I	红霉素	R	R	R
诺氟沙星	R	R	R	四环素	R	R	R
环丙沙星	R	R	R				

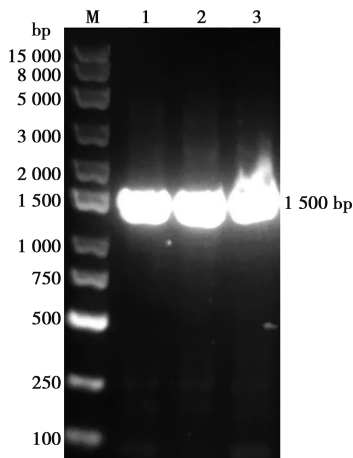
注：S 表示敏感，I 表示中敏，R 表示耐药。

2.3 分离株的 16S rDNA 鉴定

菌株 AH-6、ZJ-JX 和 NJ-2 的 16S rDNA 基因

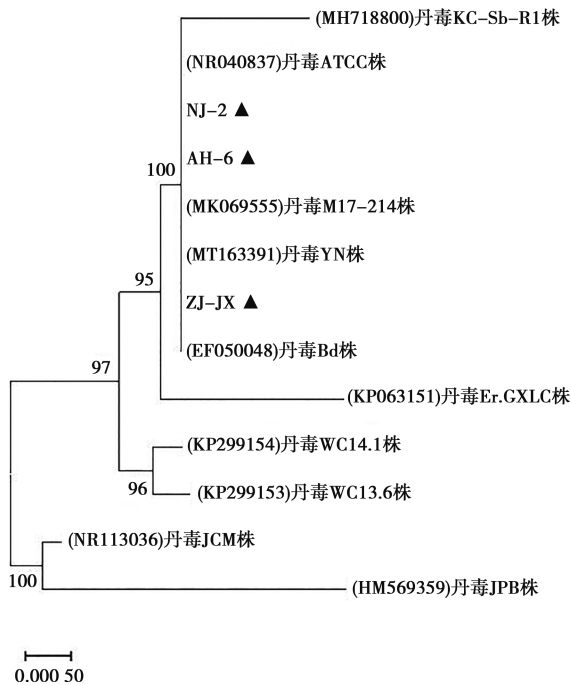
PCR 条带大小约为 1 500 bp，与预期目的条带大小相符（图 2）。测序后，在 NCBI 上进行比对，结果显

示分离菌株与序列号为 MK069555、MT163391、EF050048、NR040837 的猪丹毒丝菌属于同一分支 (图 3), 从而确定 3 株分离菌株为猪丹毒丝菌。



M. 15 000 bp DNA Marker; 1. AH-6 株; 2. ZJ-JX 株; 3. NJ-2 株。

图 2 分离株的 16S rDNA PCR 鉴定结果



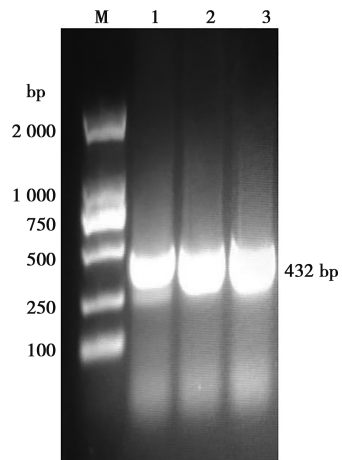
注: ▲为本试验分离株。

图 3 基于 16S rDNA 序列构建的发育树

2.4 分离株 *spaA* 基因高突变区的测序

AH-6、ZJ-JX 和 NJ-2 菌株 *spaA* 基因 PCR 产物琼条带约为 432 bp (图 4), 与预期大小相符, 测序后进一步确定分离菌株为猪丹毒丝菌。将 3 株分离菌的高突变区序列与参考株 Fujisawa 和疫苗株 G₄T₁₀ 的高突变区序列对比后, AH-6 株 195 位点的天冬氨酸

(Asp) 替换为丙氨酸 (Ala), 257 位点的亮氨酸 (Leu) 替换为异亮氨酸 (Ile); ZJ-JX 和 NJ-2 株 203 位点的 Ile 替换为甲硫氨酸 (Met), 257 位点的 Leu 替换为 Ile (表 2)。根据以上分析, 这 3 种分离株可分为 2 个 *SpaA* 型。



