

网络出版时间:2016-10-09 10:08

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.11.008

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20161009.1008.016.html>

零售肉品中产气荚膜梭菌的检测与定型: 以陕西关中地区为例

姜艳芬¹, 王清爱²

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100;

2 陕西镇巴县畜牧兽医工作站, 陕西 镇巴 723600)

【摘要】【目的】检测陕西关中地区肉品中的产气荚膜梭菌,并进行血清型和产气荚膜梭菌肠毒素(CPE)基因型鉴定,初步掌握该地区肉品中产气荚膜梭菌的污染状况。【方法】从陕西西安、杨凌、武功等地的超市、农贸市场、肉食品小摊随机采集新鲜生熟鸡、猪肉及其制品,共计 314 份,经细菌分离纯化、染色镜检、生化试验和单重 PCR 检测确定分离菌株为产气荚膜梭菌,应用多重 PCR 检测分离菌株的血清型并进行 *cpe* 毒素基因检测。【结果】样品中产气荚膜梭菌检出率为 45.86%,且均为 A 型 *cpe* 产气荚膜梭菌,其中熟肉制品、生鲜肉检出率分别为 50.91% 和 43.14%;鸡肉、猪肉检出率分别为 53.06% 和 33.90%。【结论】陕西关中地区的肉品中存在产气荚膜梭菌污染,建议针对可能引起产气荚膜梭菌污染和大量繁殖的环节采取更有效的预防措施。

【关键词】 产气荚膜梭菌;多重 PCR;零售肉品检测;菌株血清型

【中图分类号】 S855.1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2016)11-0055-06

Detection and typing of *Clostridium perfringens* from retail meat in Guanzhong, Shaanxi

JIANG Yanfen¹, WANG Qing'ai²

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Zhenba Animal Husbandry and Veterinary Station, Zhenba, Shaanxi 723600, China)

Abstract: 【Objective】To understand the contamination and distribution of *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) in raw or cooked retailed meat in Guanzhong, Shaanxi, *C. perfringens* strains were isolated from collected retailed meat samples, and serotyped using established multi-PCR. 【Method】A total of 314 samples including fresh raw meat (chicken and pork), cooked chicken claws, sausage and preserved pork were purchased randomly from supermarkets, farmer's markets and food stands in Xi'an, Yangling and Wugong. Samples were isolated and purified as suspect *C. perfringens* strains. The isolates of *C. perfringens* were then confirmed using Gram staining, biochemical test, PCR amplification and serotyped by the developed multiplex PCR and genotyped by *cpe* gene detection. 【Result】The isolation rate of *C. perfringens* was 45.86% and all isolates were classified as *cpe*-type A. *C. perfringens* identification rates in cooked meat samples and raw fresh meat samples were 50.91% and 43.14%, while the rates in chicken and pork were 53.06% and 33.90%, respectively. 【Conclusion】This study demonstrated the presence of *C. perfringens* in meat products in Guanzhong, Shaanxi, and it is suggested to take more effective preventive measures to control contamination and mass proliferation of *C. perfringens*.

〔收稿日期〕 2015-06-02

〔基金项目〕 西北农林科技大学基本科研业务费创新专项(QN2012019)

〔作者简介〕 姜艳芬(1972—),女,陕西米脂人,副教授,博士,主要从事分子病原学与免疫学研究。E-mail:jjyf1111@nwsuaf.edu.cn

Key words: *Clostridium perfringens*; multi-PCR; retail meat detection; strain serotype

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)是一种条件性致病菌,广泛存在于自然界的水源、土壤及人和动物肠道之中,它主要引起人的食物中毒^[1-2]、抗生素相关性腹泻(Antibiotic-associated diarrhea, AAD)及动物的腹泻^[1]和猝死症等,严重威胁动物及人类公共卫生安全。产气荚膜梭菌感染家禽后主要引发坏死性肠炎(Necrotic enteritis, NE),该病是鸡的一种非常重要的经济性疾病,发病率可达30%以上,病死率18%~31%,世界范围内所有的家禽生产国均有报道,估计每年能造成国际家禽业损失约20亿美元^[3-4]。产气荚膜梭菌肠毒素(CPE)主要由A型产气荚膜梭菌产生,部分C型、D型、E型也能产生^[5-6],是该菌非常重要的一种致病毒素,可致人食物中毒及多种动物的腹泻(ADD)和非食物中毒性胃肠道疾病^[1,7]。目前在西方国家,由A型*cpe*⁺产气荚膜梭菌引起的食物中毒病例已位居食物中毒病例的第2位^[1],占总病例的10%,在美国约占细菌性食物中毒的30%,每年因该菌引起的食物中毒约近10 000人^[8]。

