

张清正, 曹思宇, 刘畅, 等. 江苏部分地区鸡源产气荚膜梭菌分离鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (9): 104-111.

ZHANG Q Z, CAO S Y, LIU C, et al. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* from chickens in some areas of Jiangsu Province [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (9): 104-111.

## 江苏部分地区鸡源产气荚膜梭菌分离鉴定

张清正<sup>1,2</sup>, 曹思宇<sup>2</sup>, 刘畅<sup>2</sup>, 李心遥<sup>2</sup>, 宋小凯<sup>2</sup>, 严若峰<sup>2</sup>, 徐立新<sup>2</sup>,  
李祥瑞<sup>2</sup>, 陆明敏<sup>2\*</sup>, 袁橙<sup>1\*</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300;

2. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 旨在鉴定江苏地区鸡源产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 毒素型并分析其流行特征。从江苏部分地区肉鸡养殖场采集疑似患坏死性肠炎 (necrotic enteritis, NE) 病鸡的肠道内容物等样品; 采用 TSC 选择培养基从样品中分离纯化产气荚膜梭菌, 并对分离菌株进行形态观察、生化鉴定和 16S rDNA 分子鉴定; 再通过 PCR 技术测定毒力基因, 并根据检测结果和现有毒素分型系统进行归类分型。结果: 从 269 份样品中分离出 234 株分离菌, 其形态、生化鉴定和 16S rDNA 分子鉴定均符合产气荚膜梭菌特性; PCR 结果显示所有分离菌株均携带  $\alpha$  毒素编码基因 *cpa*, 其中 53 株具有  $\beta$  毒素编码基因 *cpb2*, 而其余 6 种毒力因子如 *cpb* ( $\beta$  毒素)、*etx* ( $\epsilon$  毒素)、*iap/ibp* ( $\iota$  毒素)、*cpe* (肠毒素)、*netB* (坏死性肠炎毒素) 和 *tpeL* (大分子细胞毒素) 均未被检测到。综上, 本研究在江苏部分地区共分离鉴定出 234 株 A 型产气荚膜梭菌, 为该地区 NE 的防控提供参考。

**关键词:** 产气荚膜梭菌; 鸡坏死性肠炎; 分离鉴定; 毒力基因

中图分类号: S855 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)09-0104-08

## Isolation and identification of *Clostridium perfringens* from chickens in some areas of Jiangsu Province

ZHANG Qingzheng<sup>1,2</sup>, CAO Siyu<sup>2</sup>, LIU Chang<sup>2</sup>, LI Xinyao<sup>2</sup>, SONG Xiaokai<sup>2</sup>, YAN Ruofeng<sup>2</sup>, XU Lixin<sup>2</sup>,  
LI Xiangrui<sup>2</sup>, LU Mingmin<sup>2\*</sup>, YUAN Cheng<sup>1\*</sup>

(1. Jiangsu Agricultural and Animal Husbandry Technology Vocational College, Taizhou 225300, China;

2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The aim of this study was to identify the toxin types of *Clostridium perfringens* isolates derived from chickens in the Jiangsu region and to analyze their epidemiological characteristics. Samples such as intestinal contents were collected from broilers afflicted with suspected necrotizing enteritis (NE) infection in broiler farms in some areas of Jiangsu Province. *C. perfringens* was isolated and purified from the samples using the TSC selective medium, and the isolates were characterized by morphological observation, biochemical tests, and 16S rDNA gene detection. The virulence genes of the *C. perfringens* isolates were determined by PCR assays, and the *C. perfringens* isolates were classified according to the toxinotyping system. The results were that a total of 234 isolates were obtained from 269 samples, and analyses of their morphology, biological characteristics, and 16S rDNA gene identification confirmed their identity as *C. perfringens*. The PCR results showed that all isolates possessed the *cpa* gene, responsible for  $\alpha$  toxin production. Additionally, 53 isolates contained the *cpb2* gene, encoding the  $\beta$  toxin. However, the other six major virulence factors—*cpb* ( $\beta$ -toxin), *etx* ( $\epsilon$ -toxin), *iap/ibp* ( $\iota$ -toxin), *cpe* (Enterotoxin), *netB* (Necrotic enteritis B-like toxin) and *tpeL* (the glycosylating *C. perfringens* large cytotoxin) were not detected. In summary, this study successfully identified 234 *C. perfringens* isolates in the selected areas of Jiangsu, all being classified as type A. The information presented here might refine the distribution and toxinotypes of *C. perfringens* isolates derived from chickens and contribute to a deeper understanding of the

收稿日期: 2024-12-17; 修回日期: 2025-07-20

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (32202837); 江苏农牧科技职业学院校级科研项目 (NSF2023ZR02)

第一作者: 张清正, 男, 硕士

\* 通信作者: 陆明敏, 副教授, 主要从事兽医寄生虫分子与免疫、兽医公共卫生研究, E-mail: mingmin.lu@njau.edu.cn; 袁橙, 副教授, 主要从事预防兽医学、职业教育研究, E-mail: 2407211038@qq.com。

epidemiological features of NE in China, thereby providing a reference for prevention and control of NE.

