



產氣芽胞梭狀桿菌污染的飼料— 是否威脅到家禽生產量？有哪些控制方法？

林欣其 專員 祥圃實業股份有限公司動物保健部
翻譯自亞當史密斯博士於 2009 年 VIV Asia 發表文章

前言

產氣芽胞梭狀桿菌 (*Clostridium perfringens*) 是一種厭氧、可形成芽胞的細菌，本菌可引起臨床和亞臨床壞死性腸炎，且在其他臨床條件下，可造成家禽壞疽性皮膚炎 (Gangrenous dermatitis)。此菌也被認為是第 3 個最常引起人類食源性疾病的病因。此菌在家禽的發病率似乎有上升趨勢。這可能是全球許多地區藉著禁用抗生素作為生長促進劑以及那些常態以填加抗生素來控制細菌而衍生抗藥性的後果。因此更透徹了解細菌特性是有必要的，了解細菌進入家禽場的媒介與誘發疾病因子才能事先預防疾病的發生，並促進動物生長性能和達到動物產品安全性的最佳保障。本文將探討下列幾個主題，梭狀桿菌對家禽生產和家禽產品安全的重要性，特別是在受污染的動物飼料和原料可能是一個重要感染源，及飼料污染發生率與不同處理方法的優缺點也將被討論。

梭狀桿菌屬

梭菌桿菌屬，為革蘭氏陽性菌、桿狀、厭氧性、可形成芽胞的細菌。本菌無處不在，它們可在腐爛的植被、土壤、海洋沉積物和人類腸道內、其他脊椎動物和昆蟲的正常組織中發現。本菌可在生長階段產生具高度抵抗性的芽胞並產生毒素，這些毒素可能會引起人和動物的臨床、亞臨床的症狀。

在家禽有 4 個疾病與梭狀桿菌感染相關。鷓鴣梭狀桿菌 (*Clostridium colinum*) 可引起潰瘍性腸炎；在壞死性腸炎和壞疽性皮膚炎病例中可分離到產氣芽胞梭狀桿菌和敗血型梭狀桿菌 (*Clostridium septicum*)，而肉毒桿菌毒素中毒的病因則是肉毒型梭狀桿菌 (*Clostridium botulinum*) (Truscott and Al-Sheikhly, 1977; Annett et al, 2002; Carr et al,

1996)。其他種別的梭菌可能在零星或新的疾病中見到，例如：難辨梭狀桿菌 (*Clostridium difficile*) 和孝伏氣腫梭狀桿菌 (*Clostridium chauvoei*)。梭狀桿菌所產生的毒素為引起上述病理症狀的原因。然而在其他病例中，梭狀桿菌可無害地生長在動物腸道內，除非有其他相關因素，例如：飼料成份的改變、嚴重緊迫、球蟲感染或免疫抑制性的感染...等，這就可能誘發臨床或亞臨床性疾病。

產氣芽胞梭狀桿菌

如同其他梭狀桿菌，產氣芽胞梭狀桿菌具有無所不在的特性，經常可在土壤、灰塵、糞便、飼料和垃圾中發現。它產生的芽胞可耐過許多化學消毒劑，並能存活達一世紀之久。本菌會分泌毒素和酵素，引起病變及臨床症狀。不像其他病原性梭狀桿菌，產氣芽胞梭狀桿菌是被包覆起來的，因此，具有相當的耐氧性 (aero-tolerant)，這更增強了細菌的存活能力。

家禽壞死性腸炎和潰瘍性腸炎的存在，構成了經由食物鏈傳染給人類的風險。這在人類可造成兩種不同疾病，C 型可引起腹瀉，A 型則引起壞死性腸炎。這些症狀分別由 A 型和 C 型產氣芽胞梭菌的腸毒素所造成。

本菌是公認最常見的一種細菌病原體。在人類，它可經由食物鏈造成疾病爆發 (Buzby and Roberts, 1997)。據報導它在英國和美國，是排名第 3 最常見的人類食源性疾病 (Warrell *et al*, 2003)，在全球排名第 4，每年全球約有 249,000 病例發生 (Tauxe, 2002)。雖然產氣芽胞梭狀桿菌可引起疾病爆發，但此菌可追溯到不同的來源，其中最常見的是禽肉，特別是在不易煮熟的肉類 (Schiemann, 1977; Regan *et al*, 1995; Hook *et al*, 1996)。

