

耕牛“蹄腿肿烂病”致病真菌毒素研究 —粗毒素提取与生物活性测定

秦 晟 汪昭贤 谢毓芬

刘心一 李长生 刘秀生

(陕西省畜牧兽医研究所)

李克昌 单迎富

(上海师范学院)

屠传忠 张树荣

(中国科学院上海有机化学研究所)

摘 要

1979—1982年用耕牛“蹄腿肿烂病”区霉稻草80%酒精抽出物和木贼镰刀菌与半裸镰刀菌玉米培养物乙醚浸提液,以腹腔、皮下注射、口服和涂擦皮肤试验等染毒途径,测试对家兔、小白鼠及山、绵羊的毒性。结果:家兔呈现白细胞浸润与水肿、出血、坏死性皮肤反应;55/66只小白鼠中毒死亡,部分出现耳、尾、爪等末梢部水肿、瘀血、出血和干性坏死变化,部分呈现出血性胃肠炎变化;引起12/22只山、绵羊中毒死亡和出现类似耕牛“蹄腿肿烂病”综合征。

Keyl等(1),给羊胃管投服芽枝状枝孢霉(*Cladosporium Cladosporioides*)和雪腐镰刀菌(*Fusarium nivale*)培养物,出现与牛“苇状羊茅草烂蹄病”(Fescue foot)相似的症状。Yates等(1)报导,用引起牛“苇状羊茅草烂蹄病”的拟分枝孢镰刀菌(*F.Sporotrichioides*)对动物毒性反应指出:可引起羊发生与牛“苇状羊茅草烂蹄病”相似的症状;小白鼠呈现出血性胃肠炎,皮肤出血、坏死,肝、肾出血和淋巴细胞增生等病变;家兔皮肤呈白细胞浸润与水肿、出血反应。

