

Właściwości i chorobotwórczość toksyny β_2 *Clostridium perfringens*

BERNARD WASIŃSKI

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Wasiński B.

Properties and pathogenicity of β_2 toxin produced by *Clostridium perfringens*

Summary

Described recently and investigated intensively over the last years, β_2 toxin (CPB2) is produced by all toxino-types of *Clostridium perfringens*. The ability of CPB2 production was found in *C. perfringens* strains isolated from humans and many species of domestic animals and wildlife. The *cpb2* gene encoding CPB2 was found in strains isolated from pathological cases and from animals without clinical symptoms. Apart from the detection of *cpb2* presence, the demonstration of the expression of the gene is critical for laboratory diagnosis. CPB2 is postulated to participate in the development of differing in intensity enteric inflammatory changes. Its contribution to other *C. perfringens* toxins through the facilitating of their absorption is also suggested. Current data concerning regulation of *cpb2* expression, CPB2 structure, its properties and presumptive role in pathogenesis of *C. perfringens* infections were reviewed in the present paper. Additionally some case reports concerning the putative role of CPB2 were reviewed.

Keywords: Beta2 toxin, *Clostridium perfringens*

Zróznicowanie obrazu zmian chorobowych wywołanych u ludzi i zwierząt przez beztlenowe laseczki z gatunku *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) związane jest aktywnością wytwarzanych przez nie toksyn (5, 27, 33, 34). Zdolność poszczególnych szczepów do syntezy czterech tzw. toksyn głównych, oznaczonych jako α , β , ϵ , ι stała się podstawą podziału tych drobnoustrojów na pięć typów toksynogennych A, B, C, D, E. Oprócz wymienionych czterech antygenów szczepy gatunku *C. perfringens* mogą wytwarzać m.in. enterotoksynę (CPE) oraz szereg toksyn ubocznych i enzymów (27). Odkryta przed kilku laty toksyna β_2 (CPB2) (17) wytwarzana jest przez szczepy *C. perfringens* izolowane głównie z przypadków zakażeń przewodu pokarmowego zwierząt.

Celem opracowania jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat właściwości toksyny β_2 oraz jej udziału w patogenezie zakażeń wywołanych przez *C. perfringens*.

Budowa i wytwarzanie CPB2

Toksynę β_2 uzyskano pierwotnie ze szczepu *C. perfringens* typu C (oznaczonego jako CWC245), izolowanego od prosięcia padłego z objawami zakaźnego martwicowego zapalenia jelit (21). Pierwsze dane na temat kodującego ją genu *cpb2* oraz obszerniejsze wyniki badań cech CPB2 opublikowano w 1997 r. (17). Badania prowadzone w kolejnych latach wykazały występowanie *cpb2* u szczepów reprezentujących wszystkie typy toksynogenne *C. perfringens* (8, 32). O ile pierwsze izolaty

C. perfringens wykazujące obecność *cpb2* pochodziły od świń, wkrótce wyosobniono szczepy z wymienionym genem również od innych gatunków zwierząt, m.in. od koni (15, 20), dużych i małych przeżuwaczy (15, 18, 25), drobiu (12), psów i kotów (35), zamieszkujących różne strefy klimatyczne gatunków ssaków wolno żyjących (3, 4, 7), ryb (2), a także od ludzi (13, 14, 22).

Badania ostatnich lat wykazały występowanie dwóch alleli *cpb2* kodujących omawianą toksynę. Ulokowane są one na plazmidach o wielkości 50-100 kpz. Opisany wcześniej (17) allel, określany ostatnio w piśmiennictwie jako consensus *cpb2*, koduje białko o masie 31 kDa, które po translacji modyfikowane jest do formy aktywnej toksyny o długości 235 aminokwasów i masie ocenianej na 27,6 kDa (14, 17, 30).

Opisany ostatnio (14, 22), drugi ze wspomnianych alleli, określany jest jako nietypowy (atypical) *cpb2*. Jego sekwencja wykazuje 70,2-70,7% identyczności z sekwencją consensus *cpb2* (22). Klonowanie nietypowego *cpb2* wykazało (22), że koduje on białko o długości 268 aminokwasów, które w wyniku modyfikacji potranslacyjnej uzyskuje aktywną postać o wielkości 235 aminokwasów. Sekwencja aminokwasowa nietypowej CPB2 wykazuje 62,3% identyczności i 80,4% podobieństwa z sekwencją toksyny kodowanej przez consensus *cpb2*.

Wstępne badania (22) przeprowadzone na należących do wszystkich 5 typów toksynogennych *C. perfringens* 154 szczepach izolowanych od ludzi i różnych gatunków zwierząt wykazały występowanie nietypowego *cpb2* u 60-

-90% badanych izolatów pozyskanych od ludzi, ptaków, koni i przeżuwaczy. Wśród 76 szczepów (typów A i C) pochodzących od świń wspomniany allel wykryto tylko w 2 izolatach (oba typu A).

