

采用 AFLP 和 ERIC-PCR 技术研究规模化鸡场健康鸡群中产气荚膜梭菌的遗传多样性

倪学勤^{1,2}, 郑晓丽^{1,4}, 曾东^{1,2*}, Joshua Gong³, 宋振银^{1,4}

(1. 四川农业大学动物医学院动物微生态研究中心, 雅安 625014;

2. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 雅安 625014; 3. Food Research

Program, Agriculture and Agri-Food Canada, Guelph, Ontario,

Canada N1G 5C9; 4. 四川农业大学资源环境学院, 雅安 625014)

摘要: 为了调查产气荚膜梭菌在健康鸡群中的流行现状, 掌握我国部分地区规模化鸡场产气荚膜梭菌的遗传多样性, 分析其流行特点与地区差异的关系, 利用 AFLP(amplified fragment length polymorphism) 和 ERIC-PCR(enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR) 方法对从四川省 8 个市 10 个规模化鸡场分离得到的 34 株 A 型产气荚膜梭菌进行基因型分析。结果表明, 用 AFLP 技术将 34 株菌分为 12 个亚型, 用 ERIC-PCR 方法分为 8 个亚型。分析亚型分布情况发现: 不同鸡场产气荚膜梭菌的亚型差异明显; 而同一鸡场的亚型较简单, 以一种亚型为主, 交叉有少数其他亚型; 优势基因型分别为 AFLP 基因 VIII 型或 ERIC-PCR 基因 1 型。该研究结果说明: 四川省规模化鸡场健康鸡群中产气荚膜梭菌的遗传多样性较低, 其流行特点与地区差异相关。

关键词: 产气荚膜梭菌; 健康鸡群; 遗传多样性; AFLP; ERIC-PCR

中图分类号: S852.616.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)05-0717-08

Genetic Diversity of *Clostridium perfringens* Isolated from Healthy Chickens at Commercial Farms Revealed by AFLP and ERIC-PCR

NI Xue-qin^{1,2}, ZHENG Xiao-li^{1,4}, ZENG Dong^{1,2*}, Joshua Gong³, SONG Zhen-yin^{1,4}

(1. Animal Microecology Institute, College of Veterinary Medicine, Sichuan

Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. Key Laboratory of

Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Ya'an 625014,

China; 3. Food Research Program, Agriculture and Agri-Food Canada,

Guelph, Ontario, Canada N1G 5C9; 4. College of Resources and Environment,

Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: The objective of this research was to study the epidemiology of *C. perfringens* colonizing healthy birds, characterize the population diversity and observe how diversity changed between different areas. Isolates were obtained from fresh feces and cecal samples of healthy chicken in ten farms of 8 cities in Sichuan province. Each isolate was typed using amplified fragment length polymorphism (AFLP) and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR). A total of 34 *C. perfringens* isolates of type A from 600 birds were typed. There found 12 AFLP genotypes and 8 ERIC-PCR genotypes. The analysis of genetic type and origin source revealed that isolates from different farms had different genetic types. The subtype of *C. perfringen* appeared to be simple within a single farm, and mixed with few other gene subtypes. The

收稿日期: 2008-11-10

基金项目: 四川省科技厅国际合作项目(HH20080016)

作者简介: 倪学勤(1968-), 女, 四川名山人, 副教授, 博士, 主要从事动物微生态研究, Tel: 0835-2886037, E-mail: xueqinni@yahoo.com

* 通讯作者: 曾东, E-mail: zend@sicau.edu.cn

dominant gene type of *C. perfringens* was AFLP gene type VIII or ERIC-PCR gene type 1. These results reveal that the diversity of *C. perfringens* of healthy chickens in Sichuan province is low and there is close correlation between the epidemiology and regions.

Key words: *Clostridium perfringens*; healthy chickens; genetic diversity; AFLP; ERIC-PCR

