

团体标准

T/ NAIA×××-××××

规模化肉牛场牛产气荚膜梭菌病的诊断与 防治技术规程

Technical protocol for the diagnosis and prevention of *Clostridium*
perfringens in large-scale beef cattle farms

××××-××-××发布

××××-××-××实施

宁夏化学分析测试协会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏农林科学院动物科学研究所、宁夏大学、宁夏回族自治区畜牧工作站、宁夏回族自治区动物疾病预防控制中心、宁夏回族自治区兽药饲料监察所。

本标准主要起草人：郭亚男、李珂、王建东、李知新、祁燕蓉、李昕、梁小军、李勇、杨萌萌、陈秀红、闫背背、李继东、曹晓真、黎玉琼、邵倩、白涛涛、张慧宁、谢建亮、毛磊、施安、周海宁、康晓冬、高海慧、张久盘、封元、蒋秋斐、历龙。

本文件为首次发布。

规模化肉牛场牛产气荚膜梭菌病的诊断与防治技术规程

1 范围

本文件规定了规模化肉牛场牛产气荚膜梭菌病的诊断与防治技术的术语和定义、诊断、预防和治疗。

本文件适用于规模肉牛场牛产气荚膜梭菌病的防治。其他肉牛场参照执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 4789.13 食品安全国家标准 食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求。

SN/T 2709 国境口岸产气荚膜梭菌毒素检测方法。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 产气荚膜梭菌 *Clostridium perfringens*

又名魏氏梭菌（*Clostridium Welchii*），为梭状芽胞杆菌属，是厌氧、无动力、能产生芽胞的革兰氏阳性杆菌，在机体内可形成荚膜。本菌广泛存在于土壤，动物和人的肠道，通过污染的饲料和饮水而引起动物感染发病。

3.2 产气荚膜梭菌毒素 *Clostridium perfringens* toxins

产气荚膜梭菌引起动物发病的因素主要由其分泌的毒素所致，根据其产生的毒素种类 α 、 β 、 ι 、 ϵ 、CPE、NetB，可将产气荚膜梭菌分为A~G七种类型，其中对人和动物致病的主要是A型（产生 α 毒素，部分菌株还产生肠毒素CPE），主要引起食物中毒和坏死性肠炎，甚至可以引起肠毒血症，造成重大影响。

3.3 汹涌发酵 (stormy fermentation)

产气荚膜梭菌在牛奶培养基中能分解乳糖产酸，使酪蛋白凝固，同时产生大量气体，将凝固的酪蛋白冲成蜂窝状，并将液面上的凡士林层向上推挤，甚至冲开管口，气势凶猛，是此菌的特征。

4 诊断

4.1 流行病学

产气荚膜梭菌能使不同年龄不同品种的牛发病，主要呈零星散发或区域性流行，一年四季均有发生，但春末、秋初及气候突然变化时发病率明显升高。寄生于动物体的产气荚膜梭菌，内环境因饮食改变以及天气变化而发生变化菌群大量繁殖并产生相应的毒素，致使动物发病。

4.2 临床症状

在肉牛养殖业中多呈散发性，但病程发展快、死亡率高，主要症状表现为牛突然倒地、两眼呆滞、眼球突出、全身抽搐并伴有角弓反张，腹部明显膨胀，采食和反当机能减甚至废绝，瘤胃、瓣胃和网胃积食严重，皱胃严重扩张。

4.3 病理变化

病理剖检变化主要为全身实质性器官广泛出血，肠系膜淋巴结充血肿大，肝脏质地坚实呈土黄色；小肠极其膨胀，肠体扩张明显，肠壁外观呈暗黑色，肠腔内充满大量气体；切开肠壁后，流出黑色稠状液体。

4.4 样本采集

剖检后无菌采集病牛肠系膜淋巴结、肝脏及肠道组织进行病原学诊断。样品采集后应尽快检验，若不能及时检验，可在 2℃~5℃保存；如 8 h 内不能进行检验，应-20℃保存。样品解冻时，置于 38℃~40℃水浴解冻。