国内鲜有产气荚膜梭菌引起食物中毒的相关报道^[9],肉品中产气荚膜梭菌的污染^[10-11]及该菌与食物中毒关系的系统研究也较少^[12]。尤其随着社会的发展,人们生活节奏的加快和生活方式的变化,以及卫生条件和饮食习惯等因素的影响,有必要对肉品中产气荚膜梭菌对人类健康的危险性进行评估。因此,了解和掌握生鲜鸡、猪肉类及其制品中产气荚膜梭菌的污染状况,对改善我国畜禽养殖和保证肉类产品质量安全性,进而保护人类健康有重要意义。本研究随机采集不同地区、不同来源、不同种类生熟肉品,进行产气荚膜梭菌的分离和纯化,并应用多重PCR对菌型进行鉴定,以初步了解和掌握肉类产气荚膜梭菌的菌型、动态分布以及携带的毒素基因,从而预测肉制品引起人类食物中毒的可能性,为产气荚膜梭菌引起疾病的流行病学研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标准菌株 产气荚膜梭菌B型菌(CVCC56)、C型菌(CVCC59)、D型菌(CVCC84)、E型菌(CVCC90)均购于中国兽医微生物菌种保藏中心;产气荚膜梭菌A型菌由西北农林科技大学动物医学院微生物实验室保存。

1.1.2 试剂及培养基 10×buffer(含Mg²⁺)、*Taq* DNA聚合酶、dNTPs、DL2000 DNA Ladder均为中国Thermo Scientific公司产品,Tris Base为美国Angus chemical公司产品,EDTA为美国Amresco公司产品,AN025A厌氧产气袋为英国OXOID公司产品。

液体硫基乙醇酸盐培养基(FTG)、TSC琼脂(Tryptose Sulfite-Tyloserine Agar)、营养琼脂,均为北京奥博星生物技术有限公司产品;5%鲜血-葡萄糖-琼脂平板、牛乳发酵试验培养基等,均按常规方法制备。

1.1.3 仪器设备 YQX-II厌氧培养箱,宁波江南仪器厂;AG0025A厌氧罐,英国OXOID公司;50i显微成像系统,上海光学仪器进出口有限公司;C1000 PCR扩增仪,德国Bio-RAD公司;EPS-300电泳仪和DYY-1型水平电泳槽,北京六一仪器厂;Gene genius凝胶成像系统,美国SYNGENE公司;GNP 9080电热恒温培养箱,上海景宏实验设备有限公司;AUY220分析天平,Sartorius公司;微量移液器3111,德国Eppendorf公司。

1.2 方法

1.2.1 样品采集 2013-03—2014-06分别从陕西杨凌区、武功县、西安市等地连锁超市、农贸市场、肉食品小摊无菌随机采集鲜肉和冷鲜肉(鸡肉、猪肉)及腊肠、腊肉、卤鸡爪等生熟肉制品共计314份,每个摊点、每种样品仅采集1份,样品密封并放至冰盒保存,尽快送至实验室。

1.2.2 细菌的分离与纯化 分别无菌称取约25 g样品,将样品用灭菌后的手术剪剪碎置于无菌均质袋,按照(1:5)~(1:10)的比例(质量体积比)加入液体硫基乙醇酸盐培养基(FTG),用拍击式均质器拍打1~2 min制成样品匀液,37℃厌氧培养24 h,然后在严格的无菌条件下将有气泡产生的培养物划线接种至含有体积分数5%鲜血-葡萄糖-琼脂平板上,37℃厌氧培养24~48 h。挑取在5%鲜血-葡萄糖-琼脂平板上呈灰色的有典型双溶血环现象的特征菌落涂片、革兰氏染色、镜检。将镜检疑似产气荚膜梭菌再划线接种于TSC琼脂培养基,42℃厌氧培养24 h后挑取典型的黑色菌落,1/2接种在普通营养琼脂上,置于37℃有氧条件下培养24 h,检测该菌是否纯化;另1/2接种于5%鲜血-葡萄糖-琼脂平板,43℃厌氧培养24 h,取出后置于有氧环境1

