

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.09.03

# 规模化养鸡场 A 型产气荚膜梭菌的分离鉴定 及其对海南霉素敏感性的测定

耿梅<sup>1</sup>, 赵艳利<sup>2</sup>, 蒋红霞<sup>2</sup>, 侯庆明<sup>1\*</sup>

(1. 山东胜利生物工程有限公司, 山东济宁 272000; 2. 华南农业大学兽医学院, 国家兽医微生物耐药性风险评估实验室, 广州 510642)

[收稿日期] 2023-02-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 09-0014-06 [中图分类号] S852.61

**[摘要]** 为探究海南霉素对产气荚膜梭菌的敏感性, 在某大型养鸡场采集了 209 份鸡肠道样本, 采用选择性培养基和 MALDI-TOF 质谱仪微生物鉴定仪鉴定, 并对鉴定的菌株进行分型。采用琼脂稀释法测定了海南霉素、恩拉霉素、盐霉素、丁酸甘油酯对临床分离的产气荚膜梭菌的抗菌活性, 以期为当前限抗禁抗后养殖场选择合适的药物控制产气荚膜梭菌提供理论依据。试验结果表明: 共分离出 61 株产气荚膜梭菌, 分离率为 29.2%; 通过多重 PCR 对所分离的产气荚膜梭菌进行分型, 结果分离株均为 A 型产气荚膜梭菌; 4 种药物均有不同程度的抑菌效果, 其中海南霉素与恩拉霉素对鸡源产气荚膜梭菌的抑菌效果最好, 且 MIC 值范围均为 0.004 ~ 0.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。海南霉素具有很好的抗梭菌效果。

**[关键词]** 海南霉素; 产气荚膜梭菌; 抑菌试验

## Isolation and Identification of *Clostridium perfringens* from Type A in Large-scale Chicken Farm and Determination of Hainanmycin Susceptibility

GENG Mei<sup>1</sup>, ZHAO Yan-li<sup>2</sup>, JIANG Hong-xia<sup>2</sup>, HOU Qing-ming<sup>1\*</sup>

(1. Shandong Shengli Biological Engineering co., LTD., Jining, Shandong 272000, China; 2. National Risk Assessment Laboratory for Antimicrobial Resistance of Animal original Bacteria, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Corresponding author: HOU Qing-ming, E-mail: 497683128@qq.com

**Abstract:** In order to explore the sensitivity of Hainanmycin to *Clostridium perfringens*, 209 intestinal samples of chickens were collected from a large poultry farm and identified by selective medium and MALDI-TOF mass spectrometer, and the strains were classified. The antimicrobial activities of hainanmycin, enramycin, salinomycin and tributyrin to *Clostridium perfringens* were determined by agar plate dilution method, in order to provide a theoretical basis for the selection of suitable drugs to control *Clostridium perfringens* after the current restriction and prohibition. The results showed as follows: (1) A total of 61 strains of *Clostridium perfringens* were

作者简介: 耿梅, 研究生, 研究方向为动物营养与饲料科学。

通讯作者: 侯庆明, E-mail: 497683128@qq.com

isolated, with a separation rate of 29.2% ; (2) The isolated *Clostridium perfringens* were classified by multiple PCR, and the results showed that all the isolated *Clostridium perfringens* were TYPE A. (3) All the four drugs had different degrees of antibacterial effect, among which hainanmycin and enramycin had the best antibacterial effect on *Clostridium perfringens* from chicken, and their MIC values ranged from 0.004  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to 0.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . This proves that Hainanmycin has a good anti clostridium effect.