**Keywords:** *C. perfringens*; necrotic enteritis; isolation and identification; virulence gene

产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 是一种革兰阳性、杆状、可形成芽孢的条件性致病菌, 又名魏氏梭菌 (*Clostridium welchii*)<sup>[1]</sup>。该菌广泛地存在于自然界及多种动物和人的肠道中, 属于肠道微生物正常菌群的一种常在菌<sup>[2-3]</sup>。临床上, 产气荚膜梭菌可迅速在食物、伤口或肠道中增殖并分泌各种毒素进而引发多种疾病, 导致人食物中毒、非食源性腹泻和气性坏疽, 并可诱发鸡坏死性肠炎、牛羊和其他动物肠毒血症等, 其最常见的传播媒介为家禽和未煮熟的肉类<sup>[4-6]</sup>。产气荚膜梭菌可分泌外毒素和酶等多种毒力因子, 已被鉴定出超过 20 余种<sup>[7]</sup>, 其中起主要致病作用的毒素有  $\alpha$  毒素、 $\beta$  毒素、 $\beta 2$  毒素、 $\epsilon$  毒素、 $\iota$  毒素、大分子细胞毒素 (TpeL)、肠毒素 (CPE) 及坏死性肠炎 B 毒素 (NetB) 等。根据该菌产生的毒素可将其分为 A ( $\alpha$ ), B ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ ), C ( $\alpha$ 、 $\beta$ ), D ( $\alpha$ 、 $\epsilon$ ) E ( $\alpha$ 、 $\iota$ ), F ( $\alpha$ 、CPE), G ( $\alpha$ 、NetB) 7 种类型<sup>[8]</sup>。

由产气荚膜梭菌引起的鸡坏死性肠炎 (necrotic enteritis, NE) 是一种常见的禽类肠道疾病<sup>[9]</sup>, 每年可对全球各个国家养殖业造成大约 60 亿美元的经济损失<sup>[10]</sup>。该病常发于 2~6 周龄的鸡, 病死率较高, 典型临床特征为宿主突发性死亡及剖检后小肠中出现气性病变及黏膜糜烂性坏死点<sup>[11]</sup>。随着欧盟、美国等地区对饲料中抗生素生长添加剂预防性使用的禁令

实施, 曾经被控制较好的 NE 已经重新流行, 并对家禽养殖业造成重大影响<sup>[7]</sup>。我国于 2020 年进入“限抗时代”, 全面限制抗生素的使用<sup>[12]</sup>, 已有研究报道 A 型鸡源产气荚膜梭菌在河北、山西省部分规模化养殖场患 NE 病鸡中检出<sup>[13]</sup>。因此, 该菌在家禽养殖地区的流行情况需引起高度关注。

本研究从江苏省部分地区肉鸡养殖场中采集疑似 NE 病鸡的肠道内容物等临床样品, 分离产气荚膜梭菌并鉴定其毒素型, 通过多重和单重 PCR 法, 检测  $\alpha$  毒素 (*cpa*)、 $\beta$  毒素 (*cpb*)、 $\epsilon$  毒素 (*etx*)、 $\iota$  毒素 (*iap*)、肠毒素 (*cpe*)、NetB (*netB*)、 $\beta 2$  毒素 (*cpb2*) 和 TpeL 毒素 (*tpeL*) 等 8 种毒力基因。根据现有的毒素分型系统, 确定分离菌株的毒素型, 从而进一步掌握江苏地区鸡源产气荚膜梭菌毒素型分布特点以及流行特征, 以期为当地 NE 诊断和防控提供必要的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源

2023 年 6 月至 2024 年 3 月, 先后从江苏省镇江市、连云港市、泰州市、盐城市、南京市、常州市、徐州市和淮安市共 8 个地区采集到样品 269 份 (表 1)。

表 1 样品信息

采样时间	采样地点	采样鸡品种	采样日龄	样品类型	样品数量
2023 年 6 月	江苏镇江	黄羽岭南黄鸡 3 号	63	肠道内容物	27
2023 年 7 月	江苏连云港	黄羽雪山鸡	56	肠道内容物	15
2023 年 8 月	江苏泰州	黄羽 AA	72	粪便	57
2023 年 8 月	江苏盐城	黄羽青脚麻鸡	68	肝脏、粪便	43
2023 年 9 月	江苏南京	白羽科宝	64	肛拭子、粪便	28
2023 年 12 月	江苏常州	黄羽三黄鸡	68	肠道内容物	32
2024 年 2 月	江苏徐州	黄羽淮南麻黄鸡	59	肠道	21
2024 年 3 月	江苏淮安	白羽罗斯	58	肝脏、肠道内容物	46

### 1.2 参考菌株

产气荚膜梭菌 A 型参考菌株 (ATCC 13124) 购自南京娇子藤科学器材有限公司; 产气荚膜梭菌 B 型 (CVCC 54)、C 型 (CVCC 2041)、D 型 (CVCC 1168) 和 E 型 (CVCC 90) 均购自中国兽医药品监察所国家兽医微生物菌 (毒) 种保藏中心。产气荚

膜梭菌 F 型 (CP-TZ08) 保存于江苏农牧科技职业学院, 产气荚膜梭菌 G 型 (CP-NJ56) 保存于南京农业大学。

### 1.3 主要试剂

硫乙醇酸盐液体培养基 (FTG)、胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂培养基 (TSC)、D-环丝氨酸溶液、