h,染色镜检并观察菌落特征。每个样品选择 2~3 个纯化菌株用于试验。无菌挑取已纯化的菌落接种于含铁牛乳培养基,37 ℃培养 8~10 h 后,观察并记录结果。

1.2.3 分离菌株的单一 PCR 检测 引物序列参考文献[13],cpa-F: 5'-ATGAGCTTCAATTAGGT-TCTACT-3';cpa-R: 5'-ATCAGCATAAAAATC-CTCATT-3'。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,预期扩增产物长度为 398 bp。分别以分离纯化菌株的单个菌落的 1/2 作为 PCR 反应模板。PCR 反应体系为 25 μL:10×PCR buffer 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL,上、下游引物各 0.5 μL(10 μmol/L),Taq 酶 0.3 μL,分别挑取各纯化菌株的单个菌落的 1/2 溶于 PCR 反应体系作为模板,加灭菌 ddH₂O 补至 25 μL。PCR 扩增程序:先在 PCR 管中加入除 Taq 酶以外的其他成分 94 ℃预变性 10 min;冰浴 2 min 之后加入 Taq 酶继续以下循环,94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。试验同时设灭菌 ddH₂O 作模板为阴性对照,A 型产气荚膜梭菌标准菌株菌落为阳性对照。取 10 μL PCR 产物与 2 μL 6×loading buffer 混合,在 2%琼脂糖凝胶中以 90 V 的电压电泳 40 min,用凝胶成像系统观察结果并拍照。

1.2.4 产气荚膜梭菌分离菌株血清型鉴定 将经单一 PCR 检测确定为产气荚膜梭菌菌落的另 1/2

无菌接种于 5%鲜血-葡萄糖-琼脂平板或 FTG 培养基,37 ℃培养 24 h,应用西北农林科技大学兽医公共卫生与畜禽产品安全实验室已建立的多重 PCR 方法^[14]进行菌株的血清型鉴定。根据产气荚膜梭菌产生 α、β、ε、ι 4 种致死性毒素(编码基因分别为 *cpa*、*cpb*、*etx*、*ia*)的能力,将其分为 5 种血清型,即 A、B、C、D、E 型。其中,A 型产生 α 毒素,B 型产生 α、β 和 ε 毒素,C 型产生 α 和 β 毒素,D 型产生 α 和 ε 毒素,E 型产生 α 和 ι 毒素。分别以 *cpa*、*cpb*、*etx*、*ia* 毒素基因的特异性基因序列为目标片段,参考文献[14-17]设计并合成引物(表 1)。多重 PCR 反应体系为 25 μL:10×PCR buffer 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2 μL,2.5 mmol/L dNTPs 3 μL,上、下游混合引物(*cpa*、*cpb*、*etx*、*ia*)各为 2.15 μL,Taq 酶 0.5 μL,分别挑取经单一 PCR 鉴定为产气荚膜梭菌的单个菌落(或 1 μL 24 h 培养的 FTG 菌液)溶于 PCR 体系作为反应模板,灭菌 ddH₂O 补至 25 μL。PCR 扩增程序:先在 PCR 管中加入除 Taq 酶以外的其他成分 94 ℃预变性 10 min;冰浴 2 min 之后加入 Taq 酶继续以下循环,94 ℃ 1 min,52 ℃ 1 min 30 s,72 ℃ 1 min 50 s,30 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。试验设灭菌 ddH₂O 作模板为阴性对照,B+E 型产气荚膜梭菌标准菌株菌落为阳性对照。取 10 μL PCR 产物与 2 μL 6×loading buffer 混合,在 2%琼脂糖凝胶中以 90 V 的电压电泳 40 min,用凝胶成像系统观察结果并拍照。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 Sequences for PCR primers

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	扩增长度/bp Product length	位置/bp Location	引用文献 Reference
<i>cpa</i>	GCTAATGTTACTGCCGTTGA	325	496~515	[15]
	CCTCTGATACATCGTGTAAG		801~820	
<i>cpb</i>	ACTATACAGACAGATCATTC AAC C	236	787~810	[16]
	TTAGGAGCAGTTAGAACTACAG		1 001~1 022	
<i>etx</i>	AGTATCTAATGAAATGTCCA	585	120~139	[14]
	TTCCACTTACTTGTCTCTAC		685~703	
<i>ia</i>	ACTACTCTCAGACAAGACAG	445	1 739~1 758	[15]
	TTTCCTTCTATTACTATACG		2 161~2 180	
<i>cpe</i>	GGAGATGGTTGGATATTAGG	233	120~139	[17]
	GGACCAGCAGTTGTAGATA		685~703	