**Key words:** hainanmycin; *Clostridium perfringens*; bacteriostatic test

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*, Cp)是一种革兰氏阳性厌氧菌,又称为魏氏梭菌,能够产生孢子,广泛存在于土壤、污水、沉积物以及人和动物的消化道中,可以在环境中水平传播<sup>[1]</sup>。产气荚膜梭菌作为鸡肠道中的常在菌,一般不发病,但在外界诱因下如患球虫病,饲养卫生条件不良,饲料营养缺乏等造成鸡群机体抵抗力降低时,诱发坏死性肠炎(Necrotic Enteritis, NE)。目前该病已广泛分布于世界各地,呈全球流行态势,严重危害各国养禽业的发展。Cp 所分泌的外毒素已经达到 20 余种,基于其产生的外毒素  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$  和  $\iota$  的差异,将 Cp 分成 A、B、C、D 和 E 型<sup>[2]</sup>,目前国内流行的感染禽类的产气荚膜梭菌主要是 A 型<sup>[3]</sup>。随着限抗禁抗政策的落地,一些对产气荚膜梭菌高敏的药物被禁止使用。海南霉素是一种聚醚类抗球虫药,是我国具有知识产权的原创性药物,用于防治鸡球虫病药物且效果较好<sup>[4-5]</sup>。盐霉素是第一种被中国引进的离子载体类药,前期被广泛应用。恩拉霉素对革兰氏阳性菌有很强的活性,特别是对肠内的有害产气荚膜梭菌(*Clostridium*)抑制力很强,但目前已被禁用。三丁酸甘油酯在幼龄动物上使用,有减少幼龄动物断奶后的腹泻,减少断奶应激,增加成活率和日增重的作用。在目前限抗、禁抗的养殖环境下可选择药物较少,且一些药物易产生耐药性,使得 NE 的问题愈发严重,给养殖带来了巨大的困难<sup>[6]</sup>。本研究选择了几种不同的药物对产气荚膜梭菌的抑菌效果作了比较,以期在养殖中选择有效的抗生素控制产气荚膜梭菌提供理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 样本来源及试验菌株 2019 年从广东省某大型养鸡场采集 209 份鸡肠道样本。参考菌株 A 型

产气荚膜梭菌 ATCC13124,质控菌株脆弱拟杆菌 ATCC25285 和艰难梭菌 ATCC700057 均保存于华南农业大学药理教研室。

1.2 主要试剂和仪器 液体硫乙醇酸盐培养基(FT)、胰酪-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂培养基(TSC)、哥伦比亚琼脂培养基、脑心浸出液肉汤(BHI)、水解酪蛋白培养基(MH)、布氏琼脂培养基均购自广东环凯微生物科技有限公司;海南霉素、恩拉霉素、盐霉素由山东胜利生物工程有限公司提供,丁酸甘油酯购自湖北浩华生物技术有限公司;PCR Mix、DNA Marker 和琼脂糖购自广州擎科生物技术有限公司;微生物质谱鉴定仪 MALDI-TOF-MS(基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪)购自岛津公司。

1.3 细菌的分离鉴定 将采集的鸡肠道样品置于 3 mL FT 培养基,厌氧袋中 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 20 h。将增菌液划线接种于 TSC 平板,厌氧袋中 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 ~ 36 h。挑单菌落划线接种于含有卵黄的 TSC 培养基中,置于厌氧袋中 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 ~ 36 h。挑单菌落划线接种于无菌含脱纤维绵羊血的哥伦比亚平板上,于厌氧袋中 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 ~ 36 h。挑单菌落进行增菌,采用 MALDI-TOF-MS 对疑似菌株进行菌种鉴定。将鉴定的菌株在 BHI 营养琼脂平板上涂布,置于厌氧袋 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 36 h 后,将菌苔刮取下来置于 30% 甘油 BHI 肉汤中,涡旋混匀后 -80  $^{\circ}\text{C}$  保存。

1.4 菌株分型 根据已发表文献合成四种基因的引物,采用多重 PCR 方法对菌株进行分型<sup>[7]</sup>。反应体系为 25  $\mu\text{L}$ ,DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ ,PCR Mix 12.5  $\mu\text{L}$ 、上下游引物(cpa、cpb、etx、iap)各 0.125  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  2 min;94  $^{\circ}\text{C}$  45 s,50  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  45 s 共 30 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  10 min(表 1)。

表 1 分型引物序列

Tab 1 Typing primer sequence

| 目的基因<br>Objective gene | 产物大小/bp<br>Product size | 引物序列(5'-3')<br>Primer sequences                        |
|------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------|
| cpa                    | 324                     | F: GCTAATGTTACTGCCGTTGACC<br>R: CCTCTGATACATCGTGAAG    |
| cpb                    | 196                     | F: GCGAATATGCTGAATCATCTA<br>R: GCAGGAACATTAGTATATCTTC  |
| etx                    | 656                     | F: CCACTTACTTGTGCTACTAAC<br>R: GCGGTGATATCCATCTATTTC   |
| iap                    | 461                     | F: GGAAAAGAAAATTATAGTGATTGG<br>R: CCTGCATAACCTGGAATGGC |

