

研究报告

2012–2015 年江淮地区猪丹毒杆菌分离株血清型、 *spaA* 基因遗传进化及 PFGE 基因型分析

魏文涛¹ 姚焱彬¹ 刘全喜¹ 杨志鹏¹ 魏建忠¹ 孙裴¹ 李郁^{1,2*}

(1. 安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230036)

(2. 安徽省畜禽产业共性技术研究院 安徽 合肥 230036)

摘要:【目的】了解 2012–2015 年江淮地区猪丹毒杆菌分离株血清型分布、*spaA* 基因遗传进化关系和基因分型特征。【方法】收集临床分离鉴定的 42 株猪丹毒杆菌，应用琼脂扩散沉淀实验、PCR 扩增和序列分析技术、脉冲场凝胶电泳分型技术(PFGE)分别测定分离株的血清型、*spaA* 基因遗传变异性及 PFGE 基因型。【结果】42 株猪丹毒杆菌分离株血清型均为 1a 型；*spaA* 基因与猪丹毒杆菌国内外参考株核苷酸序列相似性为 98.5%–100%，分离株在第 609 bp 处出现 T 突变为 G、769 bp 处 C 突变为 A，对应的氨基酸第 203 位 Ile 突变为 Met、第 257 位 Leu 突变为 Ile，为 Met-203、Ile-257 型；分离株形成 8 个 PFGE 基因型，相似度达 88.8%–100%，优势基因型为 ER2 (54.8%)，弱毒疫苗 G₄T₁₀ 和 GC₄₂ 株独立为同一个基因型。【结论】江淮地区致病猪丹毒杆菌流行血清型为 1a 型，*spaA* 基因相似性高，分离株变异小、源于同一克隆系，Met-203、Ile-257 型菌株致病力强，是江淮地区猪丹毒发生与流行的主要致病菌型。

关键词: 猪丹毒杆菌，血清型，表面保护性抗原 A 基因，脉冲场凝胶电泳

Analysis of serotypes, *spaA* gene phylogeny and PFGE genetic patterns of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated between 2012 and 2015 in Jianghuai areas

WEI Wen-Tao¹ YAO Yan-Bin¹ LIU Quan-Xi¹ YANG Zhi-Peng¹
WEI Jian-Zhong¹ SUN Pei¹ LI Yu^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

(2. Anhui Institute of Generic Industrial Science and Technology in Livestock and Poultry, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: [Objective] To study the serotypes, phylogeny of surface protective antigen A gene (*spaA*),

Foundation item: The Key Project of the National Spark Program (No. 2014GA710002); Quality Project of Anhui Province (No. 2013sxx008); Innovation Fund Project of Anhui Agriculture University (No. XJDC2014140); Anhui Pig Industry Fund Project

*Corresponding author: Tel: 86-551-65786329; E-mail: liyouer@163.com

Received: March 25, 2016; Accepted: May 09, 2016; Published online (www.cnki.net): August 01, 2016

基金项目: 国家星火计划重点项目(No. 2014GA710002); 安徽省质量工程项目(No. 2013sxx008); 安徽农业大学大学生创新基金项目(No. XJDC2014140); 安徽省生猪产业体系基金项目

*通讯作者: Tel: 86-551-65786329; E-mail: liyouer@163.com

收稿日期: 2016-03-25; 接受日期: 2016-05-09; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-08-01

and molecular subtyping of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated between 2012 and 2015 in Jianghuai area. **[Methods]** We collected 42 clinically isolated *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains. Agar gel precipitation tests, PCR and sequence analysis methods, and pulsed-field gel electrophoresis were used to investigate the serotypes, phylogeny of *spaA* gene, and PFGE typing, respectively. **[Results]** All 42 strains belonged to serotype 1a. *spaA* gene was 98.5% to 100% homologous to the reference strains. The sequences showed that the mutations occurred from T to G and C to A at base 609th and 769th respectively, and the corresponding amino acid showed mutations from Ile to Met as Met-203-type, and Leu to Ile as Ile-257-type strains; PFGE revealed 8 different genotypes, with 88.8% to 100% similarity. ER2 (54.8%) was the dominant PFGE genotype, and erysipelas attenuated vaccine strains (G4T10 and GC42) were the same genotype strains. **[Conclusion]** *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 1a was the prevalent serotypes in Jianghuai area. The homology of the *spaA* was high and had small variations. All the isolates came from one clone strain. Met-203-type and Ile-257-type strains had high pathogenicity and were the most prevalent pathogens type in Jianghuai area.

Keywords: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, Serotypes, Surface protective antigen A gene, Pulsed-field gel electrophoresis

猪丹毒(Swine erysipelas)是由猪丹毒杆菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)引起的一种人兽共患传染病, 临床特征主要包括急性败血症、皮肤荨麻疹和多发性关节炎, 该病广泛流行于世界各地, 给养猪业造成很大的经济损失^[1]。

猪丹毒杆菌血清型众多, 迄今已确认的血清型有 26 个(即 1a、1b、2–24 及 N 型), 约 80% 以上的猪源分离菌株属于 1 型(包括 1a 和 1b)和 2 型。不同血清型菌株的致病力不同, 1 型毒力最强, 主要引起急性败血型猪丹毒, 2 型毒力较弱, 主要与疹块型或关节炎型猪丹毒有关^[2]。我国致病猪丹毒杆菌主要是 1a、1b 和 2 型。免疫接种是预防和控制猪丹毒的重要措施, 当前我国使用的疫苗有猪丹毒 G₄T₁₀ 或 GC₄₂ 弱毒活菌苗、猪丹毒灭活菌苗以及猪瘟、猪丹毒、猪肺疫三联活疫苗等。