家禽產氣芽胞梭狀桿菌感染症

家禽的產氣芽胞梭狀桿菌感染症，對產業有很高的經濟損失，估計其發生率可由 1% 至 40% (McDevitt *et al*, 2006)。此症可能引起急性或亞急性的壞死性腸炎。在飼養的最後幾週，急性型可導致雞群死亡率上升，可接連數天見到死亡率高至 1% (Kaldhusdal and Lovland, 2000)。臨床症狀包括：精神沈鬱、脫水、羽毛凌亂、下痢、飼料消耗量減低。大部份的顯微病變可在小腸見到，其他臟器也可見到病變，例如：盲腸、肝臟和腎臟。在十二指腸和空腸，有時在盲腸，可見到病變呈現包覆樣、易碎、腸道膨脹並充滿氣體。

黏膜表面則覆蓋著一層灰棕色至黃綠色的偽膜。

一些較輕微的亞臨床病例，則在腸道黏膜見到局部壞死灶。這會造成消化、吸收功能的下降、體重減輕和飼料轉換率上升 (Elwinger *et al*, 1992; Kaldhusdal and Hofshagen, 1992; Kaldhusdal *et al*, 2001; Hofacre *et al*, 2003)。此病通常容易伴隨膽管肝炎，因此可見到肝臟極度腫大、蒼白網狀樣病灶，有時呈現蒼白放射線-針點樣。這些病變與疾病嚴重程度是正相關的 (Lovland and Kaldhusdal, 1999)。此型疾病是目前比較常見的，且發病率似乎有增加的趨勢。這可能與全球某些地區和歐洲在 1999 年禁用抗生素作為生長促進劑有關 (Kaldhusdal and Lovland, 2000)。基於細菌對抗生素抗藥性增加的顧慮，越來越少抗生素添加劑可使用於家禽中，這對家禽產業來說可能是另一個衝擊。

雖然家禽壞死性腸炎的病因已確定為產氣芽胞梭狀桿菌，但由敗血型梭狀桿菌引起病例也在持續增加中。梭狀桿菌是增加屠宰過程中廢棄屠體（因皮膚炎廢棄）比例的原因，而通常這些疾病出現在美國一些以素食為基礎飼料和不使用抗生素的肉雞場。

有許多不同的評論家曾評估過亞臨床疾病對肉雞產業造成的損失。其中最近的評論家 Dahiya 曾指出，此病對生產性能有下降的影響，可造成 0.05 美元/雞隻的損失 (Dahiya *et al*, 2006)。因此深入了解這些疾病的成因和控制措施對家禽產業經濟表現是不可或缺的。

影響產氣芽胞梭狀桿菌感染的因素

產氣芽胞梭狀桿菌（以下簡稱梭菌）主要來自於環境中，包括受污染的飼料、水或雞隻棟舍的任何部分 (Craven *et al*, 2001a,b, 2003)。腸道內的細菌不一定會引發感染。一個或多個誘發因素都需要在這些細菌定殖後才會引起疾病的發生。許多誘因可輕易造成雞隻爆發梭菌感染，這些誘因包括黏膜損傷、飼糧配方、飼糧改變、墊料品質、遺傳和免疫抑制 (Truscott and Al-Sheikhly, 1977; Annett *et al*, 2002; Van Immerseel *et al*, 2004)。儘管科學家試著鑑定各種不同的誘因，但目前還未有正確計算各種誘因與相關風險的研究。

其中最常被觀察到的誘因是球蟲造成的腸道損害。腸道損傷造成血漿蛋白釋出，這為細菌增殖提供了一個廣泛的生長基質。在小腸內定殖的球蟲種別有堆型艾美球蟲和巨型艾美球蟲，這兩者是眾所周知誘發梭菌致病的病因。離子型藥物可預防梭菌的相關疾病，在飼料中停止使用離子型藥物也會成為誘發梭菌疾病的因素。

飲食習慣對梭狀桿菌感染的發生率有巨大的影響。以玉米為基礎飼料者，飼料中添加

高比例的小麥，大麥或黑麥，這些穀類會提高不易消化率、水溶性非澱粉多醣類、增加腸內容物黏性並刺激細菌過度生長。當肉雞連續 3 天飼餵含梭菌的飼料（玉米為主），可見到死亡率由 0% 升至 12.5%；然而餵飼高比例的小麥、黑麥和大麥的飼料，其死亡率從 26% 升到 35%（Riddell and Kong, 1992）。飼料中富含動物蛋白和魚粉也被證實對梭菌感染發生率有影響（Kocher, 2003），如：氧化脂肪、黴菌毒素和突然或顯著的飲食習慣改變。這些飲食變化會增加緊迫及對免疫系統造成負面影響，進而降低雞隻對細菌感染的抵抗力。