M. 2 000 bp DNA Marker; 1. AH-6 株; 2. ZJ-JX 株; 3. NJ-2 株。

图 4 分离株 *spaA* 基因高突变区的鉴定结果

表 2 *spaA* 高变区氨基酸替换位置

菌株	氨基酸替换位置		
	195	203	257
Fujisawa	Asp (GAT)	Ile (ATT)	Leu (CTT)
G ₄ T ₁₀	Asp (GAT)	Met (ATG)	Ile (ATT)
AH-6	Ala (GCT)	Ile (ATT)	Ile (ATT)
ZJ-JX	Asp (GAT)	Met (ATG)	Ile (ATT)
NJ-2	Asp (GAT)	Met (ATG)	Ile (ATT)

2.5 猪丹毒毒株对小鼠的 MLD 测定

攻毒后小鼠先后出现精神不振、被毛蓬乱等, 对小鼠的死亡情况进行分析, 结果显示 AH-6 株的 MLD 为 4×10^1 CFU/mL, ZJ-JX 株的 MLD 为 1×10^3 CFU/mL, NJ-2 株的 MLD 为 6×10^1 CFU/mL (表 3)。相较于 ZJ-JX 株, AH-6 和 NJ-2 株对小鼠的致病力更强。

2.6 弱毒疫苗的免疫保护效果

攻毒后, 注射 1 000 MLD 和注射 1 MLD 的对照组小鼠全部死亡, 注射 ZJ-JX 株 1 000 MLD 的免疫组小鼠死亡 1 只, 其余完全保护 (表 4)。结果表明, 传统活疫苗 G₄T₁₀ 对丹毒 AH-6 株和 NJ-2 株的免疫保护率为 100%, 对丹毒 ZJ-JX 株的免疫保护率为 90%。传统活疫苗 G₄T₁₀ 对目前流行猪丹毒丝菌仍具有较好的免疫保护效力。

表3 分离株对小鼠的MLD测定

组别	菌株	接种剂量/ (CFU · mL ⁻¹)	动物数/只	死亡数/只	组别	菌株	接种剂量/ (CFU · mL ⁻¹)	动物数/只	死亡数/只
A1	AH-6	1×10 ¹	5	1	B2	ZJ-JX	2×10 ³	5	5
		1×10 ²	5	5			4×10 ³	5	5
		1×10 ³	5	5			6×10 ³	5	5
		1×10 ⁴	5	5			8×10 ³	5	5
		2×10 ¹	5	4			1×10 ¹	5	0
A2	AH-6	4×10 ¹	5	5	C1	NJ-2	1×10 ²	5	5
		6×10 ¹	5	5			1×10 ³	5	5
		8×10 ¹	5	5			1×10 ⁴	5	5
		1×10 ¹	5	0			2×10 ¹	5	0
		1×10 ²	5	0			4×10 ¹	5	1
B1	ZJ-JX	1×10 ³	5	2	C2	NJ-2	6×10 ¹	5	5
		1×10 ⁴	5	5			8×10 ¹	5	5

表4 弱毒疫苗G₄T₁₀免疫保护效果

组别	免疫菌株	每只免疫剂量/CFU	攻毒菌株	攻毒剂量/MLD	动物数/只	死亡数/只
A	A1	G ₄ T ₁₀ 株	10 ⁷	1 000	10	0
	A2	/	AH-6	1 000	3	3
	A3	/		1	3	3
B	B1	G ₄ T ₁₀ 株	10 ⁷	1 000	10	1
	B2	/	ZJ-JX	1 000	3	3
	B3	/		1	3	3
C	C1	G ₄ T ₁₀ 株	10 ⁷	1 000	10	0
	C2	/	NJ-2	1 000	3	3
	C3	/		1	3	3

注：/表示无此项。

3 讨论

自1990年以来，由于抗生素的广泛使用以及养殖方法和管理的改进，猪丹毒在中国得到了有效控制。近几年，受养殖环境变化的影响，猪场暴发猪丹毒疫情的概率逐渐增加，严重威胁着中国养猪业的发展。

本试验应用传统的细菌形态学检查方法对3株分离菌株进行了初步鉴定，之后通过PCR和测序鉴定spaA基因高变区域和细菌16S rDNA基因，从而确定3株分离株为猪丹毒丝菌。日本学者通过对猪丹毒丝菌spaA基因高变区域对应基因序列的分析，发现其对应氨基酸主要存在195、203和257这3个位点的改变，可将分离菌株分为4个SpaA型^[10-11]。本研究将3株分离株与参考株Fujisawa和疫苗株G₄T₁₀的spaA基因进行比较，发现AH-6株存在195和257这