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*, *C. perfringens*)是人和动物肠道的一种重要共生菌和条件致病菌,通常能从健康宿主的消化道分离到,可产生多种外毒素,对人和多种动物致病,尤其是与禽类坏死性肠炎(Necrotic Enteritis, NE)的暴发有直接的关系。现已发现该菌可产生 12 种外毒素,起主要致病作用的为 α 、 β 、 ϵ 、 ι 4 种。根据产生毒素的不同,可将 *C. perfringens* 分为 A~E5 个型,其中 A 型和 C 型与禽类相关^[1-2]。*C. perfringens* 产生的 α 毒素可引起鸡的坏死性肠炎和亚临床感染^[3],在养鸡业中通常采用添加饲用抗生素的方法进行控制。但是,近年来随着欧盟禁止抗生素作为促生长剂使用,全世界主要养禽国家和地区都普遍发生鸡坏死性肠炎,尤其是欧美等发达国家。NE 不仅使动物生产性能、饲料报酬降低,鸡群死亡率增高,造成巨大的经济损失,还通过鸡肉制品引起人的感染,对人类健康构成重大威胁^[4-5]。随着抗生素促生长剂在我国的限用,NE 在我国可能会越来越严重,因此建立该病的调查和诊断方法对我国 NE 的防治具有重要的现实意义。

目前对健康鸡群 *C. perfringens* 遗传多样性的研究还较少,仅有少量文献比较了健康鸡群和 NE 发病鸡群 *C. perfringens* 的遗传多样性。Engstrom 等发现,健康鸡群 *C. perfringens* 的多样性较暴发 NE 时高,健康鸡群常携带有几种基因亚型,而发病鸡 *C. perfringens* 的基因亚型则较单一^[2,6-7]。这些现象均发生在大量抗生素促生长剂禁用 10 年以后的欧洲^[8-9]。在我国抗生素仍然被作为促生长剂和 NE 预防药物使用的情况下,健康鸡群 *C. perfringens* 的流行现状和遗传多样性等均未见报道,因此,作者采用 AFLP 和 ERIC-PCR 技术对分离自四川省不同地区,10 个规模化鸡场健康鸡群的 *C. perfringens* 进行基因亚型分析,旨在探明鸡群 *C. perfringens* 的遗传多样性和流行特点,为今后鸡坏死性肠炎的诊断和防治提供理论基础和技术支持。

1 材料和方法

1.1 样品采集

从四川省成都、雅安、绵阳等地(表 1)10 个规模化鸡场健康鸡群中采集新鲜粪便和盲肠内容物。粪便取样时采集 30~60 min 的新鲜粪样,不同个体分开收集。每个鸡场随机选择 10 只鸡用颈脱脂法处死,无菌操作取出盲肠段。采集的样品立即放入冰盒带回实验室。

1.2 菌株的分离和保存

取 5 g 左右样品加入 45 mL 厌氧增菌肉汤,43 °C 厌氧培养 18 h,划线接种卡那霉素卵黄琼脂培养基(CW 培养基),43 °C 厌氧培养 24 h,选择产生白浊环的单菌落进一步划线纯化培养。然后再接种 1% 葡萄糖鲜血平板,选择具有双溶血环菌落接种紫牛乳培养基,有爆裂发酵现象的菌株作为受试菌株。最后每个分离菌株从血平板上挑选 1 个单菌落接种疱肉培养基,43 °C 厌氧培养 12 h,菌悬液加 30% 甘油,于 -70 °C 保存。

1.3 菌株 DNA 的提取及鉴定

菌株接种疱肉培养基,43 °C 厌氧培养 10~12 h 后,参照 CTAB 法提取 DNA^[10]。采用 0.8% 琼脂糖电泳确定样品 DNA 浓度。参照文献用多重 PCR 方法检测毒素基因,鉴定 *C. perfringens* 及其分型^[2,7,11]。

1.4 AFLP 分析

取 5~8 μ L 供试 DNA 样品,用 *Eco*R I 和 *Mse* I 进行双酶切,再用 T₄ DNA 连接酶将酶切片段与 *Eco* 连接头(5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'; 5'-AATTGGTACGCAGTC-3') 和 *Mse* 连接头(5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'; 5'-TACTCAGGACTCAT-3') 连接后,先用具有 1 个选择性碱基的引物, *Eco*R I + A(5'-GACTGCGTACCAATTCA-3') 和 *Mse* I + C(5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3') 进行 PCR 反应。再用预扩引物加 2 个选择性碱基的引物进行二次扩增,从 12 对引物中筛选出 1 对多

态性较好且扩增条带数适宜的引物。选择性扩增引物: *EcoR* I + A + GC (5'-GACTGCGTACCAAT-TCAGC-3') 和 *Mse* I + C + AC (5'-GATGAGTC-CTGAGTAACAC-3')。酶切连接及 PCR 反应程序按张小平^[12]、陈强^[13] 等方法进行。反应完毕用 0.8% 琼脂糖凝胶初步检测 PCR 产物, 然后取 3 μ L PCR 产物与 2 μ L 上样缓冲液混合, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染、固定后室温过夜干燥, 用 HP 扫描仪扫描凝胶。