飼料形態也會影響雞隻壞死性腸炎的發生率。與較粗糙的飼料相比，細磨飼料已被證實會增加死亡率與壞死性腸炎的發生（Branton *et al.*, 1987）。然而另一項研究指出，飼料粗磨和細磨程度對腸道內產氣芽胞梭菌的數量並無影響（Engberg *et al.*, 2002）。

墊料水份過高也會促使梭菌感染症發生，因此保持墊料的足夠厚度來吸收水份、確保良好通風和維持良好飲水設備是重要的。但應注意高纖維的墊料會損害胃腸道的黏膜，使禽類容易發生其他疾病。

降低雞隻接觸到細菌的措施，目前有更好的選擇可預防臨床和亞臨床疾病感染。充份的屋舍消毒可有效減少球蟲病，控制粉塵、飲水中添加有機酸或氯可減少病原體進入到雞舍，使用塑膠靴子、進門前消毒鞋子、確保飼料內無梭菌和其芽胞的污染...等，皆可幫助將疾病降至最低。生物安全對環境相當重要，尤其在禁用抗生素作為生長促進劑後及某些存有抗生素抗藥性疑慮的地區。在這種情況下，以前環境中微不足道的污染將成為威脅家禽經濟表現的一環，這都必須加以適當控制。

梭菌污染的飼料

飼料和原料中含有各種各樣的細菌污染，其中一些對人類和動物具有病原性。飼料中可發現的病原菌有：沙門氏菌、大腸桿菌、金黃葡萄球菌、鏈球菌、巴氏桿菌、綠膿桿菌和梭菌。有鑑於某些細菌，如沙門氏菌已得到很好的研究，其他如梭菌則相對地較少受到注意，直到最近，大家還是一致公認，家禽梭菌感染的源頭是飼料（Wicker *et al.*, 1977; Ficken *et al.*, 1997）。

目前飼料中，只有兩屬厭氧性芽胞梭狀桿菌被報告出來：產氣芽胞梭狀桿菌和肉毒型梭狀桿菌。肉毒型梭狀桿菌往往獨自存在於其他青貯飼料，梭菌則經常在動物飼料原料中被分離到，其菌落數範圍可從 3 CFU/g—8,000 CFU/g。在飼料中可分離到梭菌的繁殖體

(Vegetative form) 和具高度抗性的芽胞。這種具芽胞的細菌可長期生存在惡劣條件下，因此，如果預防措施是針對梭菌的話，使用對抗其他不具芽胞的細菌的方法可能會呈現無效結果。舉例來說，芽胞梭菌和許多其他細菌不一樣，是因梭菌的芽胞具有高耐熱性，因此本菌還是很容易在打粒飼料內被分離到 (Greenham et al, 1987)。

飼料原料可在任何階段受到梭狀桿菌的污染，包括了生長期、收割期、加工期、儲存期和運送到飼料廠的過程中。污染可能由直接或間接接觸環境而發生，或和已受污染的原料交叉污染。由環境而來的直接污染源有：土壤、嚙齒類動物、野生鳥類、天敵、昆蟲和灰塵。間接污染源則有受污染的水、地下水和施肥於農作物的動物糞便。

美國和歐盟的 2,049 份樣品分析結果指出，產氣芽胞梭狀桿菌可在許多不同飼料原料中出現，例如：飼料、穀物、油菜籽飼料和動物蛋白飼料，結果摘要列於圖 1 (Xylouri et al, 1997; Prio et al, 2001)。由結果可知，菌落數範圍可從 < 10 CFU/g 至 2,000 CFU/g，平均檢出率為 21.3%。雖然檢出率相對較低，但只要有適當的誘因，就足以引起家禽亞臨床疾病。此次結果與波蘭研究結果非常相似，從 2003 年至 2006 年，波蘭研究單位採樣超過 25,000 件飼料原料樣品，檢驗其中的梭菌 (Kwiatek et al, 2008)。大部分樣品檢測結果為陽性，然而，在肉骨粉樣品中檢出的梭菌數比油菜籽粕或穀類的樣品都還要高。

