

猪一般型生殖道放线菌的分离鉴定与系统进化分析

周玉龙 董华兴 侯喜林 邵红 夏成 倪宏波* 朴范泽*

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院 黑龙江 大庆 163319)

摘要: 2007年4月,从患有化脓性肺炎、化脓性关节炎和心内膜炎的8周龄病死仔猪内脏器官中分离到一株细菌,对其进行了种属关系鉴定、致病性及药物敏感性等研究。首先从表型特征和生化特性方面进行鉴定,然后应用分子技术对其16S rDNA进行测序分析,最后进行了动物实验和药物敏感性实验。该细菌表型特征和生化特性表明其与生殖道放线杆菌(*A. hyovaginalis*)非常相似;对16S rDNA测序结果分析发现其与*A. hyovaginalis* III群菌株同源性高达99.2%,系统进化分析也表明分离株与*A. hyovaginalis* III群菌株亲缘关系最近;对小白鼠具有较强的致病性;对红霉素、庆大霉素和阿米卡星等药物高度敏感。因此,证实分离菌株为有致病性的*A. hyovaginalis* III型。

关键词: 猪, 生殖道放线菌, 分离, 鉴定, 系统发育分析

Identification and Phyletic Evolution Analysis of *Actinomyces hyovaginalis* from Swine

ZHOU Yu-Long DONG Hua-Xing HOU Xi-Lin SHAO Hong
XIA Cheng NI Hong-Bo* PIAO Fan-Ze*

(Heilongjiang August First Land Reclamation University Animal Technology College, Heilongjiang, Daqing 163319, China)

Abstract: A strain was isolated from internal organ of died porcine about 8 weeks with purulent pneumonia, arthritis, pyogenic arthritis and endocarditis in April 2007. Objectives of the study are to confirm the genus of the strain, pathopoiesis, and drug sensitivity. The mainly study methods: the first, the strain was identified by the phenotype and the characteristics of the biochemistry, sequence 16S rDNA genes of the strain was analyzed by molecular biology technology, finally animal experiment and drug sensitivity testing were done. The results of the phenotype and the characteristics of the biochemistry showed that it is greatly similar to *Actinomyces hyovaginalis*, 16S rRNA sequence analysis exhibited the homology achieved to 99.2% compared with group III strains of *Actinomyces hyovaginalis*, and the phyletic evolution analysis also indicated that it has mostly relationship with group III strains of *Actinomyces hyovaginalis*. Animal experiment discovered it has highly pathogenicity to *Mus musculus albus*; Drug sensitivity testing showed that it is hypersensitive to Erycin, Gentamicin and Amikacin. So, the result of the study confirmed that the strain is *Actin-*

基金项目: 黑龙江省农垦总局攻关项目(No. HNKXIV-08-03-01)

*通讯作者: 倪宏波: nihongbo@sina.com; 朴范泽: zhouyulong1980@163.com 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

收稿日期: 2008-10-13; 接受日期: 2008-12-23

omyces hyovaginalis III with the pathogenicity.

Keywords: Porcine, *Actinomyces hyovaginalis*, Isolation, Identification, Phylogenetic analysis

生殖道放线菌 (*Actinomyces hyovaginalis*, *A. hyovaginalis*) 属于放线杆菌属^[1]。到目前仅从猪的体内分离到了 *A. hyovaginalis*。Hommeze 等(1991)根据某些生化反应和菌落形态特征, 把以前从具有化脓性病变的猪体内分离到的类放线菌分为两个亚群, 即 II 群和 III 群。II 群菌株主要分离自脓性的阴道分泌物和流产胎儿; III 群菌株分离自具有化脓性病变的鼻腔、关节、子宫、膀胱、肾脏、肺脏和肝脏, 以及阴道分泌物^[2]。Collins 等(1993)通过 16S rRNA 测序分析, 首次将这类细菌命名为 *A. hyovaginalis*^[1]。Storms 等(2002)研究表明, 尽管 II 群和 III 群在生态学上明显不同, 但是 16S rRNA 基因测序结果表明, 这两个菌群的相似性达到 98.8% 以上, DNA-DNA 杂交和 tRNA 基因间的长度多态性分析结果进一步验证 III 群菌株属于 *A. hyovaginalis*, 根据以上结果把 *A. hyovaginalis* 分成两个生物型即“一般”生物型(主要是 III 群菌株)和“生殖道”生物型(主要是 II 群菌株)^[3]。*A. hyovaginalis* 主要引起母猪流产、仔猪或者育肥猪化脓性肺炎、坏死性肺炎和脓毒败血症等病变, 给养猪业造成巨大损失, 目前仅在丹麦和比利时有关于该病的报道^[3]。

