

胡 波,魏后军,范志宇,等.兔流行性腹胀病样品中产气荚膜梭菌的分离鉴定[J].江苏农业科学,2020,48(6):160-163.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.06.032

# 兔流行性腹胀病样品中产气荚膜梭菌的分离鉴定

胡 波,魏后军,范志宇,仇汝龙,薛家宾,王 芳

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业农村部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室,江苏南京 210014)

**摘要:**从发生典型病理特征的兔流行性腹胀病死亡兔盲肠内容物中分离到 1 株产气荚膜梭菌,命名为 SD14-02。经革兰氏染色、生化鉴定、16S rRNA 比对和毒素型特异性 PCR 等方法对分离细菌进行鉴定和分型,结果显示,分离株 SD14-02 为革兰氏阳性杆菌,生化鉴定显示其符合产气荚膜梭菌的生化图谱。经系统发育分析,SD14-02 的 16S rRNA 基因序列与产气荚膜梭菌位于同一分支。经毒素型特异性 PCR 方法鉴定,SD14-02 为 A 型产气荚膜梭菌,蛋白电泳显示其与 A 型产气荚膜梭菌疫苗株苏 84-A 存在一定差异。动物试验证明 SD14-02 对小鼠具有致病性。研究结果为兔流行性腹胀病致病源的进一步研究奠定了基础。

**关键词:**兔流行性腹胀病;产气荚膜梭菌;分离;鉴定

**中图分类号:** S858.291 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)06-0160-04

兔流行性腹胀病是一种由特定病原菌引起的兔肠道综合征,具有一定的传染性和流行性,但病原未知<sup>[1]</sup>。中国于 2004 年首次发生该病,且近年来在我国江苏和山东等省份仍有该病的发生与流行。该病主要发生于断奶仔兔至 4 月龄兔,表现为腹部臃胀、胶冻样黏液排泄物,病理剖检可见盲肠内容物干硬成块状,结肠内存在大量胶冻样黏液,胃及小肠内充满液体和气体,发病兔死亡率最高可达 90% 以上<sup>[1-2]</sup>。该病的临床症状与病理变化与 1996—1997 年法国报道的未知病原的兔流行性肠病<sup>[3-4]</sup>十分相似,很多学者认为两者为同一种病<sup>[4]</sup>。

国外研究表明,兔流行性肠病为多病原共同作用的结果,且产气荚膜梭菌是该肠道综合征的重要致病原之一<sup>[5-6]</sup>。肠道菌群分析也表明梭菌属是病兔盲肠中特异性升高的致病菌群之一<sup>[7]</sup>。从病兔盲肠样品中分离的产气荚膜梭菌具有一定的致病性,通过口服途径攻击断奶兔后,部分兔表现为盲肠阻塞症状,但不能复制出该病的其他特征,也不能引起死亡。这与常见的导致家兔肠毒血症的 A 型产气荚膜梭菌在临床症状和病理变化上有明显

差异。本研究采用产气荚膜梭菌特异性鉴定培养基成功从兔流行性腹胀病盲肠样品中分离出 1 株产气荚膜梭菌,毒素基因分型结果显示为 A 型,且具有致病性,为该病致病源的进一步研究奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与培养基

卵黄琼脂培养基、产气荚膜梭菌鉴定培养基、多价蛋白胨-酵母膏(PY)培养基均购自青岛海博生物科技有限公司;细菌微量生化反应管购自杭州微生物试剂有限公司;细菌 DNA 抽提试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司;Pfu 高保真酶 Mix 购自北京擎科生物科技有限公司;凝胶回收纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司;SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 实验动物

清洁级 ICR 小鼠,购自扬州大学比较医学中心。

### 1.3 引物

参照 Corby-Harris 等的方法<sup>[5]</sup>合成细菌 16S rRNA 基因通用引物;根据产气荚膜梭菌  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\iota$  毒素基因 *cpa*、*cpb*、*etx*、*iA* 序列,参照 Yoo 等的方法<sup>[8]</sup>合成产气荚膜梭菌特异性分型引物。引物均由上海 Invitrogen 公司合成(表 1)。