Fisher i wsp. (14) w oparciu o wyniki analizy sekwencji nukleotydowej *cpb2* szczepów *C. perfringens* izolowanych z przypadków zakażeń jelitowych ludzi (nie pochodzących z żywności) wyróżnili dwa warianty CPB2, które oznaczyli jako CPB2h1 i CPB2h2. Wariant CPB2h1 odpowiadał nietypowej CPB2, a wariant CPB2h2 stanowił odpowiednik consensus CPB2. Wymienieni autorzy prowadzili badania na szczepach noszących jednocześnie gen *cpb2* oraz zlokalizowany na plazmidach lub chromosomie gen *cpe* kodujący enterotoksynę. Ustalili oni, że CPB2h1 może być wytwarzana przez szczepy, u których na plazmidzie po *cpe* występuje sekwencja insercyjna IS1151. Z kolei CPB2h2 wytwarzają szczepy, u których po zlokalizowanym na plazmidzie *cpe* występuje sekwencja IS1470-podobna. Autorzy omawianej pracy stwierdzili również, że tam gdzie *cpe* ograniczony jest przez IS1151 geny *cpb2* i *cpe* ułożone są na tym samym plazmidzie, zaś gdy *cpe* ograniczony jest przez sekwencję IS1470-podobną, geny te zlokalizowane są na różnych plazmidach. Należy również zaznaczyć, że u noszących *cpe* na chromosomie szczepów *C. perfringens* izolowanych z żywności stwierdzono w trakcie wspomnianych badań występowanie tylko CPB2h1.

Fisher zwraca uwagę (13) na nieznaczne różnice między nietypowym *cpb2* ze szczepów izolowanych od zwierząt i *cpb2h1* ze szczepów izolowanych od ludzi, jak też, odpowiednio, między *consensus cpb2* szczepów odzwierzęcych i *cpb2h2* szczepów ludzkich. Przykładowo sekwencja nietypowego *cpb2* z izolowanego od zwierząt szczepu JGS 1902 i sekwencja *cpb2h1* wykrytego w szczepie F 5603 izolowanym od człowieka wykazują 97% podobieństwa. Sekwencje aminokwasowe kodowanych przez wymienione geny białek wykazują 96% podobieństwa. W przypadku *consensus cpb2* z izolowanego od świń szczepu CWC245 oraz *cpb2h2* występującego w izolowanym od ludzi szczepie F4859 podobieństwo wynosi 90% dla sekwencji nukleotydowych oraz 92% dla sekwencji aminokwasowych.

Gen *cpb2* podlega systemowi pozytywnej regulacji przez dwuskładnikowy układ regulatorowy *virR/virS* (26). Proces ten odbywa się na drodze pośredniej, z udziałem regulującego RNA, określanego w skrócie jako VR-RNA (od *VirR regulated RNA*) (31). Mechanizm działania VR-RNA w tym procesie nie został dotychczas całkowicie wyjaśniony. Ekspresja *cpb2* w hodowli osiąga najwyższy poziom w końcowej części logarytmicznej fazy wzrostu (26). Zwraca się uwagę (13), że *cpb2* jest pierwszym znany spośród występujących na plazmidach genów *C. perfringens*, który podlega dwuskładnikowemu układowi regulatorowemu, kodowanemu przez geny ułożone na chromosomie.

W ostatnich latach przedstawiono dodatkowe dwa prawdopodobne mechanizmy kontroli *cpb2* zaobserwowane głównie u szczepów *C. perfringens* izolowanych z przypadków zakażeń jelitowych koni (37, 39). W obu przypadkach badania prowadzono na szczepach, u których mimo stwierdzenia występowania *cpb2* nie wykryto *in vitro* ekspresji tego genu.

Pierwszy z mechanizmów rozpoznano (37) w oparciu o wyniki sekwencjonowania *cpb2* szczepów, u których stwierdzono brak pojedynczego nukleotydu A w występującym bezpośrednio za kodonem inicjacyjnym poliadenylowanym fragmencie o sekwencji AAAAAAT-TATTT. Skutkiem tej delecji była mutacja fazy odczytu polegająca na przedwczesnej translacji kodonu terminacyjnego. Powstała w wyniku przerwanej translacji proteina składała się z 9 aminokwasów (prawidłowa CPB2 po translacji złożona jest z 265 aminokwasów) i nie wykazywała aktywności toksycznej. Odblokowanie tego mechanizmu następowało m.in. pod wpływem gentamycyny i streptomycyny. Wymienione antybiotyki aminoglikozydowe wiążą się z podjednostkami 30S (streptomycyna) i 50S (gentamycyna) rybosomu, co powoduje, między innymi, niedokładne odczytywanie przez rybosom informacji zawartej w mRNA. Dochodzi do pominięcia wymienionej delecji i w wyniku dalszego przebiegu translacji wytworzona zostaje prawidłowa CPB2. Podobny efekt może wywoływać szok termiczny (oddziaływanie temperaturą 50°C przez 10 min.). Autorzy omawianych badań nie stwierdzili występowania tej delecji (a więc i opisanego typu kontroli) tylko u szczepów *C. perfringens* izolowanych od świń. Wykazano ją natomiast u różnego odsetka izolatów pozyskanych od koni, przeżuwaczy, psów i kotów.