本研究从临床病死猪的心脏血栓、肺脏、肝脏、肾脏和关节液内分离到一种呈棒状、弯杆状或者海鸥状等不规则形状革兰氏染色阳性细杆菌, 对分离菌株进行生化鉴定、生物学特征性检查, 以及 16S rRNA 克隆测序分析, 结果证实该分离株属于 *A. hyovaginalis* III 群。现将试验结果报告如下。

1 材料

1.1 病料

无菌采集病死仔猪的心脏血栓、肺脏、肝脏、脾脏、肾脏和关节液。

1.2 培养基

按常规方法制备新鲜的 10% 的绵羊血液营养琼脂培养基、巧克力培养基; 营养琼脂、麦糠凯、伊红美兰培养基和马丁肉汤培养基购自北京奥博星生物技术有限公司; 脑心浸液培养基(BHI)购自 BD 公司; 蛋白胨和酵母抽提物为 Oxoid 公司产品。

1.3 生化试管及药敏片

生化管购和药敏片均购自杭州天和微生物试剂有限公司, 批号分别为 20070617 和 20070406。

1.4 主要试剂

LA Taq DNA 聚合酶、pMD18-T 载体(TaKaRa); dNTPs 和 DNA Marker(Tiagen); 限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III 和 *Eco*R I (MBI); 蛋白酶 K (MERCK); 寡核苷酸引物由上海生物工程技术有限公司合成; *E. coli* DH5 α 由黑龙江八一农垦大学预防兽医实验室保存。

1.5 试验动物

30 g~40 g 健康昆明系小白鼠, 购自哈药集团黑龙江省生物制品一厂。

2 方法

2.1 临床症状与病理变化

2007 年 3 月初, 安达市某养猪户外购 40 头仔猪, 接种过猪瘟和猪丹毒疫苗。入舍后互相咬尾, 于 8 周龄左右陆续发病, 出现死亡病例。发病仔猪初期精神不振, 食欲减退或厌食, 饮欲增加; 中期有的气喘咳嗽, 蹄部溃烂, 四肢关节肿胀发炎, 触摸有波动感, 严重的后肢瘫痪, 呈犬坐姿势, 只能用两前肢爬行, 体温 41℃ 以上; 后期病猪呼吸极度困难, 卧底张口呼吸, 皮肤和可视黏膜发绀, 食欲废绝, 一般经 2 d~3 d 体温下降而死亡。病死仔猪剖检病理变化基本相似, 其主要表现为膝关节和髋关节的肿胀关节腔、心包腔和胸腔内蓄积大量似牛乳状的脓汁, 酸臭难闻; 肺脏与胸膜及心包粘连, 肺脏和膈肌上有大量大小不等的脓包, 切开后流出, 乳汁样脓汁; 肾脏表面散在白色坏死灶。腹腔积液, 小肠壁变薄, 肠系膜淋巴结轻微水肿, 膀胱积尿, 肝脏未见异常, 脾脏略肿大呈暗红色, 右心房内有心栓。

2.2 细菌分离培养

将心脏血栓、肺脏、肝脏、脾脏和肾脏分别接种于新鲜 10% 绵羊血液营养琼脂培养基和巧克力培养基进行普通需氧和烛缸法厌氧培养。对培养出的细菌进行菌落形态特征观察和革兰氏染色镜检。将纯培养后的细菌接种 BHI(加入 10% 犊牛血清)、麦糠凯培养基和伊红美兰培养基, 37℃ 需氧培养, 24 h

后观察结果。

2.3 生化试验

选取葡萄糖、麦芽糖、阿拉伯糖、靛基质、脲酶、甘露醇和山梨醇等相应的微量生化反应管,将纯培养的细菌挑取单个菌落接种于各反应管中,37℃恒温箱中培养24 h~48 h后观察结果。

2.4 细菌 16S rDNA PCR 扩增以及鉴定

2.4.1 引物设计:在细菌的 16S rDNA中有多个区段高度保守,根据这些保守区人们设计出通用引物,可以用来扩增所有细菌的 16S rDNA片段,并且这些引物仅对细菌是特异性的。而 16S rDNA可变区的差异可以用来区别不同的细菌。根据Lane等的报道,合成扩增细菌 16S rDNA的通用引物,扩增的DNA片段约 1.5 kb,引物如下^[4,5]:

Common Forward: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCT CAG-3'(8-27);

Common Reverse: 5'-ACGGTTACCTTGTTACG ACTT-3'(1512-1492)。

2.4.2 细菌基因组 DNA 提取:参照文献[6]进行细菌基因组制备。

2.4.3 PCR 扩增细菌 16S rDNA:采用 25 μL 反应体系:引物浓度各为 0.5 μmol/L, dNTPs 浓度 200 μmol/L, LA Taq DNA 聚合酶 2.5 U, 10×PCR 缓冲溶液 2.5 μL, DNA 模板 1 μL, 补充去离子水至总体积为 25 μL。扩增条件为:94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 50 s, 59℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。用 1%的琼脂糖凝胶在 1×TAE 电泳液中电泳,EB 染色,在凝胶成像系统(Gel Doc 2000)中观察扩增结果。