### 1.4 细菌分离培养

取含 20% 甘油冻存的兔流行性腹胀病盲肠内

收稿日期:2019-02-14

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-43-C-1)。

作者简介:胡 波(1982—),男,江苏南京人,博士,副研究员,主要从事畜禽疫病防控与兽医生物技术研究。E-mail:hubolshg@163.com。

通信作者:王 芳,博士,研究员,主要从事畜禽疫病防控及免疫机理研究。E-mail:rwangfang@126.com。

表 1 各目的基因的引物序列

基因	引物序列 (5'→3')	片段大小 (bp)
16S	F:AGAGTTTGATCMTGGCTCAG;R:GGTTACCTTGTTACGACTT	约 1 500
<i>cpa</i>	F:GTTGATAGCGCAGACATGTTAAG;R:CATGTAGTCATCTGTTCCAGCATC	402
<i>cpb</i>	F:ACTATACAGACAGATCATTCAACC;TTAGGAGCAGTTAGAACTACAGAC	236
<i>etx</i>	F:ACTGCAACTACTACTCATACTGTG;CTGCTGCCTTAATAGAAAGACTCC	541
<i>iA</i>	F:GCGATGAAAAGCCTACACCACTAC;GGTATATCCTCCACGCATATAGTC	317

容物 1 mL,加入 2 mL 无菌水,混匀后 500 r/min 离心 10 min,取 200 μL 上层液接种于含 5% 葡萄糖的 PY 液体培养基,37 ℃ 厌氧培养过夜后,划线于卵黄琼脂平板,37 ℃ 厌氧培养 24 ~ 48 h 后,选取具有卵磷脂酶活性的疑似菌落,于产气荚膜梭菌鉴定培养基平板上进一步分离纯化。经多次纯化培养后,挑取单个菌落,进行革兰氏染色及镜检观察。

1.5 分离菌株生化试验

利用细菌微量生化反应管对分离纯化的菌株进行生化指标测定。将菌株接种于葡萄糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、甘露醇、水杨苷、硫化氢、吡啶、硝酸盐(还原)、明胶等微量生化反应管,37 ℃ 厌氧培养 24 h,观察结果。

1.6 分离菌株 16s rRNA 基因的分析

1.6.1 分离细菌基因组 DNA 的提取 采用分离菌株培养物,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取细菌的基因组 DNA。

1.6.2 分离菌株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增 以提取的基因组 DNA 为模板,应用细菌 16S rRNA 基因的通用引物进行 PCR 扩增。反应体系如下:2 × PCR Mix 12.5 μL,模板 DNA 1.0 μL,10 μmol/L 上下游引物各 1.0 μL,加 ddH<sub>2</sub>O 至总体积 25.0 μL;后执行下列反应条件:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 5 min,结束反应。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析后,以 DNA 凝胶回收试剂盒对目的片段进行回收纯化。

1.6.3 16S rRNA 基因的序列分析 将回收纯化的 PCR 扩增产物直接进行序列测定,由上海 Invitrogen 公司测序。测序结果在 NCBI 数据库中以 BLAST 程序进行同源性比对,并从 RDP 数据库中选取相似性较高的代表菌株 16S rRNA 序列,用 MEGA 5.2 软件中 Kimura-2 参数矩阵的邻接法构建系统发育树。

1.7 分离菌株 PCR 分型鉴定

由表 1 可知,产气荚膜梭菌 *cpa*、*cpb*、*etx*、*iA* 序列

特异性引物对分离菌株进行 PCR 扩增,以产气荚膜梭菌疫苗株苏 84 - A 为对照。反应体系和反应条件同“1.5.2”节 PCR 扩增条件。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析后,用凝胶成像系统观察结果并拍照。

1.8 分离菌株的 SDS - PAGE 分析

取厌氧培养的分离菌株 SD14 - 02 和疫苗株苏 84 - A,12 000 r/min 离心收集菌体,PBS 洗涤 2 次后冰浴超声破碎,取全菌蛋白进行 12% SDS - PAGE 电泳分析。