1979—1982年,我们应用病区霉稻草和木贼镰刀菌与半裸镰刀菌的玉米培养物提取毒素,以不同染毒途径测试对家兔、小白鼠和山、绵羊的毒性,现将结果报告如下。

试 验 材 料

检(1)—采自陕西耕牛“蹄腿肿烂病”区霉稻草。

检(2)—木贼镰刀菌771093和半裸镰刀菌77743毒株玉米培养物(孢子悬液接种玉米培养基,置于25~28℃培养7~10天,转置7~15℃培养4~5周收毒)。

检(3)—检(2)菌株的稻草培养物(切碎稻草200克、蛋白胨10克、葡萄糖40克、氯化钠5克)。

*该文由汪昭贤执笔整理。陈仁文协助病理组织学检查。刘胜利、刘晓红、金文荣及上海师范学院丁小燕、苏惠萍、吴立人同学参加部分试验工作。

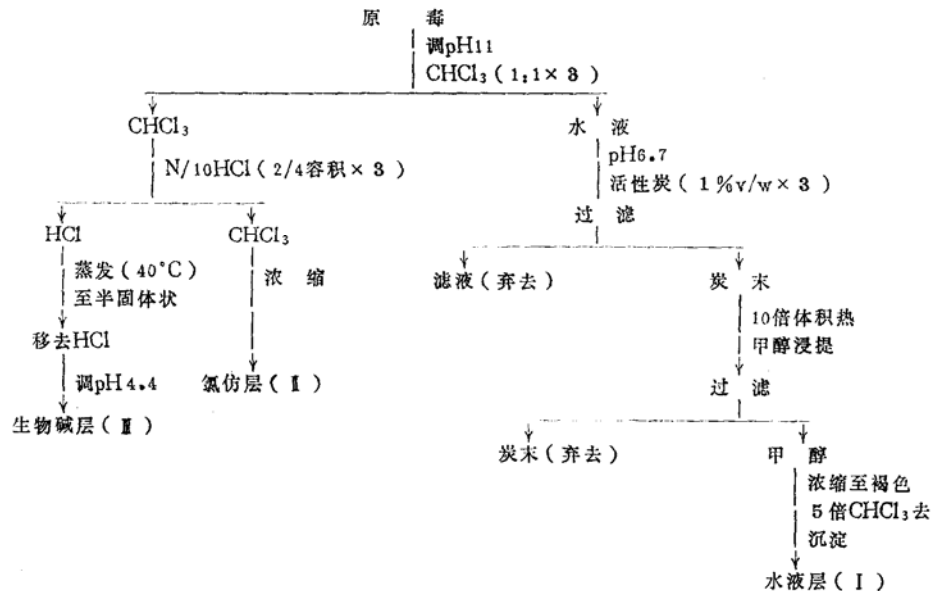
**本文于1985年3月5日收稿。

检(4) — 采自病区非病点的稻草。

检(5) — 粮站供应食用玉米。

粗毒素提取

一、以稻草为基质的毒素提取方法 将霉稻草风干或置于60℃烘干, 切碎, 用80%酒精室温浸提两次(第一次3天, 第二次1天), 过滤, 减压(40℃)浓缩至糖浆状, 5000转/分低温(3℃)离心两次(每次40分钟), 去脂肪与沉淀, 获得糖浆状粗毒素(称原毒)。然后按下图分离程序进行毒素分层, 共分离出水液层(I), 氯仿层(II)和生物碱层(III)。



二、以玉米为基质的毒素提取方法 将霉玉米置于60℃烘干, 研细, 加乙醚浸提2天, 过滤, 滤渣再加乙醚浸提1天, 合并滤液, 浓缩至油状粗毒素。

生物活性测定

一、动物毒性试验

(一) 试验方法

家兔作皮肤试验, 每次涂擦量为0.15毫升(相当20.4克霉草), 每日两次, 连续8次, 观察一周。小白鼠用腹腔和皮下注射染毒, 剂量每次0.1~0.2毫升(相当13.6~27.2克霉草), 连注8次观察反应情况。山、绵羊以腹腔注射和胃管投服染毒。试验前进行临床、血常规检查和蹄冠部管围测量, 试验期除每日进行临床观察外, 还不定期进行上述项目的检查。

(二) 试验结果

1. 家兔皮肤试验: 结果见表1。

皮肤反应的病理组织学变化: 表皮坏死脱落, 大量白细胞与坏死组织堆积表面, 真

表1 家兔皮肤试验结果表

检 样	项 目	皮肤充血	皮肤肿胀 (毫米)			皮肤坏死	综合判定
			试验前	试验后	增加倍数		
检 (1)		+++	1.0	3.5	2.5	+	阳性
检 (2)	木贼F771093	+++	2.0	8.0	3.0	+++	阳性
	半裸F77743	++	1.7	5.0	1.94	++	阳性
检 (3)	木贼F771093	++	2.0	7.6	2.8	++	阳性
	半裸F77743	++	1.5	5.8	2.8	+++	阳性
对 照	检 (4)	-	1.6	2.0	0.25	-	阴性
	检 (5)	-	1.4	2.1	0.5	-	阴性

皮层水肿、炎性细胞浸润及坏死(图1)。

2. 小白鼠毒性试验: 结果见表2。

表2 小白鼠毒性试验结果表

分 组	检 样	项 目	染毒途径	试验只数	染毒次数	总剂量 (毫升)	染毒至 死亡时间 (小时、天)	死亡只数	死亡率(%)
试 验 组	检 (1)	原 毒	皮下	13	1	0.2	1~6.5小时	12	92
			腹腔	6	1	0.1~0.2	2~3小时	6	100
	水液层(I)	皮下	25	1	0.2	2~96小时	23	92	
		皮下	5	1	0.2	34~104小时	5	100	
	检 (2)	木贼F771093	腹腔	3	2~3	0.3~0.45	3~4天	3	100
			腹腔	3	7~8	0.9~1.04	10~12天	3	100
检 (3)	水液层(I)	腹腔	6	1~2	0.15~0.3	2小时	3	50	
		皮下	5	1	0.2				
对 照 组	检 (4)	原 毒	皮下	10	1	0.2			
		水液层(I)	皮下	5	1	0.2	60小时	1	20
		水液层(II)	皮下	5	1	0.2			
	检 (5)	腹腔	4	5-8	1.6-1.9				

由表2可知: 各试验组小白鼠均引起死亡, 急性中毒可在数分钟至几小时内死亡, 也有延续1—3天后死亡。毒力较弱, 连续注射7~8次后, 于10—12天内也归于死亡。对照组仅检(4)水液层死亡1只。

中毒症状及病理变化: 初期精神兴奋后转沉郁、震颤、背腰卷缩。部分鼠尾尖、爪瘀血、出血和水肿, 个别耳、尾尖脱皮、干裂或呈环纹状干性坏死。脾脏程度不同肿大、瘀血或出血, 心室扩张, 部分呈纤维蛋白性腹膜炎和出血性胃肠炎。

