

拉萨市羊产气荚膜梭菌的分子流行病学调查

王冬经¹, 苏中华², 马弘财¹, 巴桑次仁³,
尼玛潘多⁴, 王登云⁵, 元振杰¹, 卓玛¹, 曾江勇¹

(1. 西藏自治区农牧科学院畜牧兽医研究所, 西藏 拉萨 850009; 2. 西藏自治区动物疫病预防控制中心, 西藏 拉萨 850000;
3. 西藏那曲市比如县农牧业科学技术服务站, 西藏 那曲 852200; 4. 西藏那曲市索县农牧业科学技术服务站, 西藏 那曲
852200; 5. 西藏那曲市聂荣县农牧业科学技术服务站, 西藏 那曲 852200)

摘要: 为了掌握拉萨市羊产气荚膜梭菌的流行情况及毒素型分布情况, 试验从拉萨市曲水县、当雄县采集羊组织、粪便样品共计 172 份, 提取样品基因组 DNA, 进行 16 S rRNA 基因 PCR 检测和毒素基因分型鉴定。结果显示: 曲水县和当雄县羊产气荚膜梭菌的总体阳性率为 29.65% (51/172), 其中 A 型阳性率为 26.74% (46/172), D 型阳性率为 2.91% (5/172)。从样品来源看, 曲水县组织样品中阳性率为 87.50% (7/8), 粪便样品中阳性率为 50.00% (32/64), 总阳性率为 54.16% (39/72); 当雄县组织样品阳性率为 0 (0/7), 粪便样品阳性率为 12.90% (12/93), 总阳性率为 12.00% (12/100)。

关键词: 羊; 产气荚膜梭菌; 流行病学调查

中图分类号: S852.6

文献标识码: A

Molecular Epidemiological Investigation of *Clostridium perfringens* on Sheep in Lhasa City

WANG Dongjing¹, SU Zhonghua², MA Hongcai¹, Bashangciren³,
Nimapan duo⁴, WANG Dengyun⁵, YUAN Zhenjie¹, Zuoma¹, ZENG Jiangyong¹

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences of Xizang Autonomous Region, Lhasa Xizang 850009, China; 2. Animal Disease Prevention and Control Center, Xizang Autonomous Region, Lhasa Xizang 850000, China; 3. Dirl Agricultural and Animal Husbandry Science and Technology Service Station, Nagchu Xizang 852200, China; 4. Sokshan Agricultural and Animal Husbandry Science and Technology Service Station, Nagchu Xizang 852200, China; 5. Nyerong Agricultural and Animal Husbandry Science and Technology Service Station, Nagchu Xizang 852200, China)

Abstract: To understand the prevalence and toxin-type distribution of *Clostridium perfringens* in sheep in Lhasa, a total of 172 tissue and fecal samples were collected from Qushui County and Dangxiong County. Genomic DNA was extracted from the samples for 16 S rRNA gene PCR detection and toxin genotyping. The results showed an overall positive rate for *Clostridium perfringens* in both counties of 29.65% (51/172), with type A positivity at 26.74% (46/172) and type D at 2.91% (5/172). Regarding sample sources, the positivity rate in Qushui County was 87.50% (7/8) for tissue samples and 50.00% (32/64) for fecal samples, yielding a total positivity rate of 54.16% (39/72). In Dangxiong County, the positivity rate was 0 (0/7) for tissue samples and 12.90% (12/93) for fecal samples, resulting in a total positivity rate of 12.00% (12/100).

Key words: sheep; *Clostridium perfringens*; epidemiological investigation

拉萨市位于中国西南地区、西藏自治区东南部, 雅鲁藏布江支流拉萨河北岸。拉萨北部的当雄全县和尼木县等部分区乡属藏北草原南沿, 水草丰美, 牧业兴旺, 盛产牛羊肉类、酥油、牛绒和

收稿日期: 2025-06-11

基金项目: 西藏自治区自然科学基金项目(XZ202401ZR0133); 西藏自治区农牧科学院畜牧兽医研究所统筹项目(XZNKY-XM-STC-2025-003)。

作者简介: 王冬经(1992—), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事高原动物传染病学研究, E-mail: 920535395@qq.com。

