

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.7.02

3 株猪源绿色气球菌的分离鉴定

钱丽敏, 何依蓉, 陈梦婷, 陈培富*

(云南农业大学动物医学院, 昆明 650201)

[收稿日期] 2020-11-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021)07-0008-06 [中图分类号] S852.61

[摘要] 为确定云南省不同地区 3 个猪场仔猪发生非创伤性四肢运动障碍的病原因素, 无菌采集病死仔猪深部组织样品, 采用血琼脂分离培养病原菌, 随后对分离菌株做形态观察、生化试验、药敏试验及 16S rRNA 基因测序分析。结果: 从 3 个猪场病料中均分离到菌落及个体形态一致的细菌, 其 16S rRNA 基因序列与 NCBI 中 7 株绿色气球菌参考菌株的同源性均在 99% 以上, 据此判定为绿色气球菌(*Aerococcus viridans*); 3 个分离菌株均对克拉霉素、头孢曲松和青霉素敏感, 对复方新诺明、庆大霉素和卡那霉素耐药。鉴于未见绿色气球菌单独有强致病力的报道且病死猪有检出猪瘟病毒或猪肺炎支原体感染的情况, 研究结果证实绿色气球菌是危害猪健康养殖的重要机会致病菌, 并提示其与仔猪非创伤性四肢运动障碍有关。

[关键词] 猪; 绿色气球菌; 分离鉴定; 机会致病菌

Isolation and Identification of Three *Aerococcus viridans* Strains from Swine

QIAN Li-min, HE Yi-rong, CHEN Meng-ting, CHEN Pei-fu*

(College of Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Corresponding author: CHEN Pei-fu, E-mail: cltwins2003@sina.com

Abstract: In order to determine the pathogenic agent causing non-traumatic limb disability of piglets from 3 pig farms in different areas of Yunnan Province, the samples from deep tissues of dead piglets were aseptically collected for pathogen isolation using blood agar and the resulting bacterial isolates were then subjected to morphological examination, biochemical tests, drug susceptibility tests and sequencing of 16S rRNA gene. Consequently, bacteria obtained from the samples of the 3 pig farms had the same colony and individual morphology, and their 16S rRNA gene sequences shared a higher than 99% homology with 7 reference strains of *Aerococcus viridans* deposited in NCBI, which proved that the isolates were *A. viridans*. The 3 isolates were sensitive to clarithromycin, ceftriaxone and penicillin, and resistant to cotrimoxazole, gentamicin and kanamycin. In view of no reports that *A. viridans* itself had high pathogenicity and infection caused by classical swine fever virus or *Mycoplasma hyopneumoniae* was detected in some dead cases, the results here proved that *A. viridans*

基金项目: 云南省专家工作站项目(202005AF150041)

作者简介: 钱丽敏, 硕士研究生, 从事动物微生物学与免疫学研究。

通讯作者: 陈培富。E-mail: cltwins2003@sina.com

could be an important opportunistic bacterium that did harm to the health of pigs and indicated that this bacterium was involved in the non-traumatic limb disability of piglets.

Key words: swine; *Aerococcus viridans*; isolation and identification; opportunistic bacterium

气球菌属介于葡萄球菌属和链球菌属之间,其模式种为绿色气球菌(*Aerococcus viridans*)^[1],还包括尿道气球菌、柯气球菌、血气球菌和人尿气球菌^[2]。绿色气球菌是一类重要的机会致病菌^[3],广泛存在于自然界,如空气、土壤、动植物以及健康动物体表,若未做好消毒,可随空气和粉尘传播。绿色气球菌也被视为一种人兽共患病原菌,当人和动物机体免疫力水平降低、免疫功能不健全以及体表产生开放性外伤时,可引起人尿道感染、心内膜炎、主动脉假性动脉瘤及皮肤血管炎等疾病^[4-6]。据报道^[7],绿色气球菌感染可增加猪患其他感染性疾病的风险,最终导致仔猪生长发育受阻,出栏时间延迟,乃至引起死亡,造成重要经济损失。