猪丹毒杆菌 *spaA* 基因编码的产物为表面保护性抗原(Surface protect antigen, Spa), 根据基因水平和蛋白水平的差异, 可将 Spa 分为 SpaA、SpaB、SpaC 三类。研究发现, SpaA 仅存在于毒力较强的血清型 1a、1b、2、5、8、9、12、15、16、17 和 N 型的菌株中, 不仅具有良好的免疫原性及免疫保护功能, 而且是猪丹毒杆菌的重要致病因子^[3]。通过 *spaA* 基因的遗传进化研究, 可从基因水平上分析猪丹毒杆菌分离株之间的差异^[4]。

近年来, 脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)开始广泛

应用于多种细菌的分子流行病学研究中。与传统的血清型分型方法相比, PFGE 具有更高的分辨力和敏感性, 被誉为细菌分型的“金标准”, 它能够从细菌基因组水平上分析不同时间、不同地区散在分布菌株之间的流行病学相关性, 了解疫病流行的内在规律^[5]。此外, Opriessnig 等^[6]和 Sawada 等^[7]研究报道 PFGE 可用于区分猪丹毒杆菌疫苗株与野毒株。

在 20 世纪 80 年代和 90 年代初, 猪丹毒与猪瘟、猪肺疫并称为我国养猪业的三大传染病, 虽已有二十余年极少见到, 但近几年来, 在江西、浙江、湖南、四川、云南、广州、福建、安徽等地均有猪丹毒散发的报道, 猪丹毒似乎又有卷土重来的趋势。本研究系对 2012–2015 年江淮地区临床分离鉴定的 42 株猪丹毒杆菌进行血清型鉴定、*spaA* 基因遗传进化分析和 PFGE 基因分型, 旨在了解当前该地区猪丹毒的流行特点以及致病菌株的差异, 为有效防控猪丹毒提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 受试菌株

42 株猪丹毒杆菌源自 2012–2015 年江淮地区临床病例, 详细背景资料见表 1。按地理位置分布, 长江以南包括宣城、黄山、马鞍山; 江淮之间包括合肥、安庆、六安; 淮河以北包括蚌埠、亳州、阜阳、淮南、宿州。猪丹毒活疫苗(G₄T₁₀ 株 1a 型)、

表 1 42 株猪丹毒杆菌背景资料

Table 1 Background information of 42 *Erysipelothrix rhusiopathiae*

菌株 Strain	地点 Origin isolated	时间 Time	来源 Source	菌株 Strain	地点 Origin isolated	时间 Time	来源 Source
LA120609	六安	2012.06.09	败血症型	HF130820	合肥	2013.08.20	败血症型
HF120827	合肥	2012.08.27	败血症型	BB130822	蚌埠 b	2013.08.22	败血症型
TL120914	铜陵	2012.09.14	败血症型	BZ130831	亳州	2013.08.31	败血症型
MAS120915	马鞍山	2012.09.15	败血症型	HF130921	合肥	2013.09.21	败血症型
HF120919	合肥 a	2012.09.19	败血症型	LA130925	六安	2013.09.25	关节炎型
HF120922	合肥 a	2012.09.22	败血症型	BB131008	蚌埠 b	2013.10.08	败血症型
HS121019	黄山	2012.10.19	疹块型	LA131010	六安	2013.10.10	败血症型
HF130201	合肥 a	2013.02.01	败血症型	HF140320	合肥	2014.03.20	败血症型
HF130329	合肥 a	2013.03.29	败血症型	SZ140326	宿州	2014.03.26	败血症型
HF130415	合肥	2013.04.15	败血症型	HF140607	合肥	2014.06.07	败血症型
BB130721	蚌埠 b	2013.07.21	败血症型	LA140620	六安	2014.06.20	败血症型
AQ130724	安庆	2013.07.24	败血症型	XC140709	宣城	2014.07.09	败血症型
BB130724	蚌埠 b	2013.07.24	败血症型	AQ140814	安庆	2014.08.14	败血症型
AQ130725	安庆	2013.07.25	败血症型	TL140918	铜陵	2014.09.18	败血症型
BB130725	蚌埠 b	2013.07.25	败血症型	LA140929	六安	2014.09.29	败血症型
XC130727	宣城	2013.07.27	败血症型	FY141002	阜阳	2014.10.02	败血症型
HF130729	合肥	2013.07.29	疹块型	AQ150411	安庆	2015.04.11	败血症型
HN130805	淮南	2013.08.05	败血症型	AQ150414	安庆	2015.04.14	败血症型
AQ130807	安庆	2013.08.07	败血症型	BZ150422	亳州	2015.04.22	败血症型
HF130810	合肥	2013.08.10	败血症型	FY150511	阜阳	2015.05.11	败血症型
BB130818	蚌埠 b	2013.08.18	败血症型	LA150627	六安	2015.06.27	败血症型

注：a、b 代表分离株分别分离自 A 猪场、B 猪场。

Note: a, b represent the strains were isolated from farm A and farm B.