4.5 分离培养

5%脱纤维羊血豆粉固体培养基配制见附录 A.1，产气荚膜梭菌显色培养基配制见附录 A.2，实验用水应符合 GB/T 6682 规定。

将采集的内脏组织表面火焰灭菌，剪取深部组织一小块 (0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm)，在无菌条件下，分别接种 3 个含有 5%脱纤维羊血的豆粉固体培养基和 3 个产气荚膜梭菌显色培养基。将固体培养基放入厌氧袋，倒置于 37℃恒温培养箱培养 24 h 后，观察菌落形态，挑取血平板培养基上疑似单菌落接种于新的血平板培养基，37℃厌氧培养 24 h。血平板培养基上呈现出灰白色、表面湿润、

半透明、中部凸起菌落，菌落周围出现双层溶血现象，内层完全溶血，外层不完全溶血，见附录 B.1；梭菌显色培养基上出现若干单个橙红色菌落，见附录 B.2。

4.6 显微镜观察

挑取血平板培养基上的单菌落进行革兰氏染色，显微镜下观察菌体形态，为两端顿圆、短杆状、蓝紫色、单个或者成对排列的革兰氏阳性菌，见附录 B 中图 B.3。

4.7 牛乳爆裂发酵

挑取 5 %脱纤维羊血固体培养基上的单菌落，加入含铁牛乳培养基（附录 A.3）中，将凡士林融化沿管壁加入试管中，形成密闭的厌氧环境。同条件下做一空白对照，将试管放置于 37℃恒温培养箱培养 24 h 后，观察到产气荚膜梭菌产生大量气体将凝固的酪蛋白冲散形成蜂窝状，并将液面上的凡士林向上推挤，气势凶猛，呈现出“爆裂发酵”的现象。

4.8 PCR 鉴别诊断

4.8.1 PCR 扩增模板制备

取液体培养物 2 mL，12 000 r/min 离心 2 min，使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒对菌体沉淀进行基因组 DNA 的提取。

4.8.2 毒素基因的 PCR 引物

表 1 毒素基因的 PCR 扩增引物序列

基因	引物	引物序列(5'→3')	片段大小/bp
<i>Cpa</i>	<i>cpa</i> -F	GCTAATGTTACTGCCGTTGA	325
	<i>cpa</i> -R	CCTCTGATACATCGTGTAAG	
<i>Cpb</i>	<i>cpb</i> -F	ACTATACAGACAGATCATTCAACC	236
	<i>cpb</i> -R	TTAGGAGCAGTTAGAACTACAG	
<i>EtX</i>	<i>etx</i> -F	AGTATCTAATGAAATGTCCATTCC	585
	<i>etx</i> -R	ACTTACTTGTCCTAC	
<i>Itx</i>	<i>itx</i> -F	ACTACTCTCAGACAAGACAG	445
	<i>itx</i> -R	TTTCCTTCTATTACTATACG	
<i>netB</i>	<i>netB</i> -F	ATTATGTTTAGGAATACAGTTA	741
	<i>netB</i> -R	CAATACCCTTCACCAAATACTC	
<i>Cpe</i>	<i>cpe</i> -F	GGAGATGGTTGGATATTAGG	233
	<i>cpe</i> -R	GGACCAGCAGTTGTAGATA	

4.8.3 PCR 扩增体系

引物 cpa、cpb、etx、itx 采用多重 PCR，反应体系为 50 μL ：模板 2 μL ，上下游引物各 1 μL （10 $\mu\text{mol/L}$ ），2 $\times$ Taq Master Mix 25 μL ，ddH₂O 15 μL 。反应条件：94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min，94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，52.6 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，30 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。引物 netB、cpe 采用单项 PCR，反应体系为 20 μL ：模板 2 μL ，上下游引物各 1 μL （10 $\mu\text{mol/L}$ ），2 $\times$ Taq Master Mix 10 μL ，ddH₂O 6 μL 。反应条件：94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min，94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，54 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，30 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。检测过程设立阴性对照、阳性对照和空白对照，用产气荚膜梭菌标准菌株的 DNA 作阳性对照模板，用非产气荚膜梭菌的细菌 DNA 作阴性对照，用无菌水作空白对照模板。