1.5 ERIC-PCR 分析

用 ERIC 引物 (5'-ATGTAAGCTCCTGGG-GATTAC-3'; 5'-AAGTAAGTGACTGGGGT-GAGCG-3') 扩增, 反应体系: 10 \times buffer 2.5 μ L, 引物 (10 μ mol \cdot L⁻¹) 2 μ L, dNTPs (2.5 mmol \cdot L⁻¹) 2.0 μ L, MgCl₂ (25 μ L)。优化的反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 36 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 0.5 min, 48 $^{\circ}$ C 退火 0.5 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 5 μ L PCR 产物在

1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 用 BIO RAD 凝胶成像系统拍照记录结果。

1.6 药敏试验

采用 K-B 纸片扩散法, 根据抑菌圈大小判断菌株的敏感性。药敏纸片由杭州微生物有限公司生产。

1.7 数据分析和处理

AFLP 和 ERIC-PCR 图像用 Tif 文件保存; 图像信息采用 GelcomparII 分析软件, 用 UPGMA (unweighted pair group mean average) 进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 菌株分离结果

从四川省成都、雅安、绵阳等地 10 个规模化鸡场健康鸡群采集了 500 份新鲜粪便和 100 份盲肠内容物样品, 共分离得到 34 株 *C. perfringens*, 总分离率为 5.7% (表 1)。多重 PCR 检测 34 株菌均只扩增出 α 毒素基因, 都属于 A 型 *C. perfringens* (另文报道)。

表 1 菌株分离结果

Table 1 The results of *C. perfringens* isolation

地点 City	成都 Chengdu	成都 Chengdu	雅安 Ya'an	雅安 Ya'an	宜宾 Yibin	泸州 Luzhou	乐山 Leshan	广汉 Guanghan	绵阳 Mianyang	德阳 Deyang	合计 Total
鸡场 Farm	A1	A2	B1	B2	C	D	E	F	G	H	
菌株数量 Number of isolates	4	3	3	7	2	1	4	3	5	2	34(5.7% ^a)