猪丹毒活疫苗(GC₄₂ 株 1a 型)分别购自哈药集团生物疫苗有限公司和辽宁益康生物股份有限公司；沙门氏菌标准株 H9812 由安徽农业大学动物传染病研究室保存。

1.2 主要试剂和仪器

脑心浸液肉汤(BHI)、脑心浸液琼脂(BHIA)及 LB 培养基购自绍兴天恒生物科技有限公司；Prime STAR[®] Max DNA Polymerase、pMD19-T 载体、*Sma* I、*Xba* I 内切酶购自 TaKaRa 公司；十二烷基肌氨酸钠(Sarcosyl)、溶菌酶、脱氧胆酸钠(Sodium deoxycholate)购自 Solarbio 公司；聚氧乙烯月桂醚

(Brij-35)购于北京拜尔迪生物技术有限公司；蛋白酶 K 购自 Merck 公司；SeaKem Gold Agarose 购自 Lonza 公司。CHEF-DR II 脉冲场凝胶电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司；TProfessional Thermocycler 梯度 PCR 仪购自德国耶拿分析仪器股份公司。

1.3 血清型鉴定

参照文献[8]制备分型抗原，略做改动。在含 10%犊牛血清的 30 mL BHI (37 g/L)培养基中接种猪丹毒杆菌受试菌株，37 °C 培养 48 h，加入终浓度为 1%的甲醛溶液，室温下静置 24 h 灭活，4 000 r/min 离心 15 min 收集菌体，弃上清液，用含 5%甲醛的

PBS 溶液洗涤, 重复 3 次, 1 mL 灭菌蒸馏水重悬, 110 kPa 高压灭菌 45 min, 5 000 r/min 离心 5 min 收集上清, 送至英国爱丁堡大学 Dr. Tanja Opriessnig 的实验室进行血清型鉴定。

1.4 *spaA* 基因克隆测序

参照 GenBank 中登录的猪丹毒杆菌 *spaA* 基因序列设计一对引物, P1 :5'-ATGAAAAAGAAAAA CACCTATT-3'; P2 :5'-CTATTTTAAACTTCCATCG TTC-3', 预期目的片段大小为 1 881 bp。采用煮沸法提取细菌全基因组 DNA 作为 PCR 模板。PCR 反应体系(25 μ L) : Prime STAR[®] Max DNA Polymerase 12.5 μ L, 模板(10 mg/L) 2 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 51 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。琼脂糖凝胶电泳后用胶回收试剂盒回收目的片段, 与 pMD19-T 载体连接过夜, 转化 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含有氨苄青霉素抗性的 LB 琼脂平板上, PCR 鉴定阳性克隆, 提取质粒经双酶切鉴定后, 送至南京金斯瑞生物公司测序。将测序结果登录 GenBank, 并采用 DNASTar 中的 MegEditSeq 和 MEGA 4.1 软件与 NCBI 中已发表的 *spaA* 基因序列(表 2)进行相似性比较和遗传进化分析。

表 2 猪丹毒杆菌 *spaA* 基因参考菌株
Table 2 *spaA* gene of *Erysipelothrix rhusiopathiae* reference strains

登录号 Accession No.	菌株名称及血清型 Strains name and serotype	地区(时间)及来源 Area (time) and source
AB019124	Fujisawa (1a)	日本(1998), 猪
KF177344	GD1201 (-)	广东(2013), 猪
KJ660060	GD-GZ (1a)	广东(2014), 猪
EF635597	C43311 (2)	湖南(2007), 猪
JF710589	M11 (-)	湖南(2011), 猪
KC661045	XY10.2 (-)	湖南(2010), 猪
AB259653	422/1E1 (1b)	日本(2006), 猪
KR606305	ATCC 19414 (2)	德国(2015), 猪

注: - : 未知血清型。

Note: -: Non serotype.

1.5 PFGE 分型

参照美国疾病控制与预防中心(CDC)的 PulseNet 实验手册及文献[9]并略作调整。

1.5.1 细菌处理: 复苏冻存的猪丹毒杆菌分离株及沙门氏菌 H9812 标准菌株。用灭菌棉签取适量菌落于 1.5 mL CSB 溶液(0.1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L EDTA, pH 8.0)中制备菌悬液, 混匀后调节至 OD₆₁₀ 约为 1.3–1.4, 取 200 μ L 菌悬液于 1.5 mL EP 管中 37 $^{\circ}$ C 保温 10 min。

1.5.2 细菌裂解与酶切: 猪丹毒杆菌处理: 用 1 \times TE 溶液制备 1% SeaKem Gold Agarose : 1% SDS 琼脂糖, 56 $^{\circ}$ C 水浴中预热, 取 200 μ L 与制备好的菌悬液轻轻混匀, 之后取适量加入模具中, 置室温或 4 $^{\circ}$ C 中冷却; 将胶块转移到终浓度为 1 g/L 的溶菌酶缓冲液(0.006 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L EDTA, 1 mol/L NaCl, 0.5% Sarcosyl, 0.2% Sodium deoxycholate, 0.2% Brij 35, pH 8.0)中, 37 $^{\circ}$ C、130 r/min 水浴摇床处理 12 h, 破碎细胞壁; 将胶块转移到终浓度为 0.5 g/L 的蛋白酶 K 裂解液(0.25 mol/L EDTA, 0.02 mol/L NaCl, 1% Sarcosyl, pH 8.0)中, 55 $^{\circ}$ C、130 r/min 处理 20 h, 除去蛋白; 用 55 $^{\circ}$ C 预热的灭菌超纯水和 1 \times TE 溶液分别清洗 3 遍, 每次 15 min; 胶块经 *Sma* I 25 $^{\circ}$ C 酶切 7 h; 用 0.5 \times TBE 溶液配制 1% SeaKem Gold Agarose 胶进行脉冲场凝胶电泳。