2.4.4 分离株 16S rDNA 克隆测序:大量扩增分离株 16S rDNA,用 DNA 凝胶回收试剂盒(Biospin Gel Extraction Kit)回收和纯化DNA。将纯化的DNA片段连接到pMD18-T载体后转化到 *E. coli* DH5α感受态细胞中,再将菌液涂布在LB/Amp+固体培养基上 37℃培养 18 h,挑选疑似阳性菌落接种到LB/Amp+液体培养基 3 mL 37℃培养 12 h,小量提取质粒,后用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 鉴定^[6],鉴定为阳性的质粒菌株委托北京基诺博实生物技术有限公司测序。

2.4.5 分离菌株 16S rDNA 基因片段测序结果同源性及系统进化分析:把测序结果在 NCBI 上用 Blast 比较分析,然后把同源性较高的不同种有代表性的序列下载下来,总计选择 12 个菌株的序列,应用

DNAStar 软件中 Clusta II 方法进行序列同源性百分率的比较,同时绘制系统进化树,分析分离株与其它菌株之间的亲缘关系。

2.5 药敏试验

取青霉素、米诺环素、庆大霉素、红霉素、链霉素和复方新诺明等药敏片按常规方法进行药敏试验。37℃需氧培养 24 h 后,观察结果。

2.6 动物接种试验

对分离菌株 20 h 肉汤培养物,应用平板稀释法计数,含菌量约 8.68×10^8 CFU/mL。把 10 只体重 30 g~40 g 昆明系健康小白鼠分成两组,每组 5 只。第 1 组腹腔接种分离菌株培养液 0.5 mL;第 2 组腹腔接种无菌肉汤培养基 0.5 mL。隔离饲养观察。

3 结果与分析

3.1 分离培养结果

在巧克力培养基和 10%新鲜绵羊血液营养琼脂培养基上,需氧和厌氧条件下培养 48 h 后均可见细菌生长,而且在烛缸法培养条件下比需氧条件下生长的快。肺脏菌落数量比较多,其菌落特征:在血液营养琼脂培养基上,24 h 呈针尖大小透明菌落,48 h 菌落略大呈半透明,周围有明显的β溶血环(见图 1);在巧克力培养基上菌落呈灰色,比血液营养琼脂培养基上生长的大;该菌株在普通营养琼脂培养基上生长较贫瘠;该菌在麦糠凯培养基和伊红美兰培养基上不生长。在加入 10%犊牛血清的马丁肉汤培养基中,肉汤上部清亮,管底有少量颗粒状沉淀物,无菌膜、菌环,振摇时呈絮状混浊现象。革兰氏染色阳性,具有多形性,多呈逗号状、弧形或者短杆状,还有少量呈球状菌体,无荚膜和芽孢,菌体着色不均常散在,也有呈丛或 2~4 个并列者(见图 2)。在马丁肉汤培养基中呈革兰氏阳性中等大小弯杆状。

3.2 生化试验结果

按照常规生化试验方法对分离菌株进行鉴定得到的结果见表 1,可见大部分生化与 Aalbæk 等报道的 *A. hyovaginalis* 结果相符。

3.3 细菌 16S rDNA PCR 扩增以及鉴定结果

3.3.1 细菌 16S rDNA PCR 扩增结果:以分离菌株基因组 DNA 为模板,用根据细菌的 16S rDNA 保守区设计的通用引物,应用 PCR 方法扩增出分离菌株的部分 16S rDNA 基因片段,大小约为 1.5 kb(见图 3)。

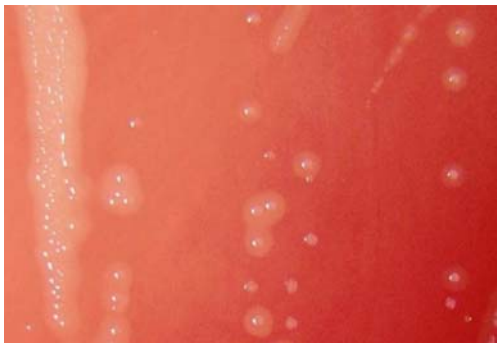


图 1 *A. hyovaginalis* 在新鲜 8%绵羊血琼脂培养基上需
氧气条件下培养 48 h 菌落形态
Fig. 1 Colonial morphology of *A. hyovaginalis* cultured 48
hour under the agar medium with 8% fresh sheep blood and
oxygen condition



图 2 *A. hyovaginalis* 革兰氏染色镜检结果
Fig. 2 Results of Gram staining for *A. hyovaginalis*