通信作者: 曾江勇(1973—), 男, 研究员, 主要从事疫病流行病学及病原研究, E-mail: zengjiangyong@126.com。

羊毛。农牧业是拉萨市的第一产业,而养羊业则在农牧业经济中占有重要的地位。

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)是一种革兰氏阳性厌氧菌,在自然环境中广泛存在,是多种疾病的病原^[1]。产气荚膜梭菌毒素和酶至少有 20 余种,其中与疾病密切相关的有 *cpa*、*cpb*、*etx*、*itx*、*netB* 和 *cpe* 毒素,根据菌株携带上述毒素的情况将产气荚膜梭菌分为 7 个基因型:A 型携带 *cpa* 毒素;B 型携带 *cpa*、*cpb* 和 *etx* 毒素;C 型携带 *cpa* 和 *cpb* 毒素;D 型携带 *cpa* 和 *etx* 毒素;E 型携带 *cpa* 和 *itx* 毒素;F 型携带 *cpa* 和 *cpe* 毒素;G 型携带 *cpa* 和 *netB* 毒素^[2]。据报道,A、B、C、D 型均可感染羊,其中 A 型(少数 C、D 型)导致羊肠毒血症,C 型是羊猝狙的病原,B 型则主要引起羔羊痢疾^[3],由 C、D 型产气荚膜梭菌引起的羔羊痢疾也时有发生^[4]。可通过 PCR 等方法对菌株所分泌毒素进行检测,从而确定分型^[5]。

2023 年以来,拉萨市多地羊场陆续发生疑似产气荚膜梭菌疫情,病羊表现为急性死亡或腹泻,给当地养羊户造成严重的经济损失。为进一步了解拉萨市曲水县、当雄县等地产气荚膜梭菌的感染现状及其毒素型分布情况,采集该地区羊组织、粪便样品 172 份,提取 DNA,开展羊产气荚膜梭菌的分子流行病学调查,为该地区羊产气荚膜梭菌的防控提供数据指导。

1 材料与方法

1.1 样品来源

2024—2025 年,从拉萨市曲水县、当雄县收集羊病料组织、粪便样品共计 172 份,其中曲水县 72 份(组织 8 份,粪便 64 份),当雄县 100 份(组织 7 份,粪便 93 份),保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰柜中待用。

1.2 主要试剂

血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒、粪便基因组 DNA 提取试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司;核酸染料、DL2000 DNA Ladder、Trans2K Plus DNA ladder、 $2\times$ Taq Master Mix、ddH₂O 均购自北京擎科生物科技股份有限公司。

1.3 主要仪器

冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限

公司;电泳仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;超纯水机,四川优普超纯科技有限公司;eppeendorf 微量移液器,赛伯乐(上海)仪器有限公司;低温冰箱,青岛海尔股份有限公司;PCR 仪,耶拿分析仪器(北京)有限公司;凝胶成像系统,君意电泳公司。

1.4 样品基因组 DNA 提取

采用血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒进行羊病料组织基因组 DNA 提取,采用粪便基因组 DNA 提取试剂盒进行羊粪便基因组 DNA 提取,提取过程按照试剂盒说明书进行,提取得到的 DNA 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰柜中保存。

1.5 16 S rRNA 基因 PCR 检测及测序

参照张蕾等^[6]的细菌 16 S rRNA 基因 PCR 鉴定方法,以样品 DNA 为模板,合成细菌 16 S rRNA 通用引物进行 PCR 检测,引物序列如表 1。PCR 反应体系($25\text{ }\mu\text{L}$): $2\times$ Taq Master Mix $12.5\text{ }\mu\text{L}$,上、下游引物各 $1\text{ }\mu\text{L}$,DNA 模板 $2\text{ }\mu\text{L}$,ddH₂O $8.5\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s , $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min , 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,进行凝胶成像,拍照。阳性产物送至北京擎科生物科技股份有限公司测序,测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 分析。