1.9 小鼠致病性试验

将分离菌株培养物经过平板计数后,分别以 1 × 10<sup>9</sup> CFU/只和 2 × 10<sup>9</sup> CFU/只的剂量各腹腔注射 6 只 6 周龄 ICR 小鼠,进行 ICR 小鼠攻毒试验。攻毒后观察并记录死亡情况,并对死亡动物进行剖检和细菌分离。

2 结果与分析

2.1 细菌分离培养

在厌氧条件下,经过卵黄琼脂培养基和产气荚膜梭菌鉴定培养基的分离和筛选,从发生典型兔流行性腹胀病特征的盲肠样品中分离得到 1 株产气荚膜梭菌,命名为 SD14 - 02,革兰氏染色镜检可见两端钝圆的革兰氏阳性杆菌(图 1)。

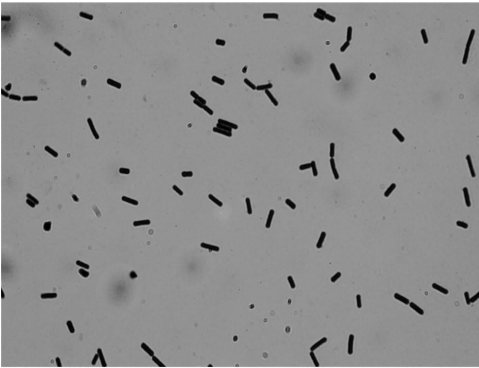


图1 分离菌株 SD14-02 的革兰氏染色(10 × 100)

2.2 分离菌株的生化反应

对分离纯化的菌株进行了 11 项生化指标的鉴

定,结果显示,分离菌株符合《伯杰氏细菌鉴定手册》(第八版)关于产气荚膜梭菌的生化图谱(表 2)。

表 2 分离菌株 SD14-02 的生化特性

生化项目	结果	生化项目	结果
葡萄糖	+	水杨苷	-
甘露糖	+	硫化氢	+
麦芽糖	+	吲哚	-
乳糖	+	硝酸盐	+
蔗糖	+	明胶液化	+
甘露醇	-		

2.3 分离菌株 16S rRNA 分析

以 SD14-02 株提取的细菌基因组 DNA 为模板,采用 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增,获得大小在 1.5 kb 左右的特异性条带。将回收纯化的 PCR 产物进行序列测定,所得基因序列提交 GenBank 数据库 (GenBank NO. KX986316)。16S rRNA 序列在 RDP 数据库中比对后,构建系统发育树,结果显示,SD14-02 与产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 位于同一分支(图 2),表明分离菌为产气荚膜梭菌。