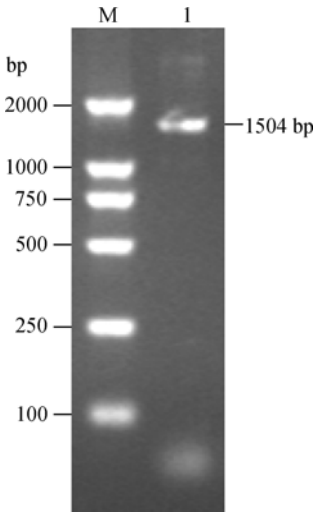


图 3 分离菌株 16S rDNA PCR 扩增结果
Fig. 3 Results of PCR of isolated strains 16S rDNA
注: M: DL2000; 1: 分离株.
Note: M: DL2000; 1: Isolated strain.

3.3.2 分离菌株 16S rDNA 片段克隆酶切鉴定结果:
按照常规方法,把 PCR 扩增出的分离菌株 16S
rDNA 片段连接到 pMD18-T 载体上进行克隆,提取
的质粒用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,
将有 DNA 片段被切下来的的重组质粒进行测序分析。
结果表明多个质粒酶切得到相同大小和数量的 DNA
片段,即约 220 bp 和 1330 bp 的 DNA 片段(见图 4)。

表 1 生化试验结果 Table 1 The results of biochemistry					
生化项目 Biochemistry tems	结果 Results	生化项目 Biochemistry items	结果 Results	生化项目 Biochemistry items	结果 Results
葡萄糖 Glucose	+	阿拉伯糖 Manico	-	肌醇 Cyclohexanhexol	-
棉子糖 Gossypose	+	甘露醇 Manico	-	蔗糖 Sucrose	+
山梨醇 Sorbitol	-	α -葡萄糖苷酶 α -glucosidase	+	乳糖 Lactose	+
麦芽糖 Maltose	+	卫矛醇 Galactitol	-	核糖 Ribose	+
鼠李糖 Rhamnose	-	密二糖 Melibiose	-	菊糖 Synanthrin	+
马尿酸盐 Hippurate	-	靛基质 Hippurate	-	海藻糖 Mycose	-
丙二酸盐 Malonate	-	β -半乳糖苷酶 ONPG	+	甘露糖 Carubinese	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	赖氨酸 Lysine	+	木糖 Xylose	-
氰化钾 Potassium cyanide	-	鸟氨酸 Ornithine	-	淀粉 Starch	-
枸橼酸盐 Citrate	-	精氨酸 Arginine	-	七叶苷 Esculin	+
溴甲酚紫牛乳 Bromocresol purple milk	产酸产气 O.R.F	运动性 Mobility	-	硫化氢 Hydrogen sulfide	-
5%绵羊血琼脂培养基 Agar culture-medium with 5% blood of sheep	β 溶血	甲基红 M.R	+	吲哚 Indole	-
5%牛血琼脂培养基 Agar culture-medium with 5% ox blood	β 溶血微弱 Haemolysis	乙酞甲基甲醇试验 V.P	-	明胶 Gelatinum	-
BHI 加 10%小牛血清 BHI with 10% calf serum	生长旺盛 Growth prosperity	氧化酶 Oxidase	-	尿素 Urea	-
营养肉汤加 10%犊牛血清 Nutrient broth with 10% calf serum	生长贫瘠	触酶 Catalase	-	乙酰胺 Acetamide	+

注: +: 阳性; -: 阴性.
Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction.

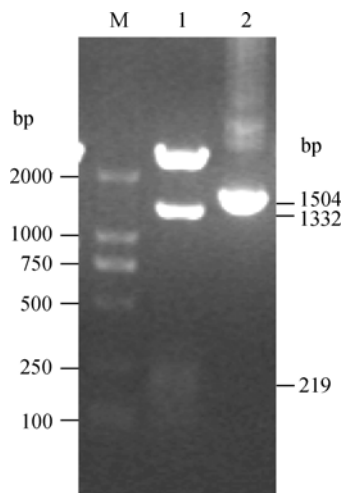


图 4 阳性质粒 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定结果
Fig. 4 Results of double digest of positive plasmid identified by *Bam*H I and *Hind* III

注: M: DL2000; 1: 质粒酶切; 2: 16S rDNA PCR 的基因片段。
Note: M: DL2000; 1: Positive plasmid; 2: 16S rDNA PCR production of isolated strain.