产气荚膜梭菌测定用培养基 (CPAM)、强化梭菌培养基 (RCM)、含铁牛乳培养基、革兰染色液试剂盒、细菌生化微量反应管均购自青岛海博生物技术有限公司; 日本三菱 MGC 2.5 L 厌氧产气袋购自南京有晴生物科技有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒和胶回收纯化试剂盒购自 OMEGA 公司; DL2000 DNA Marker、2 × Rapid Taq Master Mix 和 Multiplex PCR Kit 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

#### 1.4 样品的采集

采集疑似 NE 病鸡临床病料。对临床表现为沉郁、嗜睡、食欲下降、严重腹泻症状的鸡用无菌棉采集肛门拭子; 采集血便、煤焦油样粪便; 对病死鸡进行无菌剖检, 采集具有局灶性或弥漫性坏死点病变的组织和器官。将上述病料置于无菌采集袋中标记后迅速放入适量冰袋低温运输。

#### 1.5 细菌的分离纯化

分别称取适量肠道内容物、粪便和组织样品, 匀浆后接种与 FTG 液体培养基在 37 °C 恒温培养箱厌氧培养 16~18 h; 无菌条件下, 用细菌接种环将 FTG 液体增菌样品接种于 TSC 平板, 37 °C 厌氧培养 24~48 h, 培养期间观察平板上的菌落形态; 用接种环挑取周围有中心为黑色周围有乳白色浑浊晕环的单菌落转接至 RCM 液体培养基中, 厌氧培养 16~18 h; 用接种环将 RCM 液体增菌样品接种于 CPAM 固体培养基平板, 厌氧培养 24~48 h 进行二次纯化; 再挑取中心为黑色的单菌落置于 RCM 培养基中液体增菌用于后续鉴定。

#### 1.6 染色镜检和生化试验

涂片固定, 用预先灭菌的细菌接种环蘸取纯化后

的菌液涂抹、干燥并固定于洁净的载玻片上; 染色, 包括初染、媒染、脱色、复染等 4 个步骤; 将染色完毕的载玻片放置室温下自然晾干后, 置于 1 000 倍光学显微镜下, 油镜观察细菌形态特征。

参照《常见细菌系统鉴定手册》和《伯杰细菌鉴定手册》(第八版) 的方法, 挑取镜检后的疑似菌落, 分别接种于含铁牛乳培养基和不同的生化鉴定管中, 观察并记录结果。

#### 1.7 16S rDNA 基因鉴定

细菌基因组 DNA 提取: 参照文献 [14] 将冻干保存的参考菌株进行复苏。按照 Omega 细菌 DNA 提取试剂盒说明书的操作流程分别提取分离菌株和参考菌株的基因组 DNA, 用作 PCR 反应模板。

产气荚膜梭菌 16S rDNA 引物: 参照文献 [15], 采用细菌 16S rDNA 通用引物, 由上海生工生物工程技术有限公司合成 (表 2)。以上述提取的 DNA 为模板, 常规 PCR 扩增 16S rDNA 基因。PCR 反应体系 (25 μL): 2 × Rapid Taq Master Mix 12.5 μL, 上、下游引物各 1 μL, DNA 模板 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 8.5 μL。PCR 反应程序: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 58 °C 15 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。取 PCR 扩增产物 10 μL, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 120 V 约 30 min, 观察条带。阳性对照为 A 型参考菌株 (ATCC 13124), 阴性对照为 ddH<sub>2</sub>O。用 Omega DNA 胶回收试剂盒纯化目的条带, 送至北京擎科生物科技股份有限公司测序。测序结果在 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上进行 BLAST 分析, 以确定分离菌株是否为产气荚膜梭菌。

表 2 PCR 引物序列

目的基因	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp	参考文献
16S rDNA	F: GTTGTGAACTCCTTTTTCTCC R: CGCAGAAACACAGGATAGCA	1 500	[15]
<i>cpa</i>	F: GCTAATGTTACTGCCGTTGA R: CCTCTGATACATCGTGAAG	324	[8]
<i>cpb</i>	F: GCGAATATGCTGAATCATCTA R: GCAGGAACATTAGTATATCTTC	195	[8]
<i>cpb2</i>	F: AAATATGATCCTAACCAACAA R: CCAAATACTATAATCGATGC	548	[16]
<i>etx</i>	F: TGGGAACCTCGATACAAGCA R: AACTGCACTATAATTTCTTTTCC	376	[8]
<i>iap</i>	F: AATGGTCCTTTAAATAATCC R: TTAGCAAATGCACTCATATT	272	[8]

续表2

目的基因	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp	参考文献
<i>cpe</i>	F: TTCAGTGGATTACTTCTG R: TGTCCACTAGCTGTAATTGT	485	[8]
<i>netB</i>	F: CTTCTAGTGATACCGCTTCAC R: CGTTATATTCACCTTGTGTGACGAAAG	738	[8]
<i>tpeL</i>	F: ATATAGAGTCAAGCAGTGGAG R: GGAATACCACTTGATATACCTG	466	[16]