沙门氏菌标准株 H9812 处理 :200 μ L 菌悬液中加入 20 μ L 蛋白酶 K (20 g/L)后与等量上述琼脂糖混合后制备小胶块; 将胶块转移至 5 mL CLB 溶液(0.05 mol/L Tris, 0.05 mol/L EDTA, 1% Sarcosyl, 0.1 g/L 蛋白酶 K, pH 8.0)中, 55 $^{\circ}$ C、130 r/min 水浴摇床中裂解 2 h; 洗胶后经 *Xba* I 37 $^{\circ}$ C 酶切 5 h, 电泳。
1.5.3 电泳条件: 配制 0.5 \times TBE 电泳缓冲液, 依次设置电泳参数: 温度 14 $^{\circ}$ C, 脉冲夹角 120 $^{\circ}$, 电压 6 V/cm, 第一阶段, 起始转换时间 1.3 s, 最后转换为 45 s, 电泳时间 17 h; 第二阶段, 起始与最后转换时间均为 6.5 s, 电泳时间 1.4 h。

1.5.4 图像的获取与分析: 电泳完毕, 将胶块置于

1 mg/L 溴化乙锭溶液中染色 30 min, 再置超纯水中脱色 30 min。凝胶成像系统中获取图谱并以 Tiff 格式保存图像。电泳图像采用 BioNumerics (version 7.1) 软件处理, 用非加权配对算术平均法 (UPGMA) 进行聚类分析, 构建聚类树。参照文献 [10-11] 进行结果判定: 当菌株间 PFGE 图谱完全相同时, 判定为菌株一致; 当图谱相差 1-3 个条带, 且菌株相似性 >85% 时, 判定为密切相关; 当图谱相差 4-6 个条带, 且相似性在 50%-85% 时, 判定为可能相关; 当图谱相差 7 个条带以上, 且相似性 <50% 时, 判定为不相关。

2 结果与分析

2.1 血清型鉴定

42 株猪丹毒杆菌分离株血清型均为 1a 型。

2.2 *spaA* 基因序列分析

在 42 株猪丹毒杆菌分离株中, 有 40 株 *spaA* 基因全长均为 1 881 bp, 只有 HF120919 和 SZ140326 为 1 821 bp。猪丹毒活疫苗 G₄T₁₀ 株(1a 型)和 GC₄₂ 株(1a 型) *spaA* 基因全长分别为 1 761 bp 和 1 641 bp。分离株之间核苷酸序列相似性为 99.9%-100%, 其中有 37 株相似性为 100%; 分离株与湖南 M11 株和 XY10.2 株、广东 GD-GZ 株(1a 型)和 GD1201 株、猪丹毒活疫苗 G₄T₁₀ 株(1a 型)和 GC₄₂ 株(1a 型)、日本 Fujisawa 株(1a 型)和 422/1E1 株(1b 型)的核苷酸相似性均很高, 为 99.7%-100%, 与德国 ATCC19414 株(2 型)、湖南 C43311 株(2 型)的核苷酸相似性为 98.5%-99.1% (表 3)。

表 3 42 株分离菌与国内外参考菌株 *spaA* 基因核苷酸相似性比对
Table 3 Homology of *spaA* gene nucleotide sequence between 42 isolated strains and reference strains

菌株 Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1		99.9	99.9	99.9	99.9	100	99.9	99.9	100	100	99.9	99.9	99.8	99.8	99.0	98.5
2	0.0		99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.7	99.0	98.5
3	0.0	0.1		99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.7	99.0	98.5
4	0.0	0.1	0.1		99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.7	99.0	98.5
5	0.0	0.1	0.1	0.1		99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	99.7	99.0	98.5
6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		99.9	99.9	100	100	99.9	99.9	99.8	99.8	99.1	98.8
7	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0		100	99.9	99.9	99.8	99.8	99.9	99.8	99.0	98.6
8	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0		99.9	99.9	99.9	99.8	99.9	99.8	99.0	98.8
9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1		100	99.9	99.9	99.8	99.8	99.0	98.5
10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0		99.9	99.9	99.8	99.8	99.0	98.5
11	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1		99.8	99.7	99.7	98.9	98.4
12	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2		99.7	99.7	98.9	98.4
13	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.3	0.3		99.8	99.1	98.5
14	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2		99.0	98.6
15	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1	0.9	1.0		98.0
16	1.5	1.6	1.6	1.6	1.6	1.2	1.4	1.2	1.5	1.5	1.6	1.6	1.6	1.4	2.1	

注: 右上方为 *spaA* 基因核苷酸序列相似性比较, 左下方为离散度。1: 以 LA120609 株为代表的基因序列完全相同的 37 株菌株; 2: HF140607 株; 3: SZ140326 株; 4: TL140918 株; 5: FY150511 株; 6: HF120919 株; 7: G4T10 株; 8: GC42 株; 9: M11 株; 10: XY10.2 株; 11: GD1201 株; 12: GD-GZ 株; 13: Fujisawa 株; 14: 422/1E1 株; 15: C43311 株; 16: ATCC19414 株。

Note: Nucleotide similarity of *spaA* gene on the upper right and the divergence on the lower left; 1: LA120609 represent 37 strains of identical *spaA* gene sequence; 2: Strain HF140607; 3: Strain SZ140326; 4: Strain TL140918; 5: Strain FY150511; 6: Strain HF120919; 7: Strain G4T10; 8: Strain GC42; 9: Strain M11; 10: Strain XY10.2; 11: Strain GD1201; 12: Strain GD-GD; 13: Strain Fujisawa; 14: Strain 422/1E1; 15: Strain C43311; 16: Strain ATCC19414.

