

# 关节炎患猪中猪丹毒丝菌的分离与鉴定

梁 跃<sup>1</sup>, 徐引弟<sup>1</sup>, 杨志昆<sup>2</sup>, 朱文豪<sup>1</sup>, 郭成留<sup>1</sup>

(1. 河南省农业科学院 畜牧兽医研究所, 河南 郑州 450002; 2. 河南华盛联邦科技有限公司, 河南 郑州 450045)

**摘要:** 为给猪丹毒的防制提供依据, 分离并鉴定了猪丹毒丝菌。将发生关节炎的猪关节液接种 TSA 培养基, 挑取透明小菌落, 染色, 对 G<sup>+</sup> 小长丝杆菌进一步用猪丹毒丝菌 16S rRNA 基因的引物进行 PCR 鉴定。对鉴定为阳性的菌株进行药敏试验, 结果显示, 分离菌株对青霉素、头孢噻肟、头孢他啶、头孢曲松、头孢哌酮、头孢唑啉、氨苄西林、阿莫西林、克林霉素、四环素、强力霉素、环丙沙星等敏感, 对新霉素、复方新诺明、庆大霉素、阿米卡星、万古霉素、痢特灵等完全耐药, 临床上应根据上述结果指导用药。

**关键词:** 关节炎; 猪丹毒丝菌; 分离; 鉴定; 药敏试验

**中图分类号:** S858.28 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)11-0136-03

## Isolation and Identification of *Erysipelothrix rhusiopathiae* from Arthritis Swine

LIANG Yue<sup>1</sup>, XU Yin-di<sup>1</sup>, YANG Zhi-kun<sup>2</sup>, ZHU Wen-hao<sup>1</sup>, GUO Cheng-liu<sup>1</sup>

(1. Institute for Animal Husbandry and Veterinary Research, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. Henan Helmsun United Technology Co., Ltd., Zhengzhou 450045, China)

**Abstract:** In order to provide a basis for control of swine erysipelas, swine erysipelas bacillus was isolated and identified. The synovial fluid of arthritis pigs was inoculated to TSA medium. Small transparent colonies were picked and Gram stained, and the G<sup>+</sup> small filamentous bacteria were further identified by PCR using 16S rRNA primers of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Susceptibility of the positive strains was tested and showed that these isolates were sensitive to penicillin, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefoperazone, cefazolin, amikacin, amoxicillin, clindamycin, tetracycline and ciprofloxacin but completely resistant to neomycin, sulfamethoxazole, gentamicin, amikacin, vancomycin, and furazolidone. Clinical medication guidance should be based on the above results.

**Key words:** arthritis; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; isolation; identification; drug susceptibility

猪丹毒 (swine erysipelas) 是由猪丹毒杆菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) 引起的一种急性、热性传染病。其临床与解剖特征为高热、急性败血症, 皮肤疹块 (亚急性), 慢性症状心内膜炎, 皮肤坏死与多发性、非化脓性关节炎<sup>[1-2]</sup>。猪丹毒杆菌是一种革兰氏阳性纤细杆菌, 具有明显的形成长丝的特性, 因此又称为丹毒丝菌<sup>[3-4]</sup>。猪丹毒过去曾经是猪主要的传染病之一, 是猪必须防疫的常规疾病。近

些年由于大量新型抗生素的应用, 猪丹毒的发生及危害大大降低, 疫苗的使用也极少。但是由于猪丹毒丝菌具有超强抵抗力, 加上抗生素的滥用以及人们对其长期忽视, 使得丹毒丝菌的耐药性越来越强, 临床上大量使用的抗生素对其大多无效, 因此, 猪丹毒的发病又有所上升, 并且临床症状较之以前有了新的变化, 通常的急性高热败血症以及亚急性皮肤疹块型的症状较少, 而大多是以慢性多发性关节炎

收稿日期: 2012-06-12

基金项目: 河南省科技攻关项目 (072102140004); 河南省农科院孵化项目 (200712)

作者简介: 梁 跃 (1979-), 男, 河南郑州人, 本科, 主要从事动物传染病研究。E-mail: 14881617@qq.com

在猪场长期顽固存在,影响猪的生长,给养猪业造成了极大损失。为此,本试验以河南省近期发生的多发性关节炎患猪的关节液为材料,对其进行猪丹毒丝菌的分离与鉴定,并做了药敏试验,以期为该病的防制提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