## 1.8 毒力基因鉴定与毒素分型

引物由上海生工生物工程技术有限公司合成(表2)。采用多重PCR法对16S rDNA阳性分离菌株的*cpa*、*cpb*、*etx*、*iap*、*cpe*、*netB* 6种主要毒力基因进行检测(引物序列见表2)。反应体系: 2 × Multiplex Buffer 25 μL, 10 × Primer Mix 5 μL, 分离菌株DNA模板2 μL, 灭菌 ddH<sub>2</sub>O 17 μL, *Taq* DNA聚合酶1 μL。反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 90 s, 72 °C 60 s, 35个循环; 72 °C 10 min。单重PCR法检测*cpb2*和*tpeL*毒力基因, 反应程序同1.7。在多重PCR检测中, 以B型、C型、D型、E型、F型及G型参考菌株的混合菌株为阳性对照, 以ddH<sub>2</sub>O为阴性对照; 在β<sub>2</sub>毒素和TpeL毒素的单重PCR检测中, 分别以CP-NJ56菌株以及实验室保存pET28a-TpeL质粒的为阳性对照, 并均以ddH<sub>2</sub>O为阴性对照。取上述两种PCR扩增产物10 μL, 经2%

琼脂糖凝胶电泳, 120 V约30 min后参照DL2000 DNA Marker观察分析结果。根据文献[1, 8]报道的毒素分型系统对分离株归类分型。

## 2 结果

### 2.1 细菌分离鉴定

#### 2.1.1 细菌分离与形态观察

在TSC平板上, 因培养基中含亚硫酸盐与铁盐, 产气荚膜梭菌可以还原亚硫酸盐成硫化物并与铁反应生成黑色菌落, 并在黑色菌落周围可见由卵磷脂酶分解卵磷脂产生的米黄色不透明的晕圈(图1A)。从269份样品中, 共分离出疑似产气荚膜梭菌234株, 分离率为87% (234/269)。分离菌株经革兰染色后在1000倍光学显微镜下观察可见短粗、两端钝圆的杆状形态, 单个或成双排列(图1B)。

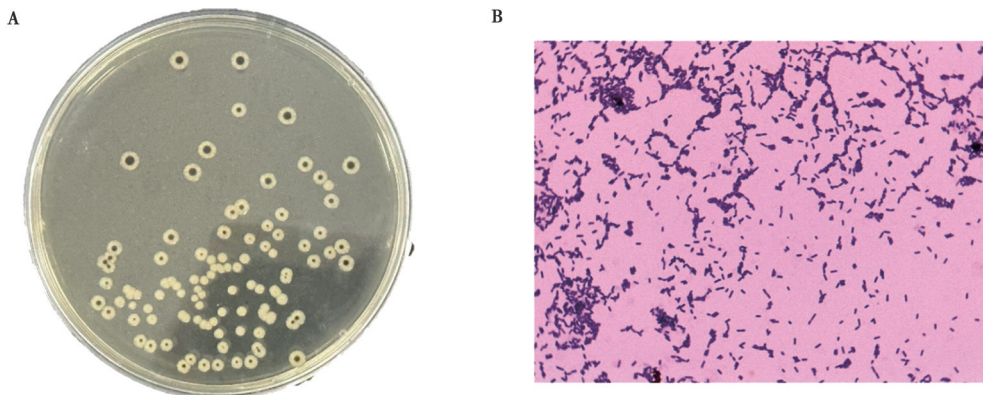
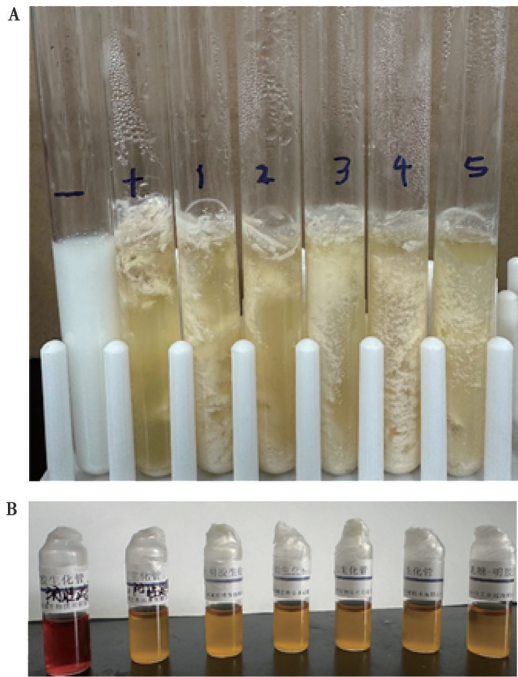


图1 分离菌株在选择性培养基上的特征(A)及革兰染色形态(B)

#### 2.1.2 牛乳汹涌发酵和生化鉴定

将234株分离菌株分别接种于含铁牛乳培养基中, 于46 °C水浴锅中培养5 h后可见试管内产生气体, 形成蜂窝状团块, 即“汹涌发酵”(图2A)。产气荚膜梭菌能发酵乳糖, 凝固酪蛋白并大量产气, 此

现象具有特征性的鉴别意义。生化试验显示分离菌株可发酵葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘露糖和麦芽糖; 不发酵甘露醇、鼠李糖和山梨醇; 产气产酸, 产生硫化氢、不产生吲哚、液化明胶(图2B)、不还原硝酸盐。上述特点符合产气荚膜梭菌的生化特性。