与野生型强毒株 Fujisawa 株相比, 42 株猪丹毒杆菌 *spaA* 基因在 609 bp 处由 T 突变为 G, 对应 203 位氨基酸由 Ile 突变为 Met, 即为 Met-203 型菌株; 在 769 bp 处由 C 突变为 A, 对应 257 位氨基酸由 Leu 突变为 Ile, 即为 Ile-257 型菌株; 除此之外, FY150511 株在 203 bp 处 A 突变为 G, 对应 77 位氨基酸由 Gln 突变为 Arg; HF140607 株在 347 bp 处由 A 突变为 G, 对应 116 位氨基酸由 Asn 突变为 Ser; SZ140326 株在 803 bp 处由 G 突变为 T, 对应 268 位氨基酸由 Arg 突变为 Leu; TL140918 株在 865 bp 处由 G 突变为 T, 对应 289 位氨基酸

由 Val 突变为 Phe。猪丹毒弱毒苗 G₄T₁₀ 株和 GC₄₂ 株在 609 bp 处未发生改变, 对应 203 位氨基酸为 Ile, 即为 Ile-203 型菌株, 仅在 769 bp 处由 C 突变为 A, 对应 257 位氨基酸由 Leu 突变为 Ile。建立的 *spaA* 基因遗传进化树显示, 分离株与湖南 M11 株和 XY10.2 株、广东 GD-GZ 株(1a 型)和 GD1201 株处于同一分支, 亲缘关系最近, 其次是猪丹毒弱毒苗 G₄T₁₀ 株(1a 型)和 GC₄₂ 株(1a 型)、日本 Fujisawa 株(1a)和 422/1E1 株(1b 型), 而与湖南 C43311 株(2 型)、德国 ATCC19414 株(2 型)的亲缘关系较远(图 1)。

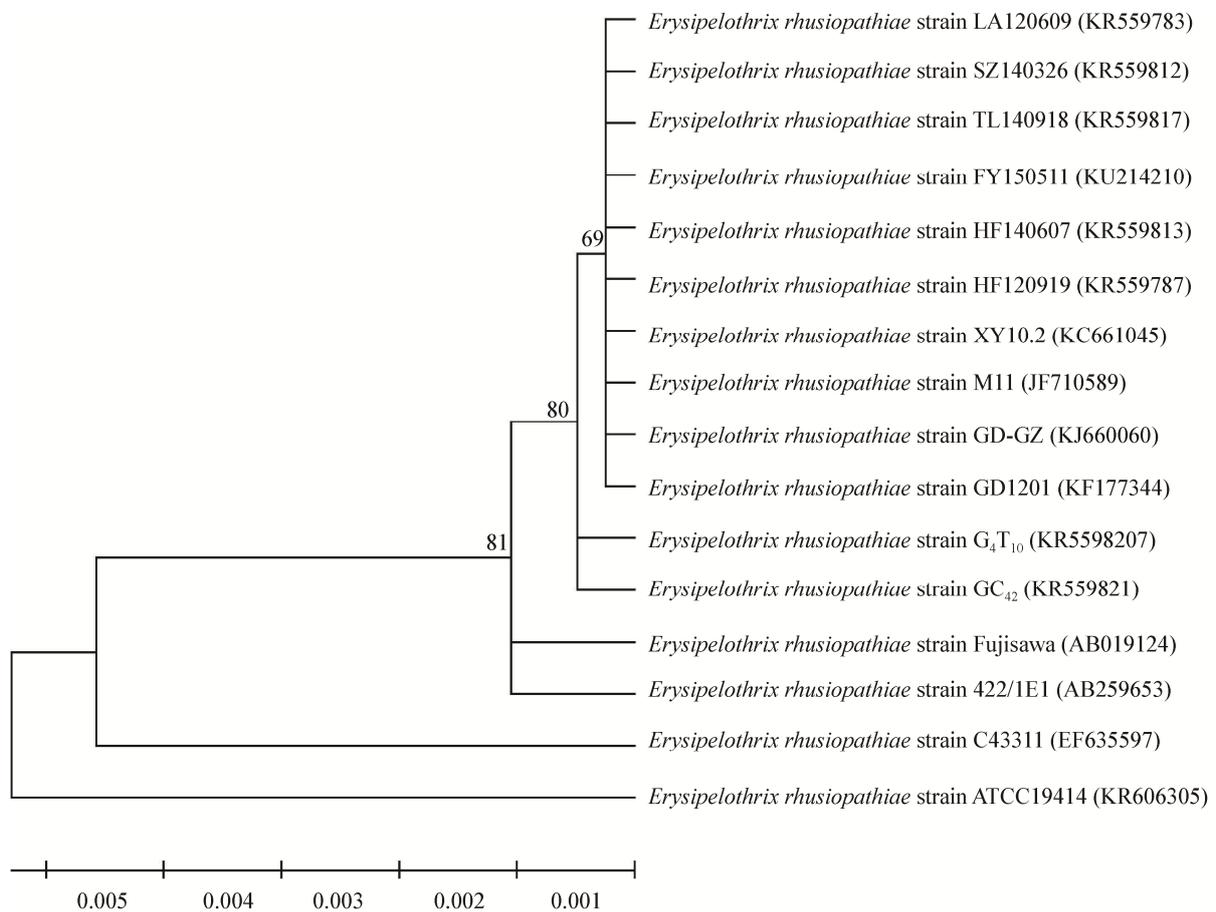


图 1 42 株分离菌与参考菌株 *spaA* 基因序列的系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree based on *spaA* gene sequence of the 42 isolated strains and reference strains

注: LA120609 代表 *spaA* 基因序列完全相同的 37 株分离菌株; 括号内代表 GenBank 序列登录号; 标尺代表进化距离; 分支点上的数字代表分支的可靠程度。

Note: LA120609 represent 37 strains of identical *spaA* gene sequence. The serial number in the bracket is GenBank accession number. The scaleplate is evolutionary distance. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap.