表中 F 代表上游引物;R 代表下游引物

1.5 药敏试验

1.5.1 药物稀释液的制备 按照临床实验室标准化委员会(CLSI)标准,依据公式:质量×效价=体积×浓度,计算所需抗菌药物的量,配置成 5120 μg/mL 药物稀释液。海南霉素、盐霉素用甲醇溶解,恩拉霉素用盐酸溶解,丁酸甘油酯用 DMSO 溶解,药物现配现用。

1.5.2 琼脂稀释法 挑选单菌落接种于 3 mL 营

养肉汤中,厌氧培养 12 ~ 18 h 后用生理盐水调整菌液浓度为 10<sup>7</sup> CFU/mL。将制备好的菌液接种于强化布氏琼脂平板,每点接种的菌量约为 10<sup>4</sup> CFU,质控菌株为脆弱拟杆菌 ATCC25285 和艰难梭菌 ATCC700057。每种菌株分别加入两个未加药物的平板作为生长对照,一个置于有氧环境检测有无需氧菌污染,一个置于厌氧环境作为厌氧生长质控的起点。37 ℃ 厌氧培养 48 h,判读结果。

2 试验结果

2.1 产气荚膜梭菌的分离鉴定 如图 1 所示,挑取 TSC 平板中的黑色单菌落,划线接种于含有卵黄的 TSC 培养基中。再选取在卵黄 TSC 板中呈黑色并有 2 ~ 4 mm 宽的白色沉淀环的单菌落,划线接种于含无菌脱纤维绵羊血的哥伦比亚平板,选取在血平板上形成双溶血环的单菌落菌株,采用 MALDI-TOF-MS 对疑似菌株进行菌种鉴定。共鉴定出 61 株产气荚膜梭菌,分离率为 29.2%。

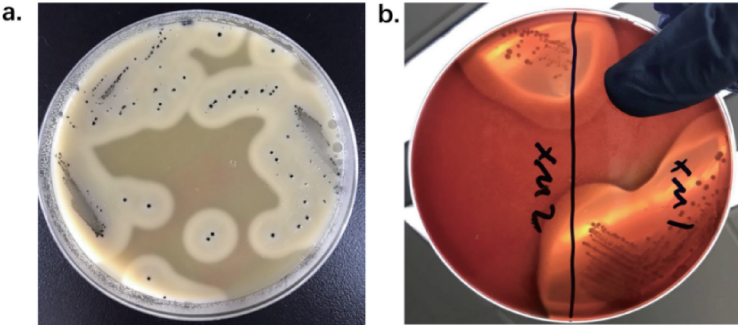


图 1 产气荚膜梭菌在选择性培养基上的菌落形态(a. TSC 卵黄囊琼脂培养基,b. 血液琼脂培养基)

Fig 1 Colony morphology of *Clostridium perfringens* on selective medium;  
a. TSC yolk sac agar medium, b. Blood agar medium.

2.2 分离菌株的分型 多重 PCR 方法对 61 株分离菌株分型结果显示(图 2),所有菌株仅扩增到

324 bp 左右的 cpa 片段,因此判定所分离的鸡源产气荚膜梭菌均为 A 型产气荚膜梭菌。

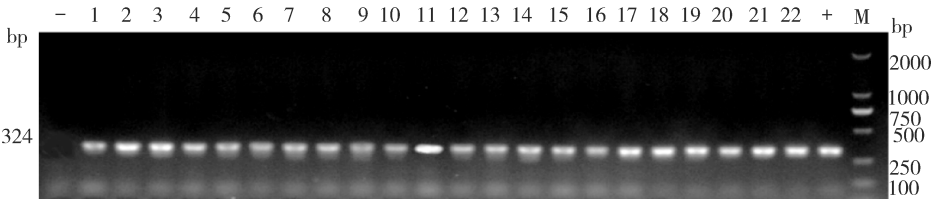


图 2 部分产气荚膜梭菌多重 PCR 分型结果

(泳道 M 为 DL2000;“-”为阴性对照;1 ~ 22 为分离株;“+”为 A 型产气荚膜梭菌标准株 ATCC13124)

Fig 2 Partial mpLtiplex PCR typing resuLts of *Clostridium perfringens*

2.3 药敏试验结果 随机选择 50 株产气荚膜梭菌进行海南霉素 MIC 值测定,10 株进行恩拉霉素、盐霉素和丁酸甘油酯 MIC 值测定。结果显示菌株对海南霉素敏感性差异不大,总 MIC 值范围为 0.004 ~ 0.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之间,MIC<sub>50</sub> 为 0.008  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,