1.2.5 *cpe* 毒素基因的检测 引物序列参考文献[17](表 1),由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,预期扩增产物长度为 233 bp。PCR 反应体系为 25 μL:10×PCR buffer 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL,10 μmol/L 上、下游引物各 1 μL,Taq 酶 1 μL,分别挑取各菌株单个菌

落作为 PCR 反应模板,灭菌 ddH₂O 补至 25 μL。PCR 扩增程序:先在 PCR 管中加入除 Taq 酶以外的其他成分 94 ℃预变性 5 min;冰浴 2 min 之后加入 Taq 酶继续以下循环,94 ℃ 50 s,56 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,30 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。试验同时设灭菌 ddH₂O 为阴性对照,PCR 产物在 2%琼

脂糖凝胶中以 90 V 的电压电泳 40 min,用凝胶成像系统观察结果并拍照。

1.3 统计分析

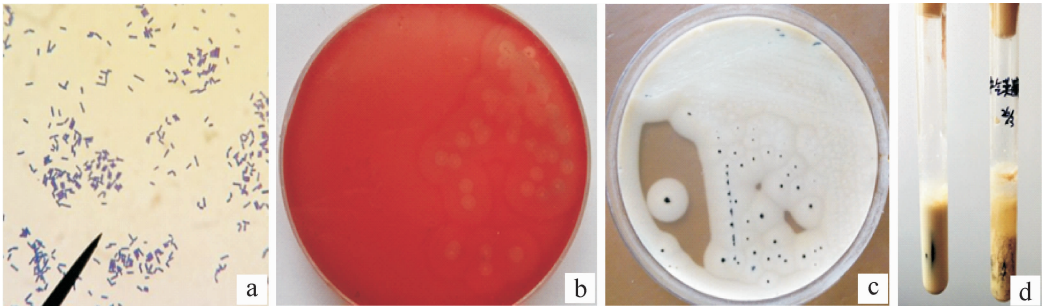
所有样品的产气荚膜梭菌的检出率均运用 IBM SPSS Statistics 21.0 χ^2 检验进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 分离菌株的培养特征

镜检可见 G⁺ 呈粗杆状,两端钝圆,单个、成双

或短链,有荚膜的梭菌,横径稍大于菌体,呈卵圆形梭状芽胞杆菌(图 1-a)。5% 鲜血-葡萄糖-琼脂平板上呈灰色、边缘整齐、表面光滑的圆形菌落;在空气中暴露一段时间后,菌落变为浅绿色,菌落周围呈大小不一的单环或双环溶血(图 1-b)。TSC 琼脂平板上形成黑色菌落,且菌落周围有乳白色浊环(图 1-c)。牛乳“暴烈发酵”试验阳性(图 1-d)。初步从 314 份样品中分离鉴定出 396 株疑似产气荚膜梭菌菌株。



a. 显微镜下的形态特征(10×100);b. 5%鲜血-葡萄糖-琼脂平板上的菌落特征;
c. TSC 琼脂平板上的菌落特征;d. 牛乳“暴烈发酵”(左为阴性对照,右为阳性)
a. Characteristics of isolates through microscope (10×100);b. Typical colonies on BA plate;
c. Colonies on TSC plate;d. Stormy fermentation of milk (left:negative control,right:positive)

