

李贝贝, 沈馨予, 靳琪瑶, 等. 犬源和猫源产气荚膜梭菌的分离鉴定与生物学特性研究 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (2): 91-96.

LI B B, SHEN X Y, JIN Q Y, et al. Isolation, identification and biological characterization of *Clostridium perfringens* isolated from canine and feline [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (2): 91-96.

犬源和猫源产气荚膜梭菌的分离鉴定与生物学特性研究

李贝贝^{1,2}, 沈馨予^{1,2}, 靳琪瑶^{1,2}, 王子仪^{1,2}, 丁志刚^{1,2},
陈昌胜^{1,2}, 胡沁楠^{1,2}, 王彦红^{1,2*}

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009;

2. 江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009)

摘要: 为了探究犬源和猫源产气荚膜梭菌的生物学特性, 收集犬和猫粪便并进行细菌分离, 对分离菌株进行毒素分型、小鼠致病性试验和耐药性测定。分离出的 13 株产气荚膜梭菌中有 2 株猫源、11 株犬源菌株。毒素基因检测结果显示, 13 株菌 *plc* 基因均为阳性, *etc*、*iap*、*netB* 基因均为阴性, 其中 4 株菌 *cpb* 基因为阳性, 1 株菌株 *cpe* 基因为阳性, 毒素型为 A 型 8 株, C 型 4 株, F 型 1 株。小鼠致病性试验结果显示 3 种毒素型菌株均可导致小鼠出现血尿、肠壁变薄和肠内积液等病变。药敏试验结果显示, 分离株对新霉素和多黏菌素 B 等药物耐药, 对氟苯尼考和阿莫西林等药物敏感。综上, 犬和猫携带 A 或者 C 型产气荚膜梭菌, 另外犬携带 F 型产气荚膜梭菌, 这 3 种毒素型可能对犬和猫的泌尿系统和消化系统产生致病作用。

关键词: 犬; 猫; 产气荚膜梭菌; 毒力分型; 耐药性

中图分类号: S855.1 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)02-0091-06

Isolation, identification and biological characterization of *Clostridium perfringens* isolated from canine and feline

LI Beibei^{1,2}, SHEN Xinyu^{1,2}, JIN Qiyao^{1,2}, WANG Ziyi^{1,2}, DING Zhigang^{1,2},
CHEN Changsheng^{1,2}, HU Qinnan^{1,2}, WANG Yanhong^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, China)

Abstract: In order to investigate the biological characteristics of *Clostridium perfringens* from canine and feline, feces samples from canines and felines were collected and subjected to bacterial isolation; and the virulence typing, pathogenicity test in mice and drug resistance of the isolated strains were determined. Among the 13 strains of *Clostridium perfringens* isolated, 2 were from feline and 11 were from canine. All the 13 strains were positive for the *plc* gene and negative for the *etc*, *iap* and *netB* genes by genetic testing of virulence, in which 4 strains were positive for the *cpb* gene and 1 strain was positive for the *cpe* gene. Consequently, there were 8 strains of type A, 4 strains of type C and 1 strain of type F. The results of the mouse pathogenicity test showed that all the three types of virulent strains could cause the mice to develop lesions such as hematuria, thinning of the intestinal wall and intestinal effusion. The results of the sensitivity test showed that they were resistant to neomycin and polymyxin B, and sensitive to florfenicol and amoxicillin. In conclusion, *Clostridium perfringens* types A, C, and F isolated from clinical canines and felines exerted pathogenic effects on the urinary and digestive systems.

Keywords: canine; feline; *Clostridium perfringens*; virulence typing; pathogenicity test in mice; drug resistance

产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 又称魏氏梭菌, 属于梭菌属, 是一种厌氧的革兰阳性芽胞杆菌, 通过分泌不同基因编码的毒素引起动物和人发生腹泻和肠炎等胃肠道疾病^[1]。已知产气荚膜梭菌可分泌超过 20 种外毒素^[2], 如 α 、 β 、 ϵ 和 ι 致死毒素, 肠毒素 (CPE) 和坏死性肠炎毒素 (*netB*)^[3], 这些毒素能产生特定的疾病症状, α 毒素能引起人和动物创伤性气性坏疽, β 毒素能引起动物出血性坏死性肠炎, 肠毒素 (CPE) 引起人食物中毒。根据毒素产生情况, 将其分成 A (α)、B (α 、 β 、 ϵ)、C