3.3.3 分离菌株 16S rDNA 片段克隆测序结果: 测序结果在 NCBI 上 Blast 结果表明与 GenBank No. AF489584 *A. hyovaginalis* 同源性最高达到 98%, 对限制性内切酶位点分析发现在目的片段 206 bp 位置有 *Hind* III 酶切位点, 再加上载体本身具有的 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点, 酶切时恰好应该出现约 220 bp 和 1330 bp 的 DNA 片段, 其结果与阳性质粒酶切鉴定结果相符(见图 5)。

3.3.4 分离菌株 16S rDNA 基因片段测序结果同源性比较结果: 测序结果同源性比较发现分离株

16S rDNA 基因序列与 *A. hyovaginalis* III 群菌株 GenBank No. AF489584 和 AJ293302 同源性最高, 分别是 99.2% 和 96.9%; 与 *A. hyovaginalis* II 群菌株 GenBank No. X69616 相似性是 95.6%, 与 *A. hyovaginalis-like* GenBank No. AJ234064 同源性 98.3%。而与细菌的生态学特征非常相似的化脓性隐秘杆菌 (*Arcanobacterium pyogenes*, *A. pyogenes*) GenBank No. X79225 同源性 85.6%, 可见两者差异较大 (见表 2)。

3.3.5 分离菌株 16S rDNA 基因片段测序结果系统进化树分析结果: 把测序结果与 GenBank 上的 12 株相似序列应用 DNASTar 软件中 Clusta II 方法绘制系统进化树后进行分析发现, 分离株 16S rDNA 基因序列与 *A. hyovaginalis* III 群菌株中 GenBank No. AF489584 和 AJ293302 亲缘关系最近, 差异性为 0%; 与 *A. hyovaginalis-like* GenBank No. AJ234064 亲缘关系也比较近略微存在差异; 与 *A. hyovaginalis* II 群菌株 GenBank No. X69616 亲缘关系略远, 差异性大约 0.5%; 而与细菌的生态学特征非常相似的 *A. pyogenes* GenBank No. X79225 亲缘关系较远, 差异性达到 3% 以上(见表图 6)。

3.4 药敏试验

根据药物敏感性试验确定分离菌株对氯霉素、庆大霉素、红霉素、阿米卡星和米诺环素等药物高度敏感, 而对复方新诺明、氨苄青霉素和青霉素 G 等具有耐药性(见表 3)。

表 2 分离菌株与 GenBank 上菌株 16S rDNA 基因同源性比较结果													
Table 2 The results of sequence homology comparing the isolated strains with 16S rDNA genes from GenBank strains													
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
1	86.8	86.3	91.5	86.7	83.3	83.9	85.1	88.1	82.5	83.1	84.4	86.2	1 <i>A.bovis</i> (X81061)
2	10.8		88.6	80.8	92.1	89.7	90.9	91.6	92.7	84.4	85.6	86.8	2 <i>A.canis</i> (AJ243891)
3	10.2	7.9		85.1	87.0	85.4	86.6	87.0	87.5	83.1	85.3	85.9	3 <i>A.hordeovulneris</i> (X82448)
4	5.8	12.0	12.0		81.1	79.4	79.9	80.9	80.9	77.6	78.2	78.0	4 <i>A.howellii</i> (X80411)
5	10.3	5.2	9.0	11.6		96.7	96.2	98.8	92.1	83.8	82.9	85.6	5 <i>A. hyovaginalis</i> (AF489584)
6	10.5	5.3	8.9	11.7	0.1		94.3	96.6	91.3	82.5	81.2	84.6	6 <i>A. hyovaginalis</i> (AJ293302)
7	10.6	5.1	9.0	12.1	0.9	1.1		96.8	90.4	83.7	83.2	84.5	7 <i>A. hyovaginalis</i> (X69616)
8	10.3	5.1	8.7	11.4	0.1	0.3	0.7		93.0	84.2	83.6	85.7	8 <i>A. hyovaginalis-like</i> (AJ234064)
9	10.2	4.9	9.3	12.0	5.3	5.4	5.4	5.2		84.3	84.9	85.6	9 <i>A.odontolyticus</i> (AJ204040)
10	13.5	12.9	13.7	15.3	13.6	13.5	12.7	12.8	13.5		85.8	88.7	10 <i>Actinobaculum suis</i> (S83623)
11	11.8	11.1	11.1	12.7	12.4	12.5	12.2	12.0	11.4	11.0		91.1	11 <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> (J234059)
12	12.5	11.4	11.5	13.3	12.3	12.0	12.4	12.0	12.3	9.4	5.7		12 <i>Arcanobacterium pyogenes</i> (X79225)
13	10.4	5.2	8.8	11.9	0.1	0.2	0.9	0.1	5.2	13.0	12.3	12.2	13 Isolated strain
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	