Drugi z mechanizmów obserwowano (39) u izolowanych z przypadków zaburzeń jelitowych koni 23 szczepów wykazujących prawidłową sekwencję *cpb2*. Metodą western blotting nie stwierdzono u nich ekspresji omawianego genu. Wykazano, że w porównaniu do produkujących wykrywalne ilości CPB2 izolatów od świń (jak CWC245) omawiane szczepy prezentowały znacznie niższy poziom *cpb2* mRNA (do 35 razy). Autorzy wskazują na niski poziom mRNA jako prawdopodobną przyczynę braku wykrywalności CPB2 u tej grupy szczepów. Wykazali oni istotne podwyższenie poziomu mRNA oraz wytwarzanie CPB2 na wykrywalnym poziomie u wybranych szczepów tej grupy po wprowadzeniu do ich komórek przy użyciu wektora większej liczby kopii *cpb2*.

Fisher (13) zwraca uwagę, że grupy szczepów analizowane w dwu przytoczonych powyżej pracach pochodziły z niezbyt odległych od siebie regionów Europy. Zauważa również, że ze względu na zróżnicowanie w zakresie wielkości plazmidów noszących *cpb2*, *locus* tego genu, różnice sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej oraz warianty regulacji ekspresji CPB2 wyróżnia się na tle innych toksyn *C. perfringens*.

Właściwości CPB2

Ze względu na stosunkowo niedawne odkrycie nietypowego wariantu tej toksyny większość danych dotyczących właściwości i działania CPB2 pochodzi z badań prowadzonych z *consensus CPB2*. W badaniach Gibert i wsp. (17) nie stwierdzono istotnego podobieństwa sekwencji aminokwasowej CPB2 do innych znanych toksyn. Mimo nazwy sugerującej podobieństwo, CPB2 (toksyna β 2) różni się od poznanej wcześniej, wytwarzanej przez szczepy *C. perfringens* typów B i C, toksyny β (CPB) oznaczanej ostatnio również jako β 1. Sekwencja aminokwasowa CPB2 wykazuje ok. 15% homologii z CPB. Badania z zastosowaniem metody western blotting wykazały nieznacz-

ne powinowactwo immunologiczne obu toksyn (17). Przeciwciała swoiste dla CPB2 rozpoznawały oczyszczoną CPB2 i wykazywały znacznie słabszą reakcję z CPB. Z kolei przeciwciała swoiste dla CPB nie reagowały z CPB2.

Właściwości biologiczne CPB2 wykazują podobieństwa do CPB. Obie toksyny są letalne dla myszy. Minimalna dawka letalna CPB2 przy podaniu dożylnym wynosi 3 µg. W doświadczeniach prowadzonych na świnkach morskich stwierdzono, że CPB2 powoduje w ich jelitach zmiany krwotoczne i martwicowe (17). Manteca i wsp. (25) obserwowali rozwój podobnych zmian u cielęcia po dojelitowej aplikacji hodowli wytwarzających CPB2 szczepów *C. perfringens* typu A. Nie stwierdzili oni jednak gromadzenia w pętłach jelitowych płynu, jak miało to miejsce w przypadku enterotoksyny (CPE).

Działanie cytotoksyczne CPB2 wykazywano m.in. na komórkach linii I407 izolowanych z jelita płodu człowieka, linii komórek nowotworowych okrężnicy człowieka CaCo-2 i linii komórek CHO izolowanych z jajnika chomika. W badaniach Gibert i wsp. (17) ustalono, że minimalna koncentracja CPB2 mogąca indukować efekt cytotoksyczny wynosi 20 µg/ml. Znaczną różnicę między tą wartością a uzyskanym we wcześniejszych badaniach (21) wynikiem 0,2 µg/ml tłumaczą autorzy niestabilnością CPB2, a także zauważonym przez nich obniżaniem swoistej aktywności toksyny w trakcie jej oczyszczania. Nowsze badania, prowadzone na komórkach linii CaCo-2 i dotyczące wariantów CPB2 wykazały (14), że koncentracja toksyny w podłożu hodowlanym przy dawce powodującej śmierć 50% komórek (TCD₅₀) dla CPB2h1 wynosi 0,3 µg/ml, a w przypadku CPB2h2 osiąga 4 µg/ml. Wskazuje to na około 10-krotnie wyższą toksyczność CPB2h1.

Wynikiem działania CPB2 w hodowlach komórkowych jest zmiana kształtu komórek na zaokrąglony i oddzielenie się ich od jednolitej, warstwowej struktury hodowli. Nie stwierdzono (podobnie jak w przypadku CPB), by omawiana toksyna wywierała istotne oddziaływanie na szkielet aktywny komórek. Nie wykazano, aby CPB2 powodowała modyfikację białka G czy aktywny na drodze ADP-rybozylacji lub UDP-glikozylacji (17, 21).