a. 分离率 a. Isolated rate

2.2 *C. perfringens* 遗传多样性的 AFLP 分析

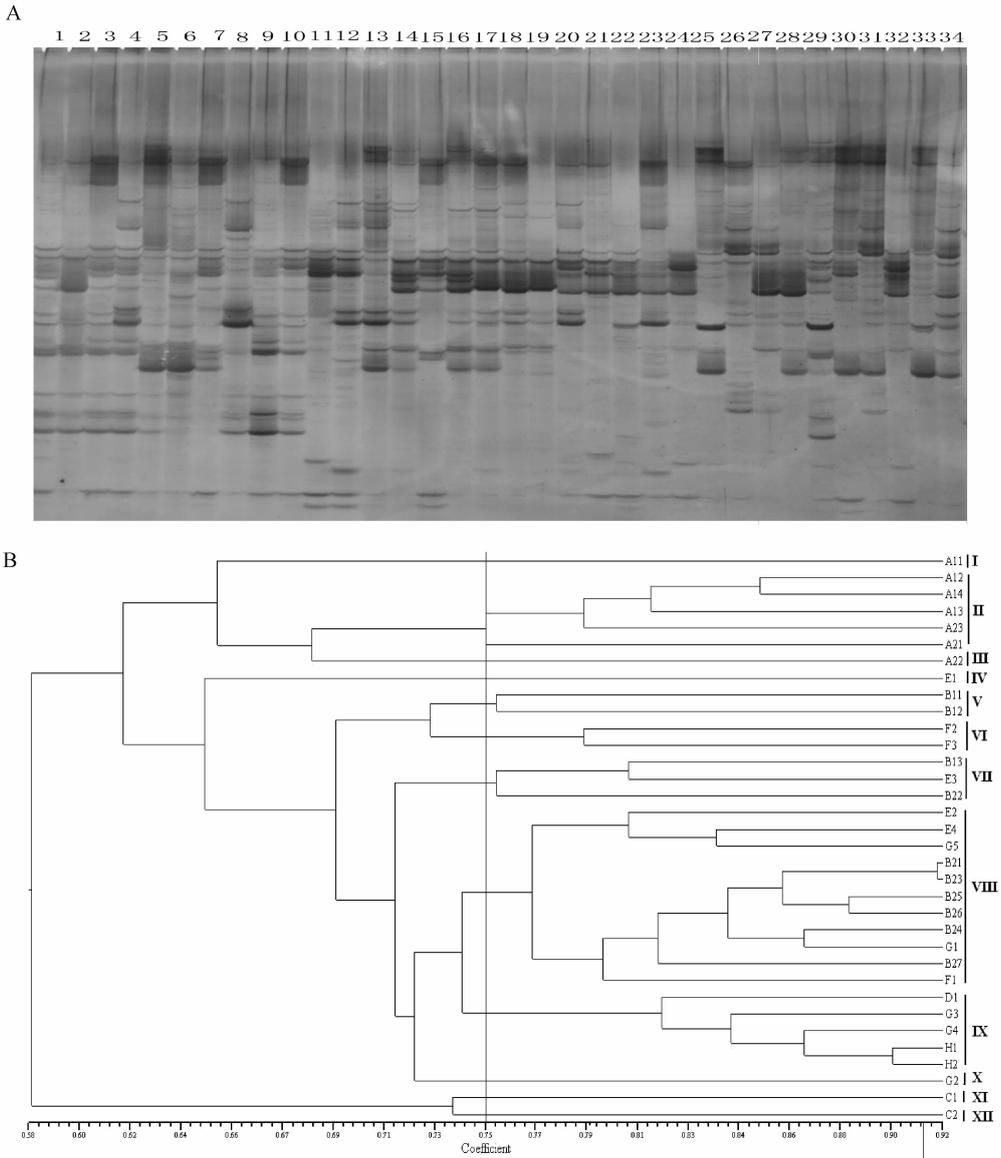
34 株 *C. perfringens* 的 AFLP 指纹图谱和聚类分析见图 1。AFLP 指纹图谱产生的条带数较多, 多态性丰富。聚类分析结果表明, 不同鸡场分离得到的 *C. perfringens* 菌株间存在明显的遗传差异, 若以相似性系数 0.75 为分界点, 34 株 *C. perfringens* 可分为 12 个类群, 其中 B21 和 B23 的相似性系数最高, 在 92% 相似水平上, 亲缘关系较近。供试 *C. perfringens* 菌株的遗传聚群既有一定的地域性, 同时也表现出多样性特征; 来源于不同鸡场的菌株, 主要表现为不同的 AFLP 基因型, 而同一鸡场主要以 1 种 AFLP 基因型为主, 也包含其它基因型。如: 菌株 A12、A13、A14 和 B21、B23、B24、B25、B26、B27 分别来自 2 个相同的鸡场, 各自聚为一群; 而同样来自 A2 鸡场的 3 菌株, A21、A23 聚在一群, A22 则聚为另一群, 表现出 2 种 AFLP 基因

型, 来自 G 鸡场的 5 株菌则聚到 3 个遗传群中, 表现出 3 种 AFLP 基因型。

2.3 *C. perfringens* 遗传多样性的 ERIC-PCR 分析

34 株 *C. perfringens* 菌株的 ERIC-PCR 指纹图谱和聚类分析见图 2。ERIC-PCR 指纹图谱的条带数为 4~10 条, 多态性较好。从聚类图中可以看出, *C. perfringens* 菌株间存在明显的遗传差异, 以相似性系数 0.77 为分界点, 34 株 *C. perfringens* 可分为 8 个类群。ERIC 指纹图谱也表明菌株的来源不同, 表现出不同的 ERIC 基因型, 菌株亚型与鸡场密切相关, 如 2 型菌株 A13、A14 来自 A1 鸡场, 4 型菌株 B21、B23、B24、B27 都来自 B2 鸡场, B1 鸡场的 3 株菌也全部聚在 1 型; 但是, 分离自同一鸡场的菌株之间也存在遗传差异, 如: 来自 A2 鸡场的菌株 A21-A23, 分别聚到 1 型和 5 型, 表现为 2 种 ERIC

基因型,同样来自 G 鸡场的 5 株菌 G1-G5 也被聚到 2 个遗传群中,有 2 种 ERIC 基因型。



In Fig. A(From the left to right):1. A11;2. A12;3. A13;4. A14;5. B11;6. B12;7. B13;8. A21;9. A22;10. A23;11. C1;12. C2;13. D1;14. B21;15. B22;16. B23;17. B24;18. B25;19. B26;20. B27;21. E1;22. E2;23. E3;24. E4;25. F1;26. F2;27. F3;28. G1;29. G2;30. G3;31. G4;32. G5;33. H1;34. H2; the same as below