3. 山、绵羊毒性试验: 结果见表3。

表3结果表明: a. 试验组16/22只羊出现症状, 占72.7%, 死亡12/22只, 占54.5%。对照组7只羊均未见异常。b. 大剂量10/13中毒死亡, 小剂量2/9死亡。c. 口服毒素的羊较腹腔注射者, 病程长, 症状明显, 体重亦有明显减轻。d. 检(1)原毒较分层毒强, 而分层毒又以水液层(I)较强, 可致明显的中毒症状和死亡。其次为氯仿层(II), 虽不引起死亡, 但有较明显的中毒症状, 体重急骤下降。生物碱层(III)不致中毒, 且

表3 绵羊毒性试验结果表

分组	项目 检 样	大 剂 量										小 剂 量							
		染毒途径	试验只数	每 次 毒 量 (斤)	染 毒 次 数	总 剂 量 (斤)	出现症状只数	染 毒 至 死 亡 时 间 (天)	死 亡 数	体 重 变 化 (增 减)	试 验 只 数	每 次 毒 量 (斤)	染 毒 次 数	总 剂 量 (斤)	出现症状只数	染 毒 至 死 亡 时 间 (天)	死 亡 数	体 重 变 化 (增 减)	
																			腹 腔 口 服
试 验 组 (1)	原 毒	腹 腔 口 服	3	1.7~3.0	1	1.7~3.0	2	40分~36小时	3		2	0.9	5	4.5	1				
		口 服	1	5~6	17	97	1	20天	1										
	水 液 层 (I)	腹 腔 口 服	2	6	3~4	18~25	2	3~6天	2										
		口 服	1	6~36	15	250.6	1	15天	1		1	6	46	276	1				减 2 斤
	生物碱层 (II)	口 服	1	6~36	15	264	1			减 11.5 斤	1	6	46	276					不 增 不 减
		口 服	1	6~36	13	234				增 8 斤	1	6	46	276					增 5.5 斤
对 照 组	检 (2)	腹 腔 口 服	2	2.3~3.0	1	2.3~3.0	2	22-24 小时	2		4	1~2.0	3~3.6~6 9.0	3	3~5 天	2			
	检 (3) 原毒	腹 腔 口 服	2	5	1~4	5~24	1	60小时	1										
对 照 组	检 (4) (未分层)	腹 腔 口 服	2	2~8	1	2~8					1	1~1.3	3	3.5					
		口 服	1	6	30	180				增 5 (斤)									
对 照 组	检 (5)	腹 腔 口 服	1	3.0	1	3.0				2	1~2.8	4~8	4.2~10.2						

增重 3~5.5 斤。

中毒症状及病理变化: 体温升高 0.2—0.6℃, 蹄冠微温、肿胀, 管围增宽 0.5~1.6 厘米, 部分患肢频举或跛行, 蹄冠至系部充血和出血, 耳、尾尖水肿、瘀血和出血, 个别出现干性坏死。口服检 (1) 原毒的羊, 眼睑水肿, 结膜充血; 阴门水肿、充血, 阴道流出粘脓性分泌物。病羊频频排尿, 精神萎靡, 头下垂, 拱背, 食欲减退或废绝, 瘤胃蠕动减弱或消失, 口服毒素的羊呈现腹痛、腹泻、粪便带血和大量肠粘膜。有的还表现精神兴奋、共济失调, 后肢无力, 呈犬坐姿势。后期呼吸困难, 呼吸增数 (50—60次/分), 心跳加快 (150—180次/分), 节律不齐, 终因心力衰竭死亡。病羊血液无明显规律性变化。

剖检与镜检 22 例, 多数羊系部与蹄冠部微血管充血、出血, 血管周围水肿, 淋巴细胞浸润及组织增生, 皮下肌纤维间大量出血。部分羊冠状带微血管壁增厚, 管腔窄小。耳尖及耳廓表皮细胞坏死, 真皮层小动脉管增厚, 皮下组织间水肿; 尾尖皮下充血、水肿, 炎性细胞浸润。口服检 (1) 原毒的羊, 眼睑皮下水肿。结膜充血; 外阴水肿, 表皮坏死脱落, 真皮层微血管充血、出血, 管壁增厚, 皮下组织疏松, 肌间水肿。病羊心脏内外膜下充血、出血, 肌纤维间水肿, 淋巴细胞浸润, 浦氏细胞核溶解。肝脏肿大, 瘀血, 胆囊肿大 3~4 倍, 肝小叶呈灶状坏死, 淋巴细胞及枯否氏细胞增生。胃肠粘膜水肿、充血、出血, 上皮细胞坏死剥落, 炎性细胞浸润。肠系膜淋巴结肿大, 被膜下淋

