

# 一株奶牛“猝死症”病原菌的分离鉴定

刘胜利<sup>1</sup>, 周炳森<sup>1</sup>, 夏 成<sup>2</sup>, 周玉龙<sup>2</sup>, 吴 凌<sup>2</sup>, 张洪友<sup>2</sup>

(1. 黑龙江省垦区牡丹江分局云山农场第三、十九作业区, 虎林 158420; 2. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319)

**摘要:** 针对黑龙江省垦区牡丹江分局某奶牛场奶牛猝死症开展了流行病学调查、临床症状、病理变化及实验室诊断等工作, 证实了本次奶牛猝死症是由 A 型产气荚膜梭菌所致, 为该牛场今后防治此病提供了科学依据。

**关键词:** 奶牛; 猝死症; 病原菌; 分离鉴定

中图分类号: S858.233      文献标识码: A      文章编号: 1002-2767(2008)02-0080-02

## Identification and Isolation of a Strain of Pathogenic Bacterium from a Dairy Cows Sudden Death Syndrome

LIU Sheng-li<sup>1</sup>, ZHOU Bing-sen<sup>1</sup>, XIA Cheng<sup>2</sup>, ZHOU Yu-long, WU Ling<sup>2</sup>, ZHANG Hong-you<sup>2</sup>

(1. Homework Area Third, Nineteenth of Yunshan Farm, Mudanjiang Division, Hulin, 158420; 2. College of Animal Science and Technology, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319)

**Abstract:** A case of sudden death syndrome occurred in a dairy cow farm, Yunshan farm, Mudanjiang Division in Heilongjiang province. Pathogenic bacterium was diagnosed as a type of Clostridium perfringens by epidemiologic survey, clinical symptom, pathology, and laboratory. It is important for the dairy cow farm to prevent the disease in the future.

**Key words:** words dairy cows; sudden death syndrome; pathogenic bacterium; identification and isolation

牛猝死症(*Sudden Death Syndrome*)是以无任何前驱症状, 突然发病死亡, 全身实质器官及消化道出血、小肠分段性坏死为特征的一种急性死亡综合症。各种年龄的牛均可发病, 但以犊牛、孕牛和高产牛多发, 病死率几乎为 100%<sup>[1-3]</sup>。2007 年 4 月, 针对黑龙江省垦区牡丹江分局某奶牛场一头高产成年母牛无任何症状, 突然发病死亡的研究结果报道如下。

### 1 流行病学调查和临床表现

本次猝死的成年荷斯坦母牛, 4 岁多, 产后 1 个月, 榨乳时, 无任何前驱症状, 突然发病, 4 h 内死亡。发病时卧地不起, 不采食, 精神沉郁, 全身肌肉震颤, 结膜发绀, 呼吸急促, 心跳快而弱(110 次·min<sup>-1</sup>), 很快体温下降(37℃以下), 心跳慢而弱(48 次·min<sup>-1</sup>), 出现四肢划动, 惨叫几声, 迅速死亡。死亡后腹部迅速膨胀, 鼻腔流出红色泡沫样液体, 舌

脱出于口外, 肛门外翻呈暗红色, 呈角弓反张状态。

### 2 病理剖检变化

以全身实质器官和小肠出血为特征。尸体外观营养状况良好, 鼻孔有血样液体流出。心肌质地变软, 心内外膜有出血斑点; 血液暗红; 颌下、肩前、肠系膜淋巴结水肿, 切面有斑点状出血; 肺气肿, 有出血; 肝脏呈紫黑色, 有出血斑点; 胆囊、膀胱黏膜充血, 有少量出血点; 脾脏表面散在出血点、斑; 瘤胃、网胃、瓣胃浆膜有散在的出血点、斑; 真胃充血、出血; 小肠浆膜充血, 黏膜呈现斑块状出血或弥漫性出血; 肠内容物为暗红色粘稠液体。

### 3 病原菌的分离和鉴定

#### 3.1 细菌分离培养

无菌采取猝死牛小肠内容物、肝、淋巴结等, 分离病原菌, 接种于血液和肉汤培养基中, 37℃厌氧培养 24~48 h 后, 观察生长情况, 挑取单个菌落进行纯培养。

