

真菌培养物对耕牛“蹄腿肿烂病”的致病试验

秦 晟 汪昭贤 张士贤 陈仁文 翟俊英

(陕西省畜牧兽医研究所)

王广智 聂秀兰

(汉中地区畜牧兽医中心站) (汉 中 县 兽 医 站)

我省汉中地区耕牛发生的“蹄腿肿烂病”，经过调查研究，诊断为真菌中毒病。为了明确致病真菌种类，从根本上解决本病病因学问题，我们于1977年初至1978年3月，进行了发霉稻草的真菌分离培养及菌饲料对牛的饲喂试验。初步结果证明：木贼镰刀菌 (*Fusarium equiseti*) 与半裸镰刀菌 (*Fusarium semitectum*) 培养的菌饲料，均可分别使耕牛发生“蹄腿肿烂病”。

(一) 真菌分离与鉴定

1. 霉稻草：先后两批采集发霉稻草186份。第一批129份，于1975年8月至1976年3月，采自汉中、南郑、洋县、城固、西乡等县。第二批57份，于1976年11月至1977年元月，采自汉中、城固及南郑三县。

2. 分离培养：将发霉稻草剪成2公分左右，置烧杯内，加入0.1%升汞溶液，消毒一分钟，以灭菌蒸馏水冲洗后，分别接种于马铃薯葡萄糖琼脂和察氏琼脂培养基内，置22—25℃培养6—8天。以平皿稀释法，分别挑取不同的单个菌落，仍置同上温度培养6—8天。镜检。纯化后，挑取单个菌落，接种于察氏琼脂斜面培养基，作为供试菌，保存于冰箱备用。

3. 鉴定结果：第一批129份发霉稻草共分离出真菌有：镰刀菌属 (*Fusarium*) 青霉属 (*Penicillium*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、头孢霉属 (*Cephalosporium*)、芽枝霉属 (*Cladosporium*)、木霉属 (*Trichoderma*)、交链孢霉属 (*Alternaria*)、葡萄穗霉属 (*Stachybotrys*)、弯孢霉属 (*Curvularia*)、蠕孢霉属 (*Helminthosporium*)、卓孢霉属 (*Papularia*)、单毛菌属、核盘霉属 (*Sclerotinia*)、黑孢霉属 (*Nigrospora*)、短梗霉属 (*Aureobasidium*)、葡萄孢霉属 (*Botrytis*)、放线菌属 (*Actinomyces*)、根霉属 (*Rhizopus*)、毛霉属 (*Mucor*)、粘帚霉属

(*Gliocladium*)、毛壳霉属 (*Chaetomium*)、腐霉属 (*Pythium*)、帚霉属 (*Scopulariopsis*)、轮枝孢霉属 (*Verticillium*)、瘤孢霉属 (*Sepedonium*)、茎点霉属 (*Phoma*)、漆斑霉属 (*Myrothecium*)。

第二批57份霉稻草分离出真菌有：镰刀菌属、青霉属、曲霉属、头孢霉属、芽枝霉属、交链孢霉属、茎点霉属、瘤孢霉属、短梗霉属、黑孢霉属、葡萄穗霉属、蠕孢霉属、轮枝霉属、拟青霉属 (*Paecilomyces*) 附球霉属 (*Epicoccum*)、腐质霉属 (*Humicola*)。

(二) 产毒菌株的筛选

1. 产毒培养：从以上分离的真菌中，根据资料选取可能和本病有关的禾谷镰刀菌、木贼镰刀菌、串珠镰刀菌、半裸镰刀菌、茄病镰刀菌、烟草镰刀菌、尖孢镰刀菌、燕麦镰刀菌、本色镰刀菌、芽枝霉、交链孢霉、头孢霉、附球霉、茎点霉，分别接种于玉米粉三角瓶培养基内，置22—24℃培养7—10天，然后转入11—13℃培养30—40天。

2. 毒素提取：将上述培养物于60℃烘干，磨碎，加入乙醚(分析纯)浸渍、过滤、浓缩。浓缩物供家兔皮肤试验。

3. 家兔皮肤试验：^[1,2]选用健康家兔，在兔体两侧剪出直径约2寸的无毛部位，用卡尺测量皮肤厚度，然后用玻棒沾取浓缩物涂擦，每天两次，每次约0.3毫升，连续四天。另一侧用正常玉米粉同法用乙醚浸渍提取与涂擦，作为对照。按下述标准判定结果：