Trypsyna powoduje rozcięcie CPB2 na dwa peptydy o masie 13 i 15 kDa i w konsekwencji całkowitą utratę toksyczności (17). W badaniach nad CPB2h1 stwierdzono, że jest ona termolabilna (całkowita utrata aktywności w temperaturze 52°C po 20 min.) oraz wykazuje wrażliwość na utlenianie (13). Wspomniane cechy, jak i trudności z uzyskaniem oczyszczonej, aktywnej CPB2 wydają się wskazywać na znaczną jej labilność. Przemawiają za tym również ograniczenia spotykane przy próbach bezpośredniego wykrywania CPB2 w materiale patologicznym, jak i kłopoty związane z wykorzystaniem oczyszczonej toksyny do doświadczeń mających wyjaśnić mechanizm jej patologicznego oddziaływania.

Dostępne dane wydają się wskazywać, że CPB2 należy do grupy toksyn tworzących pory w ścianach wrażliwych komórek, co przez zaburzenia równowagi koloidalno-osmotycznej prowadzi do ich zamierania. Dla utworzenia por w ścianie komórkowej konieczna jest większa liczba cząstek toksyny, które ulegają polimeryzacji w wybranym miejscu (lub wielu miejscach) na powierzchni zaatakowanej komórki. Wyniki badań (13, 32) wska-

zują, że pory tworzone przez CPB2 w ścianach komórek linii CaCo-2 mają prawdopodobnie większe rozmiary (co może wymagać większej liczby spolimeryzowanych cząstek toksyny) niż te tworzone przez CPE, toksynę β, czy toksynę ε. Z kolei perfringolizyna (PFO) tworzy prawdopodobnie większe pory niż CPB2. Wyniki te wydają się przynajmniej częściowo tłumaczyć stosunkowo wysokie wartości LD₅₀ wykazywane przez CPB2 w porównaniu z innymi toksynami. Jeszcze jednym czynnikiem warunkującym te różnice może być mniejsze niż u innych toksyn powinowactwo CPB2 do receptorów.

Niestabilność toksyny CPB2 może warunkować jej aktywność w zależności od sposobu dostarczenia do miejsca działania. Immunohistochemiczne badania preparatów z wycinków chorobowo zmienionych jelit zwierząt padłych w wyniku zakażeń wywołanych przez niosące cpb2 szczepy *C. perfringens* oraz wyniki immunohistochemicznych badań lizatów bakteryjnych *C. perfringens* wskazują na występowanie CPB2 bezpośrednio na powierzchni komórek bakteryjnych (6, 7, 37). Jest to zjawisko raczej nietypowe wśród toksyn wytwarzanych przez bakterie Gram-dodatnie. Ten sposób lokalizacji toksyny wskazywałby na bezpośrednie jej przekazywanie z powierzchni komórki bakteryjnej do komórki docelowej. Argumentem mogącym dodatkowo przemawiać na rzecz przytoczonego poglądu są wyniki badań Jost i wsp. (23), które wskazują, że u niemal 70% izolatów z puli 153 niosących cpb2 szczepów *C. perfringens*, izolowanych od różnych gatunków zwierząt, występował gen *cna* kodujący wiążącą się z kolagenem domniemaną adhezynę CpCna. Wśród 75 szczepów wymienionej puli pozyskanych od świń obecność *cna* stwierdzono u 74 (98,7%) izolatów. Należy nadmienić, że wszystkie te szczepy niosły *consensus* cpb2. Autorzy zwracają uwagę na wysoką korelację między występowaniem *cna* i *consensus* cpb2 w całej puli badanych szczepów (cpb2 i *cna* zlokalizowane są zwykle na jednym plazmidzie).

Ekspresja *cna* podlega negatywnej regulacji przez dwuskładnikowy układ *virR/virS* (odwrotnie niż ekspresja cpb2) (26). Może to sugerować, że CpCna wytwarzana jest np. w początkowej fazie zakażenia w celu ułatwienia adhezji komórek bakteryjnych, podczas gdy ekspresja cpb2, powodująca zniszczenie wrażliwych tkanek, ma miejsce w późniejszej fazie (23). Badacze zwracają uwagę na rzadsze występowanie *consensus* cpb2 i *cna* u szczepów izolowanych od innych niż świny gatunków zwierząt. Mogłoby to wskazywać, że CpCna odgrywa rolę głównie w zakażeniach świń. Należy też pamiętać, że kolagen nie jest zwykle dostępny w prawidłowym nabłonku jelitowym, co skłania do przypuszczeń, że efektywne działanie CpCna może mieć miejsce dopiero po zniszczeniu wierzchnich warstw prawidłowej struktury ścianki jelitowej np. przez toksyny *C. perfringens* czy innych drobnoustrojów, nieprawidłowe pH treści jelitowej i inne czynniki.