1.6 毒素基因分型检测

参照袁媛等^[7]的产气荚膜梭菌毒素分型鉴定方法,以样品 DNA 为模板,进行 *cpa*、*cpb*、*etx*、*itx*、*netB* 和 *cpe* 毒素基因检测。特异性 PCR 引物序列如表 1。采用多重 PCR 扩增 *cpa*、*cpb*、*etx*、*itx* 毒素基因,PCR 反应体系($50\text{ }\mu\text{L}$): $2\times$ Taq Master Mix $25\text{ }\mu\text{L}$,上、下游引物各 $1\text{ }\mu\text{L}$,DNA 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$,ddH₂O 补充至 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $51.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min , 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 。采用单重 PCR 扩增 *netB* 和 *cpe* 毒素基因,PCR 反应体系($20\text{ }\mu\text{L}$): $2\times$ Taq Master Mix $10\text{ }\mu\text{L}$,上、下游引物各 $1\text{ }\mu\text{L}$,DNA 模板 $1\text{ }\mu\text{L}$,ddH₂O 补充至 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s , 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行验证。

表 1 引物信息表

基因名称	引物序列(5'→3')		产物大小/bp
16 S rRNA	F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	R: AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	1 500
<i>cpa</i>	F: GCTAATGTTACTGCCGTTGA	R: CCTCTGATACATCGTGTAAG	325
<i>etx</i>	F: AGTATCTAATGAAATGTCCA	R: TTCCACTTACTTGTCTAC	585
<i>cpb</i>	F: ACTATACAGACAGATCATTCAACC	R: TTAGGAGCAGTTAGAACTACAG	236
<i>itx</i>	F: ACTACTCTCAGACAAGACAG	R: TTTCCTTCTATTACTATACG	445
<i>cpe</i>	F: GGAGATGGTTGGATATTAGG	R: GGACCAGCAGTTGTAGATA	233
<i>netB</i>	F: CTTCTAGTGATACCGCTTCAC	R: CGTTATATTCCTTGTGACGAAAG	738

2 结果与分析

2.1 16 S rRNA 基因 PCR 检测分析

16 S rRNA 基因 PCR 检测结果显示,阳性样本在 1 500 bp 左右可见特异性条带,部分样品 PCR 扩增如图 1。阳性 PCR 产物测序结果显示,样品 16 S rRNA 基因序列与 GenBank 中产气荚膜梭菌的核苷酸同源性高达 100%,如图 2,证明样品为产气荚膜梭菌阳性。从 172 份样品