阴性：涂擦四天后，观察一周，涂部皮肤颜色、厚度均无异常。

本文于1979年6月13日收到。

中国科学院微生物研究所陈庆涛同志、北京市卫生防疫站张国柱同志协助真菌鉴定工作，特此致谢。

可疑：涂部皮肤一部分变红、微肿、微硬，厚度比涂前增加 1—2 倍，但不形成坏死。

阳性：涂部皮肤变红、肿胀显著，皮肤厚度增加 2 倍以上，并发生坏死。

试验结果：供试的 63 株菌中，阳性反应 39 株，可疑反应 12 株，阴性反应 12 株。

(三) 菌饲料之培养

1. 选择供试菌株：经家兔皮肤试验，选出产毒菌株有禾谷、木贼、串珠、半裸、燕麦、茄病、尖孢、烟草等镰刀菌，芽枝霉、交链孢霉、附球霉及头孢霉等 12 种，共 48 株。

2. 培养方法：采用三级培养法，一级培养在察氏试管斜面培养基，二级培养在三角瓶玉米粉培养基，三级培养在玉米粉培养筛内。先置 20—28℃ 培养 7—10 天，然后转入 2—15℃ 培养 20—40 天，即收贮饲喂。

(四) 菌饲料对牛饲喂试验

1. 分组与饲喂方法：选择营养中等以上的健康牛 23 头，分五个组。

第一组：水牛 3 头、黄牛 2 头，饲喂木贼镰刀菌饲料。

第二组：水牛 3 头、黄牛 2 头，饲喂半裸镰刀菌饲料。

第三组：水牛 2 头、黄牛 2 头，饲喂禾谷、串珠、燕麦、茄病、烟草及尖孢等镰刀菌等量混合菌饲料。

第四组：水牛 2 头、黄牛 2 头，饲喂芽枝霉、交链孢霉、头孢霉及附球霉等量混合菌饲料。

第五组：对照组，水牛 3 头，黄牛 2 头，饲喂优质玉米粉饲料。

饲喂菌饲料组，于开始的半个月，每头每天喂菌饲料 2 斤，半月后增至 3 斤。对照组每头每天饲喂玉米粉 2 斤。各组牛自由采食优质稻草。

试验前，对试验牛进行体温、脉搏、呼吸、食欲、大小便、血常规检查及四肢系部管围的测量。1978 年元月 10 日至 3 月 31 日，进行饲喂试验，每日观察试验牛情况。

2. 试验结果

第一组：试验牛 5 头。3 头(水牛 12 号、15 号及黄牛 21 号)出现“蹄腿肿胀烂病”病状。

12 号水牛于元月 2 日开始喂菌饲料，6 日发现左后肢系部微热微肿、干裂出血。17 日，尾端柔软溃烂，有三条环形裂口，血液渗出。18 日，尾尖坏死脱落 1 厘米，左前肢蹄冠部出现干裂。22

日，右后肢系部出现铜钱大破口，并有灰黄色液体渗出。25 日，右后肢蹄冠外侧有干裂口三条，长 1 厘米，两后肢股部以下皮肤干硬龟裂，乳房表面



图 1 12 号水牛左后肢提举



图 2 12 号水牛股外侧皮肤干裂



图 3 12 号水牛乳房及股内侧皮肤干裂

有一些小豆大干痂。2月16日,尾端10厘米共有环形裂口六条。27日,尾端长达14厘米出血,尾尖3厘米干硬如木棒样。3月8日,左后肢附关节皮肤干裂,悬蹄上部有1厘米长的干裂,左后肢系部微肿、微热,蹄冠部管围较原来增宽3厘米。13日左前肢蹄冠部干裂。间歇性的患肢提举在整个试验期经常出现。(图1—5)。试验后期上述症状逐渐消失。



图4 12号水牛附关节部皮肤干裂坏死



图5 12号水牛尾尖坏死

15号水牛于元月10日开始喂菌饲料,16日左后肢出现间歇性提举,并以舌舐系部,局部微热微痛。以后,两后肢不断交替提举。

21号黄牛于10日喂菌饲料,23日见右后肢蹄冠与系部肿胀,以后干裂,形成长2—4厘米环形裂口四条(图6)。肿部微热、疼痛、站立与行走困难。元月30日,卧地不起,可视粘膜苍白,极度贫血,红血球减少至231万/毫米³,于2月7日死于心力衰竭。