图 1 34 株产气荚膜梭菌分离株 AFLP 指纹图谱(A)和聚类分析(B)
Fig. 1 AFLP fingerprint and dendrogram of 34 *C. perfringens* isolates

2.4 C. perfringens 基因型在不同鸡场的分布情况

从 10 个规模化鸡场分离的 34 株 *C. perfringens* 菌株的基因型分布情况见图 1、图 2 和表 2。无论是 AFLP 优势基因型,还是 ERIC-PCR 优势基因型均达到 30% 以上,说明四川省规模化鸡场健康鸡群 *C. perfringens* 菌株以 1 种基因型为主要流行型。在 AFLP 分型中,除基因 VIII 型外,其余基因型

都主要分布于 1~2 个鸡场,而 VIII 型包含菌株数量最多,是遗传多样性最丰富的一型,且分布到 4 个不同的鸡场,可以认为是四川地区健康鸡群 *C. perfringens* 最主要的一类流行型。在 ERIC-PCR 分型中,基因 1 型包含菌株数量最多,分布到了 7 个鸡场,而且是其中 4 个鸡场的优势基因型,所以 ERIC-PCR 基因 1 型是四川省规模化鸡场健康鸡群 *C. perfringens* 菌株的主要流行型。

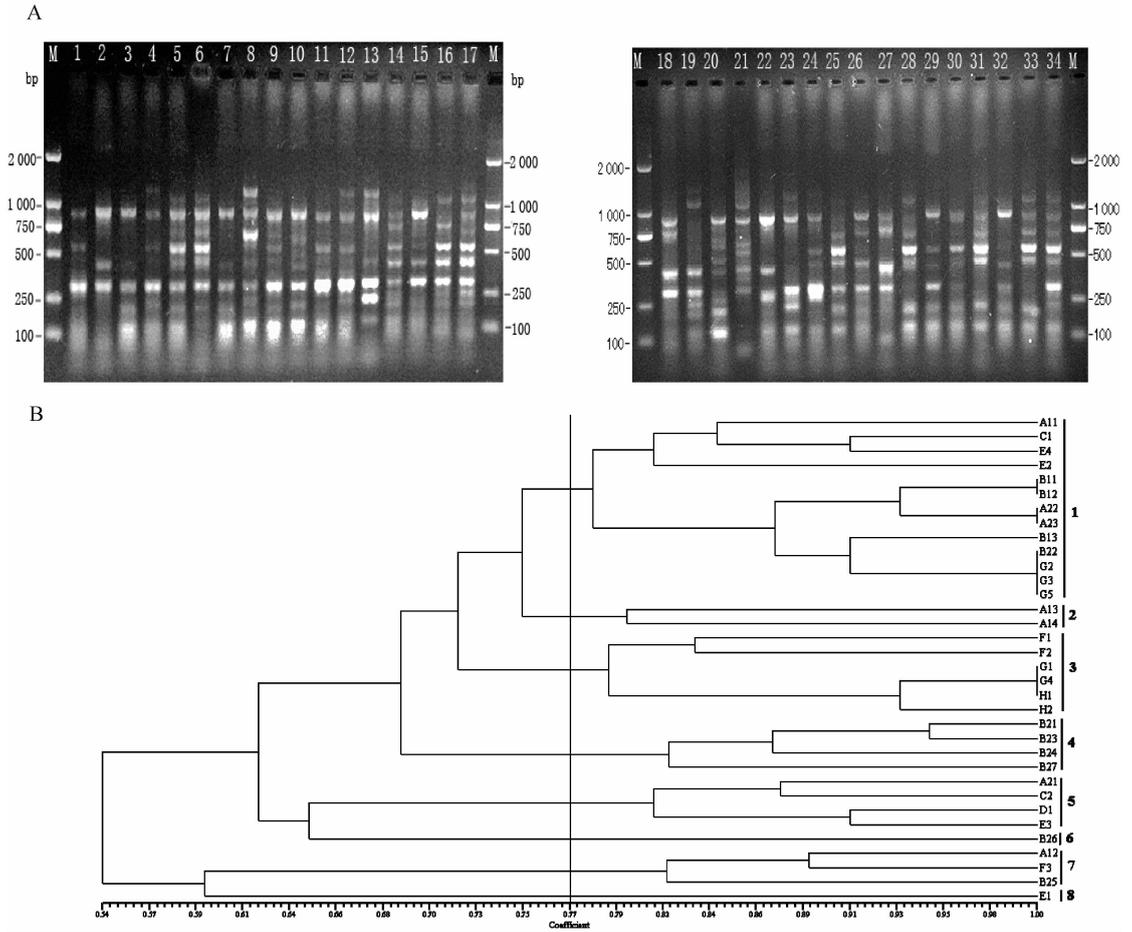


图 2 34 株产气荚膜梭菌分离株 ERIC-PCR 指纹图谱(A)和聚类分析(B)