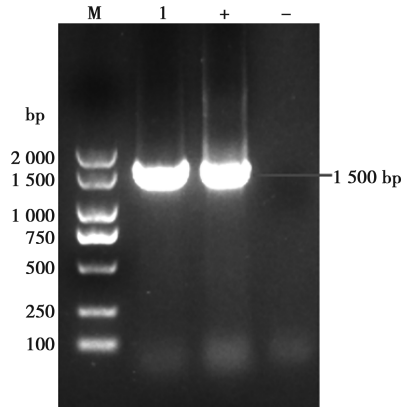
- 阴性对照, + 阳性对照, 1~5. 分离菌株。

图 2 分离菌株牛乳汹涌发酵试验 (A) 和生化试验 (B)

### 2.2 分离菌株 16S rDNA 基因鉴定

采用常规 PCR 方法, 分离菌株 16S rDNA PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 图 3 显示, 出现与预期片段大小相符 (1 500 bp) 的特异性条带, 将 PCR 产物纯化回收后送至公司测序, 测序序列经 BLAST 比对分析显示, 分离菌株 ZJCP-01 和产气荚膜梭菌参考菌株 (ATCC 13124) 同源性达 99%。其

余分离菌株均符合上述结果。综合上述形态、生化鉴定和 16S rDNA 基因 PCR 检测结果, 确定本研究共分离出 234 株产气荚膜梭菌。



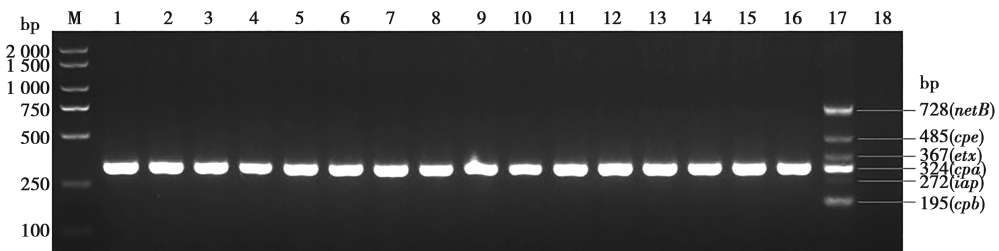
M. DL2000 DNA Marker; 1. 分离菌株 ZJCP-01; +. 阳性对照; -. 阴性对照。

图 3 分离菌株 16S rDNA PCR 产物电泳

### 2.3 分离菌株毒力基因检测和分型

#### 2.3.1 多重 PCR 法毒力基因检测

多重 PCR 法检测 16S rDNA 阳性分离菌株毒力基因 *cpa*、*cpb*、*etx*、*iap*、*cpe*、*netB*, PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示, 仅出现与 *cpa* 基因预期片段大小相符 (324 bp) 的特异性条带, 检出率为 100% (234/234), 其余 5 种基因均未被检测到 (图 4)。



M. DL2000 DNA 相对分子量标准; 1~16. 分离菌株; 17. 阳性对照; 18. 阴性对照。

图 4 分离菌株多重 PCR 毒力基因检测

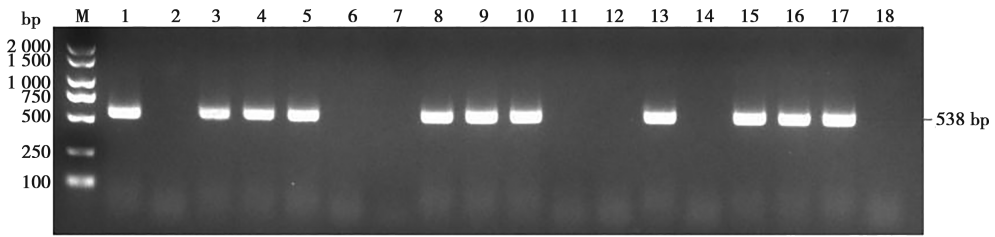
#### 2.3.2 *cpb2* 和 *tpeL* 毒力基因检测

单重 PCR 法分别检测 *cpb2* 和 *tpeL* 毒力基因, PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示, 部分菌株出现与 *cpb2* 基因预期片段大小相符 (538 bp) 的特异性条带 (图 5), 检出率约为 22.6% (53/234)。而 *tpeL* 基因未被检测到 (图 6)。

#### 2.3.3 分离菌株毒素分型

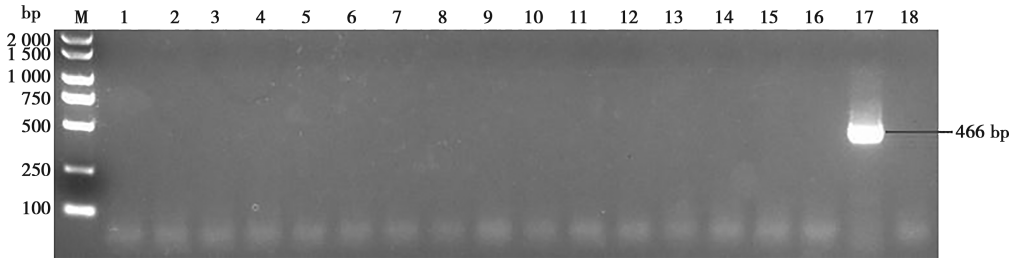
综合上述毒力基因 PCR 检测结果, 本研究共从

269 份样品中分离到 234 株产气荚膜梭菌, 毒素型均为 A 型。其中仅含 *cpa* 基因的菌株有 181 株, 阳性率为 77.4% (181/234); *cpa* 和 *cpb2* 基因阳性的菌株有 53 株, 阳性率为 22.6% (53/234)。同时含有 *cpa*、*cpb2* 和 *tpeL* 3 种毒力基因的 A 型菌株和其余 6 种毒素型均未被检测到 (表 3)。