中共检测出产气荚膜梭菌阳性样品 51 份,阳性率为 29.65%(51/172)。

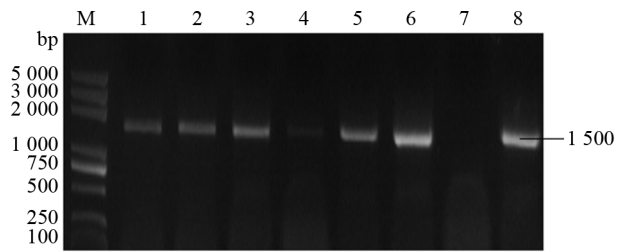


图 1 部分样品 16 S rRNA 基因 PCR 检测结果

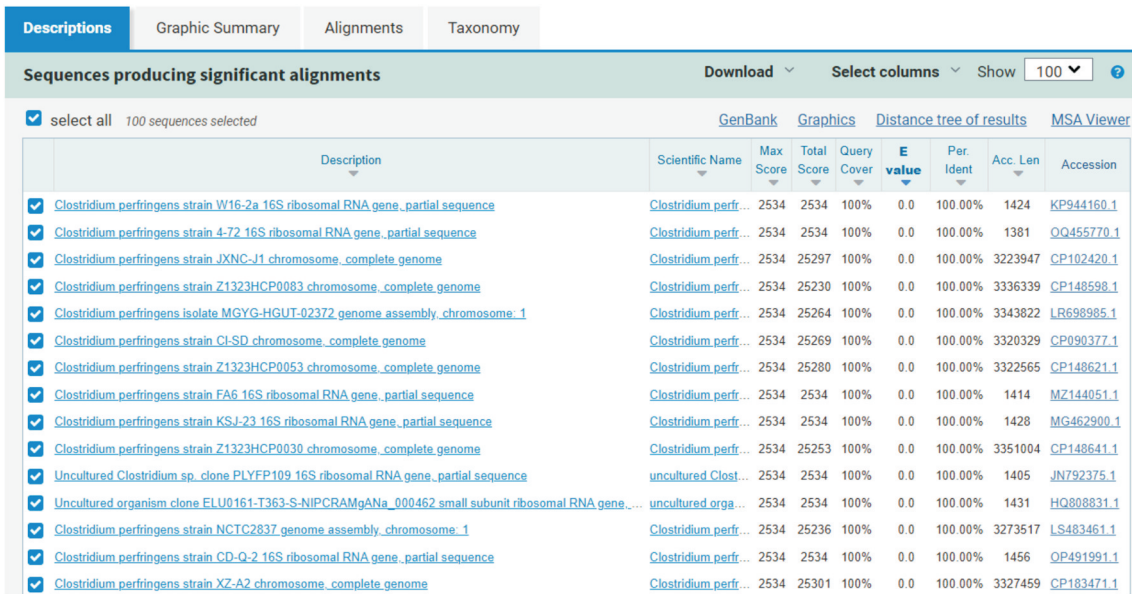


图 2 部分样品 16 S rRNA 基因 BLAST 分析结果

2.2 毒素基因分型检测

羊产气荚膜梭菌 PCR 检测结果显示,部分样品检测出 *cpa* 基因和 *etx* 基因(图 3),为 D 型产气荚膜梭菌,部分样品只检测出 *cpa* 基因(图 4、图 5),为 A 型产气荚膜梭菌,统计结果如表 2。曲水县和当雄县羊产气荚膜梭菌的总体阳性率为 29.65%(51/172),其中 A 型阳性率为 26.74%(46/172),D 型阳性率为 2.91%(5/172)。从样品来源看,曲水县组织样品中阳性率为 87.50%(7/8),粪便样品中阳性率为 50.00%(32/64),总阳性率为 54.16%(39/72);当雄县组织样