Isolated strain	TAAGTTTGATCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCACGGCCTTGGGGTTTCTTGGGGTTGG	90
<i>A. hyovaginalis</i>	-----	72
Isolated strain	TGAGTGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCCTTCTTTGGGATAACGGTCGGAACGGCTGCTAATACTGGATATTACA	180
<i>A. hyovaginalis</i>	162
<i>Hind</i> III		
Isolated strain	CATTGTCGCATGGTGGTGTGTGGAAGCTTTTGTGGTGGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCTTACCAAG	270
<i>A. hyovaginalis</i>	252
Isolated strain	GCTTTGACGGGTAACCGGCTGAGAGGGTGACCGGTACATTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAAT	360
<i>A. hyovaginalis</i>	342
Isolated strain	TTTGACAATGGACGCAAGTCTGATGCAGCGACCCGCTGAGGGATGGAGGCCTTCGGGTTGTGAACCTCTTTCGCTCATGGTCAAGCC	450
<i>A. hyovaginalis</i>	432
Isolated strain	GCACGTGTGCGTGTGGTGAAGGTAGTGGGTAAAGAAGCGCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGCGCAGCGTTG	540
<i>A. hyovaginalis</i>	522
Isolated strain	TCCGGAATTATTGGCGTAAAGGGCTTGTAGGCGGTTGGTGTGCTCTGCCGTGAAATCCTCTGGCTTAACGGGGCGTGCGGTGGGTAC	630
<i>A. hyovaginalis</i>	612
Isolated strain	GGGCTGGCTTGAGTGCAGTGGGGAGACTG-AATTCCTGGTGTAGCGGTGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGTGGCGAAGCGC	719
<i>A. hyovaginalis</i> G.....	702
Isolated strain	GGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCTGTAACGTTGGG	809
<i>A. hyovaginalis</i> S.....	792
Isolated strain	CACTAGGTGTGGGGGCCACCCGTGGTTTCTGCGCCGTAGCTAACGCTTAAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTC	899
<i>A. hyovaginalis</i> N.....	882
Isolated strain	AAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGCACC	989
<i>A. hyovaginalis</i>	972
Isolated strain	CAGAGCCTCCAGAGATGGGGTGCAATTGGTTGGGGGTGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTGTGGGTTAA	1079
<i>A. hyovaginalis</i> Y. R.....	1062
Isolated strain	GTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGCCCTATGTTGCCAGCACGTTGTGGTGGGACTCGTGGGGACTGCCGGGGTAACTCGGAGGAAGG	1169
<i>A. hyovaginalis</i>	1152
Isolated strain	TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTACGCATGCTACAATGGCTGGTACAGAGGGTTGCGATGCTGTGAGGC	1259
<i>A. hyovaginalis</i>	1242
Isolated strain	GGAGCGAATCCCTTAAAGCTGGTCTCAGTTCGGATCGAAGTCTGCAACTCGACTTCGTGAAGGTGGAGTCGCTAGTAACTCGCAGATCAGC	1349
<i>A. hyovaginalis</i> A.....	1332
Isolated strain	AACGCTGCGGTGAATACGTTCTCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACGTACGAAAGTTGGTAACCCGAAGCTCATGGCTAACC GG	1439
<i>A. hyovaginalis</i>	1374
Isolated strain	TTTGCCGGGGGAGTGGTCAAGGTGGGATTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAACCGT	1504
<i>A. hyovaginalis</i>		1374

图 5 分离株 16S rDNA 基因测序结果

Fig. 5 Sequencing results of 16S rDNA Gene isolated strains

注: *A. hyovaginalis*: GenBank 序列号是 AF489584; Isolated strain: 从病死亡猪体内分离的菌株。

Note: *A. hyovaginalis*: GenBank No.AF489584; Isolated strain: Isolated from died piglet.

3.5 动物接种试验

5 只小白鼠接种分离菌株后, 神情立刻沉郁, 逐渐出现食欲、饮欲下降, 被毛逆立, 小便失禁, 趴卧不动, 呼吸极度困难, 均在 6 h~7 h 内死亡。小鼠

死亡后, 立刻剖检, 可见肝脏、脾、肾等充血和出血, 胸腔与腹腔有清亮积液; 并且从死亡小白鼠心脏内分离到接种的病原菌。接种无菌肉汤的对照组小白鼠, 饲养观察 30 d 未见异常。