M. DL2000 DNA 相对分子量标准; 1~16. 分离菌株; 17. 阳性对照; 18. 阴性对照。

图5 分离菌株 *cpb2* 毒力基因检测



M. DL2000 DNA 相对分子量标准; 1~16. 分离菌株; 17. 阳性对照; 18. 阴性对照。

图6 分离菌株 *tpeL* 毒力基因检测

表3 分离菌株基因型的分类结果

基因型	毒力基因	分型毒素					非分型毒素		数量	
		α 毒素	β 毒素	ε 毒素	ι 毒素	CPE	NetB	β2 毒素		TpeL
	<i>cpa</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	181
A	<i>cpa, cpb2</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	53
	<i>cpa, cpb2, tpeL</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	0
B	<i>cpa, cpb, etx</i>	+	+	+	-	-	-	+/-	+/-	0
C	<i>cpa, cpb</i>	+	+	-	-	+/-	-	+/-	+/-	0
D	<i>cpa, etx</i>	+	-	+	-	+/-	-	+/-	-	0
E	<i>cpa, iap</i>	+	-	-	+	+/-	-	+/-	-	0
	<i>cpa, cpe</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	0
F	<i>cpa, cpe, cpb2</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	0
	<i>cpa, cpe, cpb2, tpeL</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	0
	<i>cpa, netB</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	0
G	<i>cpa, netB, cpb2</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	0
	<i>cpa, netB, cpb2, tpeL</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	0

注：“-”表示有；“+”表示无；“+/-”表示不确定是否存在。

### 3 讨论

产气荚膜梭菌通过其所产生的多种毒素和酶作用于宿主的各种组织和细胞, 可使多种动物发生严重疾病。该菌还可以感染鸡、鸭、猪、牛羊肉等动物性食品, 通过食物链传播给人, 具有诱发食物中毒等消化

道疾病的潜在风险<sup>[17]</sup>。目前, 产气荚膜梭菌在世界范围内已成为一种常见的人畜共患病病原菌, 具有重要的公共卫生学意义。

A~G 型产气荚膜梭菌毒株均可产生 α 毒素, 而 A 型是最常见的毒素型, 在临床患病动物中的检出率很高。王帝等<sup>[18]</sup>从江苏和浙江地区采集样品分离到

16株产气荚膜梭菌菌株,均为A型。邵蓉<sup>[19]</sup>从湖南、湖北、山东、山西等地鸡场分离到139株产气荚膜梭菌,其中,113株为A型,约占81.29%;26株为G型,约占18.71%;而在139株分离株中,具有*cpb2*毒素基因的有65株,约占60.75%。以上结果提示,我国目前主要流行菌株仍为A型,这与本研究结果相一致。 $\alpha$ 毒素是由位于染色体DNA上由*cpa*基因编码的一种锌依赖性酶(一种单链多肽蛋白),具有磷脂酶C和鞘磷脂酶的活性,可通过破坏细胞膜的完整性而导致细胞裂解和死亡。临床上, $\alpha$ 毒素可引起人类的气性坏疽和胃肠损伤,并诱发鸡坏死性肠炎、仔猪的坏死性小肠结肠炎以及羔羊的肠毒血症等畜禽疾病<sup>[20]</sup>。 $\alpha$ 毒素曾被认为是引起NE的主要致病因子,但Keyburn等<sup>[21]</sup>研究发现利用 $\alpha$ 毒素突变体菌株也可诱发NE,并认为 $\alpha$ 毒素并不一定是NE发病机制的必需毒力因子。在本研究中,所有产气荚膜梭菌分离株均被检测到携带有*cpa*基因,这也可能是该菌并未在江苏地区导致广泛NE发病的原因。

以往的研究将产气荚膜梭菌归类为A~E型,但在2018年,Rood等修订了最新的产气荚膜梭菌分型方案,增加了2种新的分型,即F型和G型<sup>[8]</sup>。G型可产生的NetB毒素,该毒素是由Keyburn等<sup>[22]</sup>于2008年发现的一种新型穿孔毒素,由位于质粒DNA上的*netB*基因编码<sup>[22]</sup>,其作用机制是导致宿主细胞形成亲水性孔洞,最终造成破裂死亡。尽管NetB毒素被认为是造成NE的主要毒力因子,但最新的研究表明产气荚膜梭菌的致病不仅由NetB毒素引起,还可由其他受遗传调控的致病蛋白和酶所介导<sup>[23]</sup>。在本研究中,未在产气荚膜梭菌分离株中鉴定到NetB毒素。