近年,云南省不同地区 3 个猪场陆续发生多起仔猪非急性死亡病例,患病仔猪均表现出明显的四肢运动障碍。2015 年 3 月芒市某小型猪场仔猪群发病,前期表现发热和呼吸困难,呈犬坐姿势,后期腹泻和四肢僵直,死亡率高达 10%,病理剖检见胸腔有积液、肝脏有肿块、肺脏呈虾肉样病变,与胸膜粘连,肺组织经 PCR 扩增检出猪肺炎支原体阳性。2018 年 4 月富民县某猪场部分 2 月龄仔猪出现生长缓慢,肌肉震颤,后期出现体温升高、全身皮肤潮红,跛行,无法站立,按压背部及臀部肌肉表现疼痛,经青霉素连续治疗 4 d,无效死亡,剖检发现颌下淋巴结显著肿大。2019 年 1 月禄劝县某养猪场发生温和型猪瘟(取白细胞经 RT-PCR 扩增检测猪瘟病毒核酸呈阳性),病猪全身体表发红,精神沉郁,肌肉震颤,关节肿胀,死前口鼻流血。为确定以上 3 个猪场仔猪发生四肢运动障碍的病原因素,无菌采集病死仔猪内部组织样品进行病原检测,为防控此类疾病提供必要的参考依据。

1 材料

1.1 病料来源 分别从上述各猪场发病期间采集病猪组织样品。芒市小型猪场无菌采集病死仔猪脾脏、肝脏和肺脏各 5 份;富民县某猪场无菌采集

病死仔猪肝脏、脾脏、颌下淋巴结、腹股沟淋巴结及心包积液各 2 份;禄劝县某养猪场采集 3 月龄患病仔猪抗凝血液 2 份。

1.2 主要试剂 少量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(Lot:EG101-01)购自北京全式金生物技术有限公司,DH5 α 感受态大肠杆菌细胞(Lot:CB101)购自天根生化科技有限公司,胰蛋白酶大豆胨绵羊血琼脂等细菌培养基由实验室自行配制。

1.3 仪器设备 PCR 仪(型号 EDC-810)购自北京东胜创新生物科技有限公司;高速离心机(型号 H1650-W)购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;凝胶成像系统(型号 GELDOC-XR)购自 BIO-RAD;电热恒温培养箱(型号 303-S)购自沪南试验仪器厂;超低温冰箱购自日本 SANYO 公司;立式压力蒸汽灭菌器(型号 YXQ-50SII)购自上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

2 方法

2.1 细菌分离培养 无菌取病变组织或体液涂布绵羊血琼脂、LB 琼脂,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,挑取单个菌落继续做划线培养,直至形成外观形态完全一致的菌落,随机挑取单菌落少许菌样做革兰染色,镜检并记录细菌个体形态。

2.2 生化试验 对细菌纯培养物进行葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、山梨醇、棉籽糖、七叶苷、乙酰甲基甲醇(VP)等生化试验。37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,记录反应结果。挑取经液体培养的细菌置于两张洁净玻片上,一张滴加少量现配的 3% H₂O₂ 溶液,另一张滴加蒸馏水作为对照,观察触酶试验结果。

2.3 分离菌株 16S rRNA 基因序列测定 取 1 mL 新鲜培养菌液 12000 r/min 离心 5 min 弃上清,留取沉淀,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取菌株 DNA,以其为模板进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增。16S rRNA 基因通用引物^[8](上游引物:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3',下游引物:5'-CGG CTA CCT TGT TAC GAC TT-3')由生

工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 扩增程序:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 50 s,52 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 50 s,共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸反应 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 扩增产物,胶回收产物做 TA 克隆,随机取白色菌落样品送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,将所获基因片段序列于 NCBI 网站进行 BLAST 分析,选取同源性最高的 7 条序列(GenBank:CP014164、CP046334、GQ161096、HQ465288、KU922464、MG576151、MN932266)为参考序列,应用 MEGA6.0 软件构建系统发育树。

2.4 药敏试验 选用 9 种兽医临床常用抗菌药物,以纸片扩散法(K-B 法)测定菌株敏感性。取纯培养菌液 150 μL 均匀涂布于 M-H 琼脂平板表面,每个平板贴 4~5 片药敏片,37 ℃ 培养 18~24 h,用游标卡尺测量抑菌圈直径,按说明书判定菌株敏感性。

3 结果与分析

3.1 细菌分离培养 芒市脾脏样品、富民县肝脏和淋巴结样品、禄劝县血液样品在血琼脂均只形成白色圆形、隆起光滑、直径约 1 mm 并产生明显溶血环的菌落(图 1),转种 LB 琼脂,均形成光滑、平整的灰白色小菌落(图 2)。分离菌株依次命名为 ASV-1、ASV-2 和 ASV-3。革兰染色镜检为阳性球菌,可见四联、成团块状排列,也有单个或成双排列(图 3)。