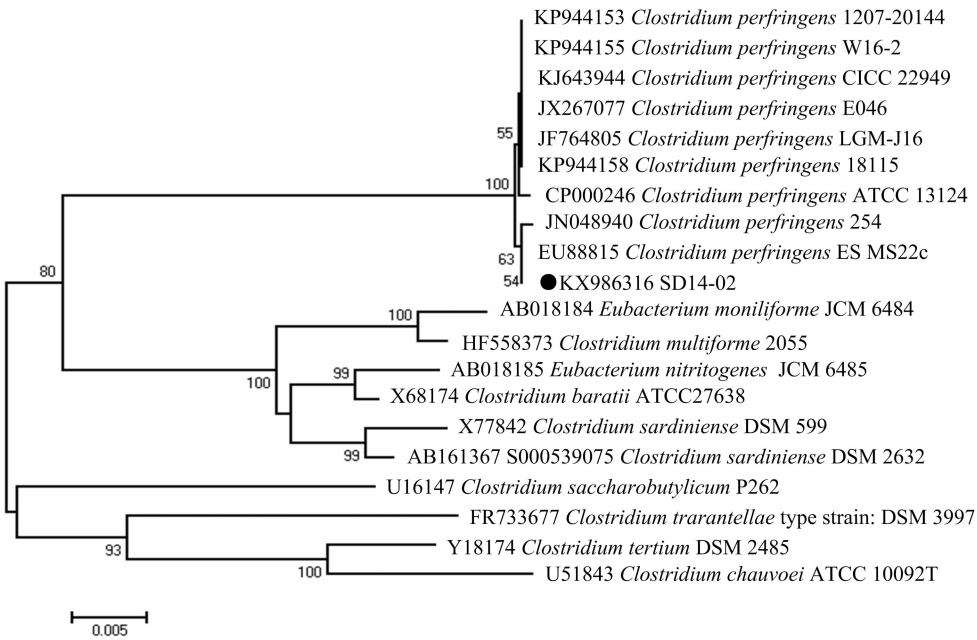


图2 分离菌株 SD14-02 16S rRNA 基因的系统发育树

2.4 分离菌株的基因分型

以产气荚膜梭菌 *cpa*、*cpb*、*etx*、*iA* 序列特异性引物对分离菌株进行 PCR 扩增,以产气荚膜梭菌疫苗株苏 84-A 株为对照,经电泳鉴定,产气荚膜梭菌 SD14-02 和苏 84-A 均扩增出大小约为 400 bp 的特异性条带,与 *cpa* 基因片段大小一致,但未扩增出 *cpb*、*etx* 和 *iA* 基因的特异性条带(图 3)。将扩增得到的阳性基因片段测序后进行 BLAST 比对,结果显示其为产气荚膜梭菌 *cpa* 基因,表明分离株 SD14-02 与苏 84-A 一致,为 A 型产气荚膜梭菌。

2.5 分离菌株全菌蛋白的 SDS-PAGE 分析

对分离菌株 SD14-02 进行全菌蛋白 SDS-PAGE 分析,以产气荚膜梭菌疫苗株苏 84-A 为对照,经电泳鉴定,两者的全菌蛋白条带在 40~100 ku 之间有明显差异(图 4)。

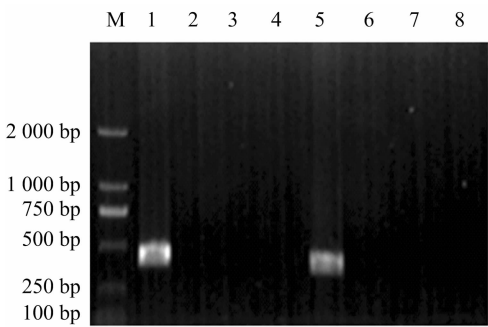
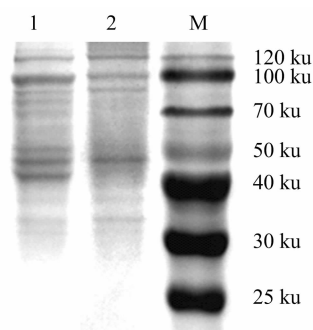


图3 分离菌株毒素基因的 PCR 鉴定

2.6 动物致病性试验

对产气荚膜梭菌分离株 SD14-02 培养物进行平板计数,并将分离菌以不同的剂量腹腔注射 ICR 小鼠,由表 3 可知,所有 ICR 小鼠于 2 d 内死亡,从小鼠肝脏中可分离到纯净的产气荚膜梭菌。



M—蛋白质相对分子质量标准；1—苏 84-A 全菌蛋白；2—SD14-02 全菌蛋白

图4 分离菌株的 SDS-PAGE 分析

表 3 ICR 小鼠攻毒试验

组别	样品	注射方式	注射剂量	死亡数/攻毒数 (只)
试验组 1	菌液	腹腔注射	1 × 10 <sup>9</sup> CFU/只	6/6
试验组 2	菌液	腹腔注射	2 × 10 <sup>9</sup> CFU/只	6/6
对照组	PBS	腹腔注射	0.2 mL/只	0/6

3 讨论

目前,国内外研究仍未明确兔流行性腹胀病的病原,但部分研究发现病兔盲肠内容物经处理后通过口服可以成功复制该病<sup>[6]</sup>。国外学者等通过蔗糖密度梯度离心法对盲肠内容物中微生物进行了分层,通过口服攻击断奶兔,初步证明兔流行性腹胀病是由细菌感染引起而非病毒或寄生虫感染引起<sup>[6,9]</sup>。在此基础上,也排除了一些通过盲肠菌群比对得到的特殊分离菌是该病病原的可能性,如 R6B 阳性葡萄球菌<sup>[10]</sup>。另外,国内外学者发现部分抗生素如泰乐菌素、复方新诺明、恩拉霉素等对兔流行性腹胀病的治疗有一定效果<sup>[1,2,11]</sup>,也提示该病为一种细菌性传染病。之后,有学者在对盲肠内容物的细菌菌群进行分析时发现兔盲肠中梭菌属所占比列显著高于正常对照组<sup>[7]</sup>,且产气荚膜梭菌与兔流行性腹胀病的病因密切相关<sup>[5,6,12]</sup>。单独分离的产气荚膜梭菌经口服途径攻击,部分断奶兔可出现兔流行性腹胀病特有的盲肠内容物干硬阻塞的病理变化,但未表现出该病的其他特征<sup>[13]</sup>。这些研究提示产气荚膜梭菌可能是兔流行性腹胀病的重要致病病原之一,但并非是唯一致病病原。