Do jednoznacznego wyjaśnienia mechanizmu patogenego działania CPB2 konieczne są badania *in vivo*. Nieliczne dotychczas próby wykonywane m.in. na cielętach, świnkach morskich, królikach, myszach z powodu rozmaitych ograniczeń często nie dawały rozstrzygnięcia rozpatrywanych zagadnień. Wiele z tych doświadczeń prowadzonych było z wykorzystaniem oczyszczonej tok-

syny, co przy jej niestabilności mogło istotnie wpływać na uzyskiwane wyniki. Dodatkowym problemem okazało się m.in. uzyskanie mutantów bakteryjnych z inaktywowanym *cpb2* (13).

Wyniki uzyskane z przeprowadzonych dotychczas badań pozostawiają otwartym pytanie o rolę CPB2 w patogenezie zakażeń wywoływanych przez *C. perfringens*. Wskazuje się na ewentualne jej znaczenie jako toksyny dodatkowej, która przez swoje oddziaływanie na ściany komórek nabłonka jelit umożliwiałyby lub zwiększała absorpcję innych toksyn *C. perfringens* do krwiobiegu. Jej obecność wydaje się powodować zaostrenie procesu chorobowego. Nie wyklucza się również (13), że CPB2 może samodzielnie wywoływać zaburzenia jelitowe. Opisywane przypadki zakażeń jelitowych różnych gatunków zwierząt wiązane z izolacją niosących *cpb2* szczepów *C. perfringens* miewają zróżnicowany obraz.

Występowanie CPB2 w przypadkach chorobowych

Najczęściej opisywane przypadki izolacji niosących *cpb2* szczepów *C. perfringens* (typu C i A) dotyczą zapaleń jelit prosiąt i warchlaków. Za jeden z istotnych czynników predysponujących rozwój omawianych zakażeń uznaje się obniżenie aktywności trypsyny. Należy zaznaczyć, że szczepy *cpb2*-pozytywne (typów A i C) spotyka się nierzadko u świń nie wykazujących objawów chorobowych. O potencjalnym zagrożeniu decyduje nie tyle stwierdzenie obecności genu *cpb2*, co raczej wykazanie jego ekspresji (wytwarzania CPB2). Podobnie bywa u innych gatunków zwierząt. Mimo że dostępne informacje nie zawsze zawierają potwierdzenie ekspresji *cpb2* u pozyskanych izolatów, wyniki niektórych badań (8) wskazują, że ponad 90% izolowanych z przypadków zapaleń jelit świń szczepów *C. perfringens* niosących *cpb2* wykazuje ekspresję tego genu. Fakty te wydają się wskazywać, że CPB2 może odgrywać rolę przede wszystkim w patologii świń. Występujące w opisywanych przypadkach szczególnie ostrzejsze (krwotoczne i martwicowe) zmiany zapalne śluzówki jelit przypisywano przede wszystkim szczepom typu C i wytwarzanej przez nie CPB. Znajdowało to potwierdzenie w izolacji szczepów tego typu, jak i np. w niższej toksyczności CPB2 w porównaniu z CPB (za 29). Z drugiej strony, coraz częstsze są ostatnio doniesienia o izolacji z przypadków zapaleń jelit świń szczepów niosących *cpb2* i należących wyłącznie do typu A (nie wytwarzającego CPB) (1, 8, 24, 28, 34, 38). Obserwowane w tych przypadkach patologiczne zmiany zapalne, zlokalizowane głównie w odcinku jelita czczego i biodrowego, miewają charakter od śluzowego do krwotoczno-martwicowego. Nie ustalono dotychczas, w jakim stopniu zmiany te mogą być wynikiem działania CPB2.

U koni wskazuje się na udział niosących *cpb2* szczepów *C. perfringens* (oprócz *C. difficile*) w patogenezie zapalenia kątnicy (15, 20). Pogląd ten oparto m.in. na częstym występowaniu zakażeń szczepami *C. perfringens* wykazującymi *cpb2* u koni z wymienioną chorobą. W niektórych przypadkach (6) mimo stwierdzenia metodami histochemicznymi obecności CPB2 w preparatach z wycinków jelit nie udało się wyizolować z tego materiału *cpb2*-pozytywnych szczepów *C. perfringens*. Zauważono również, że czynnikami predestynującymi do rozwoju zakażeń wymienionymi szczepami może być podawanie

koniom środków przeciwzapalnych i wymienionych już niektórych antybiotyków.

Obserwacje przypadków zapalenia jelita cienkiego i okrężnicy u źrebiąt (11, 36) nie wykazały jednoznacznie roli niosących *cpb2* szczepów *C. perfringens* w patogenezie tej choroby. Ze względu na nieliczne przypadki tych zachorowań niektórzy badacze (36) skłaniali się raczej do uznania tych szczepów za składnik normalnej flory bakteryjnej nowo narodzonych źrebiąt. Być może, w świetle przytoczonych wyżej nowszych badań (39), pewną rolę mógł tam odgrywać niski poziom ekspresji *cpb2* obserwowany u szczepów izolowanych od koni.