早期研究发现,从NE病鸡样品中可检测到 $\beta 2$ 毒力基因(*cpb2*),推测NE的发生可能与该毒素有关<sup>[24]</sup>。 $\beta 2$ 毒素是由位于质粒DNA上的*cpb2*基因编码的一种穿孔溶细胞毒素,该毒素与原来的 $\beta$ 毒素生物学活性相似,被命名 $\beta 2$ 毒素,也可由A型产生<sup>[11]</sup>。Keyburn等<sup>[22]</sup>分离检测了来自NE样品中菌株的*cpb2*基因携带情况,发现18株A型产气荚膜梭菌中仅有2株携带*cpb2*基因;Martin等<sup>[24]</sup>在106株鸡源产气荚膜梭菌分离株中检测到39株携带*cpb2*基因的菌株。本研究分离出的234株A型产气荚膜梭菌中,53株携带*cpb2*基因(22.6%)。目前,NE的发生是否与产气荚膜梭菌产生的 $\beta 2$ 毒素有关尚无定论,需要进一步的研究。

TpeL毒素是从C型产气荚膜梭菌中分离出的一种新型毒素,其可加剧NE病程<sup>[25]</sup>。该毒素与 $\beta 2$ 毒素一样,不参与毒素分型。国外学者在鹌鹑坏死性肠

炎病例中首次检测了*tpeL*阳性菌株,并且发现其与*cpb2*阳性的共现频率非常高<sup>[26]</sup>。因此,上述发现凸显了对产气荚膜梭菌在不同宿主中的基因型进行准确鉴定的必要性。目前国内对于上述2种新毒力基因的研究相对较少,尚不能明确*cpb2*与*tpeL*基因与我国NE流行相关性。近年来,随着全球进入“限抗时代”,国外NE病例激增,我国对于防控由产气荚膜梭菌引起的NE压力日益显著。国内NE主要流行于禽类生产比较集中或发达的地区,相比于国外鸡源产气荚膜梭菌主要流行毒素型,我国尚无系统性地研究。另外,对于*cpb2*、*netB*、*tpeL*基因编码的相应毒素对于国内主要流行产气荚膜梭菌毒株致病性的影响还需进一步研究。

全球范围内的“限抗令”使得学者们在开发针对NE疫苗方面做出了巨大的努力。迄今为止,已经测试了多种疫苗,包括类毒素疫苗、全灭活菌苗、弱毒疫苗、亚单位疫苗、重组载体疫苗和减毒沙门菌载体疫苗等<sup>[27-29]</sup>。一般而言,这些疫苗的靶点均为在NE致病中发挥重要功能的毒素与酶类。如含有灭活 $\alpha$ -毒素、NetB毒素和TpeL毒素的类毒素疫苗可以诱导毒素中和抗体,防止对肠道黏膜的损伤<sup>[30]</sup>。 $\alpha$ -毒素、NetB毒素、果糖-1、6-二磷酸醛缩酶(FBA)、锌金属蛋白酶(Zm)和胶原结合蛋白A(Cna)是产气荚膜梭菌重要的毒力因子或毒力相关因子,在对宿主的黏附、定殖、能量利用和早期感染传播中起着关键作用,用这些重组蛋白接种疫苗有助于改善NE感染的严重程度<sup>[31]</sup>。Heidarpanah等<sup>[32-33]</sup>鉴定了产气荚膜梭菌特有的5种表面暴露蛋白,并评估了这些重组亚单位疫苗对NE的免疫保护能力。上述研究结果表明,鉴定产气荚膜梭菌的相关抗原或致病毒素,对于NE的免疫预防策略的完善至关重要。因此,需要进一步了解鸡源产气荚膜梭菌的流行特点和病原特性,鉴定更多的疫苗候选分子,开发保护率较高的替代疫苗,保障畜禽养殖产业的持续、绿色、健康发展。

## 4 结论

本研究通过形态观察、生化鉴定、16S rDNA基因鉴定和PCR检测方法对江苏省部分地区不同鸡场269份样品进行了产气荚膜梭菌分离鉴定,共分离出234株菌株,均为A型,阳性率为86.9%。其中,*cpb2*阳性A型菌株约占22.6%,同时未检测出其余毒素型。本研究通过对我国江苏部分地市产气荚膜梭菌毒力基因及其流行趋势的鉴定,进一步补充和完善了国内NE流行特征,为NE的流行病学研究提供参考依据,有助于促进NE的防控。