品阳性率为 0(0/7),粪便样品阳性率为 12.90%(12/93),总阳性率为 12.00%(12/100)。

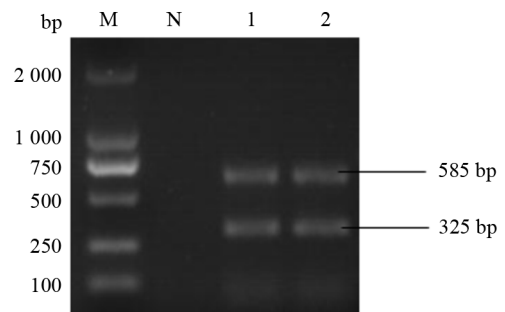


图 3 曲水县部分组织样品 PCR 检测结果

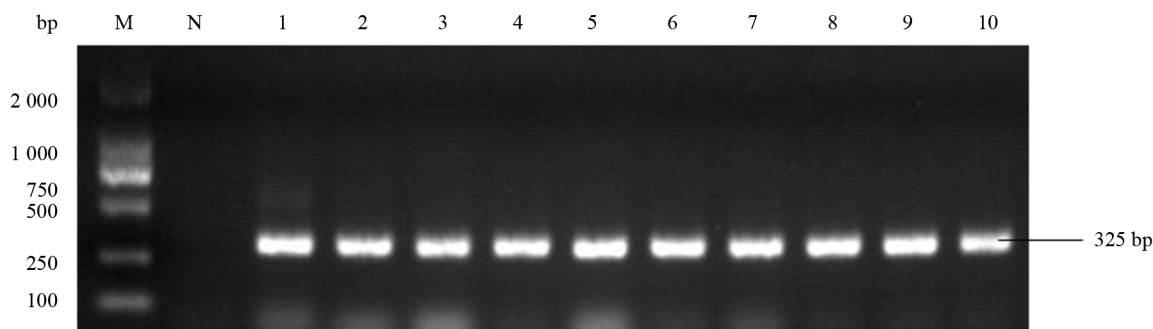


图4 曲水县部分粪便样品 PCR 检测结果图

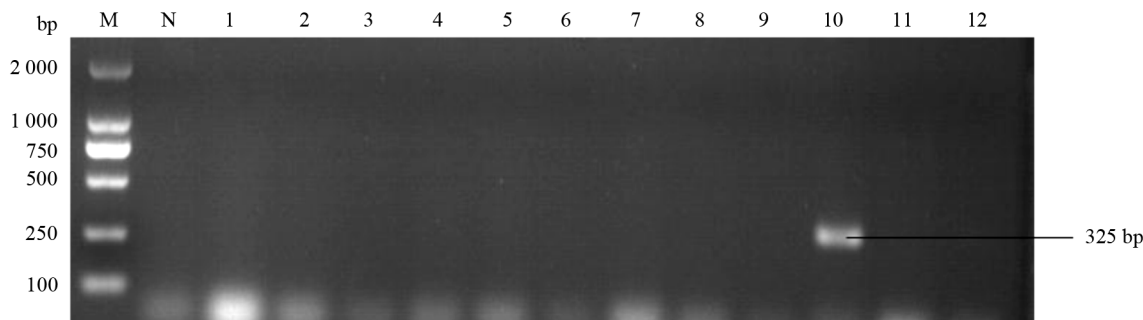


图5 当雄县部分粪便样品 PCR 检测结果

表2 拉萨市羊产气荚膜梭菌分子流行病学调查结果

地区	样品类别	样品数/份	阳性数/份			阳性率/%		
			A型	D型	合计	A型	D型	合计
曲水县	组织	8	5	2	7	62.50	25.00	87.50
	粪便	64	29	3	32	45.31	4.69	50.00
当雄县	组织	7	0	0	0	0.00	0.00	0.00
	粪便	93	12	0	12	12.90	0.00	12.90
总计		172	46	5	51	26.74	2.91	29.65

3 讨论与结论

3.1 讨论

产气荚膜梭菌,旧称魏氏梭菌,最早在18世纪末由两位英国科学家从腐败的尸体中分离出来,广泛分布于土壤、污水、料草及动物胃肠道中,一定条件下能引发人和动物的多种疾病^[8]。近年来,我国产气荚膜梭菌引起牛、羊、猪、兔、鸡以及野生动物的疾病报道不断增多,不同地区及不同动物间,产气荚膜梭菌毒型分布存在差异,其中羊产气荚膜梭菌在我国的流行毒型主要为A型,其次是D型^[9]。该病多发于青壮年羊和育肥羊,在饲养管理不当、环境变化等因素影响下,该菌就会快速增殖,产生大量毒素并进入血液,引发动物死亡^[10]。据资料显示,该病病死率较高,动物一旦感染,死亡率可为70%~100%,用抗菌药物治疗效果不明显,而且不同菌型的魏氏

梭菌常混合感染^[11-12]。

对致病菌尤其是人畜共患致病菌在畜禽群体中的流行特征分析对人和动物相应疾病的风险性评估和预防意义重大^[13]。2019年,张娜^[1]从陕西、宁夏、青海3省区采集的260份羊源样品中分离得到羊源产气荚膜梭菌61株,分离率为23.46%(61/260),其中A型占78.6%(43/61),D型占29.5%(18/61),由此结果推测A型和D型菌株已经逐渐成为羊源产气荚膜梭菌的主要流行菌株。2022年11月—2023年3月,徐吉荣等^[14]从山东省泰安、济宁和菏泽地区的3个规模化养羊场采集150份新鲜粪便样品,从中共分离到43株A型产气荚膜梭菌,分离率为28.7%(43/150)。2024年,李娜等^[15]从内蒙古鄂尔多斯市乌审旗一牧户病死绵羊腹水中分离得到1株D型产气荚膜梭菌。本研究从拉萨市曲水县和当雄县采集羊组织、粪便样品

172份,PCR检测结果显示羊产气荚膜梭菌总体阳性率为29.65%(51/172),其中A型阳性率为26.74%(46/172),D型阳性率为2.91%(5/172),研究结果证实了产气荚膜梭菌在拉萨市羊群中的广泛存在和分布。

产气荚膜梭菌可导致羊的多种疾病,其中羊肠毒血症、羔羊痢疾等较为常见,免疫接种对于产气荚膜梭菌导致的各种疫病有较好的效果,在产气荚膜梭菌病常发的羊养殖区域应定期接种羊三联四防灭活苗或羊快疫、羊猝狙、羊场毒血三联灭活疫苗^[16],加强饲养管理和做好饲养场的检疫也是预防该病的重要手段^[17]。发病早期可采用磺胺嘧啶钠和头孢噻吩钠治疗,同群羊只可使用土霉素拌料预防。综合防治是减少羊梭菌病发生最有效的措施,养殖过程中应注意定期清理羊群圈舍,保证圈舍干燥清洁,定期消毒圈舍,减少抢青抢茬次数等^[18],从而降低该病的发生率。