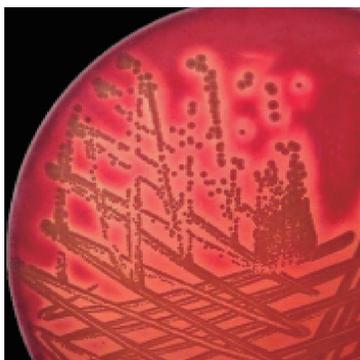


图 1 血琼脂菌落形态

Fig 1 The morphology of colonies on blood agar

3.2 生化鉴定 3 个菌株都分解葡萄糖、蔗糖、木糖、山梨醇;不分解麦芽糖、棉籽糖、蕈糖、七叶苷、水杨苷,VP 试验为阴性,不还原硝酸盐。触酶试验均为阴性。



图 2 LB 琼脂菌落形态

Fig 2 The morphology of colonies on LB agar

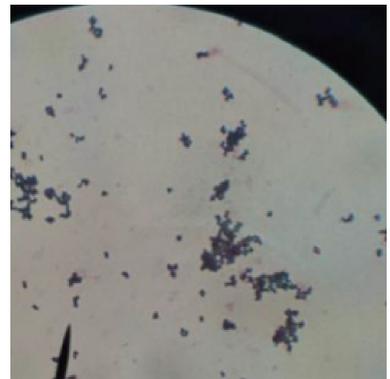
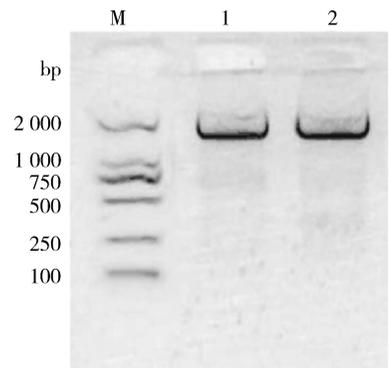


图 3 革兰染色(1000 ×)

Fig 3 The Gram stain(1000 ×)

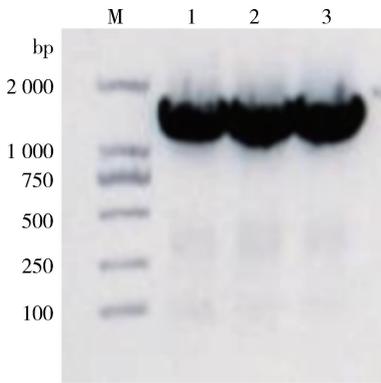
3.3 16S rRNA 基因扩增及测序结果 将所获 3 个菌株的 16S rRNA 基因序列扩增产物分别通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,均在 1500 bp 左右处出现单一的光亮条带(图 4-图 6),与预期扩增产物大小相符。



M:DL2000 DNA Marker;1-2:菌株 ASV-1

图 4 菌株 ASV-1 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物

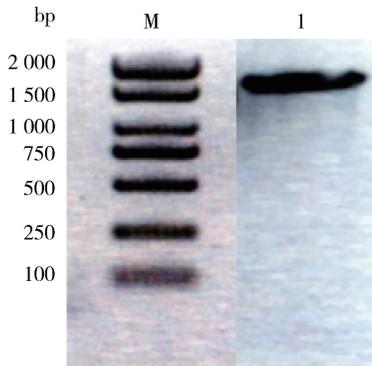
Fig 4 The PCR amplicon of ASV-1 16S rRNA gene



M:DL2000 DNA Marker;1-3:菌株 ASV-2

图 5 菌株 ASV-2 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物

Fig 5 The PCR amplicon of ASV-2 16S rRNA gene



M:DL2000 DNA Marker;1:菌株 ASV-3

图 6 菌株 ASV-3 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物

Fig 6 The PCR amplicon of ASV-3 16S rRNA gene

3.4 系统进化分析 所获 3 个分离菌株 16S rRNA 基因序列经 BLAST 分析,显示与 GenBank 收录的 7 株绿色气球菌参考菌株的同源性均在 99% 以上,据此将其判定为绿色气球菌。系统发育树显示 3 个分离菌株高度相似,且与印度分离株 MG576151 的遗传距离最近(图 7)。

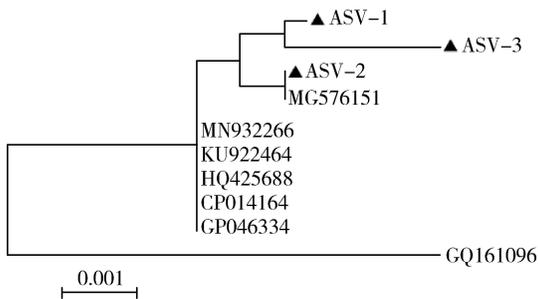


图 7 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig 7 The 16S rRNA gene - based phylogenetic tree