2个氨基酸位点的替换，ZJ-JX和NJ-2株存在203和257这2个氨基酸位点的替换，故可将这3种分离株分为2个SpaA型，这个结果和已有研究结果^[10-11]是一致的。

有学者对中国病猪分离出的猪丹毒丝菌菌株的耐药性进行研究，多数分离株对四环素、红霉素、克林霉素和喹诺酮类药物具有高度耐药性，这与之前长期抗生素滥用关系密不可分^[12-13]。本研究中，AH-6、ZJ-JX和NJ-2菌株均对氨苄西林敏感，对头孢哌酮、头孢唑林、头孢拉定等抗生素中敏，对庆大霉素、环丙沙星、诺氟沙星、四环素、氯霉素等抗生素耐药。氨苄西林是我国治疗猪丹毒的首选药物，3株分离株对氨苄西林、诺氟沙星、四环素和氯霉素的敏感性与之前的报道一致^[13-15]。耐药性研究为开发抗菌药物提供了理论依据，为临床用药提供了参考。

综上，本研究测定了猪丹毒丝菌分离株对小鼠的

致病性, 并证实传统活疫苗 G_4T_{10} 株可对分离的致病性猪丹毒丝菌提供保护, 说明 G_4T_{10} 弱毒苗对目前流行的猪丹毒丝菌仍具有较好的免疫保护效果, 为我国猪丹毒的防治提供了参考。

参考文献:

- [1] BROOKE C J, RILEY T V. *Erysipelothrix rhusiopathiae*; bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen [J]. Journal of Medical Microbiology, 1999, 48 (9): 789-799.
- [2] TAKAHASHI T, FUJISAWA T, UMEMO A, et al. A taxonomic study on *Erysipelothrix* by DNA-DNA hybridization experiments with numerous strains isolated from extensive origins [J]. Microbiology and Immunology, 2008, 52 (10): 469-478.
- [3] OGAWA Y, SHIRAIWA K, OGURA Y, et al. Clonal lineages of *Erysipelothrix rhusiopathiae* responsible for acute swine erysipelas in Japan identified by using genome-wide single-nucleotide polymorphism analysis [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83 (11): e00130-17.
- [4] OPRIESSNIG T, FORDE T, SHIMOJI Y. *Erysipelothrix* spp.: past, present, and future directions in vaccine research [J]. Frontiers in Veterinary Science, 2020, 7: 174.
- [5] MCNEIL M, GERBER P F, THOMSON J, et al. Serotypes and Spa types of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from British pigs (1987 to 2015) [J]. The Veterinary Journal, 2017, 225: 13-15.
- [6] WANG H, XU Y, OUYANG M, et al. Potential risk factors of swine erysipelas outbreak in Northeast Mainland China [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2021, 68 (3): 1652-1662.
- [7] 郭良兴, 陈克研, 赵魁, 等. 猪丹毒杆菌的分离鉴定及耐药性试验 [J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38 (4): 199-202.
- [8] 周迪, 杨旭夫, 彭凌. 红斑丹毒丝菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. 动物医学进展, 2020, 41 (2): 33-38.
- [9] POLZ M F, CAVANAUGH C M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64 (10): 3724-3730.
- [10] NAGAI S, TO H, KANDAA. Differentiation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains by nucleotide sequence analysis of a hypervariable region in the SpaA gene: discrimination of a live vaccine strain from field isolates [J]. J Vet Diagn Invest, 2008 (20): 336-342.
- [11] UCHIYAMA M, YAMAMOTO K, OCHIAI M, et al. Prevalence of Met-203 type SpaA variant in *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates and the efficacy of swine erysipelas vaccines in Japan [J]. Biologicals, 2014, 42 (2): 109-113.
- [12] WU C, LV C, ZHAO Y, et al. Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from diseased pigs in 15 Chinese provinces from 2012 to 2018 [J]. Microorganisms, 2021, 9 (12): 2615.
- [13] DING Y, ZHU D, ZHANG J, et al. Virulence determinants, antimicrobial susceptibility, and molecular profiles of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from China [J]. Emerging Microbes & Infections, 2015, 4 (1): 1-5.
- [14] OPRIESSNIG T, HOFFMAN L J, HARRIS D L, et al. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: genetic characterization of midwest US isolates and live commercial vaccines using pulsed-field gel electrophoresis [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2004, 16 (2): 101-107.
- [15] COUTINHO T A, IMADA Y, BARCELLOS D E S N, et al. Phenotypic and molecular characterization of recent and archived *Erysipelothrix* spp. isolated from Brazilian swine [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2011, 69 (2): 123-129.