病料为 2011 年 5 月至 7 月河南省数个规模化猪场发生的多发性关节炎的病猪关节液。对照菌株由河南省农业科学院畜牧兽医研究所分离鉴定并保存<sup>[5]</sup>,猪丹毒丝菌疫苗株 G4T10 购自武汉中博生物股份有限公司。

### 1.2 主要试剂及仪器

TSA (tryptic soy agar)、TSB (tryptic soy broth) 购自 Difco 公司。NAD(辅酶 I, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸), 购自中国医药(集团)上海化学试剂公司。犊牛血清自制, 过滤除菌, 使用前经 56 °C 灭活 30 min。麦康凯(MC)琼脂、革兰氏染色液购自郑州理利生物公司。药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DL2000 DNA Marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司。凝胶成像系统、电泳仪均为 Bio-Rad 公司产品。PCR 扩增仪为 Touchgene 公司产品。CO<sub>2</sub> 培养箱、超低温冰箱均为 REVCO 公司产品。E200-F 三目生物显微镜为 Nikon 公司产品。

### 1.3 分离鉴定

1.3.1 分离纯化 无菌条件下取关节液接种于 TSA+5% 牛血清 + NAD(0.01%) 的固体培养基上, 置 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 °C 培养过夜, 挑取圆形、透明、灰白色可疑菌落。取上述菌落抹片, 革兰氏染色后在显微镜下观察, 挑取革兰氏阳性细小长杆菌菌落于 TSA 加血清培养基、MC 培养基纯化。

1.3.2 PCR 鉴定 将上述初步鉴定的细菌进一步用 PCR 方法确定。用接种环取少许被检菌落于 10 μL 无菌 PBS 中, 混匀, 取 1 μL 菌悬液作 PCR 模板。参照文献<sup>[4-6]</sup>, 根据丹毒丝菌 16S rRNA 基因(NO. M23728)序列设计引物, P1: 5'-AGATGC-CATAGAACTGGTA-3', P2: 5'-CTGTATC-CGCCATAACTA-3', 扩增片段大小为 407 bp, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。反应体系(50 μL): 10× Buffer 5 μL, 2 mmol/L 的 dNTPs 1 μL, 10 μmol/L 的上下游引物各 1 μL, Taq 酶 1 μL, 模板 1 μL, 灭菌 ddH<sub>2</sub>O 40 μL。反应条件:

94 °C 预变性 4 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳, 回收后测序。

### 1.4 药敏试验

将分离鉴定好的菌接种于 TSA 平板, 涂匀, 选取相应抗生素的药敏纸片贴于培养基上。于 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 °C 下培养 24 h, 测量抑菌环直径并判定结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 分离鉴定结果

2.1.1 培养特性与镜检 分离的细菌在 TSA 培养基上培养 24 h, 长成湿润、光滑、透明、灰白色、露珠样圆形小菌落(图 1), 在 MC 培养基上不生长。革兰氏染色均为阳性、直或弯曲的细小杆菌, 散在或成堆存在, 多呈链状, 有的呈长丝、杂草样(图 2)。

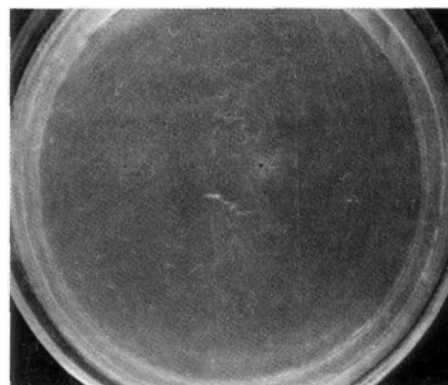


图 1 猪丹毒丝菌菌落形态



图 2 猪丹毒丝菌菌体形态

2.1.2 PCR 鉴定 对上述鉴定的可疑菌进行猪丹毒丝菌的 PCR 鉴定, 产物经琼脂糖凝胶电泳, 发现扩增大小均与预期大小一致(图 3)。PCR 产物经测序发现, 均与猪丹毒丝菌 16S rRNA 基因(NO. M23728)序列具有 100% 同源性。综合以上鉴定结果, 共从关节液中鉴定出猪丹毒丝菌 3 株。