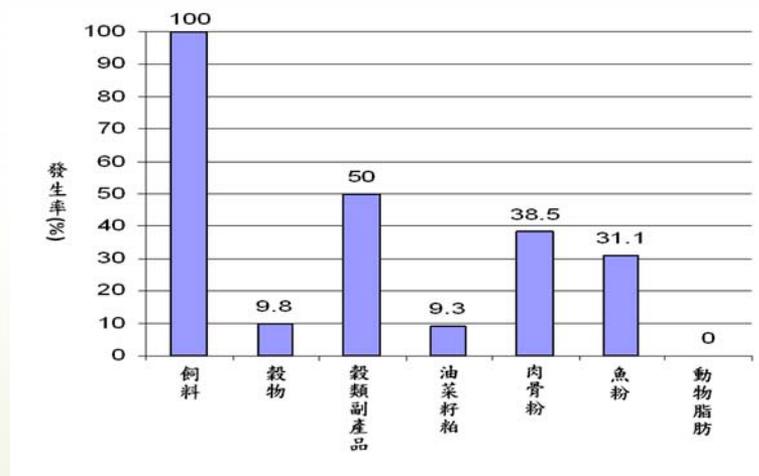


圖 1、產氣芽胞梭狀桿菌在不同飼料原料中的發生率。

不像其他細菌種類，產氣芽胞梭菌對飼料成品的影響似乎沒有特別被列入原物料污染源的名單中 (Prio et al, 2001)。在不考慮產氣芽胞梭菌對原物料的影響之下，飼料的污染會隨著時間和作業過程而有很大的不同 (圖 2)。

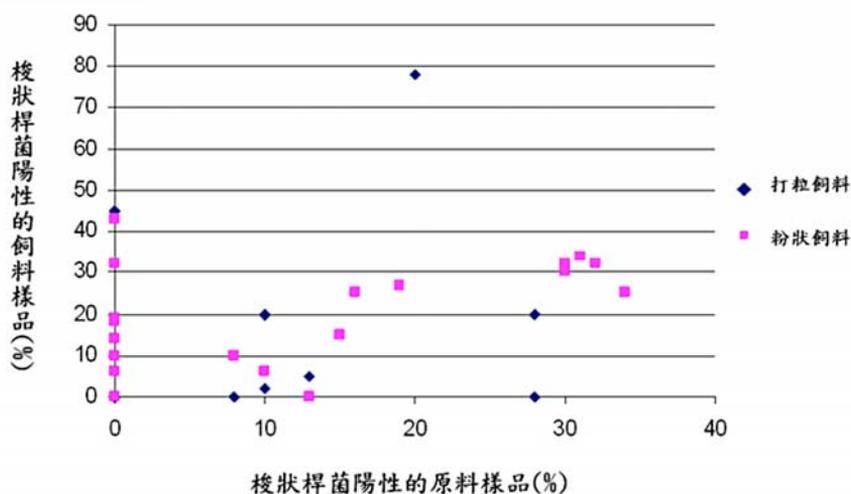


圖 2、梭狀桿菌陽性飼料與梭狀桿菌陽性原料之間的關係。

研究可看出不同動物飼料型態對原物料內容物或生產過程的影響並不是那麼明顯。圖 3 為美國和歐盟的 265 份不同動物飼料產氣芽胞梭菌樣品的試驗結果 (Kanakaraji et al, 1998)。