Fig. 2 ERIC-PCR fingerprint and dendrogram of 34 *C. perfringens* isolates

表 2 产气荚膜梭菌基因型分布情况

Table 2 Distribution of *C. perfringens* gene types from cecal and fecal samples

鸡场 Farm	AFLP			ERIC-PCR		
	基因型种类 Number of gene type	优势基因型 Dominant gene type	优势基因型比例 Ratio of dominant gene type	基因型种类 Number of gene type	优势基因型 Dominant gene type	优势基因型比例 Ratio of dominant gene type
A1	2	II	3/4	3	2	2/4
A2	2	II	2/3	2	1	2/3
B1	2	V	2/3	1	1	3/3
B2	2	VIII	6/7	4	4	4/7
C	2	—	—	2	—	—
D	1	—	—	1	—	—
E	3	VIII	2/4	3	1	2/4
F	2	VI	2/3	2	3	2/3
G	3	IX	2/5	2	1	3/5
H	1	IX	2/2	1	3	2/2
Total	12	VIII	11/34	8	1	13/34

但是,不同鸡场 *C. perfringens* 菌株的基因型差异明显,多数鸡场均有 2~3 种基因型,以一种基因型为主,交叉有少数其他基因型。只有少数鸡场基因型单一,如 H 鸡场的分离菌株无论是 AFLP 基因型,还是 ERIC-PCR 基因型均只有一种。唯有 B2 鸡场 *C. perfringens* 的 ERIC-PCR 基因型种类最多,有 4 种基因型。

2.5 *C. perfringens* 的耐药性

选取 9 种常用药物分别对分离到的 34 株 *C. perfringens* 菌进行药敏试验,结果见表 3。其中对青霉素的耐药性表现最为明显,耐药率达到

97.1%,其次是庆大霉素和万古霉素,耐药率分别为 94.1% 和 88.2%。对氨苄青霉素耐药的菌株为 B24、B26;对先锋霉素 V 耐药的菌株为 D1、H1、H2;对头孢噻肟耐药的菌株为 B27、H1、H2。这些耐药菌株的基因型较简单,主要分布在 AFLP VIII 型和 IX 型,或 ERIC-PCR 3 型和 4 型。对氯霉素敏感的菌株包括 B11、B12、B13、F2、F3、G2、G3、G5 等 8 株菌,其中 6 株菌均属于 ERIC-PCR 基因 1 型,对万古霉素敏感的 4 株菌 A11、A21、C1、C2 则分布在 ERIC-PCR 基因 1 型和 5 型。

表 3 34 株产气荚膜梭菌对抗菌药物的敏感性

Table 3 Susceptibility of 34 *C. perfringens* isolates to various antimicrobials

抗菌药物 Antimicrobial	S	I	R	耐药率/% Resistance rate
氨苄青霉素 Ampicillin	30	2	2	5.9
先锋霉素 V Cefazolin V	29	2	3	8.8
头孢噻肟 Cefotaxime	31	0	3	8.8
强力霉素 Doxycycline	20	0	14	41.2
诺氟沙星 Norfloxacin	16	0	18	52.9
氯霉素 Chloramphenicol	8	3	23	67.6
万古霉素 Vancomycin	4	0	30	88.2
青霉素 Benzylpenicillin	0	1	33	97.1
庆大霉素 Gentamicin	1	1	32	94.1

S. 敏感; I. 中度敏感; R. 不敏感

S. Sensitive; I. Moderate sensitive; R. Insensitive

3 讨论

采集了 100 份鸡盲肠内容物和 500 份粪便样品进行 *C. perfringens* 分离,分离率仅为 5.7%,与 Kalender 等报道的 5% 分离率相似^[14],但与欧洲和北美国家 20% 以上,甚至 80% 以上的分离率相比较低^[15]。分析原因可能与四川地区鸡场长期在饲料中添加抗生素和抗球虫药物有关,从 *C. perfringens* 的耐药性分析可看出分离菌株对青霉素、庆大霉素和万古霉素等的耐药率达到 88% 以上,抗生素对 *C. perfringens* 有抑制作用,可显著降低 NE 发病率^[16]。球虫是诱发 NE 最重要的因素,抗球虫药也能起到抑制 *C. perfringens*,减少 NE 发生的作用^[17-18]。其次,*C. perfringens* 分离率与鸡的日龄相关,新近 Chalmers 等的研究表明 22 日龄前的健康肉鸡,较容易从盲肠和粪便中分离得到 *C. perfringens*,22 日龄后,即使是从盲肠也较难分离到