2.3 PFGE 分型

42株猪丹毒杆菌分离株和2株猪丹毒弱毒菌苗株(G₄T₁₀、GC₄₂)被 *Sma* I 内切酶切成大小为20.5–336.5 kb的12–14条片段(图2)。按照100%相似度将分离菌株分为8种PFGE基因型,分别命名为ER1–ER8,优势基因型为ER2型,占54.8%(23/42),其次为ER7型占21.4%(9/42),ER1型占7.1%(3/42),ER6、ER8型均占4.7%(2/42),ER3、ER4、ER5均占2.4%(1/42),不同型之间相似度为88.8%–94.7%。G₄T₁₀株和GC₄₂株相似度达100%,均为ER9型,与ER8型(包括LA140929和FY141002株)相似度最高(96.3%)(图3)。

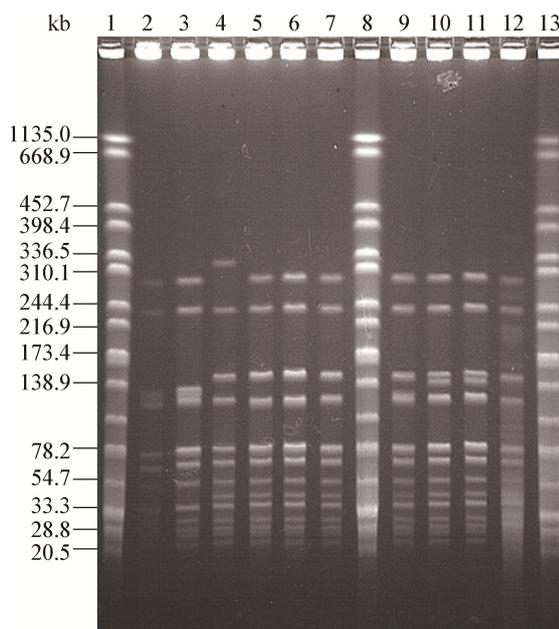


图2 部分猪丹毒杆菌分离株脉冲场凝胶电泳结果

Figure 2 Partial PFGE images of *Erysipelothrix rhusiopathiae*

注:1、8、13:标准株H9812;2:G₄T₁₀株;3:GC₄₂株;4:FY141002株;5:AQ150411株;6:AQ150414株;7:BZ150422株;9:FY150511株;10:HF140320株;11:LA150627株;12:AQ130807株。

Note: 1, 8, 13: Salmonella H9812; 2: Vaccine strain G₄T₁₀; 3: Vaccine strain GC₄₂; 4: Strain FY141002; 5: Strain AQ150411; 6: Strain AQ150414; 7: Strain BZ150422; 9: Strain FY150511; 10: Strain HF140320; 11: Strain LA1506 27; 12: Strain AQ130807.

3 讨论

猪丹毒杆菌血清型众多,在已报道的26种血清型中,至少有15种可以引起猪的感染。20世纪80年代,徐克勤等^[12]对源自我国14个省市的234株猪丹毒杆菌,鉴定优势血清型为1a型和2型,其中9株安徽分离株均为1a型。近年来,美国、日本等国猪丹毒的发生明显增多,致病猪丹毒杆菌的血清型均以1a型和2型为主^[13-14]。本研究中42株猪丹毒杆菌的血清型均属于1a型,这与2015年Zou等^[15]对我国东部地区猪丹毒流行菌株血清型的调查结果完全相同。由此可见,在江淮地区卷土重来的猪丹毒,其致病菌的血清型还是毒力强的1a型,优势血清型至今没有发生变化,现有的猪丹毒G₄T₁₀株和GC₄₂株弱毒疫苗依然有效。而没有2型菌株的出现,其原因可能在于菌株源自的临床病例数量有限,并且92.9%的临床病例属于急性败血型。

*spaA*基因在42株猪丹毒杆菌分离株之间仅有0–1个核苷酸的差别,其中有37株的基因序列完全一致,显示江淮地区致病猪丹毒杆菌变异性较小,同时与湖南、广东两地分离菌株的核苷酸相似性在99.8%以上,遗传进化树中处于同一分支,表明致病猪丹毒杆菌在江淮地区与湖南、广东两地之间有一定的遗传关系,存在跨地区传播的可能。42株猪丹毒杆菌分离株(1a型)与猪丹毒弱毒苗G₄T₁₀株(1a型)和GC₄₂株(1a型)、Fujisawa株(1a型)、422/1E1株(1b型)、C43311株(2型)、ATCC19414株(2型)的核苷酸相似性为98.5%–99.9%,进一步证明*spaA*基因在猪丹毒杆菌血清型1a、1b、2型中的高度保守性和相似性^[16],而临床猪丹毒杆菌分离菌又以血清型1a、1b、2型为主。因此由*spaA*基因编码的SpaA蛋白作为主要免疫保护性抗原,为猪丹毒杆菌亚单位疫苗的研发提供了支持。

To等^[14]在对日本2008–2011年间猪丹毒杆菌分离株的研究中发现,95%以上菌株为Met-203、Ile-257型,主要源自急性败血症病例。Uchiyama等^[17]也报道了日本在2008–2010年间分离的猪丹毒杆菌中,50%以上为Met-203、Ile-257型菌株,全部来自急性败血症病例,同时研究结果还显示Met-203、Ile-257型菌株对小鼠具有很强的致病力,其中4株