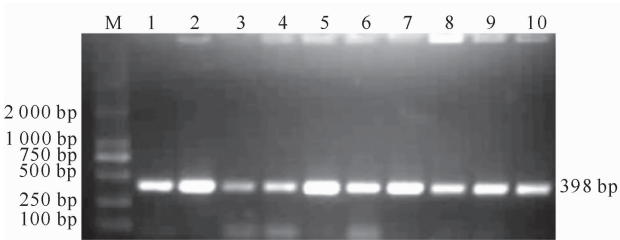
图 1 分离菌株的培养特征

Fig.1 Cultivation characteristics of isolates

2.2 分离菌株的单一 PCR 检测结果

所有分离菌株均扩增出了与阳性对照片段长度

一致的约 398 bp 的目的条带(图 2),确定这些分离菌株均为产气荚膜梭菌。



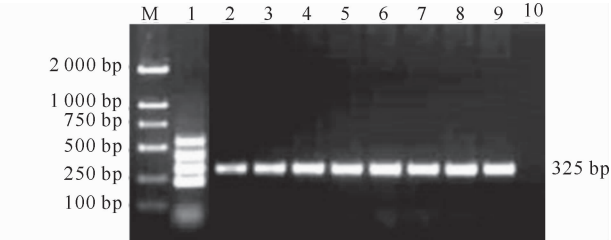
M, DL2000 DNA Ladder;1. A 型标准产气荚膜梭菌菌株
Standard *Clostridium perfringens* type A;
2~10. 分离菌株 Isolates

图 2 部分分离菌株的 PCR 扩增结果

Fig.2 PCR amplification of isolates

2.3 产气荚膜梭菌分离菌株的血清型鉴定结果

产气荚膜梭菌分离菌株的血清型鉴定结果显示,以 B+E 型产气荚膜梭菌标准菌株(携带 α 、 β 、 ϵ 、 ι)为阳性对照,396 株分离菌株均仅扩增出 1 条 325 bp 的特异性条带(图 3),确定本研究分离到的菌株均为 A 型产气荚膜梭菌。



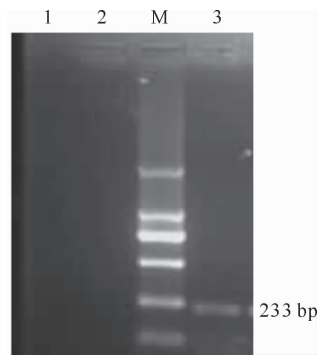
M, DL2000 DNA Ladder;1. B+E 型菌株(从上至下依次为
etx(585 bp)、*ia*(445 bp)、*cpa*(325 bp)、*cpb*(236 bp))多重 PCR 扩增
结果 *Clostridium perfringens* type B&E(from top to bottom;*etx*,*ia*,
cpa,*cpb*);2~9. 分离菌株 Isolates;10. 阴性对照 Negative control

图 3 部分分离菌株的血清型鉴定结果

Fig.3 Serotype results of isolates by multiplex PCR

2.4 cpe 毒素基因检测结果

cpe 毒素基因检测结果表明,396 株 A 型菌均未扩增出预期目的条带,仅阳性对照 E 型参考菌株扩增出了与预期目的条带长度(约 233 bp)一致的条带(图 4),说明所有的分离菌株均为 *cpe*⁻ 菌。



1~2. 分离菌株;M. DL2000 DNA Ladder(从上至下依次为
2 000,1 000,750,500,250,100 bp);3. E 型菌株
1—2. Isolates;M. DL2000 DNA Ladder (from top to bottom:2 000,
1 000,750,500,250,100 bp);3. *Clostridium perfringens* type E

图 4 部分分离菌株的 *cpe* 检测结果

Fig. 4 Serotype results of isolates detected by PCR

表 2 肉品中产气荚膜梭菌分离与鉴定结果

Table 2 Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in meat samples

样品 Samples		样品数量 Samples number	分离菌株数 Isolates number	检出率/% Isolation rate	血清型 Serotype
类型 Type	名称 Designation				
猪肉 Pork meat	腊肠 Sausages	58	84	50. 0(29/58) A	A
	腊肉 Preserved pork	25	0	0(0/25) B	A
	鲜猪肉 Fresh pork meat	35	30	31. 43(11/35) A	A
	合计 Total	118	114	33. 90(40/118) C	A
鸡肉 Chicken meat	鸡爪 Cooked chicken claws	52	74	51. 92(27/52)	A
	鸡腿 Chicken drumsticks	49	71	51. 02(25/49)	A
	鸡脯 Chicken breasts	47	59	46. 81(22/47)	A
	鸡翅 Chicken wings	48	78	62. 50(30/48)	A
	合计 Total	196	282	53. 06(104/196) D	A
生熟 Raw & cooked	熟肉制品 Cooked meat	110	158	50. 91(56/110)	A
	生鲜肉 Raw meat	204	238	43. 14(88/204)	A

注:同列数据后标不同大写字母表示 χ^2 检验有极显著性差异($P<0. 01$)。
Note:Different capitalization superscripts in each column mean significant difference by chi-squared test ($P<0. 01$).

