

Clostridium perfringens – znaczenie epidemiologiczne i diagnostyka zachorowań

NINA KOZIEŁ, ELŻBIETA KUKIER, KRZYSZTOF KWIATEK, MAGDALENA GOLDSZTEJN

Zakład Higieny Pasz, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 14.05.2018

Zaakceptowano 25.07.2018

Kozieł N., Kukier E., Kwiatek K., Goldsztejn M.

Clostridium perfringens – epidemiological importance and diagnostics

Summary

Clostridium perfringens is one of the most widespread anaerobic spore forming bacteria found in the environment. The toxotype A of the species inhabits the gastrointestinal tract of birds and mammals exhibiting pathogenic properties in the immunocompromised host. The virulence determinants of *C. perfringens* are toxins and extracellular enzymes which cause gas gangrene, enteritis necroticans, food poisoning, and non-food borne gastrointestinal infections in humans. The young animals suffer from enterotoxaemia, dysentery and necrotic enteritis due to the anaerobic spore forming bacilli. This article reviews the epidemiological significance of *C. perfringens* and its disease diagnostics, taking into account all known to date virulence determinants of the microorganism.

Keywords: *C. perfringens*, toxoinfection, epidemiological importance, diagnostics

Clostridium (C.) perfringens występuje powszechnie w glebie, ściekach, paszach i żywności, a toksotyp A tego gatunku, będąc naturalnym składnikiem mikroflory przewodu pokarmowego organizmów stałocieplnych (ptaki, ssaki), wykazuje warunkową chorobotwórczość (24, 27, 51). Enterotoksyczne szczepy tego gatunku wywołują rocznie milion zatruc pokarmowych ludzi w Stanach Zjednoczonych, co stanowi 10% wszystkich zachorowań na tle pokarmowym (7, 14). Łagodny przebieg choroby może być powodem niedoszacowania skali zachorowań, co sugerują m.in. dane Głównego Inspektoratu Sanitarnego z lat 2005-2015, w ciągu których zarejestrowano w Polsce jedynie 197 przypadków zatruc pokarmowych na tle *C. perfringens*, wobec kilkudziesięciu tysięcy przypadków bakteryjnych zatruc i zakażeń pokarmowych rejestrowanych każdego roku w tym okresie (65). W hodowli zwierząt laseczka zgorzeli gazowej jest najważniejszym czynnikiem chorobotwórczym wśród wszystkich beztlenowych laseczek przetrwalnikujących (21, 27). Zachorowalność waha się od 15% do 50%, a śmiertelność może sięgać 100% (41, 69). Największe straty notowane są w hodowli trzody chlewnej, drobiu, bydła, owiec czy psów (15, 23, 26, 30, 34, 47, 67). W przemyśle drobiarskim roczne straty na tle *C. perfringens* szacuje się na ponad 2 biliony dolarów (10). Znaczenie *C. perfringens* w hodowli

zwierząt wzrosło po wycofaniu antybiotykowych stymulatorów wzrostu w 2006 r. ograniczających liczbę zachorowań na tle mikroorganizmów oportunistycznych (29, 40).

Występowanie

Źródłem *C. perfringens* w środowisku jest kał zwierząt, a jego ilość zależy od regionu geograficznego, pory roku, gatunku, odcinka przewodu pokarmowego i dostępności składników odżywczych (63, 73). *C. perfringens* nie produkuje 13 z 20 podstawowych aminokwasów, a zapotrzebowanie zaspokaja przez rozkład tkanek gospodarza z udziałem produkowanych toksyn i enzymów (1). W gramie treści jelitowej zdrowego człowieka spotyka się 10^5 *C. perfringens*, a u osób z objawami zatrucia pokarmowego stwierdzano 10^7 jtk/g (18). Żywnością najczęściej zanieczyszczoną jest mięso i jego przetwory, rzadziej ryby, warzywa, produkty mleczne, żywność suszona czy przyprawy (4, 59, 70). Obecność laseczek zgorzeli gazowej stwierdzano na powierzchni 79% badanych tuszek drobiowych, w 66% próbek surowego mięsa wieprzowego oraz w 81% badanych produktów wieprzowych (12). Drobnoustrój był izolowany także z krekowych węzłów chłonnych zwierząt rzeźnych, badanych bezpośrednio po uboju poprzedzonym 24- i 48-godzinnym odpoczynkiem, a poziom zanieczyszczenia

przez *C. perfringens* sięga kilkuset bakterii w gramie surowca lub produktu żywnościowego (17, 44). Drobnoustroj ten był wielokrotnie izolowany z pasz, które uważane są za jego główne źródło w hodowli zwierząt (38, 66). Powodem tego jest stosowanie niewystarczającej obróbki termicznej w trakcie procesu produkcyjnego pasz, zbyt wolne schładzanie produktów, stosowanie zanieczyszczonych materiałów i dodatków paszowych czy urządzeń do produkcji oraz dostęp zwierząt (gryzonie, ptaki) będących źródłem i/lub wektorem zanieczyszczenia (2). Najczęściej stosowane temperatury procesu produkcyjnego, zabijając komórki wegetatywne, stymulują jednocześnie kiełkowanie spor oraz stwarzają środowisko beztlenowe wewnątrz produktu, co w przypadku materiałów o dużej objętości niesie ryzyko namnażania *C. perfringens* (54). W przemyśle żywnościowym i paszowym liczba spor *C. perfringens* jest wskaźnikiem zanieczyszczenia kałowego, a także pokazuje efektywność procesów technologicznych czy zabiegów dezynfekcyjnych.