收稿日期: 2024-03-14; 修回日期: 2024-12-13

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD); 扬州大学大学生创新创业训练计划基金项目 (X20210704, X20220689)

第一作者: 李贝贝, 女, 学士

* 通信作者: 王彦红, 讲师, 研究方向为动物疫病诊断与防控,

E-mail: wyh7405@163.com。

(α 、 β)、D (α 、 ϵ)、E (α 、 ι)、F (α 、CPE) 和 G (α 、*netB*) 型共 7 种毒素型^[3-4]。

目前国外对犬源和猫源产气荚膜梭菌的相关报道较多^[5-8]，显示流行的毒素型主要是 A 型，少量为其他型如 E 或者 F 型。国内报道了犬源 A 型产气荚膜梭菌^[9-10]，尚无其他型报道。为了解产气荚膜梭菌在犬和猫中的流行特点，本试验从犬和猫粪便中分离细菌，检测其携带毒素基因的情况和耐药性等方面，以确定其生物学特征。

1 材料与方法

1.1 病例背景

2021 年 5 月至 2023 年 8 月从扬州大学动物医院共收集 13 份犬、猫粪样，其中 11 份犬粪样，编号 C1~C11，仅 C1 和 C3 为非腹泻粪样，其余 9 份均为腹泻带血样；2 份猫粪样，编号 M1 和 M2，M1 为非腹泻粪样，M2 为腹泻带血样。

对有腹泻症状的犬和猫采集粪便，用 Diff-Quik 染色液染色并镜检。

1.2 试验材料

试验中所用的绵羊血平板均按照通用组方自行配制。组分中的琼脂粉与氯化钠，购自国药集团化学试剂有限公司；蛋白胨与胰酶，购自 OXOID 公司；荚膜血清型鉴定所需的试剂，购自 TaKaRa 公司；药敏纸片及绵羊血均为杭州微生物试剂公司产品；试验所涉及的 PCR 反应试剂均为宝生物工程（大连）有限公司产品；2.5 L 厌氧产气袋为 OXOID 公司产品；染色使用的 Diff-Quik 染色液购自南京建成科技有限公司。

小鼠攻毒试验中准备清洁级 6 周龄且健康状况良好的 BALB/c 小鼠 8 只，均购自扬州大学比较医学中心。

1.3 细菌分离

将犬、猫的粪便样品接种于绵羊血平板，厌氧条件培养，于 37 °C 条件下培养 24 h。从培养好的细菌中挑取典型的菌落接种绵羊血平板进行纯化并传代培养，有氧和厌氧条件培养，37 °C 培养 24 h 后观察生长状态。

1.4 16S rDNA 鉴定

按 TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit 方法，根据文献 [11] 鉴定分离菌株。

1.5 毒素基因检测及分型

plc、*cpb*、*etx*、*iap*、*cpe* 和 *netB* 6 对特异性引物

参考文献 [3]，由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。制备细菌 DNA 模板，PCR 检测其 6 种毒素基因 *plc*、*cpb*、*etx*、*iap*、*cpe* 和 *netB*，目的片段分别为 324、196、656、461、233 和 738 bp。反应体系 (20 μ L)：16 μ L 超纯水，2 μ L buffer，0.4 μ L dNTP，0.2 μ L *Taq* 酶，1 μ L DNA 模板和前后引物共 0.4 μ L。PCR 反应程序：95 °C 预变性 5 min；95 °C 变性 1 min，55 °C 退火 1 min，72 °C 延伸 1 min，共 35 个循环；72 °C 10 min。将 PCR 产物进行 10 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳后观察结果。个别基因送无阳性对照的 PCR 阳性产物进行测序比对，综合细菌分型判定标准（表 1）确定产气荚膜梭菌分型。

表 1 细菌分型判定标准

毒素型	<i>plc</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>iap</i>	<i>cpe</i>	<i>netB</i>
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	±	-
D	+	-	+	-	±	-
E	+	-	-	+	±	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+