#### 3.2 涂片染色镜检

挑取少量细菌做涂片, 经革兰氏染色后在油镜下观察细菌形态。

收稿日期: 2007-09-30  
第一作者简介: 刘胜利(1964), 男, 黑龙江省虎林市人, 学士, 助理兽医师, 主要从事临床兽医工作。Tel: 0467-5977673  
通讯作者: 夏成(1964), 男, 博士, 教授, 主要从事临床兽医教学、科研和实践工作。Tel: 04596819202 E-mail: xcwlyxf@so-hu.com.

3.3 生化鉴定试验

甘露醇、淀粉、凝固血清和牛乳中, 37℃培养 24~48 h, 观察结果<sup>[4]</sup>。

3.4 肠毒素试验

取采集的回肠内容物适量, 加双倍量的灭菌生理盐水, 制成悬液, 3 000 rpm, 离心 20 min, 取上清, 再经 0.22 μm 超微滤膜正压过滤。将滤液分成两份, 一份经 60℃水浴加热 30 min(A 组), 另一份不加热(B 组), 分别对 2 只小鼠, 尾静脉注射, 0.3 mL·只<sup>-1</sup>[5]。

3.5 PCR 鉴定试验

3.5.1 DNA 的提取 将在 TYG 培养基中 37℃厌氧培养的细菌离心后, 菌细胞重悬于含溶菌酶(2 g·L<sup>-1</sup>)的 TE 中, 37℃孵育 1 h, 然后加入 SDS(终浓度为 1%)、EDTA(终浓度 50 mmol·L<sup>-1</sup>)和蛋白酶 K(终浓度为 150 mg·L<sup>-1</sup>), 58℃水浴 4 h, 用等体积的饱和酚重复抽提 3 次, 吸取上层水相, 加 1/5 体积的乙酸铵(10 mol·L<sup>-1</sup>)和 2 倍体积的预冷无水乙醇, 充分混匀后室温 3 000 r·min<sup>-1</sup>, 离心 10 min, 弃去上清液, DNA 沉淀至管底, 加 TE 溶解, 测定浓度, 4℃保存。

3.5.2 引物设计 根据文献报道的 A 型产气荚膜梭菌肠毒素基因一对引物分别 Primer 1: 5′-CGCGGATCCCCAATGATATAGGTAAAAC-3′, Primer 2: 5′-CCGGAATTCTTAATAGCTGTACTTTGTG-3′, 可扩增出 420 bp 基因片断<sup>[6]</sup>。

3.5.3 PCR 反应条件 在 100 μL 反应体系中, 加引物 1、2 各 0.1 μmol·L<sup>-1</sup>, DNTP 各 0.25 mmol·L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol·L<sup>-1</sup>, Taq 酶 5U 和 1 ug DNA 模板。PCR 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 40 s, 61℃ 1 min, 72℃ 50 s, 循环 30 次, 72℃ 10 min<sup>[7]</sup>。

3.5.4 PCR 产物的鉴定 取 PCR 产物 10 μL, 用 1% 琼脂糖凝胶在 1×TAE 电泳液缓冲液中电泳, EB 染色, 在凝胶成像系统(Gel Doc 2000)中观察扩增结果。

4 结果

4.1 病原菌分离培养

在厌氧培养的血琼脂平皿上生长出圆形、光滑、直径 2~4 mm、边缘不整的灰黄色菌落, 周围有明显的溶血环。厌氧肉肝汤中均匀浑浊并产生大量气体。

4.2 镜检

油镜下观察到短粗的革兰氏阳性杆菌, 两端钝圆, 单个或成双排列, 具有明显的荚膜, 无鞭毛, 少数形成芽胞。初步怀疑为产气荚膜梭菌<sup>[4-5]</sup>。

4.3 生化试验结果

分离的菌能液化明胶; 还原硝酸盐, 产生 H<sub>2</sub>S; 分解葡萄糖、乳糖、果糖、麦芽糖、蔗糖, 产酸产气; 过氧化氢酶试验呈阴性; 不水解甘露醇; 淀粉水解试验呈阴性; 不液化凝固血清; 牛乳试验呈暴烈发酵。