C. perfringens 菌株^[15],因为成年鸡的肠道菌群结构较稳定,与乳杆菌和肠杆菌相比,*C. perfringens* 只是肠道菌群中很小的一个组成部分^[15,19-20]。本试验的样品主要来自成年鸡,可能是分离率较低的原因之一。此外,样品来源也会影响 *C. perfringens* 分离率,盲肠样品的分离率最高,其次是粪便样品,环境中也有少量 *C. perfringens* 存在^[15],本试验中的样品大部分是采集简便的粪便样品,也可能降低 *C. perfringens* 分离率。

本试验中分离的 34 株 *C. perfringens* 经多重 PCR 鉴定均为 A 型,为了进一步掌握 *C. perfringens* 的流行特点,很有必要作基因亚型分析。AFLP 和 ERIC-PCR 是用于细菌种属分型常用的两种方法。AFLP 方法较为灵敏,已用于 *C. perfringens* 的分型研究^[2,21],能够从全基因组的角度获得丰富而稳定的遗传信息,充分反映供试菌株的遗传多样性;重复序列 ERIC 在原核生物 DNA 中普

遍存在,可用于病原菌的流行病学监测和菌株间的遗传差异分析^[22-23]。这两种方法均能够获得大量遗传信息,广泛用于细菌的亚型分析。但由于两种方法获得遗传信息的角度不同,得到的结果也存在一定的差异,有必要将两者结合起来进行有效补充^[24]。综合比较,AFLP 较 ERIC-PCR 得到的条带数更多,对菌株的划分更细致,菌株的聚类分析图谱也更易于解释,如在 ERIC-PCR 分析中,来自 3 个鸡场的 G1、G4、H1、H2、F1、F2 聚为同一个群,而在 AFLP 聚类图中则分散到 3 个不同的遗传群中;AFLP 甚至还能将 ERIC-PCR 中相似系数为 1 的菌株,如 G1、G4、H1 分散到 2 个不同的群。另一方面,ERIC-PCR 也可以对 AFLP 中未能区分的菌株进行补充,例如,在 AFLP 中 B13、B22、E3 聚为一群,而 ERIC-PCR 将 E3 分到另一个遗传群。这是由于 AFLP 是从细菌全基因组角度获得遗传信息,而 ERIC-PCR 是从细菌全基因组中的重复序列获得有效信息,所以 AFLP 得到的信息更丰富,能够充分反映供试菌株的遗传多样性;加之检测 PCR 产物时,ERIC-PCR 采用 1.5% 琼脂糖电泳,而 AFLP 采用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增产物,两者的分辨率也存在差异。但是 ERIC-PCR 较 AFLP 更快捷,成本更低,无需进行酶切条件及引物的筛选,从菌株的序列保守性上设计引物进行扩增,也具有很强的鉴别亚种和菌株的能力^[22]。