注：+，检测结果为阳性；-，检测结果为阴性。细菌分型判定标准参考文献 [3]。

1.6 小鼠致病性试验

选取不同毒素型的分离菌株，将细菌稀释至一定浓度，每株菌腹腔注射 2 只小鼠，每只注射 0.4 mL，对照小鼠腹腔注射 0.4 mL 生理盐水。观察小鼠状态，并在攻毒 24 h 后观察所有小鼠的病理变化。随后取小鼠肝和肠组织进行触片，用 Diff-Quik 染色液染色，于显微镜下观察。同时取肝和肠样品按 1.3 方法进行细菌分离。

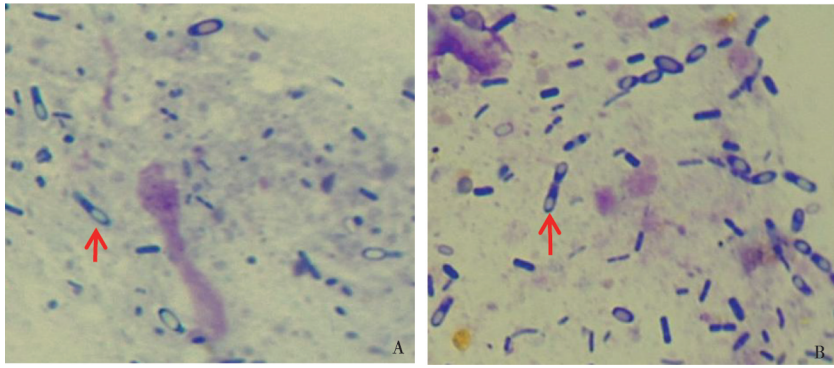
1.7 药敏试验

药敏试验采用纸片扩散法进行，具体操作步骤和判定标准参考文献 [11]。

2 结果

2.1 镜检

腹泻犬和猫粪检中有较多大小不一的，菌体一侧呈卵圆形的芽胞，初步诊断犬和猫粪便中有较多梭菌（见图 1）。



A. 犬粪便; B. 猫粪便。

图1 Diff-Quik 染色 (1 000×)

2.2 细菌分离

13份粪便样品接种于绵羊血琼脂培养基上,厌氧培养24 h后,在绵羊血平板上出现较多的透明的双溶血菌落。分离菌株有氧条件培养不生长。挑双溶血的单个菌落在绵羊血平板上厌氧条件纯化培养。

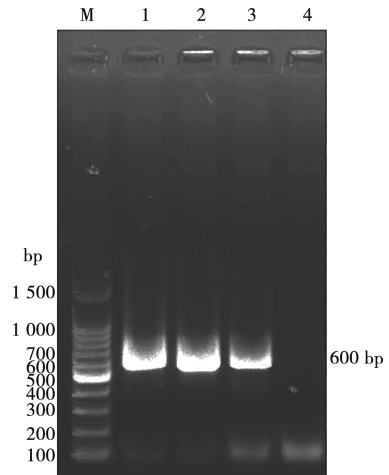
2.3 16S rDNA 鉴定

13株分离菌用PCR方法扩增16S rDNA,PCR产物送至南京金斯瑞测序,测序结果经BLAST比对,与产气荚膜梭菌(NCBI GenBank序列号:ON126215.1)同源性达99%,因此,判断分离菌是产气荚膜梭菌。