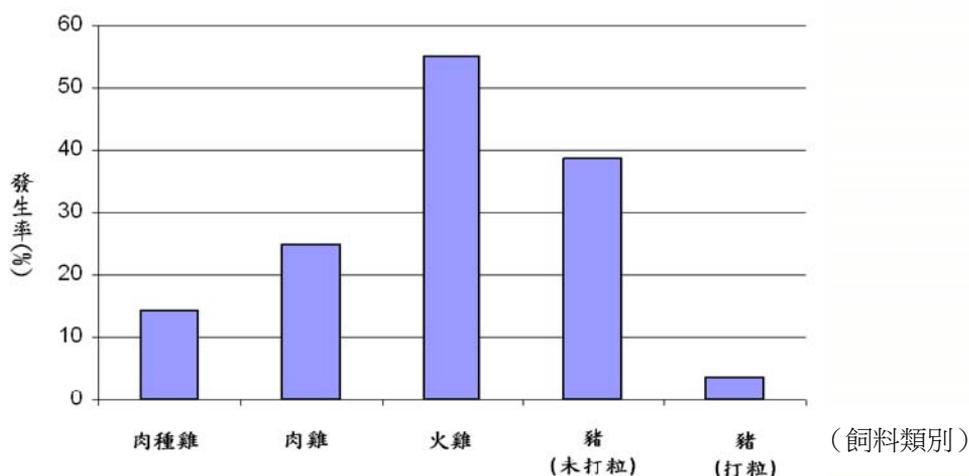


圖 3、完全飼料中的產氣芽胞梭狀桿菌的發生率。

這些研究指出，產氣芽胞梭狀桿菌的污染程度平均約 50 CFU/g。但飼料污染程度和發生率可隨著時間和採樣位置而有所變化 (圖 4)。飼料整體污染程度在打粒後會比打粒前還高，且在儲存和運輸過程中又會再增加。污染程度和疾病發生率可從飼料一直影響到生產過程，這是梭菌的特性。梭菌已被證實具有極高度的複製能力 (在理想的條件下，可能在 7.1 分鐘內發生與產生高抗性的芽胞)，這不僅可對抗一般大多數的熱處理和打粒條件，並且打粒時的高溫會刺激梭菌的出芽。有鑑於梭菌可在飼料生產過程中承受負面條件的能力，因此，飼料重覆污染的可能性和飼料在冷卻及輸送過程的梭菌含量，都比其他細菌來的還高。

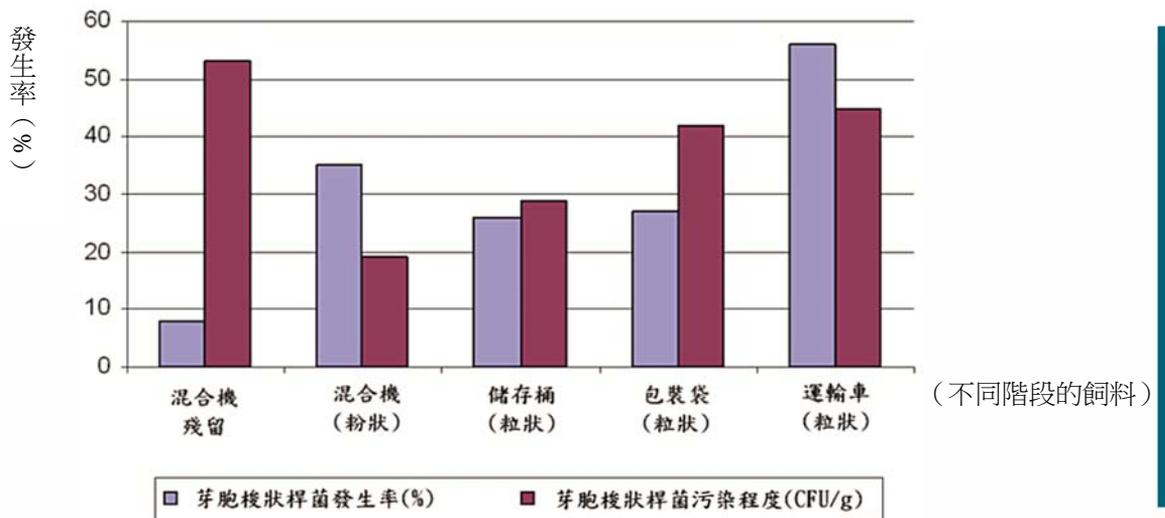


圖 4、不同生產階段的飼料之產氣芽胞梭狀桿菌污染程度和發生率。

控制飼料中梭菌的方法

採用經核准的原料供應商、排除高風險原料、實施 HACCP 計畫、控制嚙齒類動物、野生鳥類和灰塵、加上徹底了解所有生產流程，這些對控制飼料中的細菌皆是不可少的步驟。雖然大多數情況下，梭菌不可能僅靠這些措施就完全控制，或就達到動物最佳生產性能和產品安全。因此，化學性或物理性防治措施通常也需要。這些措施的目的主要是清除梭菌繁殖體和具抗性的芽胞，並同時預防重覆污染的發生。目前市面上常見的預防措施有紫外線照射法、熱處理和化學處理法。

經由熱處理來控制梭菌的效果取決於許多因素。梭菌繁殖體的數量在較低溫（50℃，1-2 分鐘）下會減少，但無法被清除（Heredia et al, 1997）。假如繁殖體已先接受熱處理，那它們可具有更佳的耐熱性且需要較高的溫度處理。因此給予正確的溫度和時間才可有效控制繁殖體。熱處理並不是一個可行的控制芽胞的方法。據報導，梭菌的芽胞可在打粒溫度（90℃）下存活（Greenham et al, 1987; Maciorowski et al, 2007）。即使在不理想條件下，飼料原料在熱處理之前，也有增加芽胞熱耐受性的可能性。打粒條件與冷卻、輸送過程對任何存活的芽胞和繁殖體的複製皆為最佳狀態，對複製速度而言是最理想的且非常迅速。