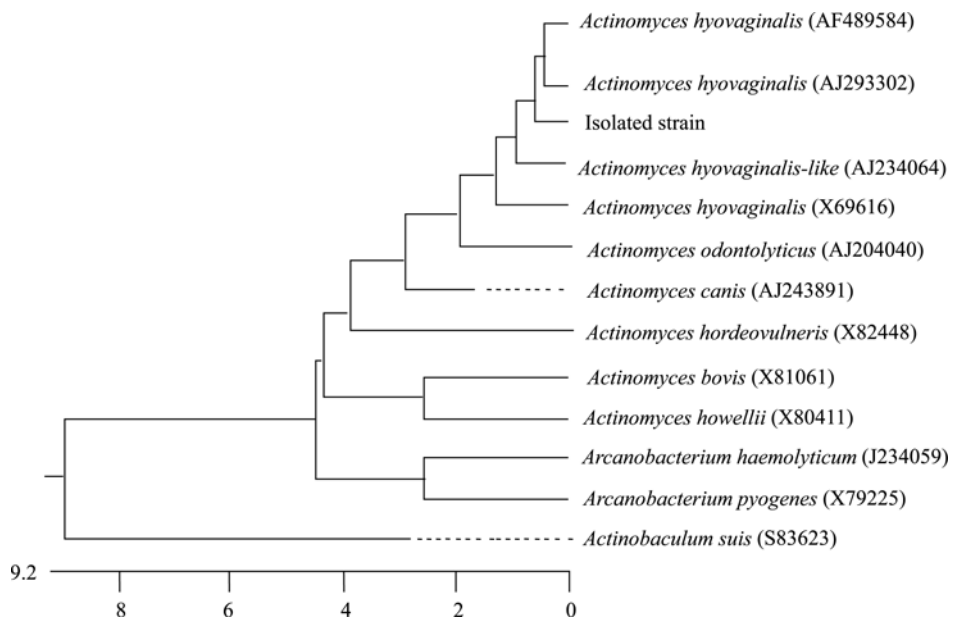


图 6 分离菌株与 GenBank 上菌株之间 16S rDNA 基因进化分析结果

Fig. 6 The analytic result of gene evolution about 16S rDNA between the isolated strains and that in GenBank

注：细菌名后括弧内字母与数字代表基因库中基因登录号；标尺代表核苷酸替代。
Note: Letter and number in parentheses behind the name of bacterium: Gene logging number in GenBank; Scale: Nucleotide Substitutions.

表 3 分离菌株药敏试验结果(单位: mm)
Table 3 The results of susceptibility test for isolated strain

药敏纸片名称 Antibiotic	抑菌环直径 Diameter	药敏制片名称 Antibiotic	抑菌环直径 Diameter	药敏纸片名称 Antibiotic	抑菌环直径 Diameter
庆大霉素 Gentamicin	28.0	壮观霉素 Actinospectacin	13.0	红霉素 Torlamician	25.0
阿米卡星 Amikacin	24.0	林可霉素 Cillimycin	15.0	链霉素 Streptomycin	18.0
米诺环素 Minocycline	22.0	新生霉素 Streptonivicin	8.0	先锋 V Aneet	6.0
复方新诺明 Chemitrim	0	氨苄青霉素 Ampicil	0	青霉素 G Penicilin G	0
乙酰螺旋霉素 Acetylspiramycin	18.0	氯霉素 Chloramphenicol	35.0		

注：抑菌环直径 20 mm~30 mm: 高度敏感; 10 mm~20 mm: 中度敏感; 10 mm 以下: 低度敏感; 0 mm: 耐药。
Note: D 20 mm~30 mm: High sensitive; 10 mm~20 mm: Mid-sensitive; <10 mm: Low sensitive; 0 mm: Resistant.

4 小结与讨论

本研究在国内首次分离到了 *A. hyovaginalis*, 并且鉴定出其生物型为“一般型”, 属于 *A. hyovaginalis* III 群菌株, 而且详细介绍了由 *A. hyovaginalis* 引起的仔猪脓毒败血症病例; 动物实验表明分离的 *A. hyovaginalis* 对小白鼠具有较强的致病性; 药物敏感性试验表明分离的 *A. hyovaginalis* 对氯霉素、庆大霉素、红霉素、阿米卡星和米诺环素等药物高度敏感, 而对复方新诺明、氨苄青霉素和

青霉素 G 等具有耐药性。
Collins 等 (1993)通过对 16S rRNA测序分析, 将这类细菌命名为新种*A. hyovaginalis*^[1]。放线菌属在分类学上一直被认为是比较复杂的^[7,8], 其中不同的种之间形态特征、生化反应和生理特征等方面都存在很大差异; 基因测序结果比较分析发现不同种之间有相当大的系统多样性, 包括*A. hyovaginalis*在内的各放线菌亚群之间 16S rDNA序列区异性可以达到 2.4%~6.6%, 而且隐秘杆菌属、罗氏菌属和动弯杆菌属与放线杆菌属在系统进化过程中都存在密