MIC<sub>90</sub> 为 0.015  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 3)。10 株菌株对恩拉霉素和盐霉素均敏感,总 MIC 值范围分别为 0.004 ~ 0.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.008 ~ 0.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之间,对三丁酸甘油酯均不敏感,总 MIC 值范围为 64 ~ > 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之间。

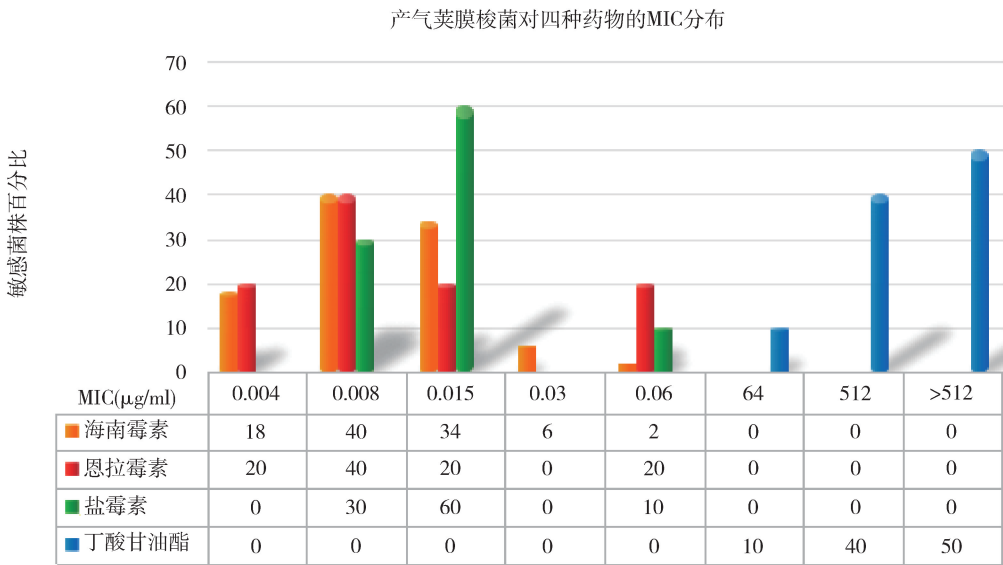


图 3 产气荚膜梭菌对 4 种药物的 MIC 分布图

Fig 3 MIC distribution map of *Clostridium perfringens* for four drugs

3 讨论与结论

产气荚膜梭菌在肠道稳态遭到破坏时则会诱发 NE 的产生,对养殖业造成了严重的危害。据报道,NE 每年可造成全球养鸡生产 20 亿的经济损失<sup>[8]</sup>。Chalmers 等对加拿大的两个肉鸡场进行鸡源产气荚膜梭菌分离,分离率分别为 24.72%、23.28%<sup>[9]</sup>。马壮等报道 2016 年产气荚膜梭菌在广州超市的冷鲜鸡肉中的污染率为 68.68% 且均为 A 型<sup>[10]</sup>,由产气荚膜梭菌 A 型引起的食物中毒是目前美国第二常见的食源性疾病<sup>[11]</sup>,我国对因该病引起的食物中毒也屡有报道<sup>[12-13]</sup>。产期荚膜梭菌作为一种常见的食源性人兽共患病原微生物,可通过动物性食品传播给人类,不仅危害养殖业的发展且对人类的健康有潜在的威胁,应当引起我们的重视<sup>[14]</sup>。

本研究中对广东省某大型养鸡场共采集了 209 份鸡肠道样本,分离鉴定出 61 株产气荚膜梭菌,分

离率为 29.2%,对菌株进行分析结果均为 A 型。陈祥杰等对珠三角地区的产气荚膜梭菌的流行情况进行调查,结果显示阳性检出率为 35%,且都为 A 型产气荚膜梭菌<sup>[15]</sup>。陆宗浩等对澳门地区供应的禽类食品进行产气荚膜梭菌的研究发现,所分离到的均为 A 型且检出率为 37.5%<sup>[16]</sup>。产气荚膜梭菌的分离受养殖环境、抗生素的使用、采样地区等因素影响,本研究中的分离率与分型结果与国内其他研究大致相符。