2.4 毒素基因检测和细菌分型

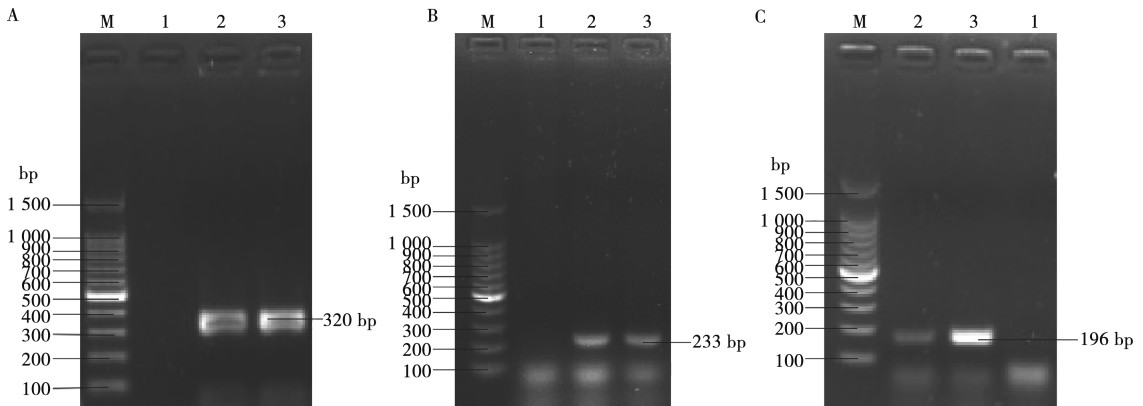
PCR分别扩增13株分离菌的*plc*、*cpb*、*etx*、*iap*、*cpe*和*netB*毒素基因,结果显示(图3)所有菌株均出现320 bp左右的条带,为*plc*基因阳性;C1菌株扩增出233 bp左右的目的条带,经测序确定为*cpe*基因;C3、C8、C11和M1菌株扩增出196 bp左右的目的条带,为*cpb*基因。因此,根据毒素分型(表

2),C1为F型产气荚膜梭菌,C3、C8、C11和M1为C型产气荚膜梭菌,C2、C4和M2等8株细菌为A型产气荚膜梭菌。



M. 100 bp DNA Marker; 1. 阳性对照; 2~3. 样本; 4. 阴性对照。

图2 16S rDNA PCR 检测



M. 100 bp DNA Marker; 1. 阴性对照; 2. 阳性对照; 3. 样本。A. *plc*; B. *cpe*; C. *cpb*。

图3 毒素基因 PCR 检测

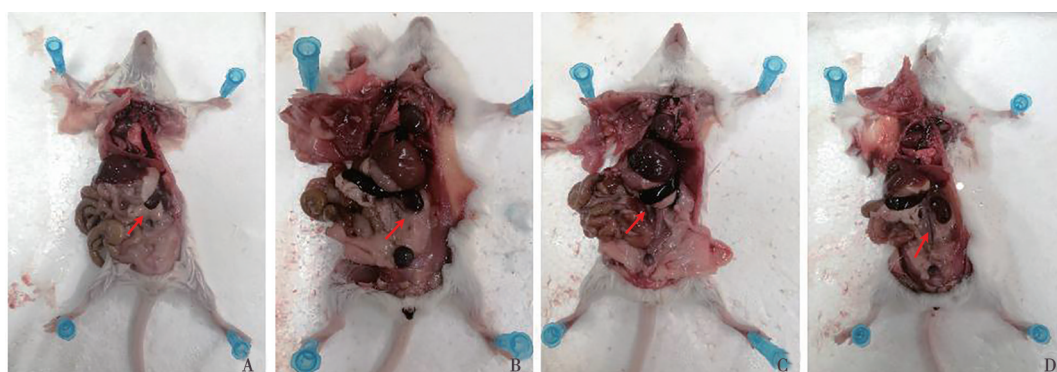
表 2 毒素基因检测分析

菌株	<i>plc</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>iap</i>	<i>cpe</i>	<i>netB</i>	分型
C1	+	-	-	-	+	-	F
C2	+	-	-	-	-	-	A
C3	+	+	-	-	-	-	C
C4	+	-	-	-	-	-	A
C5	+	-	-	-	-	-	A
C6	+	-	-	-	-	-	A
C7	+	-	-	-	-	-	A
C8	+	+	-	-	-	-	C
C9	+	-	-	-	-	-	A
C10	+	-	-	-	-	-	A
C11	+	+	-	-	-	-	C
M1	+	+	-	-	-	-	C
M2	+	-	-	-	-	-	A