本研究通过产气荚膜梭菌特异性分离培养基成功从保存的兔流行性腹胀病样品中分离到 1 株产气荚膜梭菌,且分离菌株在小鼠上具有致病性。由于兔流行性腹胀病与常见的导致家兔肠毒血症的产气荚膜梭菌病在临床症状和病理变化上有明显

差异,因此本研究对分离菌株和产气荚膜梭菌疫苗菌株进行了毒素基因分型,结果显示所分离的产气荚膜梭菌与疫苗株均为 A 型,但两者的全菌蛋白条带在 40 ~ 100 ku 之间有明显差异,暗示从兔流行性腹胀病样品中分离的产气荚膜梭菌 SD14 - 02 与苏 84 - A 疫苗株有一定差异。本研究将为进一步分析新型产气荚膜梭菌与疫苗株的差异及其与致病性的关系奠定基础。

参考文献:

[1]薛家宾,尹秀凤,周勇岐,等. 兔流行性腹胀病[J]. 中国养兔杂志,2008(1):26-28.

[2]林 毅,罗宜熟,谢 晶,等. 家兔“流行性腹胀病”的病因和防治研究初报[J]. 中国养兔杂志,2008(11):27-30.

[3]Licois D, Wyers M, Coudert P. Epizootic rabbit enteropathy: experimental transmission and clinical characterization [J]. Veterinary Research,2005,36(4):601-613.

[4]坤清芳,耿 毅,邓钊宾,等. 家兔流行性腹胀病病因及其防治措施[J]. 黑龙江畜牧兽医,2015(14):142-144.

[5]Marlier D, Dewrée R, Lassence C, et al. Infectious agents associated with epizootic rabbit enteropathy: isolation and attempts to reproduce the syndrome[J]. Veterinary Journal,2006,172(3):493-500.

[6]Szalo I M, Lassence C, Licois D, et al. Fractionation of the reference inoculum of epizootic rabbit enteropathy in discontinuous sucrose gradient identifies aetiological agents in high density fractions[J]. Veterinary Journal,2007,173(3):652-657.

[7]Bäuerl C, Collado M C, Zúñiga M, et al. Changes in cecal microbiota and mucosal gene expression revealed new aspects of epizootic rabbit enteropathy[J]. PLoS One,2014,9(8):e105707.

[8]Yoo H S, Lee S U, Park K Y, et al. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35 (1):228-232.

[9]Huybens N, Houeix J, Licois D, et al. Pyrosequencing of epizootic rabbit enteropathy inocula and rabbit caecal samples[J]. Veterinary Journal,2013,196(1):109-110.

[10]Huybens N, Houeix J, Licois D, et al. Epizootic rabbit enteropathy: comparison of PCR - based RAPD fingerprints from virulent and non - virulent samples [J]. Veterinary Journal, 2011, 190 (3): 416-417.

[11]Huybens N, Houeix J, Licois D, et al. Epizootic rabbit enteropathy inoculum (TEC4): antibiograms and antibiotic fractionation [J]. Veterinary Research Communications,2011,35(1):13-20.

[12]Sahl J W, Rasko D A. Analysis of global transcriptional profiles of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolate E24377A [J]. Infection and Immunity,2012,80(3):1232-1242.

[13]Badiola I, Perez D A, Gonzalez J, et al. Recent advances in ERE in growing rabbits [C]//Proceedings of the 11th World Rabbit Congress. Qingdao( China ),2016:491-502.