3.5 药敏试验结果 表 1 结果显示:3 个菌株均对头孢曲松、恩诺沙星、青霉素、氟苯尼考、克拉霉素、呋喃唑酮敏感,对卡那霉素、庆大霉素、复方新诺明等药物不敏感。

表 1 药敏实验结果

抗生素	抑菌圈直径/mm		
	ASV-1	ASV-2	ASV-3
氟苯尼考	20.23	16.20	18.64
青霉素	28.35	20.0	22.47
呋喃唑酮	25.30	23.50	21.78
恩诺沙星	24.43	20.20	23.00
头孢曲松	32.18	31.88	28.00
克拉霉素	32.50	28.80	31.00
复方新诺明	0.0	0.0	0.0
庆大霉素	0.0	0.0	0.0
卡那霉素	0.0	0.0	0.0

4 讨论与结论

近些年,绿色气球菌感染动物机体造成的危害引起人们逐步重视。越来越多的研究表明,绿色气球菌可以感染多种动物,国外主要从水产动物中分离到绿色气球菌,如龙虾、鳌虾^[9];国内报道最多的主要是人和仔猪的感染,从山羊、奶牛及竹鼠中也分离到绿色气球菌^[10-12],可见此菌感染的宿主范围很广。Clark 等^[9]研究发现,绿色气球菌的强毒株荚膜对美洲龙虾有强致病力;Liu 等^[11]从患乳腺炎的奶牛乳汁中分离到绿色气球菌,并发现此菌具有粘附和侵袭乳腺上皮细胞的能力。Sun 等^[13]也发现,夏季由绿色气球菌引起乳腺炎的比率最高,表明此菌是引起奶牛亚临床乳腺炎的重要病原。当然,绿色气球菌的致病性差异可能与菌株毒力和宿主种类有关。

本试验所获 3 株绿色气球菌分别源自云南省不同地区、不同年份的 3 个养猪场,证实此菌广泛存在于养猪环境,但未见其单独有强致病力的报道。Pan 等^[14]研究发现,从患病仔猪的关节液、脑脊液和肺脏中分离到猪链球菌和绿色气球菌,两种

病原菌混合感染可引起仔猪和小鼠急性脑膜炎,且两种病原菌“协同作用”引起小鼠的死亡率显著高于单一病原菌引起的死亡率。这 3 个猪场患病仔猪虽然均表现肢体运动障碍,其他临床症状不尽相同,可能与其原发性感染疾病不同有关。根据疾病前期或同期的核酸检测结果,可以判定芒市病例发生原发性感染为猪支原体肺炎,禄劝县病例则由猪瘟疫毒(CSFV)引起原发性感染。富民县病例未及时做其他病原检测,但出现天生痉挛症和“僵猪”样状态,这是 CSFV 垂直传播引起先天感染的典型特征。CSFV 具有淋巴细胞及上皮细胞嗜性,是引起猪免疫力下降而继发感染其他病原菌的主要因素。韩庆安等指出 CSFV 与其他病原体的混合感染非常普遍,与 CSFV 发生混合感染的病原体主要见于仔猪群及流产胎儿但在发育正常的育肥猪群中未检测到^[15]。此外,所处地理位置、气候因素及养殖环境不同的养殖场,引起继发感染的机会致病菌种类可能差异,本研究发现的是绿色气球菌感染。富民县发病仔猪虽采用分离菌株敏感的青霉素治疗,但仍死亡,可能因为感染已导致器官功能衰竭。Marein 等^[16]从不同患病猪关节液、脑积液及肺脏中分离到 58 株绿色气球菌,指出该菌可能是猪的致病菌;但刘洁等分离出的 8 株绿色气球菌,并未引起正常小鼠的发病或死亡^[17],进一步表明该菌为机会致病菌。

目前,绿色气球菌引起动物发病的相关机理尚不清楚,但凡能降低动物免疫功能的因素,如营养不良、天气骤变、免疫抑制病毒感染、应激反应等,都有可能引起绿色气球菌等机会致病菌的感染^[18]。鉴于所调查病猪普遍预后不良,预防或消除导致免疫力下降的原发性感染才是避免或控制绿色气球菌机会感染的根本办法。

本研究从不同年份、不同地区的 3 个猪场病料中均只分离到绿色气球菌,提示其存在重要的致病性,并有必要深入调查其毒力因子、感染途径以及造成继发感染的前置或协同因素,以设法减少该菌感染引起的经济损失。

参考文献:

- [1] 林华,陈世界,杨苗,等. 1 株猪源绿色气球菌的分离鉴定[J]. 畜牧与兽医,2015, 47(8): 113-116.
Lin H, Chen S J, Yang M, et al. Isolation and Identification of one strain of *Aerococcus viridans* from pigs[J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2015, 47(8): 113-116.
- [2] 李仲兴. 气球菌的研究进展[J]. 临床检验杂志, 2004, 22(2): 142-145.
Li Z X. Advances in the study of *Aerococcus*[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2004, 22(2): 142-145.
- [3] 李金钟,刘利平. 气球菌分类及鉴定进展[J]. 国外医学. 临床生物化学与检验学分册, 2005(1): 35-37.
Li J Z, Liu L P. Classification and identification of *Aerococcus* [J]. Foreign Medical Sciences (section of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine), 2005 (1): 35-37.
- [4] Yadav K, Sharma M, Agarwal S, et al. Aortic pseudoaneurysm & endocarditis caused by *Aerococcus viridans*: A case report and literature review[J]. Cardiovascular Revascularization Medicine, 2018, 19(2): 201-203.
- [5] Zhou W W, Nanci V, Jean A, et al. *Aerococcus viridans* native valve endocarditis [J]. The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology, 2016, 24(3): 155-158.
- [6] Parrey A H, Sofi F, Ahmad M, et al. *Aerococcus viridans* infection presenting as cutaneous vasculitis in an immunocompetent patient[J]. Rheumatologia, 2016, 54: 318-320.
- [7] 张乃嘉,李建波,陈宏达,等. 猪源绿色气球菌的分离与鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(9): 130-134.
Zhang N J, Li J B, Chen H D, et al. Isolation and Identification of *Aerococcus viridans* from pigs[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2018(9): 130-134.
- [8] Moreno C, Romero J, Espejo R T. Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio* [J]. Microbiology, 2002, 148: 1233-1239.
- [9] Clark K F, Wadowska D, Greenwood S J. *Aerococcus viridans* var. *homari*: The presence of capsule and the relationship to virulence in American lobster (*Homarus americanus*) [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2016, 133: 20-26.
- [10] 李楠,刘晔,张守峰,等. 一株山羊源浅绿色气球菌的分离[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015(18): 109-111.
Li N, Liu Y, Zhang S F, et al. Isolation of a strain of goat-derived *Aerococcus viridans*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2015(18): 109-111.

- [11] Liu G, Yin J H, Han B, *et al.* Adherent/invasive capacities of bovine - associated *Aerococcus viridans* contribute to pathogenesis of acute mastitis in a murine model[J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 230: 202 - 211.
- [12] 阎朝华, 文明, 周碧君, 等. 竹鼠源绿色气球菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(8): 2643 - 2651.
- Yan C H, Wen M, Zhou B J, *et al.* Isolation, identification and drug resistance analysis of *Aerococcus viridans* from *Rhizomys sinensis*[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 47(8): 2643 - 2651.
- [13] Sun M, Gao J, Ali T, *et al.* Characteristics of *Aerococcus viridans* isolated from bovine subclinical mastitis and its effect on milk SCC, yield, and composition[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2017, 49(4): 843 - 849.
- [14] Pan Z H, Ma Y, Ma J L, *et al.* Acute meningitis of piglets and mice caused by co - infected with *Streptococcus suis* and *Aerococcus viridans* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 106: 60 - 64.
- [15] 韩庆安, 许玉静, 郑丽, 等. 河北省规模猪场猪瘟病毒感染情况及发展趋势的调查[J]. *中国兽医科学*, 2009, 39(1): 89 - 94.
- Han Q A, Xu Y J, Zheng L, *et al.* Investigations on prevalence and trend of classical swine fever virus on intensive pig farms in Hebei Province[J]. *Veterinary Science in China*, 2009, 39(1): 89 - 94.
- [16] Martín V, Vela A I, Gilbert M, *et al.* Characterization of *Aerococcus viridans* isolates from swine clinical specimens [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(9): 3053 - 3057.
- [17] 刘洁, 刘梦龙, 曲久燕, 等. 猪源绿色气球菌的分离与鉴定[J]. *中国猪业*, 2019, 14(6): 26 - 30.
- Liu J, Liu M L, Qu J Y, *et al.* Isolation and Identification in *Aerococcus viridans* from swine[J]. *China Swine Industry*, 2019, 14(6): 26 - 30.
- [18] 董文龙, 王巍, 勾长龙, 等. 6 株猪源绿色气球菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(12): 2256 - 2259.
- Dong W L, Wang W, Gou C L, *et al.* Isolation, identification and drug resistance analysis of 6 *Aerococcus viridans* from swine [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(12): 2256 - 2259.

(编辑:李文平)