据研究报道,球虫感染后改变了鸡肠道的 PH,延长了有毒物质排除体外的时间从而有利于产气荚膜梭菌在肠道的增殖<sup>[17]</sup>。有试验表明球虫病可能使禽类易患 NE,当球虫和梭状芽孢杆菌混合感染时比球虫单独感染的症状更严重<sup>[18-19]</sup>。海南霉素主要用于防治鸡球虫病,为调查其对产气荚膜梭菌的抑菌作用,随机选取 50 个分离株进行抑菌试验。结果显示,海南霉素的 MIC 值范围为 0.004 ~



0.06  $\mu\text{g/mL}$  之间, MIC50 为 0.008  $\mu\text{g/mL}$ 。为了与其他药物进行简单的比较, 随机选取了 10 株进行恩拉霉素、盐霉素和丁酸甘油酯的抑菌效果的研究。结果表明, 海南霉素与对梭状芽孢杆菌有强抑制性的恩拉霉素的抑菌效果相当, MIC 值范围为 0.004 ~ 0.06  $\mu\text{g/mL}$ , 其次为盐霉素, MIC 值范围为 0.008 ~ 0.06  $\mu\text{g/mL}$ 。

产气荚膜梭菌 (*Clostridium Perfringens*) 是一种革兰氏阳性的专性厌氧杆菌<sup>[20]</sup>, 而海南霉素作为一种新型的离子载体抗生素, 能够较好的抑制革兰氏阳性菌<sup>[21]</sup>, 因此, 表现出了较强的抗梭菌效果。丁酸甘油酯有促进畜禽生长发育、提高免疫力、调节肠道菌群等作用, 有研究报道在饲料中添加丁酸甘油酯可对感染大肠杆菌的鸡群有一定的保护作用<sup>[22]</sup>。本研究通过琼脂法 MIC 对丁酸甘油酯的抑菌效果进行测定, 结果表明丁酸甘油酯的抑菌效果不明显。

本试验从 209 份鸡肠道样本共分离鉴定出 61 株产气荚膜梭菌, 分离率为 29.2%, 且均为 A 型产气荚膜梭菌。海南霉素不仅可以防治球虫, 对产气荚膜梭菌也有良好的抑菌效果且与恩拉霉素相当, 其次为盐霉素, 丁酸甘油酯的抑菌效果不明显。

## 参考文献:

- [1] 张辉, 包红朵. 产气荚膜梭菌耐药及防控研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(6): 6.  
Zhang Hui, Bao Hongduo. Research progress in drug resistance and control of *Clostridium perfringens* [J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2020, 11(6): 6.
- [2] Miyamoto K, Li J, McClane B A. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: detection and identification [J]. Microbes Environ, 2012, 27(4): 343–349.
- [3] 李云霄, 金鑫, 张营, 等. 魏氏梭菌病诊断方法研究进展 [J]. 动物医学进展, 2007, 28(7): 6.  
Li Yunxiao, Jin Xin, Zhang Ying, *et al.* Research progress in diagnostic methods of *clostridium welchii* disease [J]. Progress in Animal Medicine, 2007, 28(7): 6.
- [4] 黄兵, 赵其平, 韩红玉, 等. 海南霉素对鸡球虫病的预防和治疗效果评价 [J]. 中国兽医杂志, 2002, 38(010): 6–9.  
Huang Bing, Zhao Qiping, Han Hongyu, *et al.* Evaluation of the effect of Hainanmycin on prevention and treatment of chicken coccidiosis [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2002, 38(010): 6–9.
- [5] 顾梦恬, 周婷婷, 胡雪, 等. 海南霉素预混剂对鸡柔嫩艾美耳球虫病的疗效试验 [J]. 中国家禽, 2018, 40(9): 4.  
Gu Mengtian, Zhou Tingting, Hu Xue, *et al.* Efficacy of Hainanmycin premix on *Eimeria tenella* in chicken [J]. China Poultry, 2018, 40(9): 4.
- [6] Hecht D W. Anaerobes: antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing [J]. Anaerobe, 2006, 12(3): 115–121.
- [7] Meer R R, Songer J G. M $\mu$ Ltiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens* [J]. Am J Vet Res, 1997, 58(7): 702–705.
- [8] Lee K W, Lillehoj H S, Jeong W, *et al.* Avian necrotic enteritis: experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development [J]. Poultry Sci, 2011, 90(7): 1381–1390.
- [9] Chalmers G, Bruce H L, Hunter D B, *et al.* M $\mu$ Ltilocus sequence typing analysis of *Clostridium perfringens* isolates from necrotic enteritis outbreaks in broiler chicken populations [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(12): 3957–3964.
- [10] 马壮. 广州市冷鲜鸡产气荚膜梭菌的污染分析及 netB 菌株的致病性研究 [J]. 甘肃农业大学, 2016.  
Ma Zhuang. Contamination analysis of *Clostridium perfringens* and pathogenicity of netB strain in cold fresh chicken in Guangzhou [J]. Gansu Agricultural University, 2016.
- [11] Angelo K M, Nisler A L, Hall A J, *et al.* Epidemiology of restaurant – associated foodborne disease outbreaks, United States, 1998–2013 [J]. Epidemiol Infect, 2017, 145(3): 523–534.
- [12] 刘秀峰, 陈东宛, 吕金昌, 等. 一起由快餐盒饭引发的产气荚膜梭菌食物中毒 [J]. 中国卫生检验杂志, 2016, (11): 3.  
Liu Xiufeng, Chen Dongwan, Lv Jinchang, *et al.* *Clostridium perfringens* food poisoning caused by fast food box [J]. Chinese Journal of Health Inspection, 2016, (11): 3.
- [13] 郑兰紫, 冯月明, 周国营, 等. 北京市某职业学校一起食源性疾病预防暴发的调查 [J]. 中国公共卫生管理, 2018, 34(1): 4.  
Zheng Lanzi, Feng Yueming, Zhou Guoying, *et al.* Investigation on an outbreak of foodborne diseases in a vocational school in Beijing [J]. China's Public Health Management, 2018, 34(1): 4.