2.5 小鼠攻毒试验

根据毒素基因检测和细菌分型的结果选取 F、A

和 C 型产气荚膜梭菌的 C1、C2 和 M1 菌株进行攻毒试验，细菌菌液浓度分别为 2.8×10^9 、 2.38×10^9 和 3.67×10^9 CFU · mL⁻¹，每只小鼠腹腔注射 0.4 mL，0.4 mL 生理盐水腹腔注射 2 只对照小鼠。攻毒组腹腔注射 C2 菌株（A 型）的小鼠分别于攻毒后 7 和 8 h 死亡；腹腔注射 M1 菌株（C 型）的小鼠，1 只于攻毒后 9 h 死亡，1 只小鼠攻毒后 24 h 濒死；腹腔注射 C1 菌株（F 型）的小鼠攻毒后 24 h 精神不振但未死亡；对照组正常。攻毒组小鼠剖检均可见膀胱内积有深红色尿液，皮下水肿，肝颜色略深，脾和肾肿大，肠道有较多出血点且肠壁变薄，内有积液，对照组无肉眼病变（图 4 和 5）。组织触片染色后显微镜下观察可见（图 6），攻毒组的肝和肠道内有大量典型的杆菌；对照组中肝组织触片无细菌，肠内容物触片无典型的杆菌。小鼠肝脏和肠道内容物接种绵羊血平板厌氧培养 24 h 后，攻毒组出现较多的双溶血菌落，对照组未出现双溶血菌落。



箭头所示为膀胱。

A. 对照组；B. C1 菌株感染组；C. C2 菌株感染组；D. M1 菌株感染组。

图 4 小鼠攻毒试验膀胱病理变化

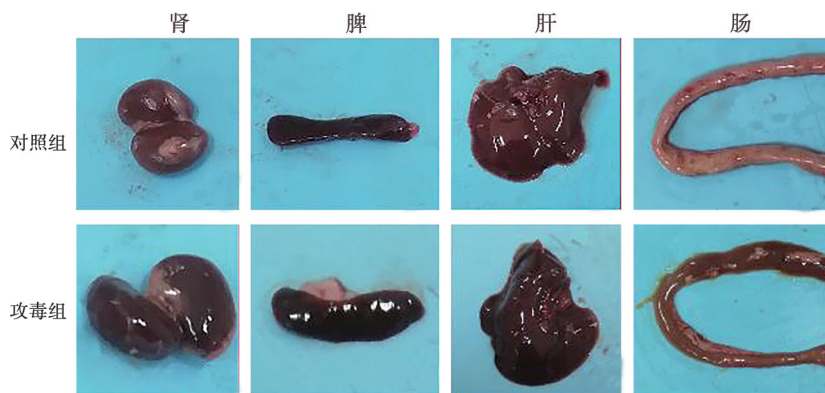
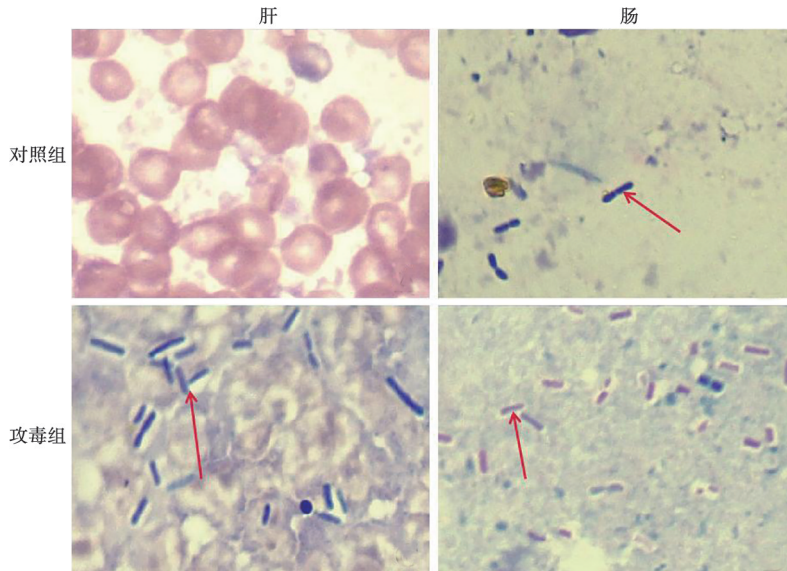


图 5 小鼠攻毒试验肝、肾、脾、肠病理变化



箭头所示为典型的杆菌。

图 6 攻毒小鼠肝和肠组织触片 (1 000×)