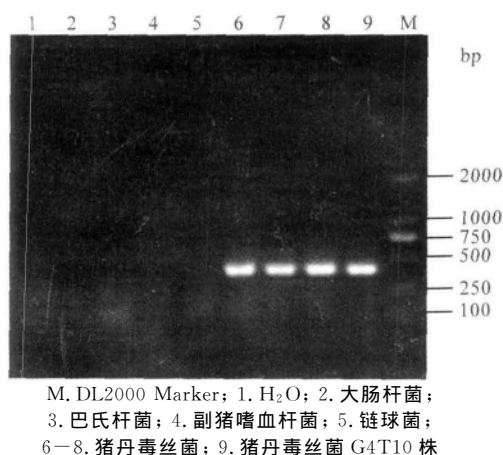


图 3 猪丹毒丝菌 PCR 扩增结果

## 2.2 药敏试验结果

从药敏试验结果看,所分离的 3 株丹毒丝菌对青霉素、头孢噻肟、头孢他啶、头孢曲松、头孢哌酮、头孢唑啉、氨苄西林、阿莫西林、克林霉素、四环素、强力霉素、环丙沙星等敏感,对新霉素、复方新诺明、庆大霉素、阿米卡星、万古霉素、痢特灵等完全耐药,所以在临床治疗猪丹毒时,应选择丹毒丝菌对其敏感的药物,同时应注意轮换用药,避免耐药性的产生。

## 3 讨论

近些年猪疾病的发生有很大变化,过去曾经比较重要、危害较大的一些疾病,如猪丹毒、副伤寒、猪肺疫等已不再是猪场特别是规模化猪场防疫的重点。新的抗生素的大量使用,使得一些传统的细菌性疾病越来越少,人们对其越来越不重视,防疫几乎停止。但这些细菌性疾病并没有在猪场消失,特别是猪丹毒丝菌,在猪场长期存在并且造成了不小的损失。近年来,在规模化猪场中引起危害最大的细菌性病原是副猪嗜血杆菌和链球菌,大多数猪场使用的药物都是针对这 2 种病原,而且这 2 种细菌都是引起猪关节炎的主要病原<sup>[6-11]</sup>,因此,人们忽略了对其他病原的防疫。

最近在一些规模化猪场发现,猪多发性关节炎的发生率十分高,达到 30%~50%,在使用副猪嗜血杆菌和链球菌疫苗进行防疫的情况下,使用针对性的抗生素仍然无法控制多发性关节炎的发生,关节肿大、变形、僵直的患猪越来越多,死亡率虽不高,但影响猪的生长,影响后备猪的种用价值,给猪场造成的损失也不可估量。本试验从多个猪场发生顽固性多发性关节炎的猪关节液中分离到猪丹毒丝菌,并且发现其耐药性较强,由此可见,引起猪关节炎的细菌性疾病不仅有副猪嗜血杆菌和链球菌,也有猪丹毒丝菌的参与,应该引起足够的重视,以减少养猪业的损失。

## 参考文献:

- [1] 朱凤琼,陈达燕,夏英杰,等. 猪丹毒杆菌的分离及鉴定[J]. 现代农业科技,2012(4):216-217.
- [2] 纵丰学,张春堂. 猪肺疫、猪丹毒、猪瘟的鉴别诊断[J]. 现代农业科技,2006(6s):94-95.
- [3] Wang Q, Chang B J, Riley T V. Erysipelothrix rhusiopathiae[J]. Vet Microbiol, 2010, 140(3/4):405-417.
- [4] Veraldi S, Girgenti V, Dassoni F, et al. Erysipeloid: A review[J]. Clin Exp Dermatol, 2009, 34(8):859-862.
- [5] 徐引弟,王治方,蔡旭旺,等. 河南省规模化猪场高热综合征细菌性病原的分离鉴定[J]. 河南农业科学, 2010(1):116-118.
- [6] 韦园园,陈进喜,马丽丽,等. 钦州地区猪链球菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 现代农业科技, 2010(21):338, 342.
- [7] 赵恒章,姜金庆,赵坤,等. 原场猪链球菌蜂胶疫苗的制备及免疫效果试验[J]. 山西农业科学, 2012, 40(3):83-85.
- [8] 逯忠新,高鹏程,贺英,等. 青海省部分地区副猪嗜血杆菌流行病学研究[J]. 华北农学报, 2009, 24(S1):239-239.
- [9] 宋帅,李春玲,杨冬霞,等. 副猪嗜血杆菌 hhdB 基因的鉴定和分析[J]. 华北农学报, 2010, 25(增刊):17-21.
- [10] 李志东,孙顺清. 猪链球菌病的调查与防治[J]. 天津农业科学, 1998, 4(增刊):49-50.
- [11] 黄凤清,邱英,钟远宣,等. 猪败血型链球菌病的发生及防治[J]. 现代农业科技, 2010(13):373-374.