- [14] Kiu R, Hall L J. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens* [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1): 141.
- [15] 陈祥杰, 古红霞, 袁伟康, 等. 珠三角地区规模化养鸡场产气荚膜梭菌分子流行病学调查研究 [J]. *广东畜牧兽医科技*, 2020, 45(5): 5.  
Chen Xiangjie, Gu Hongxia, Yuan Weikang, *et al.* Molecular epidemiological investigation of *Clostridium perfringens* in large-scale chicken farms in the Pearl River Delta region [J]. *Guangdong Animal Husbandry Veterinary Technology*, 2020, 45(5): 5.
- [16] 陆宗浩, 黄慧怡, 梁晓君, 等. 澳门地区鸡源产气荚膜梭菌的污染情况及基因分型 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2018, 34(3): 3.  
Lu Zonghao, Huang Huiyi, Liang Xiaojun, *et al.* Contamination and genotyping of *Clostridium perfringens* from chickens in Macao [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2018, 34(3): 3.
- [17] Johansson A, Engström B E, Frey J, *et al.* Survival of clostridium perfringens during simulated transport and stability of some plasmid-borne toxin genes under aerobic conditions [J]. *Acta Vet Scand*, 2005, 46(4): 241-247.
- [18] Al-Sheikhly F, Al-Saieg A. Role of Coccidia in the occurrence of necrotic enteritis of chickens [J]. *Avian Dis*, 1980, 24(2): 324-333.
- [19] Williams R. Coccidial and clostridial interactions in broilers vaccinated against coccidiosis [J]. *World Poultry Special Suppl Coccidiosis*, 2003, 4: 26-28.
- [20] 李昆, 樊云燕, 闫学艳, 等. 多种饲料添加剂类抗生素对猪源产气荚膜梭菌的抑菌效果研究 [J]. *国外畜牧学猪与禽*, 2015, 35(11).  
Li Kun, Fan Yunyan, Yan Xueyan, *et al.* Study on the antibacterial effect of various feed additive antibiotics against *Clostridium perfringens* from pigs [J]. *Foreign Animal Husbandry: Pig and Poultry*, 2015, 35(11).
- [21] 周婷婷. 海南霉素钠预混剂对鸡肠球虫的有效性及靶动物安全性评价 [C]. 扬州大学, 2019.  
Zhou Tingting. Efficacy of Hainanmycin Sodium Premix against Chicken Intestinal Coccidia and Safety Evaluation of Target Animals [C]. Yangzhou University, 2019.
- [22] 郑力维. 丁酸甘油酯对黄羽肉鸡生长性能的影响及大肠杆菌攻毒的保护作用 [D]. 佛山科学技术学院, 2020.  
Zheng Liwei. Effect of glyceryl butyrate on growth performance of yellow feathered broiler chicken and protective effect of *E. coli* attack [D]. Foshan Science and Tech Academy, 2020.

(编辑:侯向辉)