从 10 个鸡场分离得到 34 株 *C. perfringens*, 经 AFLP 指纹分型将其聚为 12 个遗传群,ERIC-PCR 分型聚为 8 个群。与国外报道相比,我国规模化鸡场 *C. perfringens* 菌株的遗传多样性较低^[6],这可能与抗生素的添加饲喂密切相关,*C. perfringens* 经过长期的遗传变异选择保留了少数耐药性较高的菌株,但其演变机理还不清楚。*C. perfringens* 的流行特点与地区差异密切相关,一方面是由于不同鸡场的饲养管理条件不同,如日粮、环境卫生等可影响 *C. perfringens* 的流行型^[25];另一方面由于各个地区地理、气候条件存在差异,而这些因素常是诱发 NE 的主要原因^[26],因此也可影响 *C. perfringens* 的流行型。有报道同一健康鸡群,即使是同一个体都含有几种不同亚型的 *C. perfringens*,而发生 NE 的鸡却只携带 1~2 个亚型^[2,6,7]其基因型发生变化的原因还不清楚,NE 发病机理是否与基因亚型演变相关,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] SONGER J G, MEER R R. Genotyping of *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals [J]. *Anaerobe*, 1996, 2: 197-203.
- [2] ENGSTROM B E, FERME R C, LINDBERG A, et al. Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry [J]. *Vet Microbiol*, 2003, 94: 225-235.
- [3] PETIT L, GILBERT M, POPOFF M R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype [J]. *Trends Microbiol*, 1999, 7: 104-110.
- [4] KALDHUSDAL M, L VLAND A. The economical impact of *Clostridium perfringens* is greater than anticipated [J]. *World Poultry*, 2000, 16: 50-51.
- [5] FILIP V I, JEROEN D B, FRANK P, et al. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health [J]. *Avian Pathol*, 2004, 33: 537-549.
- [6] NAUERBY B, PEDERSEN K, MADSEN M. Analysis by pulsed field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens [J]. *Vet Microbiol*, 2003, 94: 257-266.
- [7] AHMAD R G, RICHARD D, MARC H, et al. Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status [J]. *Vet Microbiol*, 2006, 113: 143-152.
- [8] CASEWELL M, FRIIS C, MARCO E, et al. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 52: 159-161.
- [9] GRAVE K, KALDHUSDAL M C, KRUSE H, et al. What has happened in Norway after the ban of avoparcin? Consumption of antimicrobials by poultry [J]. *Prevent Vet Med*, 2004, 62: 59-72.
- [10] MICHAEL B, ANTONIA V, ALFONSO N, et al. Ribotyping and 16S rRNA gene sequencing for identification of brewery *Pediococcus* isolates [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 553-560.
- [11] 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: 228-232.
- [12] 张小平,陈强,李登煜,等. 用 AFLP 技术研究花生

- 根瘤菌的遗传多样性[J]. 微生物学报, 1999, 39(6): 483-488.
- [13] 陈 强, 张小平, 李登煜, 等. 用 AFLP 技术检测慢生型花生根瘤菌竞争结瘤的研究[J]. 生态学报, 2003, 23(10): 2189-2194.
- [14] KALENDER H, ERTAS H B. Isolation of *Clostridium perfringens* from chickens and detection of the alpha toxin gene by polymerase chain reaction (PCR) [J]. *Turk J Vet Anim Sci*, 2005, 29: 847-851.
- [15] CHALMERS G, MARTIN S W, HUNTER D B, et al. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm [J]. *Vet Microbiol*, 2008, 127: 117-127.
- [16] ENGBERG R M, HEDEMANN M S, LESER T D, et al. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers [J]. *Poultry Sci*, 2000, 79: 1311-1319.
- [17] JACKSON M E, ANDERSON D M, HSIAO H Y, et al. Beneficial effect of beta-mannanase feed enzyme on performance of chicks challenged with *Eimeria sp.* and *Clostridium perfringens* [J]. *Avian Dis*, 2003, 47: 759-763.
- [18] WILLIAMS R B, MARSHALL R N, LA RAGIONE R M, et al. A new method for the experimental production of necrotic enteritis and its use for studies on the relationships between necrotic enteritis, coccidiosis and anticoccidial vaccination of chickens [J]. *Parasitol Res*, 2003, 90: 19-26.
- [19] BJERRUM L, ENGBERG R M, LESER T D, et al. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques [J]. *Poultry Sci*, 2006, 85: 1151-1164.
- [20] WISE M G, SIRAGUSA G R. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one-to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic free vegetable-based diets [J]. *J Appl Microbiol*, 2007, 102: 1138-1149.
- [21] MCLAUCHLIN J, RIPABELLI G, BRETT M M, et al. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing [J]. *Int J Food Microbiol*, 2000, 56: 21-28.
- [22] LIPMAN L J A, DE NIJS A, LAM T J, et al. Identification of *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis by serotyping and DNA polymorphism patterns with REP and ERIC primers [J]. *Vet Microbiol*, 1995, 43: 13-19.
- [23] 林朝洪, 倪学勤, 曾 东, 等. 重复序列 ERIC(IRU)研究进展, 微生物学报, 2007, 47(2): 370-373.
- [24] LEUNG K T, MACKERETH R, TIEN Y C, et al. A comparison of AFLP and ERIC-PCR analyses for discriminating *Escherichia coli* from cattle, pig and human sources [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2004, 47: 111-119.
- [25] CRAVEN S E, STERN N J, BAILEY J S, et al. Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during production and processing [J]. *Avian Dis*, 2001, 45: 887-896.
- [26] VAN IMMERSEEL F, DE BUCK J, PASMANS F, et al. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health [J]. *Avian Pathol*, 2004, 33: 537-549.