4.8.4 PCR 扩增产物处理

PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分析，同时加入 DL1000 DNA maker，110 V 恒压，电泳 35 min 左右，用凝胶成像系统照相记录结果。

4.9 结果判定

4.9.1 产气荚膜梭菌

反应结果应同时符合条件 a，条件 b，和条件 c 中的一项，否则实验结果无效。

a) 符合 4.1、4.2 和 4.3 的特征判断为疑似病例。

b) 符合 4.4、4.5、4.6 和 4.7 的特征判断为确诊病例。

c) 4.8 中出现大小为 325 bp 的 Cpa 毒素扩增带的为 A 型产气荚膜梭菌；出现大小为 325 bp 的 Cpa 毒素扩增带，大小为 236 bp 的 Cpb 扩增带和大小为 585 bp 的 Etx 扩增带的为 B 型产气荚膜梭菌；出现大小为 325 bp 的 Cpa 毒素扩增带和大小为 236 bp 的 Cpb 扩增带的为 C 型产气荚膜梭菌；出现大小为 325 bp 的 Cpa 毒素扩增带和大小为 585 bp 的 Etx 扩增带的为 D 型产气荚膜梭菌；出现大小为 325 bp 的 Cpa 毒素扩增带和大小为 445 bp 的 Itx 扩增带的为 E 型产气荚膜梭菌；出现大小为 325 bp 的 Cpa 毒素扩增带和大小为 233 bp 的 Cpe 扩增带的为 F 型产气荚膜梭菌；出现大小为 325 bp 的 Cpa 毒素扩增带和大小为 741 bp 的 net B 扩增带的为 G 型产气荚膜梭菌。

5 防治措施

5.1 疫苗接种防疫

一般来说抗生素对细菌病的治疗是非常有疗效的,但由于该菌的主要致病因素是其生长繁殖过程中所分泌的毒素，这无疑减弱抗生素的治疗效果，其次是由于抗生素的大量使用，细菌都产生了耐药性，产气荚膜梭菌也不例外。所以现阶段对该病的防治主要采用疫苗接种预防。

5.2 加强饲养管理

对圈舍用 3%的烧碱溶液消毒，相关的器具用 5%的次氯酸消毒，以此降低梭菌病的复发率。加强饲料的存储管理，饲喂过程中严禁饲喂霉变的饲料，合理配置饲料，避免高蛋白、高能量的饲料过度摄入，加强对于畜禽粪便排泄物的处理和消毒，从源头上消除潜在的诱发因素。国家也应加强对梭菌的流行监测，建立相关的预防、诊断和治疗的方案，彻底控制梭菌病在国内的流行。

附录 A

A.1 培养基配制

A.1.1 5%脱纤维羊血豆粉固体培养基

牛心浸粉 15g, 氯化钠 5g, 豌豆浸粉 3g, 琼脂 15g 溶于 1000mL 双蒸水中, 121℃ 高压灭菌 15 min, 待冷却至 50–55℃ 时无菌操作加入 5%–10% (V/V) 预温至 37℃ 的无菌脱纤维羊血, 混匀, 倾入无菌平皿, 4℃ 保存。

A.1.2 产气荚膜梭菌显色培养基

产气荚膜梭菌显色培养基产品 55g 溶于 1000 mL 双蒸水中, 121℃ 高压灭菌 20 min 后, 倾入无菌平皿, 4℃ 保存。

A.1.3 含铁牛乳培养基

将 1 g 硫酸亚铁 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 溶于 50 mL 双蒸水, 不断搅拌, 缓慢加入 1000 mL 新鲜全脂牛奶中, 混合均匀。分装至试管中, 每管 10 mL, 118℃ 高压灭菌 12min。本培养基必须新鲜配置。