3.2 结论

试验从拉萨市曲水县、当雄县采集羊组织、粪便样品172份,进行了羊产气荚膜梭菌的分子流行病学调查,基本掌握了产气荚膜梭菌在该地区羊群的流行情况:曲水县和当雄县羊产气荚膜梭菌的总体阳性率为29.65%(51/172),其中曲水县组织样品中阳性率为87.50%(7/8),粪便样品中阳性率为50.00%(32/64),总阳性率为54.16%(39/72);当雄县组织样品阳性率为0(0/7),粪便样品阳性率为12.90%(12/93),总阳性率为12.00%(12/100)。研究结果证实了产气荚膜梭菌在拉萨市广泛存在,且在曲水县存在较严重的感染,研究结果为该地区羊产气荚膜梭菌的分离、诊断和防控提供了数据支撑。

参考文献:

[1] 张娜.羊源产气荚膜梭菌的分离鉴定及耐药性分析[D].杨凌:西北农林科技大学,2019.
[2] 王冬经,吴金措姆,曾江勇.牦牛源A型产气荚膜梭菌的分离鉴定及生物学特性研究[J].中国畜牧兽医,2024,51(1):229-241.

[3] 成成,张彤宇,成大荣,等.江苏地区临床健康肉羊的产气荚膜梭菌感染分析[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2021,42(4):34-38.
[4] 妥鑫,刘永明,黄美州,等.羔羊腹泻细菌和病毒病原的研究进展[J].中国畜牧兽医,2016,43(3):831-836.
[5] 吴钰兴,邹潍力,程子馨,等.1株猪源A型产气荚膜梭菌的分离鉴定及致病性研究[J].中国畜牧兽医,2024,51(6):2697-2706.
[6] 张蕾,陈亮,金振华,等.1株羊源多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及病原特性研究[J].中国畜牧兽医,2024,51(1):347-356.
[7] 袁媛,吴克,张雯,等.陕西省、甘肃省和宁夏回族自治区羊源D型产气荚膜梭菌特征分析[J].中国兽医学报,2024,44(5):987-993,999.
[8] 万金隆.新疆南疆部分地区规模化羊场产气荚膜梭菌感染情况调查及耐药性研究[D].阿拉尔:塔里木大学,2024.
[9] 申宏利.石林奶山羊产气荚膜梭菌毒型鉴定及分子流行病学调查[D].普洱:云南农业大学,2023.
[10] 郑孟加,陈峰,李玉杰,等.山东省一起羊产气荚膜梭菌病的流行病学调查[J].中国动物检疫,2025,42(1):18-22.
[11] 孟霞,孙翠平,唐娜,等.一株山羊魏氏梭菌的分离鉴定及其致病性研究[J].中国畜牧兽医,2015,42(7):1905-1909.
[12] 余波,冉懋韬,谭诗文,等.羊魏氏梭菌PCR方法的建立及初步应用[J].中国畜牧兽医,2011,38(11):106-108.
[13] 吴克.西北地区羊源产气荚膜梭菌分离鉴定及生物特性分析[D].杨凌:西北农林科技大学,2023.
[14] 徐吉荣,赵翠,樊丽,等.山东省羊源产气荚膜梭菌耐药性及分子遗传进化特征分析[J].中国预防兽医学报,2024,46(6):593-600.
[15] 李娜,刘重阳,张靖靖,等.1株羊源D型产气荚膜梭菌的分离鉴定及耐药性分析[J].中国畜牧兽医,2025,52(3):1352-1359.
[16] 刘燕泽,王梦瑶,苏红萍,等.陕北白绒山羊产气荚膜梭菌的分离鉴定及生物学特性研究[J].当代畜禽养殖业,2024,44(5):22-25.
[17] 郝荣进.山羊产气荚膜梭菌感染的诊断及防治方法[J].特种经济动植物,2024,27(10):83-85.
[18] 丁剑,赵耀国,艾日登才次克,等.新疆牧区羊产气荚膜梭菌病分离及鉴定[J].草食家畜,2024(4):25-30.