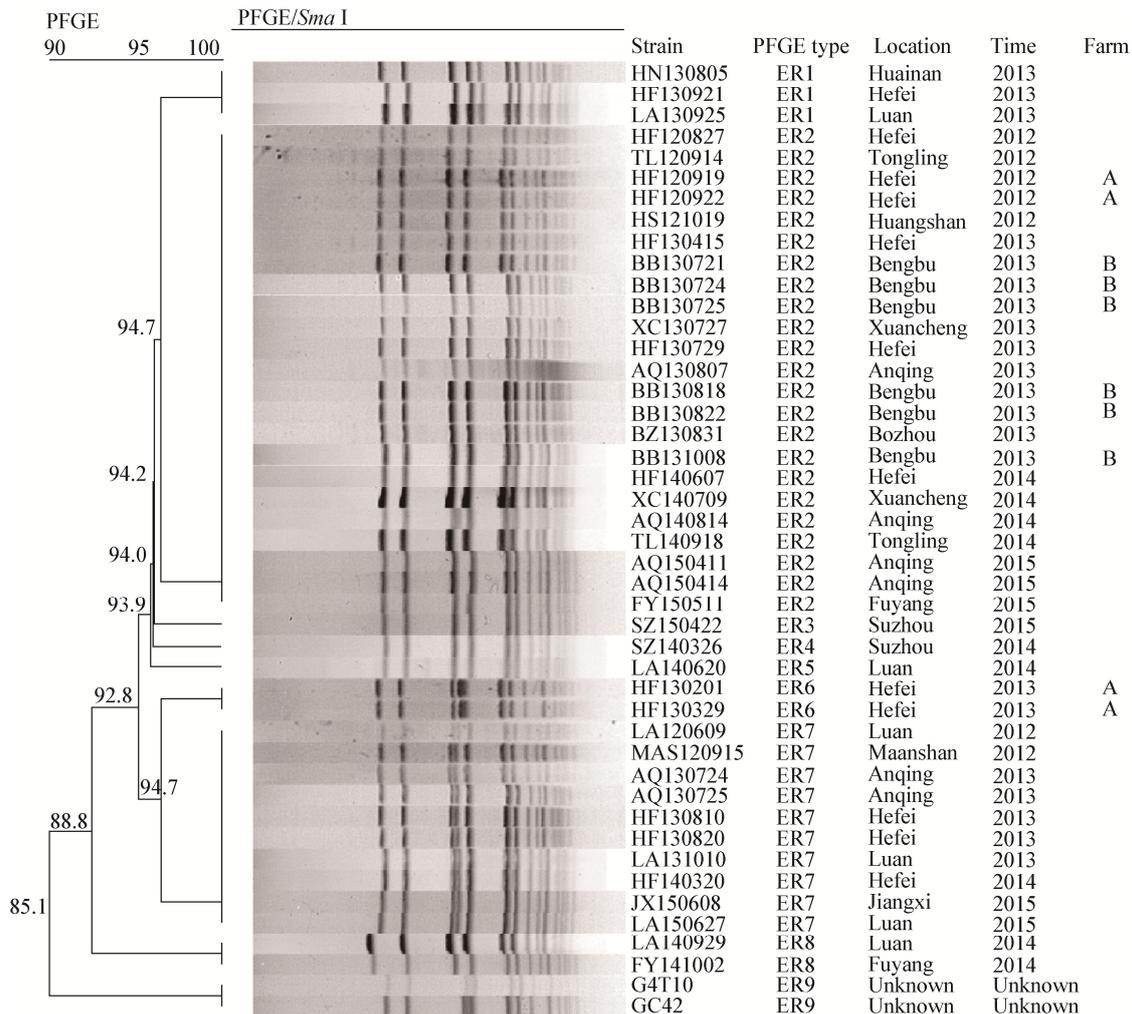


图3 42株猪丹毒杆菌分离株PFGE基因型聚类树

Figure 3 PFGE genotype of 42 *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains

分离菌的 LD_{50} 为 4.5–14.5 CFU/mL, 为强毒菌。Zou 等^[15]研究发现我国东部地区猪丹毒杆菌分离株 50% 为 Met-203、Ile-257 型, 全部分离自急性败血症病例, 10^3 CFU/mL 的受试菌(共计 8 株)全都可以引起小鼠 100% 死亡, 毒力较强。本研究中, 42 株猪丹毒杆菌 100% 为 Met-203、Ile-257 型菌株, 39 株(92.9%)来自急性败血症病例, 陆萍等^[18]已报道了本研究中的 8 株分离菌对小鼠的 LD_{50} 均在 $14.30\text{--}2.36 \times 10^2$ CFU/mL 之间, 属于强毒菌, 与上述研究报道相一致。猪丹毒弱毒活疫苗 G_4T_{10} 株和 GC_{42} 株则均为 Ile-203、Ile-257 菌型。综上所述, Met-203、Ile-257 型菌株致病力强, 是江淮地区致病猪丹毒杆菌的流行菌型。

PFGE 是近年发展起来的一种重要的分离大分子量 DNA 的电泳技术。1996 年 Feizabadi 等^[19]首次用于兽医领域, 对牛结核分支杆菌与其他肺结核分支杆菌属进行基因组分析。2001 年 Okatani 等^[9]首次将 PFGE 应用于猪丹毒杆菌的分型研究, 发现该方法较血清学分型、RAPD 分型以及核糖体分型的能力更强。本研究在分离菌株血清型全部一致、*spaA* 基因高度相似性的基础上, 进行 PFGE 分型。42 株猪丹毒杆菌分成 8 个 PFGE 基因型, 其之间仅有 0–2 个条带的差异, 菌株间相似度 >88.8%, 源于同一克隆系, 表明江淮地区致病猪丹毒杆菌变异小、亲缘关系密切; 同时 ER2 型菌株占优势, 为江淮地区致病猪丹毒杆菌流行菌株的优势基因型, 这