第二组: 试验牛5头,2头水牛(8号、11



图6 21号黄牛右后肢系部肿胀,皮肤干裂

号)出现“蹄腿肿烂病”病状。

8号水牛饲喂菌饲料后第10天至18天,右后肢肿胀较原管围增宽2.5厘米,患部微热微痛,有裂口,患肢间歇性提举(图7)。



图7 8号水牛右后肢肿胀

11号水牛出现症状大致相同。

第三组: 试验牛4头(公牛3头、母牛1头)。试验期均未出现“蹄腿肿烂病”病状。

9号母水牛在饲喂菌饲料后第16天,外阴部肿胀,频频排尿。以后,肿胀更为明显(图8),有淡黄白色粘液流出。

第四、五两组: 均未出现“蹄腿肿烂病”病状。

各组牛试验前后体温、脉搏、呼吸及血液学检查,均无明显规律性变化。

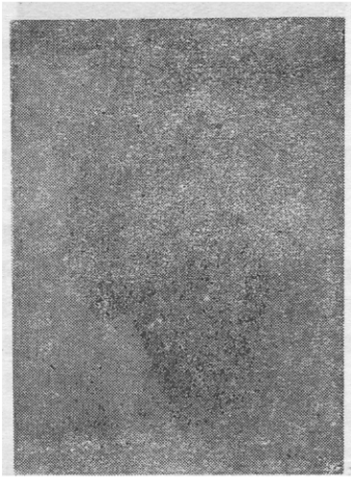


图8 9号水牛外阴部明显肿胀

讨 论

1. “蹄腿肿烂病”致病真菌种类

几年来我们经过调查研究,确定了本病的真菌中毒病因,并从发霉稻草上分离出真菌数百株,通过生物学试验,筛选出产毒菌株,对牛进行菌饲料饲喂试验。结果证明木贼镰刀菌与半裸镰刀菌的培养菌饲料均可分别使试验牛发生“蹄腿肿烂病”。

Cunningham^[3]报道,饲喂茅状羊茅(*fescue*)的牛,发生“茅状羊茅蹄病”(fescue foot),临床表现蹄腿肿烂症状,因此认为与饲喂这种牧草有关。

有的作者认为这种坏死性综合症,可能由于木贼镰刀菌的毒素引起的。

2. 镰刀菌的产毒条件

Mirocha等氏^[4]将禾谷镰刀菌培养在24—27℃,1—2周,然后置12—14℃,4—6周,即可

产生大量F₂毒素,而在高温培养不产毒素,或仅产生微量毒素。

我们从发霉稻草上分离的部分真菌,在22—25℃培养,待产生孢子后,转入7—15℃继续培养。通过对家兔皮肤试验结果亦可证明低温较常温培养的菌所产毒素的毒力强,在35株镰刀菌中,产毒菌达20株。

从流行病学规律来看,我省耕牛的“蹄腿肿烂病”、国外的“茅状羊茅蹄病”以及马匹的“大群疾病”(massive illness)、人类的食物中毒性白血球缺乏症(alimentary toxic aleukia)等,均发生在冬春季节,说明镰刀菌的产毒条件与温度(低温)有着密切关系。

3. 人工复制与自然病例的临床差异

试验组饲喂木贼与半裸镰刀菌的部分牛,虽然分别发生了“蹄腿肿烂病”,但与自然病例相比,其症状较轻(自然病例中亦有不少症状轻微的牛),分析原因可能有以下几个方面:

(1) 镰刀菌在人工培养基上移植数代后,可能发生改变,其产毒能力随之减弱。

(2) 菌饲料内真菌毒素含量较少,尚不足以引起牛发生剧烈的病变。

(3) 菌料饲喂量偏小。

(4) 环境因素(气温、湿度等)的影响。

参 考 资 料

- [1] 北京市卫生防疫站:《卫生防疫微生物检验规程》,石家庄第七印刷厂,石家庄,1975,第273页。
- [2] 方时杰等:畜牧兽医学报,2:30,1957。
- [3] Cunningham, I. J.: *Aust. Vet. J.*, 25: 27, 1949.
- [4] Mirocha, L. T. et al.: *Appl. Microbiol.*, 15: 497, 1967.