紫外線照射法對一般飼料生產過程成本太高，除了不能防止重覆污染，消費者也不易發現其效益。反之，化學處理法則廣泛應用於控制細菌及防止重覆污染。現有的處理

方法包括：有機酸、有機酸鹽和醛類化合物/有機酸處理法。在正當容許範圍內，這些方法都可有效預防或抑制許多細菌的生長，包括梭菌的繁殖體 (Skriwanova et al, 2006)。但這些方法對抗芽胞的效果則有較多的差異性。有機酸已被報告在 0.25 - 1% 的溶液中可部分抑制芽胞的出芽，其劑量相當於 2.5 – 10 kg/ton 飼料 (Juneja and Thippareddi, 2004; Coma, 2002)。但有機酸還未被證實具有抑制芽胞活動的能力。另一方面，低劑量醛類化合物已被證實可抑制芽胞，在高劑量下則可殺滅芽胞。當醛類化合物配合熱處理法，則可提高殺滅效果 (Russel, 1990)。

最近實驗室試驗顯示，產品內含有 2 kg/ton 商品化醛類化合物能有效消除梭菌的繁殖體 (表 1)，如果調至 3 kg/ton 則可顯著降低芽胞數量。從現場收集到的樣品數據指出，含醛類化合物的飼料配合熱處理法 (打粒過程) 可更有效地消除梭菌屬 (表 2)。預防梭菌的生長，經證實從處理方法開始，至少可持續 14 天。因此確定雞隻飼料中沒有細菌污染是相當重要的。

確實控制飼料中梭菌屬對預防家禽疾病的爆發是相當重要的 (Kumar et al, 2007)。Kumar 的研究發現，美國火雞爆發梭菌引起的壞疽性皮膚炎有增加的趨勢。只靠修正清潔與消毒計畫並不能確實降低發生率，然而在 HACCP 的過程中，添加醛類化合物於飼料的步驟則可減少爆發的次數。

表 1、在 24 小時和 48 小時內，添加不同劑量的醛類化合物於未打粒飼料來處理梭菌繁殖體和芽胞之結果。

梭菌數 (CFU/g)

處理劑量 (kg/ton)	24 小時		48 小時	
	繁殖體	芽胞	繁殖體	芽胞
0	111	85	136	91
0.5	75	62	76	72
1.0	40	82	44	87
1.5	15	49	12	61
2.0	<5	22	9	27
2.5	<5	12	<5	14
3.0	<5	10	<5	<5

(Richardson, 2008)

表 2、野外條件下，添加不同劑量的醛類化合物於打粒飼料來對抗梭菌之結果。

處理劑量 (kg/ton)	樣品數目	樣品中檢出 繁殖體率 (%)	陽性樣品中 的繁殖體數 量	樣品中檢出 芽胞率 (%)	陽性樣品中 的芽胞數量
0	111	23.4	31	28.8	18
1.0	258	3.5	5	7.4	7
2.0	124	1.6	5	1.6	5
3.0	68	0	0	1.5	5

(Richardson, 2008)

飼料中添加醛類化合物可控制病原體的污染，這些病原體包括：引起亞臨床壞死性腸炎的梭菌與其他飼料中可發現的細菌性病原，如採用此項處理法，家禽生產性能的改善或許就不那麼意外。在一系列的 11 個商業化試驗中（250 萬肉雞），在飼料中給予或不給予醛類化合物，藉此比較飼料中細菌污染程度和預防重覆污染的機率，試驗結果顯示，給予醛類化合物的組別，可一致見到飼料轉換率、死亡率和淘汰雞隻數目的改善（表 3）。

表 3、控制飼料中的細菌可改善肉雞生長性能 - 11 個商業化試驗（250 萬肉雞）之平均值。

參數	對照組	處理組	效益
活體重 (kg)	2.39	2.38	相當
飼料轉換率 (g/g)	1.835	1.797	-0.038
死亡率 (%)	4.25	3.58	-0.67
淘汰率 (%)	2.05	0.94	-1.11