Choi i wsp. (9) opisali też przypadek izolacji wykazującego *cpb2* szczepu *C. perfringens* z martwiczych zmian mięśni konia. Jednak przy założeniu wysokiej toksyczności wykazywanej przez toksynę α dla tkanki trudno jednoznacznie przypisać rolę CPB2 w tym procesie.

U przeżuwaczy szczepy *C. perfringens* wykazujące *cpb2* izolowano głównie z przypadków zaburzeń jelitowych młodych zwierząt. Manteca i wsp. (25) sugerują synergistyczne działanie toksyny α i CPB2 w rozwoju zmian krwotocznych i martwicowych śluzówki jelit w przebiegu enterotoksemii cieląt. Szczepy wykazujące *cpb2* wykrywano również w nielicznych (6%) przypadkach dyzenterii jagniąt (18). Dray (10) opisał przypadek pośmiertnej izolacji wykazującego *cpb2* szczepu *C. perfringens* typu A od 5-tygodniowego koźlęcia ze zmianami patologicznymi wskazującymi na enterotoksemię kóz.

Pojawiły się również doniesienia o wykryciu *cpb2*-pozytywnych szczepów *C. perfringens* z przypadków biegunek psów i kotów (35). Autorzy wyrażają sugestię, że szczepy niosące *cpb2* i *cpe* lub nawet tylko *cpb2* biorą udział w wywoływaniu biegunek tych gatunków zwierząt.

U drobiu dotychczasowe badania nie wykazały istotnej roli niosących *cpb2* szczepów *C. perfringens* (typu A) jako czynnika etiologicznego (12, 16). Odsetek izolacji tych szczepów sięga od kilku do kilkunastu procent. Nie stwierdzono jednak korelacji między występowaniem wspomnianego podtypu *C. perfringens* a pojawianiem się przypadków martwicowego zapalenia jelit. Dotychczasowe wyniki wymagają jednak potwierdzenia na liczniejszym materiale.

U zwierząt nieudomowionych szerzej opisano m.in. przypadek izolacji *cpb2*-pozytywnych szczepów *C. perfringens* typu A z martwicowo-wrrodziejących zmian zapalnych jelit cienkich słonia afrykańskiego (7). Metodami histochemicznymi wykazano obecność CPB2 w preparatach ze zmienionych chorobowo jelit. Badania bakteriologiczne nie wykazały innych, mogących być potencjalną przyczyną opisywanych zmian, patogenów bakteryjnych. Niosące *cpb2* szczepy *C. perfringens* typu A izolowano również z dwóch przypadków krwotoczno-martwicowego zapalenia jelit niedźwiedzi himalajskich (19). Szczepy te izolowano nie tylko z jelit cienkich i grubych, lecz również z wątroby, płuc i serca.

U ludzi zwrócono uwagę na częste występowanie *cpb2*-pozytywnych szczepów *C. perfringens* typu A w przypadkach biegunek poantybiotykowych i sporadycznych biegunek nie związanych z zakażeniami pochodzącymi z żywności (13, 14). Zauważono, że mają one z reguły bardziej nasilony i długotrwały przebieg niż wywoływane przez *C. perfringens* zatrucia pokarmowe. Z przypad-

ków zatruc pokarmowych izolowane są przede wszystkim szczepy wytwarzające enterotoksynę. Wykazano, że około 15% izolatów tej grupy przenosi również *cpb2*. Natomiast wśród izolatów pozyskanych z przypadków biegunek poantybiotykowych i sporadycznych biegunek nie związanych z żywnością u ponad 75% szczepów stwierdzono obecność *cpb2* (a często również *cpe*). Izolowane od ludzi szczepy *cpb2*-pozytywne wykazują zwykle ekspresję tego genu (14). Zdolność wytwarzania enterotoksyny przede wszystkim podczas sporulacji, zaś CPB2 w fazie wegetatywnej wydaje się częściowo tłumaczyć występowanie bardziej nasilonych i długotrwałych objawów w przypadkach biegunek sporadycznych i poantybiotykowych niż w przypadku wywołanych przez *C. perfringens* zatruc pokarmowych. Rolę CPB2 wydaje się dodatkowo potwierdzać opisane wyżej jej oddziaływanie na ludzkie komórki linii CaCo-2.

Różnorodność wariantów, domniemany mechanizm działania, jak i prawdopodobne uczestnictwo w indukcji zróżnicowanych procesów patologicznych u człowieka i wielu gatunków zwierząt wydają się wskazywać na szczególną pozycję CPB2 wśród toksyn wytwarzanych przez *C. perfringens*. Wiele aspektów dotyczących choćby kilku przedstawionych zagadnień wymaga jeszcze intensywnych badań. Tym niemniej wydaje się, że nawet obecny stan wiedzy wskazuje na celowość włączenia antygenów omawianej toksyny w skład wybranych biopreparatów stosowanych w profilaktyce zakażeń wywołanych przez *C. perfringens*.