## 参考文献:

- [1] KIU R, HALL L J. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens* [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7 (1): 1-15.
- [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] ENGBERG R M, HEDEMANN M S, JENSEN B B. The influence of grinding and pelleting of feed on the microbial composition and activity in the digestive tract of broiler chickens [J]. *Br Poult Sci*, 2002, 43 (4): 569-579.
- [4] 杨文静, 张富友, 刘娜, 等. 禽产气荚膜梭菌研究进展 [J]. *中国动物检疫*, 2023, 40 (3): 46-53.
- [5] QIU Q, DEWEY-MATTIA D, SUBRAMHANYA S, et al. Food recalls associated with foodborne disease outbreaks, United States, 2006-2016 [J]. *Epidemiol Infect*, 2021, 149: e190.
- [6] XU W, WANG H, LIU L, et al. Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* isolated from different chicken farms in China [J]. *Anaerobe*, 2021, 72: 102467.
- [7] FATHIMA S, AL HAKEEM W G, SHANMUGASUNDARAM R, et al. Necrotic enteritis in broiler chickens: a review on the pathogen, pathogenesis, and prevention [J]. *Microorganisms*, 2022, 10 (10): 1958.
- [8] ROOD J I, ADAMS V, LACEY J, et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme [J]. *Anaerobe*, 2018, 53: 5-10.
- [9] SONGER J G. Clostridial enteric diseases of domestic animals [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1996, 9 (2): 216-234.
- [10] SUN Z, LU M, LILLEHOJ H, et al. Characterization of collagen binding activity of *Clostridium perfringens* strains isolated from broiler chickens [J]. *Pathogens*, 2023, 12 (6): 778.
- [11] HOFACRE C L, SMITH J A, MATHIS G F. An optimist's view on limiting necrotic enteritis and maintaining broiler gut health and performance in today's marketing, food safety, and regulatory climate [J]. *Poult Sci*, 2018, 97 (6): 1929-1933.
- [12] 张田勘. 饲料禁抗生素大势所趋, 配套须跟上 [J]. *科学大观园*, 2020 (2): 62.
- [13] 臧江华, 安一娜, 王婧, 等. 鸡源 A 型产气荚膜梭菌致病性及药物疗效分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53 (10): 3561-3569.
- [14] 缪西鹏, 高瑞, 谢玉杰, 等. 产气荚膜梭菌多重 PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. *中国兽医学报*, 2022, 42 (8): 1591-1596.
- [15] WANGR F, CAO W W, FRANKLIN W, et al. A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of *Clostridium perfringens* in food [J]. *Mol Cell Probes*, 1994, 8 (2): 131-137.
- [16] PARK J Y, KIM S, OH J Y, et al. Characterization of *Clostridium perfringens* isolates obtained from 2010 to 2012 from chickens with necrotic enteritis in Korea [J]. *Poult Sci*, 2015, 94 (6): 1158-1164.
- [17] 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.
- [18] 王帝, 王欣宇, 郭伟奇, 等. 江苏和浙江地区 16 株鸡源产气荚膜梭菌的分离鉴定及生物学特性分析 [J]. *中国动物传染病学报*, 2023: 1-8. DOI:10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20230906.001.
- [19] 邵蓉. 鸡源产气荚膜梭菌的分离鉴定及噬菌体对其疗效的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
- [20] 胡贺. 我国部分地区鸡源产气荚膜梭菌菌株基因型分析及遗传多态性研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [21] KEYBURN A L, SHEEDY S A, FORD M E, et al. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens [J]. *Infect Immun*, 2006, 74 (11): 6496-6500.
- [22] KEYBURN A L, BOYCE J D, VAZ P, et al. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens* [J]. *PLoS Pathog*, 2008, 4 (2): e26.
- [23] LEE K W, LILLEHOJ H S. Role of *Clostridium perfringens* necrotic enteritis B-like toxin in disease pathogenesis [J]. *Vaccines*, 2021, 10 (1): 61.
- [24] MARTIN T G, SMYTH J A. Prevalence of netB among some clinical isolates of *Clostridium perfringens* from animals in the United States [J]. *Vet Microbiol*, 2009, 136 (1/2): 202-205.
- [25] COURSDON C F, GLOCK R D, MOORE K L, et al. TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A are highly virulent for broiler chicks [J]. *Anaerobe*, 2012, 18 (1): 117-121.
- [26] ALIMOLAEI M, EZATKHAH M, SOLTANI S. Toxin genotypes of *Clostridium perfringens* isolates from common quail (*Coturnix coturnix*) with or without acute necrotic enteritis [J]. *Toxicon*, 2023, 221: 106984.
- [27] THOMPSON D R, PARREIRA V R, KULKARNI R R, et al. Live attenuated vaccine-based control of necrotic enteritis of broiler chickens [J]. *Vet Microbiol*, 2006, 113 (1/2): 25-34.
- [28] ZHANGW, WANG P, WANG B, et al. A combined *Clostridium perfringens/Trueperella pyogenes* inactivated vaccine induces complete immunoprotection in a mouse model [J]. *Biologicals*, 2017, 47: 1-10.
- [30] KEYBURN A L, PORTELA R W, FORD M E, et al. Maternal immunization with vaccines containing recombinant NetB toxin partially protects progeny chickens from necrotic enteritis [J]. *Vet Res*, 2013, 44 (1): 108.
- [31] YUANB, SUN Z, LU M, et al. Immunization with pooled antigens for *Clostridium perfringens* conferred partial protection against experimental necrotic enteritis in broiler chickens [J]. *Vaccines (Basel)*, 2022, 10 (6): 979.
- [32] HEIDARPANAH S, THIBODEAU A, PARREIRA V R, et al. Evaluation of the immunoprotective capacity of five vaccine candidate proteins against avian necrotic enteritis and impact on the caecal microbiota of vaccinated birds [J]. *Animals (Basel)*, 2023, 13 (21): 3323.
- [33] HEIDARPANAH S, THIBODEAU A, PARREIRA V R, et al. Immunization of broiler chickens with five newly identified surface-exposed proteins unique to *Clostridium perfringens* causing necrotic enteritis [J]. *Sci Rep*, 2023, 13 (1): 5254.