3 讨 论

本研究通过对 314 份肉样进行细菌分离纯化、血清型鉴定和 *cpe* 毒素基因的检测,初步明确了陕西关中部分地区日常肉品中产气荚膜梭菌菌型的污染情况。从肉品种类来看,鸡肉检出率为 53. 06%,其中以鸡翅检出率最高(62. 50%),鸡脯检出率最低(46. 81%);猪肉检出率为 33. 90%,其中腊肠、鲜猪肉、腊肉的检出率分别为 50. 0%,31. 43%和 0,由此看来,无论猪肉还是鸡肉都存在产气荚膜梭菌的污染,这可能是由于生鸡和生猪的屠宰加工、运输贮藏以及肉制品加工过程受到了不同程度的污染。

产气荚膜梭菌的芽孢耐热性很强,90 ℃、30 min 才能将其杀死,理论上讲,熟肉制品检出率应该小于生肉,因为经过烹饪、蒸煮等处理微生物会被完全或部分杀死,但本研究检测结果显示熟肉污染率

本研究从 314 份生熟鲜肉及肉制品中共分离鉴定出 396 株产气荚膜梭菌,检出率达 45. 86%。鸡肉样品的检出率为 53. 06%(104/196),其中鸡翅样品的检出率最高,为 62. 50%(30/48),鸡脯样品的检出率最低,为 46. 81%(22/47),但鸡翅、鸡脯、鸡腿、鸡爪的检出率之间均无显著性差异(表 2)。猪肉检出率 33. 90%(40/118),其中腊肉检出率为 0,鲜肉检出率为 31. 43%,腊肠检出率为 50. 0%(29/58);腊肉与鲜肉和腊肠检出率之间差异极显著($P<0. 01$),但是鲜肉与腊肠之间的检出率差异不显著($P>0. 05$)。鸡肉与猪肉检出率差异极显著($P<0. 01$)(表 2)。熟肉制品检出率为 50. 91%(56/110),生鲜肉样品检出率为 43. 14%(88/204),二者无显著性差异($P>0. 05$)。

(50. 91%)高于生肉(43. 14%),这可能是熟肉在蒸煮加工过程中并未完全杀死肉品中产气荚膜梭菌,肉品加工成熟后储藏时间过长或存放在较高温度使得细菌能够继续生长繁殖,以及盛放的容器或包装受到污染等原因所致。值得注意的是,腊肉样品中未能分离到产气荚膜梭菌,这可能与腊肉的加工方法有关。因此,食品加工过程中应当采取更加严格的控制措施,降低加工后期污染的可能性。

本研究结果表明,关中地区的鸡肉中产气荚膜梭菌污染较为严重,检出率为 53. 06%(104/196),比梁光军等^[10]检测的鲜鸡肉中该菌的分离率 25%(7/28)高,但比国外文献报道该菌的分离率 66%~100%^[17-19]低,说明我国零售鸡肉的产气荚膜梭菌的污染程度与西方国家相比较低,这可能与我国目前还普遍将抗生素作为预防用药添加在饲料中长期使用的饲养管理方式有关。本研究分离到的产气荚膜

梭菌均为 A 型产气荚膜梭菌,未发现其他各型(B、C、D、E 型)产气荚膜梭菌,结果与前期的报道^[10,17-18]相吻合。

A 型产气荚膜梭菌引起的人类食物中毒与 CPE 毒素有关^[20],约 0~5%的产气荚膜梭菌携带 *cpe* 基因^[2,21],美国^[22]、日本^[23]、土耳其^[18]的产气荚膜梭菌分离 *cpe* 基因携带率分别为 1/147、1/55 和 1/545。但是本研究在分离到的 396 株产气荚膜梭菌中并未检测到 *cpe* 基因。这与 Nowell 等^[17]在零售鸡肉样品中未检测到 *cpe* 基因阳性菌株,Cooper 等^[19]在零售鸡肉的肝脏分离菌株中也未检测到 *cpe* 基因结果吻合,说明 *cpe* 基因在鸡肉的分离菌株中不常见。本研究结果与 *cpe* 基因在鸡源性菌株较少见的研究结果相符。说明鸡肉不是引起人类食物中毒的产气荚膜梭菌的主要来源。