4.4 肠毒素试验结果

B 组 2 只小鼠不到 20 h 均死亡, A 组 2 只小鼠健活。通过本试验确认所采集的肠内容物中有毒素

存在。

4.5 PCR 产物电泳鉴定结果

经过 30 个循环后, 扩增出了与文献报道相一致的 420bp 基因片段。这证实本次奶牛猝死症病原菌是 A 型产气荚膜梭菌。

5 讨论

该病病因复杂, 一般认为是细菌(魏氏梭菌、腐败梭菌、溶血性梭菌等), 也有认为是氟乙酰胺等中毒或微量元素硒缺乏引起。近年来普遍认为奶牛猝死症是由产气荚膜梭菌引起<sup>[1-3]</sup>。

产气荚膜梭菌广泛存在于自然界中和动物的胃肠道内, 是一种条件性致病菌, 当饲料结构改变过快、缺乏纤维素饲料或含蛋白质饲料过多, 即可引起肠道菌群失调, 造成该菌大量繁殖, 引起产气荚膜梭菌肠毒血症。此外, 牛圈卫生状况差, 舍温不适, 通风不良, 饲料搭配不当等状况也可以引发此病<sup>[1, 8]</sup>。

通过传统的细菌学检验方法, 经牛乳培养基暴烈发酵试验和明胶液化试验, 根据此最突出的生化特性和其他生化试验结果, 初步确定所分离细菌为产气荚膜梭菌。通过肠毒素试验证实该菌具有强的致病性, 根据文献报道 A 型产气荚膜梭菌肠毒素基因引物和 PCR 反应体系和条件, 扩增出与文献报道相一致的 420 bp 基因片段<sup>[6-7]</sup>, 证实该致病菌为 A 型产气荚膜梭菌。故本次奶牛猝死症是由 A 型产气荚膜梭菌引起的。

目前, 针对产气荚膜梭菌引起的奶牛猝死症主要采取加强饲养管理, 避免突然变换饲料, 饲喂生态制剂, 接种多价产气荚膜梭菌灭活菌苗等综合措施预防该病的发生<sup>[9-10]</sup>。

参考文献:

[ 1 ] 李勤凡, 蒿彩菊, 王建华. 牛猝死症的研究进展[ J ]. 黄牛杂志, 2002, 28(5): 28-30.

[ 2 ] 王伟忠, 杨晓芳, 徐桂云, 等. 一起奶牛猝死症的诊断报告[ J ]. 江西畜牧兽医杂志, 2004(4): 23.

[ 3 ] 阎常平, 关淑娟, 史同瑞, 等. 奶牛猝死症的流行病学调查和综合防治[ J ]. 畜牧兽医科技信息, 2004(7): 34-35.

[ 4 ] 杨本升, 刘玉斌, 荀仕金, 等. 动物微生物学[ M ]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1995: 622-629.

[ 5 ] 陆承平. 兽医微生物学[ M ]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 318-320.

[ 6 ] Kanakaj R, Harris D L, Songer J G. Multiplex PCR assay for detection of clostridium perfringens in feces and intestinal contents of pigs and in feed[ J ]. Vet Microbiol 1998 63: 29-38.

[ 7 ] Fach P, Guillou J P. Detection by in vitro amplification of alpha-toxin gene from clostridium perfringens[ J ]. J. Appl. Bacteriol., 1993, 74: 61-66.

[ 8 ] 魏锁成, 白钧, 邹文辉, 张家川县牛“猝死症”的流行病学调查[ J ]. 黄牛杂志, 2001, 27(4): 53-56.

[ 9 ] 施远翔, 冉多亮, 盛卓君, 等. 新疆牛 A 型产气荚膜梭菌的分离与鉴定[ J ]. 新疆畜牧业, 2006(2): 37-39.

[ 10 ] 霍晓伟, 刘锴, 付明山. 牛猝死症的诊治[ J ]. 中国动物保健, 2004(10): 24-25.