總結

家禽產業中，梭菌顯然是一個問題，它會影響雞隻生產的經濟效益和產品安全。直到最近，此細菌還是靠著抗生素生長促進劑和廣效性抗生素來加以控制。隨著此類添加

劑的禁用和抗生素抗藥性等疑慮，深入了解此細菌如何進入雞群內、與制定相關措施來防止疾病發生是需要的。飼料就是一個將細菌帶入雞群的媒介，但直到現在，此方面的資訊相對知之甚少。在適當誘發因素存在下，飼料中可發現不同程度可引起疾病的梭菌，因此在控制細菌的措施上，以醛類化合物為處理法不僅可控制梭菌的繁殖體、且具有高度殺滅芽胞的能力，這可為產業提供一個最有效的解決方法。

資料來源

1. Al-Sheikhly, F. & Al-Saieg, A. (1979). Role of coccidia in the occurrence of necrotic enteritis of chickens. *Avian Diseases*, 24 (2): 324-333.
2. Annett, C.B., Viste, J.T.R., Chirino-Trejo, M., Classen, H.L., Middleton, D.M. & Simko, E. (2002). Necrotic enteritis: effect of barley, wheat and corn diets on proliferation of *Clostridium perfringens* type A. *Avian Pathology*, 31: 599-602.
3. Busby, J.C. & Roberts, T. (1997). Economic costs and trade impacts of microbial food borne illness. *World health status quarterly*, 50: 57-66.
4. Branton, S. L., Reece, F.N. & Hagler, W.M. (1987). Influence of a wheat diet on mortality of broiler chickens associated with necrotic enteritis. *Poultry Science*, 66:1326-1330.
5. Carr, D., Shaw, D., Halvorson, D.A., Rings, B., Roepke, D., (1996). Excessive mortality in market-age turkeys associated with cellulitis. *Avian Diseases*, 40: 736-741.
6. Coma, J. (2002). Securing feed from Salmonella. *Feed Tech*, 6.2:16-19.
7. Craven, S. E., Stern, N.J., Bailey, J.S. & Cox, N.A. (2001a) Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during production and processing. *Avian Diseases*, 45:887-896.
8. Craven, S.E., Cox, N.A., Stern, N.J. & Maudlin. J.M. (2001b). Prevalence of *Clostridium perfringens* in commercial broiler hatcheries. *Avian Diseases*, 45:1050-1053.
9. Craven, S.E., Cox, N.A., Bailey, J.S. & Cosby, D.E. (2003). Incidence and tracking of *Clostridium perfringens* through an integrated broiler chicken operation. *Avian Diseases*, 47: 707-711.

10. Dahiya, J. P., Wilkie, D.P., Van Kessel, A.G. & Drew, M.D. (2006). Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. *Animal Feed Science and Technology* 129:60-88.
11. Elwinger, K., Schneitz, C., Berndtson, E., Fossum, O., Teglof, B. & Engstrom, B. (1992). Factors affecting the incidence of necrotic enteritis, caecal carriage of *Clostridium perfringens* and bird performance in broiler chicks. *Acta Veterinaria Scandinavia*, 33: 369-378.
12. Engberg, R.M., Hedemann, M.S., Jensen, B.B. (2002). The influence of grinding and pelleting of feed on the microbial composition and activity in the digestive tract of broiler chickens. *British Poultry Science*, 43: (4) 569-579.
13. Ficken, M.D., Wages, D.P. Necrotic enteritis. In: Diseases of Poultry 10th Edition. 1997. Iowa State Press, Ames, pp 261-264.
14. Greenham, L.W., Harber, C., Lewis, E., Scullion, F.T. (1987). *Clostridium perfringens* in pelleted feed. *Veterinary Record*, 120: 557.
15. Heredia, N. L., Garcia, G.A., Luevanos, R., Labbe, R.G. & Garcia-Alvardo, J.S. (1997). Elevation of the heat resistance of vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* type A by sub-lethal heat shock. *Journal of Food Protection*, 60(8): 998-1000.
16. Hofacre, C.L., Beacorn, T., Collett, S. & Mathis, G. (2003). Using competitive exclusion, mannan-oligosaccharide and other intestinal products to control necrotic enteritis. *Journal of Applied Poultry Research*, 12: 60-64.
17. Hook D., Jalaludin, B & Fitzsimmons, G. (1996). *Clostridium perfringens* food borne outbreak: an epidemiological investigation. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 20: 119-122.
18. Juneja, V. K. & Thippareddi, H. (2004). Inhibitory effects of organic acid salts on growth of *Clostridium perfringens* from spore inocula during chilling of marinated ground turkey breast. *International Journal of Food Microbiology*, 93:155-163.
19. Kaldhusdal, M. & Hofshagen, M. (1992). Barley inclusion and avoparcin supplementation in broiler diets. 2. clinical, pathological, and bacteriological findings in a mild form of necrotic enteritis. *Poultry Science*, 71:1145-1153.