2.6 药敏试验

药敏试验结果 (表 3) 显示, 13 株分离菌均对新霉素、丁胺卡那、复方新诺明、庆大霉素、链霉素和妥布霉素耐药; 所有分离菌株对氟苯尼考、阿莫西林、美洛西林和诺氟沙星敏感。

表 3 药敏试验

抗生素	敏感/株	耐药/株	抗生素	敏感/株	耐药/株
多黏菌素 B	3	10	环丙沙星	12	1
头孢噻肟	12	1	庆大霉素	0	13
左氧氟沙星	12	1	美洛西林	13	0
链霉素	0	13	复方新诺明	0	13
多西环素	10	3	丁胺卡那	0	13
卡那霉素	2	11	头孢曲松钠	12	1
妥布霉素	0	13	诺氟沙星	13	0
新霉素	0	13	阿莫西林	13	0
氟苯尼考	13	0			

3 讨论

从犬和猫粪便中分离出 13 株细菌, 完全厌氧条件下培养生长出双溶血菌落, 有氧条件下不生长。根据毒素型分型, 分离菌株分别属于 A 型 (8 株)、C 型 (4 株)、F 型 (1 株) 产气荚膜梭菌, 其中 7 株 A 型菌株来源于腹泻病犬和猫, 仅 1 株来源于非腹泻犬, 其次 C 和 F 型均来源于非腹泻和腹泻犬及非腹泻猫。对收集的样本分离发现, 腹泻样本的产气荚膜

梭菌分离率高, 而非腹泻样本的分离率低 (数据未发表)。上述结果与已有文献报道符合, A 型是引起犬和猫致病的主要毒素型, 可以引起坏死出血性肠炎^[5,8]。此外, A 型产气荚膜梭菌产生 α 和 β_2 毒素, 可以感染多种动物, 引起动物的坏死性肠炎、肠毒血症和人的气性坏疽等疾病^[12], 是广泛流行的毒素型。此外, 本次分离出 C 型产气荚膜梭菌, 此毒素型均未见于犬猫上有分离的相关报道。C 型产气荚膜梭菌主要源于猪和羊, 可引起坏死性肠炎、肠毒血症, 此外, 会引起人的食物中毒^[4,13]。F 型产气荚膜梭菌能引起人、新生动物的肠毒血症^[4,13]。Silva 等^[5]发现, F 型产气荚膜梭菌会引起伴侣动物腹泻, 然而本研究在未腹泻的猫中分离出此毒素型菌株。因此, 这 3 种毒素型细菌均可引起人类疾病, 犬和猫作为人类密切接触的伴侣, 携带此病原可能通过污染食物和水等途径导致主人食物中毒, 因此, 犬和猫是产气荚膜梭菌感染人的重要来源之一, 在公共卫生上需要进一步监控。

已有的毒性试验结果表明, A 型、C 型与 F 型产气荚膜梭菌均可引起小鼠肠毒血症^[14-17]。产气荚膜梭菌感染小肠后, 不同毒素型菌株产生毒素种类不同, 这些毒素不仅可以引起局部的损伤如肠道坏死, 还可以吸收进入体内影响肝、肾等变化^[16]。因此本研究发现, 小鼠腹腔注射 A 型、C 型与 F 型产气荚膜梭菌 3 种分离菌株后, 均出现出血性肠炎和尿血症状, 最终导致死亡, 进一步证实 3 种毒素型的致病性。然而, 在 3 种毒素型攻菌剂量相近情况下, 从致

死时间长短可见分离菌对小鼠致病性强度由强到弱依次是 A 型、C 型、F 型。

分离菌株均对新霉素和庆大霉素等氨基糖苷类药物耐药, 此类药物主要是针对革兰阴性菌的药物^[18], 因此作为革兰阳性菌的产气荚膜梭菌对其耐药。与 Sergio 等^[8]报道相似, 分离菌株对常用药物阿莫西林仍敏感, 然而因产气荚膜梭菌易引起人食物中毒, 仍需要进一步监测其耐药性特点。