本研究中鲜猪肉产气荚膜梭菌检出率为 31.43%(11/35),与江苏省的结果(37.9%)^[10]较为相近,但高于贵阳市的分离率(6.25%)^[11]。梁光军等^[10]在熟猪肉制品和熟鱼制品中共检出了 2 株 *cpe*⁺-A 型产气荚膜梭菌,检出率为 2.1%。而本研究中并未在猪肉样品中检测到携带 *cpe* 基因的 A 型产气荚膜梭菌。本试验在 E 型菌株中检测到 *cpe* 基因,证明 E 型菌也能产生 CPE 毒素^[5-6,24]。

产气荚膜梭菌作为一种重要的致人食物中毒的病原菌,其危害不容小觑,疾控和卫生监督人员在食物中毒处置工作中对此菌应引起足够的重视。建议卫生行政部门及政府决策机构针对可能引起产气荚膜梭菌污染和大量繁殖的环节采取更有效的预防措施,以保证广大民众的身心健康。

[参考文献]

[1] Lindström M, Heikinheimo A, Lathi P, et al. Novel insight into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning [J]. Food Microbiol, 2011, 28(2): 192-198.

[2] Lahti P, Heikinheimo A, Johansson T, et al. *Clostridium perfringens* type A isolates carrying the plasmid-borne enterotoxin gene (genotype IS1151-cpe or IS1470-like-cpe) are a common cause of food poisoning [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(1): 371-373.

[3] Van der Sluis W. Clostridial enteritis is an often underestimated problem [J]. World Poultry J, 2000, 16: 42-43.

[4] 姜艳芬. 携带产气荚膜梭菌分泌蛋白基因的减毒鼠伤寒沙门氏菌载体疫苗的研究 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2010.

Jiang Y F. Study on live oral recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium vector expressing *Clostridium perfringens* antigens vaccine [D]. Shaanxi, Yangling: North-

west A&F University, 2010.

[5] Miyamoto K, Li J, McCrane B A. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: detection and identification [J]. Microbes Environ, 2012, 27(4): 343-349.

[6] Qiu H, Chen F, Leng X, et al. Toxinotyping of *Clostridium perfringens* fecal isolates of reintroduced Père David's deer (*Elaphurus davidianus*) in China [J]. J Wildl Dis, 2014, 50(4): 942-945.

[7] Watanabe M, Hitomi S, Sawahara T. Nosocomial diarrhea caused by *Clostridium perfringens* in the Tsukuba-Tsuchiura district [J]. Japan J Infect Chemother, 2008, 14(3): 228-231.

[8] Scallan E, Hoekstra R M, Angulo F J, et al. Foodborne illness acquired in the United States: major pathogens [J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(1): 7-15.

[9] 郭玉梅, 秦丽云, 徐保红, 等. 中毒食品中首次检出产气荚膜梭菌的检测报告 [J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(3): 669-670.

Guo Y M, Qin L Y, Xu B H, et al. A report of *Clostridium perfringens* detected from an food poisoning case [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2010, 20(3): 669-670.

[10] 梁光军, 赵李祥, 杨旭芹, 等. 应用多重 PCR 方法鉴定粪样和食品中分离的产气荚膜梭菌 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(5): 420-423.

Liang G J, Zhao L X, Yang X Q, et al. Identification of *Clostridium perfringens* isolated from feces and food samples by multiplex PCR toxin-genotype assay [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2005, 21(5): 420-423.

[11] 文 明, 王松林, 李绍荣, 等. 鲜猪肉中 A 型产气荚膜梭菌污染情况调查 [J]. 中国兽医科技, 2002, 32(12): 29-31.

Wen M, Wang S L, Li S R, et al. Investigation of contamination by *Clostridium perfringens* from fresh pork meat [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2002, 32(12): 29-31.

[12] 张小荣, 文其乙, 刘秀梵, 等. 致人腹泻产气荚膜梭菌的分离鉴定与基因分型 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(4): 36-38.

Zhang X R, Wen Q Y, Liu X F, et al. Isolation, identification and genotyping of *Clostridium perfringens* strains causing human diarrhea [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2002, 18(4): 36-38.