20. Kaldhusdal, M. & Loveland, A. (2000). The economic impact of clostridia perfringens is greater than anticipated. *World Poultry*, 16: 50-51.
21. Kanakaraji, R., Harris, D.L., Songer, J.G. & Bosworth, B (1998). Multiplex PCR assay for the detection of Clostridia perfringens in faeces and intestinal contents of pigs and swine Feed. *Veterinary Microbiology*, 63:29-38.
22. Kumar, M. (2007) Prevention of Turkey Cellulitis (Presentation). National Turkey Federation Winter Meeting, Tucson, Arizona, February 8, 2007.
23. Kaldhusdal, M., Schneitz, C, Hofshagen, M & Skjerve, E. (2001). Reduced incidence of Clostridium perfringens-associated lesions and improved performance in broiler chickens treated with normal intestinal bacteria from adult fowl. *Avian Diseases*, 45: 149-156.
24. Kocher, A. (2003). Nutritional manipulation of necrotic enteritis outbreak in broilers. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*, 14: 111-116.
25. Kwiatek, K., Kukier, E., Wasyl, D., Hoszowski, A. (2008). Microbiological quality of feed in Poland. *Medycyna Weterynaryjna*, 64: (2) 183-188.
26. Lovland, A. & Kaldhusdal, M. (1999). Liver lesions seen at slaughter as an indicator of necrotic enteritis in broiler flocks. *FEMS Microbiology and Medical Microbiology*, 24: 345 - 351.
27. Maciorowski, K.G., Herrera, P., Jones, F.T., Pillai, S.D., Ricke, S.C. (2007) Effects on poultry and livestock of feed contamination with bacteria and fungi. *Animal Feed Science and Technology*, 133: 109–136.
28. McDevitt, R.M., Brooker, J.D., Acamovic, T., Sparks, N.H.C. (2006). Necrotic enteritis; a continuing challenge for the poultry industry. *Worlds Poultry Science Journal*, 62: (2) 221-247.
29. Prio, P., Gasol, R., Soriano, R.C. & Perez-Rigau, A. (2001). Effect of raw material microbial contamination over microbiological profile of ground and pelleted feed. In Brufau J. (ed.). *Feed Manufacturing in the Mediterranean Region. Improving Safety: From Feed to Food*. pp 197-199.
30. Russel, A. D. (1990). Bacterial spores and chemical sporicidal agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 3(2) 99-119.

31. Regan, C.M. , Syed, Q. & Tunstall, P.J. (1995). A hospital outbreak of clostridium perfringens food poisoning: implications for food hygiene review in hospitals. *Journal of Hospital Infection*, 29: 69-73.
32. Riddell, C. & Kong, X. (1992). The influence of diet on necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Diseases*, 36: 499-503.
33. Schiemann, D.A. (1977). Laboratory confirmation of an outbreak of Clostridium perfringens food poisoning. *Health Laboratory Science*, 14: 35-38.
34. Skrivanova, E., Marounek, M., Benda, V., Brezina, P. (2006). Susceptibility of Escherichia coli, Salmonella spp. & Clostridium perfringens to organic acids and monolaurin. *Veterinarni Medicina*, 51: (3) 81-83.
35. Tauxe, R. V. (2002). Emerging food borne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 78:31-41.
36. Truscott, R.B., Al-Sheikhly, F., (1977). Reproduction and treatment of necrotic enteritis in broilers. *American Journal of Veterinary Research*, 38: 857–861.
37. Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Huyghebaert, G., Haesebrouck, F. and Ducatelle, R. (2004). Clostridium perfringens in poultry: An emerging threat for animal and public health. *Avian Pathology*, 33(6):537-549.
38. Wicker, D.L., Isgrigg, W.N., Trammell, J.H. & Davis, R.B. (1977). The control and prevention of necrotic enteritis in broilers with zinc bacitracin. *Poultry Science*, 56: 1229–1231.
39. Xylouri, E., Papadopoulou, C., Antoniadis, G and Stoforo, E. (1997). Rapid identification of Clostridia perfringens in animal feedstuffs. *Anaerobe*, 3:191-193.