可能是由于 ER2 型菌株可在不同环境中表现某种适应性, 导致 ER2 型菌株在江淮地区大范围的流行。

虽然不同菌株的 PFGE 基因型与其分离地点和分离时间无明显相关性, 但是在同一猪场不同时间暴发的猪丹毒致病菌则可为同一个菌株, 例如 B 猪场, 2013 年 7 月-10 月发生 6 起猪丹毒疫情, 自病死猪中分离的 6 株猪丹毒杆菌, 其 PFGE 基因型完全一致, 这可能是由于猪丹毒杆菌对外界环境的抵抗力很强, 一旦侵入到环境中, 会借助土壤、昆虫、鼠类、鸟类等各种途径进行传播。同一猪场不同时间暴发的猪丹毒致病菌也可为不同的菌株, 例如 A 猪场, 2012 年 9 月-2013 年 3 月发生 4 起猪丹毒疫情, 自病死猪中分离到 4 株猪丹毒杆菌, 2012 年和 2013 年各分离的 2 株猪丹毒杆菌 PFGE 基因型完全一致, 而两年之间菌株的 PFGE 基因型则不相同, 表现为 2013 年菌株缺少了 1 个大小为 28.8-33.3 kb 条带, 一种原因可能是猪丹毒杆菌具有很强的潜伏性, 在传播过程中发生了变异, 另一种原因可能是通过外来途径引入了其它基因型猪丹毒杆菌。此外, Opriessnig 等^[6]应用 PFGE 技术对 90 株源自美国中西部猪丹毒杆菌和 4 株疫苗株进行比较, 结果显示分离株呈现多样性, 与疫苗株之间存在差别, 证实 PFGE 能够很好的区分野毒株与疫苗株。在本研究的 42 株猪丹毒杆菌分离株中, 没有发现与疫苗株相同的 PFGE 基因型, 与 Opriessnig 等^[6]的研究报道一致; 同时基于 *spaA* 基因分析, 分离株均为 Met-203、Ile-257 型, 疫苗株为 Ile-203、Ile-257 型, 两者在 609 bp 处存在差异; 并且江淮地区大部分猪场已多年停止使用猪丹毒疫苗, 由此可以排除江淮地区猪丹毒的暴发与疫苗株毒力返强有关的可能。

参 考 文 献

- [1] Wang QN, Chang BJ, Riley TV. *Erysipelothrix rhusiopathiae*[J]. Veterinary Microbiology, 2010, 140(3/4): 405-417
- [2] Bender JS, Shen HG, Irwin CK, et al. Characterization of *Erysipelothrix* species isolates from clinically affected pigs, environmental samples, and vaccine strains from six recent swine erysipelas outbreaks in the United States[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2010, 17(10): 1605-1611
- [3] Borrahybay E, Gong FJ, Zhang L, et al. Role of surface protective antigen A in the pathogenesis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strain C43065[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(2): 206-216
- [4] To H, Nagai S. Genetic and antigenic diversity of the surface protective antigen proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2007, 14(7): 813-820
- [5] Ye R, Shi LY, Wang P, et al. Brief introduction of pulsed-field gel electrophoresis and its application in bacterial molecular typing[J]. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 2013, 24(2): 182-185 (in Chinese)
- [6] 叶蕊, 石丽媛, 王鹏, 等. 脉冲场凝胶电泳技术简介及其在细菌分子分型中的应用[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2013, 24(2): 182-185
- [7] Opriessnig T, Hoffman LJ, Harris DL, 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
- [8] Sawada T, Hassanein R, Takahashi E, et al. Pathogenic and genetic characterization of acriflavine resistant erysipelotheix isolates from arthritic pigs[J]. Journal of Veterinary Epidemiology, 2006, 10(1): 21-28
- [9] Ozawa M, Yamamoto K, Kojima A, et al. Etiological and biological characteristics of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated between 1994 and 2001 from pigs with swine erysipelas in Japan[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2009, 71(6): 697-702
- [10] Okatani AT, Uto T, Taniguchi T, et al. Pulsed-field gel electrophoresis in differentiation of *Erysipelothrix* species strains[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(11): 4032-4036
- [11] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(9): 2233-2239
- [12] Talon D, Cailleaux V, Thouverez M, et al. Discriminatory power and usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological studies of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Hospital Infection, 1996, 32(2): 135-145
- [13] Xu KQ, Hu XF, Lu QY. Serotype identification of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated in different area of China[J]. Jiangsu Agricultural Science, 1982(6): 35-38 (in Chinese)
- [14] 徐克勤, 胡秀芳, 陆琴英. 我国不同地区分离的猪丹毒杆菌血清型鉴定[J]. 江苏农业科学, 1982(6): 35-38
- [15] Bender JS, Irwin CK, Shen HG, et al. *Erysipelothrix* spp. genotypes, serotypes, and surface protective antigen types associated with abattoir condemnations[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2011, 23(1): 139-142
- [16] To H, Sato H, Tazumi A, et al. Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from recent swine erysipelas outbreaks in Japan[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2012, 74(7): 949-953
- [17] Zou Y, Zhu XM, Muhammad HM, et al. Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from acute swine erysipelas outbreaks in Eastern China[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2015, 77(6): 653-660
- [18] Ingebritson AL, Roth JA, Haeur PJ. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: Association of Spa-type with serotype and role in protective immunity[J]. Vaccine, 2010, 28(13): 2490-2496
- [19] 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
- [20] Lu P, Huang XH, Li CF, et al. Isolation, identification and characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in Anhui province[J]. Microbiology China, 2014, 41(9): 1822-1828 (in Chinese)
- [21] 陆萍, 黄晓慧, 李春芬, 等. 安徽部分地区猪丹毒杆菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 微生物学通报, 2014, 41(9): 1822-1828
- [22] Feizabadi MM, Robertson ID, Cousins DV, et al. Genomic analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by isoenzyme analysis and pulsed-field gel electrophoresis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1996, 34(5): 1136-1142