[13] 张 曼. 牛乳中金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、产气荚膜梭菌多重 PCR 检测方法的建立及应用 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2010.

Zhang M. Development and application of multiplex PCR detection of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* in milk [D]. Shaanxi, Yangling: Northwest A&F University, 2010.

- herbosa at different position and aspects of slope in the hilly-gully region of Loess Plateau [J]. Science of Soil and Water Conservation,2009,7(1):67-73.
- [22] 程 煜,陈 灿,范海兰,等. 不同坡向对木荷马尾松凋落物分解及养分释放速度的影响 [J]. 中国农学通报,2011,27(31):6-17.
- Cheng Y,Chen C,Fan H L,et al. Effects of different aspects on litter decomposition and related nutrient release rate in *Schima superba* and *Pinus massoniana* plantations [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2011,27(31):6-17.
- [23] 王俊峰,欧光龙,陈金龙,等. 基于理论生长方程的云南松火烧迹地幼龄林林分直径结构 [J]. 中南林业科技大学学报,2014,34(3):49-52.
- Wang J F,Ou G L,Chen J L,et al. Study on stand diameter structure of young burned *Pinus yunnanensis* forest based on theoretical growth equations [J]. Journal of Central South University of Forest & Technology,2014,34(3):49-52.
- [24] Kangas A,Maltamo M. Calibrating predicted diameter distribution with additional information [J]. Forest Science,2000,46(3):390-396.
- [25] Kivinen V P,Uusitalo J. Applying fuzzy logic to tree bucking control [J]. Forest Science,2002,48(4):673-684.
- [26] Li F S,Zhang L J,Davis C J. Modeling the joint distribution of tree diameters and heights by bivariate generalized beta distribution [J]. Forest Science,2002,48(1):47-58.
- [27] 张建国,段爱国. 理论生长方程与直径结构模型的研究 [M]. 北京:科学出版社,2004.
- Zhang J G,Duan A G. Study on theoretical growth equation and diameter structure model [M]. Beijing: Science Press,2004.

(上接第 60 页)

- [14] 董 洁,杨晓静,苗承霞,等. 产气荚膜梭菌菌落多重 PCR 方法的建立及初步应用 [J]. 中国兽医学报,2013,33(12):1842-1847.
- Dong J,Yang X J,Miao C X,et al. Development and preliminary application of serotyping of *Clostridium perfringens* strains by colony multiplex PCR [J]. Chinese Journal of Veterinary Science,2013,33(12):1842-1847.
- [15] Meer R R,Songer J G. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens* [J]. Am J Vet Res,1997,58:702-705.
- [16] Yoo H S,Lee S U,Park K Y,et al. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR [J]. J Clin Microbiol,1997,35(1):228-232.
- [17] Nowell V J,Poppe C,Parreira V R,et al. *Clostridium perfringens* in retail chicken [J]. Anaerobe,2010,16(3):314-315.
- [18] Guran H S,Oksuztepe G. Detection and typing of *Clostridium perfringens* from retail chicken meat parts [J]. Lett Appl Microbiol,2013,57(1):77-82.
- [19] Cooper K K,Bueschel D M,Songer J G. Presence of *Clostridium perfringens* in retail chicken livers [J]. Anaerobe,2013,21(3):67-68.
- [20] Huang I H,Waters M,Grau R R,et al. Disruption of the gene (spo0A) encoding sporulation transcription factor blocks endospore formation and enterotoxin production in enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A [J]. FEMS Microbiol Lett,2004,233(2):233-240.
- [21] Erol I,Goncuoglu M,Ayaz N D,et al. Molecular typing of *Clostridium perfringens* isolated from turkey meat by multiplex PCR [J]. Lett Appl Microbiol,2008,47(1):31-34.
- [22] Wen Q,McClellan B A. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods [J]. Appl Environ Microbiol,2004,70(5):2685-2691.
- [23] Miki Y,Miyamoto K,Kaneko-Hirano I,et al. Prevalence and characterization of enterotoxin gene carrying *Clostridium perfringens* from retail meat products in Japan [J]. Appl Environ Microbiol,2008,74(17):5366-5372.
- [24] Miyamoto K,Yumine N,Mimura K,et al. Identification of novel *Clostridium perfringens* type E strains that carry an iota toxin plasmid with a functional enterotoxin gene [J]. PLoS One,2011,6(5):e20376.