巴细胞浸润、髓质水肿。

腹腔注射的部分羊，腹腔内有灰黄色积液，腹腔脏器被灰黄色纤维蛋白渗出物所粘连。

对照羊眼观无明显变化。口服检(4)提取液的羊，蹄冠、耳、尾尖等部位微血管扩张，充血，管腔空虚。表皮有坏死脱落，肝脏微肿大，肠粘膜轻度炎性浸润，其他无异常。

二、抑制豌豆发芽试验

(一) 检样与配制：本试验仅作检(1)水液层(I)，氯仿层(II)和检(2)毒素，

并以脱氧雪腐镰刀菌醇(上海粮食研究所提供之水溶物)和蒸馏水作对照，取数毫升毒素加水至5毫升即为配制浓度。

(二) 方法与结果：挑取大小均匀的豌豆各10粒，用0.1%升汞液浸泡5分钟，取出再用灭菌水反复冲洗3次后，浸于被检毒素溶液中16小时，再以灭菌蒸馏水反复冲洗3次，置盛有湿纱布的培养皿中，在26—28℃恒温箱中催芽，每日观察发芽率，第四天判定结果，见表4。

表4 抑制豌豆发芽试验结果表

检 样	项 目	剂 量 (毫升)	发 芽 豌 豆 个 数				发 芽 率 (%)
			第 一 天	第 二 天	第 三 天	第 四 天	
检 (1)	水液层(I)	1.0	0	0	0	0	0
		0.5	0	0	2	2	20
检 (2)	氯仿层(II)	0.125	0	0	2	2	20
		0.125	0	0	2	2	20
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (对照)		0.1	1	1	8	8	80
		1.0	0	0	0	0	0
蒸馏水(对照)		5.0	9	10	10	10	100

讨 论 与 结 论

一、从耕牛“蹄腿肿烂病”区霉稻草和木贼镰刀菌与半裸镰刀菌培养物中提取毒素，均可致小白鼠、家兔和山、绵羊呈现明显中毒反应，羊出现类似耕牛“蹄腿肿烂病”变化^[2-5]。此变化与Keyl和Yates等应用芽枝状枝孢霉、雪腐镰刀菌和拟分枝镰刀菌培养物复制羊，出现类似苇状羊茅草烂蹄病“综合征”基本一致。

二、Yates等从苇状羊茅草中分离出32株镰刀菌，其中仅8株产生单端孢霉烯毒素，而12株同时产生单端孢霉烯毒素和丁烯酸内酯。这说明自然界真菌毒素中毒，往往是多种真菌及其毒素中毒的综合征。据汉中地区霉稻草真菌相分析⁽⁶⁾，其产毒镰刀菌就有8种，因此，产生毒素种类比较复杂，所以本试验应用病区霉稻草毒素，试验中羊除呈现类似耕牛“蹄腿肿烂病”症状外，还表现出阴门水肿、阴道炎等F-2雌激素病的症状和内脏器官出血及出血性胃肠炎等真菌中毒的综合征。抑制豌豆发芽试验结果霉稻草与木贼镰刀菌培养毒素均有抑制豌豆发芽的作用，因此，可推测其中含有单端孢霉烯类毒素。