综上所述, 本试验从临床送诊的犬和猫粪便中分离出 13 株产气荚膜梭菌, 分别为 A 型 (8 株)、C 型 (4 株)、F 型 (1 株), 其中 A 型是引起犬和猫出血性肠炎的主要毒素型, 3 种毒素型都有较强的致病性。本试验结果有助于了解产气荚膜梭菌在犬和猫中的流行特点, 并为防控措施制定提供参考。

参考文献:

- [1] MISEON P, FATEMEH R. The prevalence of plasmid-coded *cpe* enterotoxin, β 2 toxin, *tpel* toxin, and tetracycline resistance in *Clostridium perfringens* strains isolated from different sources [J]. *Anaerobe*, 2019, 56: 124–129.
- [2] HEIDA F H, VAN ZONEN A G J F, HULSCHER J B F, et al. A necrotizing enterocolitis-associated gut microbiota is present in the meconium: results of a prospective study [J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 62 (7): 863–870.
- [3] ROOD J I, ADAMS V, LACEY J, et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme [J]. *Anaerobe*, 2018, 53: 5–10.
- [4] 陆承平, 刘永杰. 兽医微生物学 [M]. 6 版. 北京: 中国农业出版社, 2021: 555.
- [5] SILVA R O S, RIBEIRO M G, DE PAULA C L, et al. Isolation of *Clostridium perfringens* and *Clostridioides difficile* in diarrheic and nondiarrheic cats [J]. *Anaerobe*, 2020, 62: 102164.
- [6] ÁLVAREZ-PÉREZ S, ANEGA B, BLANCO JL, et al. *In vitro* activity of fidaxomicin and combinations of fidaxomicin with other antibiotics against *Clostridium perfringens* strains isolated from dogs and cats [J]. *BMC Vet Res*, 2023, 19 (1): 238–244.
- [7] RODRIGO O S S, FRANCISCO C F L. *Clostridium perfringens*: a review of enteric diseases in dogs, cats and wild animals [J]. *Anaerobe*, 2015, 33: 14–17.
- [8] SERGIO Á, JOSÉ L B, CELINE H, et al. Prevalence and characteristics of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in dogs and cats attended in diverse veterinary clinics from the Madrid region [J]. *Anaerobe*, 2017, 48: 47–55.
- [9] 黄建华, 陈松明. 德国牧羊犬魏氏梭菌毒素中毒引起猝死的诊断报告 [J]. *畜牧与兽医*, 2013, 45 (2): 109–110.
- [10] 吴允正, 韩春生, 戴益民, 等. 多种动物源 A 型产气荚膜梭菌的分离鉴定及生物学特性 [J]. *江西农业大学学报*, 2020, 42 (3): 546–552.
- [11] 赵一宁, 陈新延, 王丽扬, 等. 复方白头翁散抑制鸡白痢沙门菌生物被膜形成的初步研究 [J]. *扬州大学学报 (农业与生命科学版)*, 2023, 44 (2): 47–53.
- [12] OMERNIK A, PLUSA T. Toxins of *Clostridium perfringens* as a natural and bioterroristic threats [J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2015, 39 (231): 149–152.
- [13] MEHDIZADEH G I, NAVARRO M A, LI J, et al. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens* [J]. *Virulence*, 2021, 12 (1): 723–753.
- [14] AWAD M M, ELLEMOR D M, BOYD R L, et al. Synergistic effects of alpha-toxin and perfringolysin O in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene [J]. *Infect Immun*, 2001, 69 (12): 7904–7910.
- [15] UZAL F A, FREEDMAN J C, SHRESTHA A, et al. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease [J]. *Future Microbiol*, 2014, 9 (3): 361–377.
- [16] UZAL F A, SAPUTO J, SAYEED S, et al. Development and application of new mouse models to study the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C enterotoxemias [J]. *Infect Immun*, 2009, 77 (12): 5291–5299.
- [17] NAVARRO M A, LI J, MCCLANE B A, et al. NanI sialidase is an important contributor to *Clostridium perfringens* type F strain F4969 intestinal colonization in mice [J]. *Infect Immun*, 2018, 86 (12): e00462.
- [18] 陈新延, 闻亮, 王丽扬, 等. 鹤源产气荚膜梭菌的分离及其生化特性鉴定 [J]. *中国兽医科学*, 2021, 51 (11): 1404–1410.