切关系^[7,9]。与*A. hyovaginalis*关系最相近的革兰氏阳性细菌是*A. pyogenes*, 而这两个种之间通过生长特征和某些生化反应很容易区分。首先*A. hyovaginalis* II 群菌落生长速度比*A. pyogenes*快, *A. hyovaginalis*在 5%的牛血培养基上不溶血或者有微弱的溶血, 此外, *A. hyovaginalis*的两个生物型都不消化石蕊牛乳, 明胶液化阴性, 水解Tween 80 和七叶苷, 芳基酰胺酶阴性。另外一个特征是, *A. pyogenes*缺乏链球菌蓝氏分群抗原G^[3]。在以前的研究中表明, 通过某些生物学特性就可以区分出*A. hyovaginalis*的 II 群和 III 群, 主要表现在如下几方面: *A. hyovaginalis* II 群菌株主要分离自病猪的化脓性阴道分泌物和流产胎儿体内; 菌落生长的比较快、扁平而且边缘不整, 这种特征在马血琼脂平板上具有二氧化碳的培养条件下更明显; *A. hyovaginalis* III 群菌株主要分离自具有化脓性病变的猪鼻腔、关节、子宫、膀胱、肾脏、肺脏和肝脏, 以及阴道分泌物^[2]; 菌落灰白色、光滑、隆起、边缘整齐, 生长速度比 II 群慢; 生化反应之间的主要区别表现在: *A. hyovaginalis* II 群马尿酸盐和硝酸还原阳性, 而*A. hyovaginalis* III 群菌株马尿酸盐阴性, 大多数菌株硝酸还原阴性。因此本实验中分离到的*A. hyovaginalis*与 III 群特征相符合, 而且 16S rDNA 序列与*A. hyovaginalis* III 群中的菌株 GenBank 登录号 AF489584 和 AJ293302 的亲缘性为 100%, 居于以上结果可以确定分离菌株属于*A. hyovaginalis* III 群。在本研究中发现, 试验中的一些生化结果与 Aalbak 等报道的结果有一些不符合, 这可能与试验中使用的培养基成份的差异有关^[1,10]。

人和牛体内的放线菌主要寄生在健康携带者的口腔黏膜, 放线菌病一般认为是由内源性感染引起^[11], 关于*A. hyovaginalis*引起猪的化脓性感染的传染来源和传播途径目前还不清楚, 有待于进一步研究。在本研究中通过流行病学调查发现, 猪群发病发生在 3 月份, 在北方蚊虫还没有繁殖起来, 而且猪只存在互相咬尾以及撕咬、环境卫生比较差等现象, 可见外伤感染可能是引起仔猪发病的直接原因。一般情况下, 在患有化脓性肺炎、关节炎等病变的病死猪体内多能分离到链球菌、葡萄球菌和化

脓隐秘杆菌等病原一种或两种以上混合感染^[10], 而本研究中仅分离到*A. hyovaginalis*, 比较少见。*A. hyovaginalis* 是近些年新发现的一种引起猪发病的病原, 因此关于本病原有待于进一步详细研究。

参 考 文 献

- [1] Collins MD, Stubbs S, Hommez J, et al. Molecular taxonomic studies of *Actinomyces*-like bacteria isolated from purulent lesions in pigs and description of *Actinomyces hyovaginalis* sp. nov.. *Int J Syst Bacteriol*, 1993, 43: 471-473.
- [2] Hommez J, Devriese LA, Miry C, et al. Characterization of two groups of *Actinomyces*-like bacteria from purulent lesions in pigs. *J Vet Med*, 1991, **B38**: 375-380.
- [3] Storms V, Hommez J, Devriese LA, et al. Identification of a new biotype of *Actinomyces hyovaginalis* in tissues of pigs during diagnostic bacteriological examination. *Veterinary Microbiology*, 2002, **84**: 93-102.
- [4] Lane DJ. 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow. ed. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester John Wiley & Sons, 1991, **120**(3) 115-147.
- [5] Marcelino TS, Stephen J. Giovannoni bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *American Society for Microbiology*, 1996, **Ei2** (2): 625-630.
- [6] 奥斯特伯 FM, 金斯顿 RE, 赛德曼 JG 等主编. 马学军, 舒跃龙等校译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 2005, pp.55-56.
- [7] Schaal KP. The genera *Actinomyces*, *Arcanobacterium* and *Rothia*. In: Balows A, Tenover HC, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (Eds.), *The Prokaryotes Vol.1*. New York: Springer, 1992, pp.850-905.
- [8] Pascual-Ramos C, Foster G, Collins MD. Phylogenetic analysis of the genus *Actinomyces* based on 16S rRNA gene sequences: description of *Arcanobacterium phocae* sp. nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov., and *Arcanobacterium pyogenes* comb. nov.. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, **47**: 46-53.
- [9] Schaal KP. Genus *Actinomyces*. In: Sneath, PHA, Mair, NS, Sharpe, ME, Holt, JG (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, MD, 1986, pp.1383-1418.
- [10] Aalbak B, Christensen H, Bisgaard M, et al. *Actinomyces hyovaginalis* associated with disseminated necrotic lung lesions in slaughter pigs. *Comp Path*, 2003, **129**: 70-77.