Piśmiennictwo

- Ahola H. S., Fossi M., Raunio-Saarnisto M., Korhonen T., Pajala A.: Clostridium perfringens type A with Beta 2 toxin gene in porcine diarrhea. A case report. Proc. 19th IPVS Congress, Copenhagen 2006, 2, 324.
- Ashfalk A., Müller W.: Clostridium perfringens toxin types from wild-caught Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) determined by PCR and ELISA. Can. J. Microbiol. 2002, 48, 365-368.
- Ashfalk A., Müller W.: Clostridium perfringens toxin types in hooded seals in the Greenland Sea, determined by PCR and ELISA. J. Vet. Med. B 2001, 48, 765-769.
- Ashfalk A., Valentin-Weigand P., Müller W., Goethe R.: Toxin types of Clostridium perfringens isolated from free-ranging, semi-domesticated reindeer in Norway. Vet. Rec. 2002, 151, 210-213.
- Augustynowicz E.: Molekularne podstawy patologicznego działania Clostridium perfringens. Post. Mikrobiol. 1999, 38, 257-275.
- Bacciarini L. N., Boerlin P., Straub R., Frey J., Grone A.: Immunohistochemical localization of Clostridium perfringens β 2-toxin in the gastrointestinal tract of horses. Vet. Pathol. 2003, 40, 376-381.
- Bacciarini L. N., Pagan O., Frey J., Grone A.: Clostridium perfringens β 2 toxin in an African elephant (*Loxodonta africana*). Vet. Rec. 2001, 149, 618-620.
- Bueschel D. M., Jost B. H., Billington S. J., Trinh H. T., Songer J. G.: Prevalence of *cpb2*, encoding β 2 toxin, in Clostridium perfringens field isolates: correlation of genotype with phenotype. Vet. Microbiol. 2003, 94, 121-129.
- Choi Y. K., Kang M. S., Yoo H. S., Lee D. Y., Lee H. C., Kim D. Y.: Clostridium perfringens type A myonecrosis in horse in Korea. J. Vet. Med. Sci. 2003, 65, 1245-1247.
- Dray T.: Clostridium perfringens type A and beta2 toxin associated with enterotoxemia in a 5-week old goat. Can. Vet. J. 2004, 45, 251-253.
- East L. M., Savage C. J., Traub-Dargatz J. L., Dickinson C. E., Ellis R. P.: Enterocolitis with Clostridium perfringens infection in neonatal foals: 54 cases (1988-1997). J. Am. Vet. Assoc. 1998, 212, 1751-1756.
- Engström B. E., Fermer C., Lindberg A., Saarinen E., Baverud V., Gunnarsson A.: Molecular typing of isolates of Clostridium perfringens from healthy and diseased poultry. Vet. Microbiol. 2003, 94, 225-235.
- Fisher D. J.: Clostridium perfringens beta 2 toxin: a potential accessory toxin in gastrointestinal disease in humans and domestic animals. Praca dokt., University of Pittsburgh 2006.
- Fisher D. J., Miyamoto K., Harrison B., Akimoto S., Sarker M. R., McClane B. A.: Association of beta2 toxin production with Clostridium perfringens type A gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. Mol. Microbiol. 2005, 56, 747-762.
- Garmory H. S., Chanter N., French N. P., Bueschel D., Songer J. D., Tiball R. W.: Occurrence of Clostridium perfringens β 2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. Epidemiol. Infect. 2000, 124, 61-67.
- Gholamiandekordi A. R., Ducatelle R., Heyndrickx M., Haesebrouck F., Van Immerseel F.: Molecular and phenotypical characterization of Clostridium perfringens isolates from poultry flocks with different diseases status. Vet. Microbiol. 2006, 113, 143-152.
- Gibert M., Jolivet-Reynaud C., Popoff M. R.: β 2 toxin, a novel toxin produced by Clostridium perfringens. Gene 1997, 203, 65-73.
- Gkiourtzidis K., Frey J., Bourtzzi-Hatzopoulou E., Iliadis N., Sarris K.: PCR detection and prevalence of α -, β -, β 2-, ϵ -, ν -, and enterotoxin-genes in Clostridium perfringens isolated from lambs with clostridial dysentery. Vet. Microbiol. 2001, 82, 39-43.
- Greco G., Madio A., Martella V., Campolo M., Corrente M., Buonavoglia D., Buonavoglia C.: Enterotoxemia associated with beta2 toxin-producing Clostridium perfringens type A in two Asiatic black bears (*Selenarctos thibetanus*). J. Vet. Diagn. Invest. 2005, 17, 186-189.
- Herholz C., Miserez R., Nicolet J., Frey J., Popoff M., Gibert M., Straub R.: Prevalence of β 2-toxicogenic Clostridium perfringens in horses with intestinal disorders. J. Clin. Microbiol. 1999, 37, 358-361.