三、耕牛“蹄腿肿烂病”区霉稻草和木贼镰刀菌与半裸镰刀菌培养物中，毒素成分正继续提纯与鉴定。

* 小白鼠和山、绵羊，死后取肝、脾、肾、淋巴结等病料直接涂片镜检和培养检查，均未见细菌和霉菌生长。

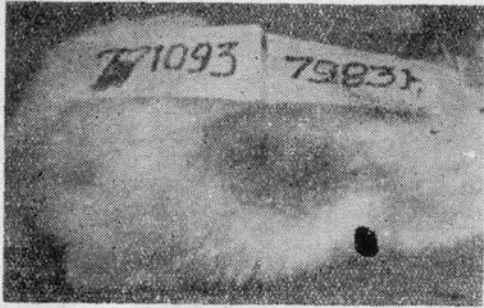


图1 检(2)毒素引起家兔皮肤出血、坏死变化。



图2 拱背

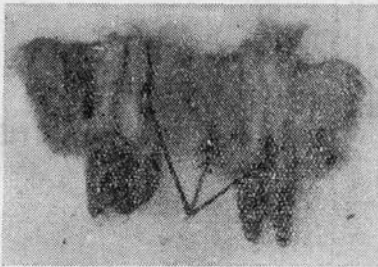


图3 蹄部充血、出血与水肿。

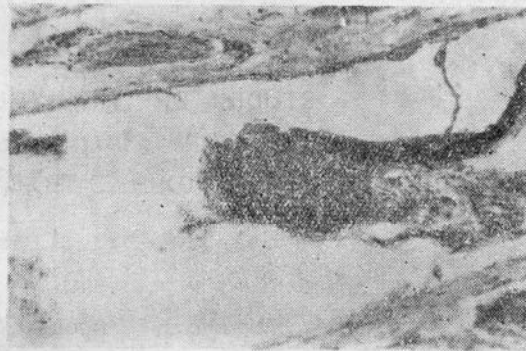


图4 蹄冠部皮下小血管充血、出血与水肿。

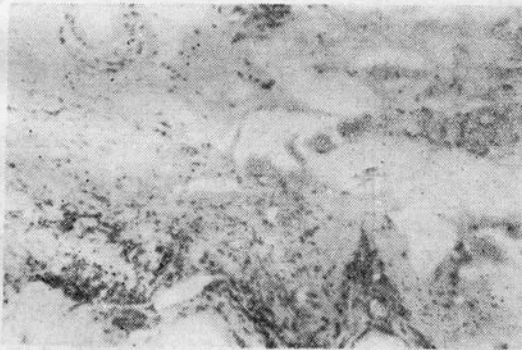


图5 小血管充血、出血，炎性细胞浸润。

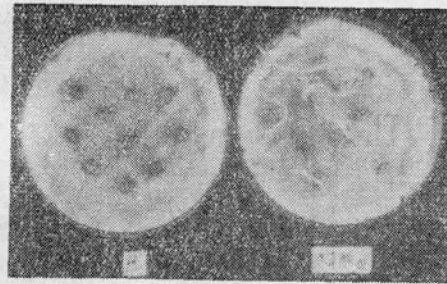


图6 检(1)毒素抑制豌豆发芽

参 考 文 献

- [1] Josef Palti, 1978. Toxigenic Fusaria, their distribution and Significance as Causes of disease in animal l and man. Verlag Paul Parey. Berlin and Hamburg. Parl 3. 80-81.
- [2] 秦晟等, 1981, 耕牛“蹄腿肿烂病”病原诊断研究。畜牧兽医学报, 12(2): 137~144。
- [3] 陈正伦等, 1981, 贵州省遵义地区耕牛“烂脚病”的初步探讨。兽医科技杂志(2)。
- [4] 秦晟等, 1980, 真菌培养物对耕牛“蹄腿肿烂病”的致病试验。微生物学报, 20(3): 335~338。
- [5] 赵从中等, 1983, 牛真菌中毒性蹄壳脱落病的研究。中兽医医药杂志, 第四期6~9。
- [6] 汪昭贤等, 1982, 耕牛“蹄腿肿烂病”区霉稻草真菌相及产毒真菌调查。兽医科技杂志, 10期31~33。

STUDIES ON THE MYCOTOXINS PRODUCING
“SORE FOOT DISEASE” IN CATTLE
—CRUDE FUSARIUM TOXIN EXTRACT AND ITS BIOLOGICAL ACTIVITIES

Qin Sheng, Wang Zhaoxian, Xie Yufen et al.

(Shanxi Provincial Institute of Animal and Veterinary
Sciences, Wugong, Shanxi Province)

Li Kechang, Shan Yingfu

(Department of Biology, Shanghai Normal University, Shanghai)

Tu Chuanzhong, Zhang Shurong

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica, Shanghai)

Abstract

The toxic mouldy rice straw collected from the region where “sore foot disease” of Cattle occurred was extracted with 80% ethanol and the corn medium inoculated with *Fusarium equiseti* and *Fusarium semitectum* was extracted with ether. Each of the extracts was tested in rabbits, mice and sheep. These extracts caused skin reactions in all rabbits(5/5). After several application, oedema, haemorrhage and necrosis were produced. Fifty-five of the sixty-six mice died 1 hour to 12 days after the extract was administered orally or subcutaneously, in some of them the tips of the ears, tails and feet became edema tous haemorrhagic and necrotic, the others showed haemorrhagic gastroenteritis. Twelve of the twenty-two sheep died 40 minutes to 20 days after the extract was administered orally or intraperitoneally. These sheep and sore foot diseased cattle resemble each other in clinic signs and pathological changes.