- Jolivet-Renaud C., Popoff M. R., Vinit M. A., Ravisse P., Moreau H., Alouf J. E.: Enteropathogenicity of Clostridium perfringens beta toxin and other clostridial toxins. Zbl. Bakteriol. S, 1986, 15, 145-151.
- Jost B. H., Billington S. J., Trinh H. T., Bueschel D. M., Songer J. G.: Atypical *cpb2* genes, encoding beta 2 toxin in Clostridium perfringens isolates of non-porcine origin. Infect. Immun. 2005, 73, 652-656.
- Jost B. H., Billington S. J., Trinh H. T., Songer J. G.: Association of genes encoding beta2 toxin and a collagen binding protein in Clostridium perfringens isolates of porcine origin. Vet. Microbiol. 2006, 115, 173-182.
- Klassen H. L. B. M., Molkenboer M. J. C. H., Bakker J., Miserez R., Häni H., Frey J., Popoff M. R., van den Bosh J. F.: Detection of the β 2 toxin gene of Clostridium perfringens in diarrhoeic piglets in The Netherlands and Switzerland. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1999, 24, 325-332.
- Manteca C., Daube G., Jeuniaux T., Linden A., Pirson V., Detilleux J., Ginter A., Coppe P., Kaeckenbeeck A., Maimil J. G.: A role for the Clostridium perfringens β 2 toxin in bovine enterotoxaemia? Vet. Microbiol. 2002, 86, 191-202.
- Ohtani K., Kawasari H. I., Okumura K., Hayashi H., Shimizu T.: The VirR/VirS regulatory cascade affects transcription of plasmid-encoded putative virulence genes in Clostridium perfringens strain 13. FEMS Microbiol. Lett. 2003, 222, 137-141.
- Petit L., Gibert M., Popoff M. R.: Clostridium perfringens: toxinotype and genotype. Trends Microbiol. 1999, 7, s. 104-110.
- Schmidt A. S., Angen Q., Jorsal S. E., Møller C.: Prevalence of Beta 2 producing Clostridium perfringens and Clostridium difficile among danish piglets – a case study. Proc. 18th IPVS Congress, Hamburg 2004, t. 1, s. 330.
- Schotte U., Truyen U., Neubauer H.: Significance of β 2-toxicogenic Clostridium perfringens infections in animals and their predisposing factors. J. Vet. Med. B 2004, 51, 423-426.
- Shimizu T., Ohshima T., Ohtani K., Shimizu T., Hayashi H.: Genomic map of Clostridium perfringens strain 13. Microbiol. Immunol. 2001, 45, 179-189.
- Shimizu T., Yaguchi H., Ohtani K., Banu S., Hayashi H.: Clostridial VirR/VirS regulon involves a regulatory RNA molecule for expression of toxins. Mol. Microbiol. 2002, 43, 257-265.
- Smedley J. G., Fisher D. J., Sayeed S., Chakrabarti G., McClane B. A.: The enteric toxins of Clostridium perfringens. Rev. of Physiol. Biochem. Pharmacol. 2004, 152, 183-204.
- Songer J. G.: Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin. Microbiol. Rev. 1996, 9, 216-234.
- Songer J. G., Taylor D. W.: Clostridial infections, [w:] Straw B., Zimmerman J., D'Allaire S., Taylor D. J. (wyd.): Diseases of Swine, wyd. 9. Blackwell Publishing, Ames, Iowa USA 2006, 613-627.
- Thiede S., Goethe R., Amtsberg G.: Prevalence of β 2 toxin gene of Clostridium perfringens type A from diarrhoeic dogs. Vet. Rec. 2001, 149, 273-274.
- Tillotson K., Traub-Dargatz J. L., Dickinson C. E., Ellis R. P., Morley P. S., Hyatt D. R., Magnuson R. J., Riddle W. T., Bolte D., Salman M. D.: Population-based study of fecal shedding of Clostridium perfringens in broodmares and foals. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2002, 220, 342-348.
- Vilei E. M., Schlatter I., Perreten V., Straub R., Popoff M. R., Gibert M., Gröne A., Frey J.: Antibiotic-induced expression of cryptic *cpb2* gene in equine β 2-toxicogenic Clostridium perfringens. Mol. Microbiol. 2005, 57, 1570-1581.
- Wasiński B., Pejsak Z.: Cechy fenotypowe i genotypowe szczepów Clostridium perfringens izolowanych od ssących prosiąt. Medycyna Wet. 2008, w druku.
- Waters M., Raju D., Garmory H. S., Popoff M. R., Sarker M. R.: Regulated expression of the Beta 2-toxin gene (*cpb2*) in Clostridium perfringens type A isolates from horses with gastrointestinal diseases. J. Clin. Microbiol. 2005, 43, 4002-4009.