Patogeneza i chorobotwórczość

C. perfringens nie infekuje zdrowych komórek lecz wytwarza toksyny i enzymy zewnątrzkomórkowe odpowiadające za patogenezę (51, 68). Jak dotąd opisano 20 toksyn *C. perfringens* (tab. 1), co sprawia, że jest on jednym z największych producentów toksyn wśród znanych mikroorganizmów (18, 57). Toksyny te można podzielić na cztery kategorie, tj. uszkodzające błonę komórkową, tworzące pory, toksyny wewnątrzkomórkowe i enzymy hydrolityczne. Synteza poszczególnych toksyn warunkuje odpowiedni obraz zmian chorobowych u poszczególnych gatunków, jednak żaden szczep nie produkuje wszystkich toksyn jednocześnie (21, 63). Zakres działania toksyn może być lokalny lub systemowy na komórki oddalone od miejsca zakażenia (19).

Tab. 1. Podział gatunku *C. perfringens* na typy toksyczne i choroby przez nie wywoływane

Typ	Toksyna				Choroba	
	α	β	ϵ	ι	zwierzęta	człowiek
A	+	-	-	-	martwicowe zapalenie jelit: drobiu, świń enterotoksemia: bydła, koni, jagniąt, kóz zapalenie kąticy u koni	zgorzel gazowa, zatrucie pokarmowe, biegunka poantybiotykowa, zespół nagłej śmierci noworodków, zakaźna biegunka
B	+	+	+	-	dyzenteria: jagniąt, owiec, cieląt, kóz enterotoksemia: owiec, kóz, źrebiąt	-
C	+	+	-	-	enterotoksemia: prosiąt, cieląt, owiec, jagniąt, źrebiąt martwicowe zapalenie jelit: drób	martwicowe zapalenie jelit
D	+	-	+	-	enterotoksemia: jagniąt, owiec, bydła, kóz	zapalenie żołądka i jelit
E	+	-	-	+	enterotoksemia: bydła, cieląt, owiec, jagniąt, królików	-

Tab. 2. Czynniki wirulencji produkowane przez *C. perfringens*

Toksyna/enzym	Gen kodujący	Lokalizacja	Aktywność
alfa (α)	cpa	chromosom	cytolytyczna, hemolityczna, dermonekrotyczna, fosfolipaza C, sfingomielinaza, letalna
beta (β)	cpb	plazmid	cytolytyczna, dermonekrotyczna, tworzy pory w błonie komórkowej, letalna
epsilon (ϵ)	etx	plazmid	nekrotyczna, tworzy pory w błonie komórkowej, letalna
iota (ι)	lap, lpb	plazmid	dermonekrotyczna, rybotransferaza, letalna
enterotoksyna	cpe	plazmid, chromosom	cytolytyczna, tworzy pory w błonie komórkowej
beta2 (β_2)	cpb2	plazmid	cytolytyczna, dermonekrotyczna, prawdopodobnie tworzy pory w błonie komórkowej
delta (δ)	cpd	plazmid	hemolityczna, tworzy pory w błonie komórkowej
teta (θ) lub perfringolizyna O	pfoA	chromosom	hemolityczna, cytolytyczna zależna od cholesterolu, tworzy pory w błonie komórkowej
kappa (κ)	colA	chromosom	kolagenaza
lambda (λ)	lam	plazmid	proteaza
Mu (μ)	nagH	chromosom	hialuronidaza
NetB	netB	plazmid	tworzy pory w błonie komórkowej
NetF	netF	plazmid	tworzy pory w błonie komórkowej
NetE	netE	plazmid	tworzy pory w błonie komórkowej
NetG	netG	plazmid	tworzy pory w błonie komórkowej
TpeL	tpeL	plazmid	ras-specyficzna monoglukosyltransferaza
BecA, BecB	becA/B	plazmid	aktywno-specyficzna ADP-rybozyltransferaza
NanI	nanI	chromosom	sialidaza
α -clostripain	ccp	chromosom	proteaza cysteinowa
NanJ	nanJ	chromosom	sialidaza

W oparciu o zdolność do produkcji toksyn głównych (α , β , ϵ , ι) szczepy *C. perfringens* zostały podzielone na pięć toksotypów (tab. 1), od A do E.

Najbardziej rozpowszechniony w środowisku toksotyp A, przyczyna zgorzeli gazowej i zatruc pokarmowych ludzi i zwierząt, jest oportunistycznym saprofitem, a zachorowanie na jego tle poprzedza działanie czynników usposabiających. Należą do nich wysoka kontaminacja żywności lub paszy tym drobnoustrojem, nadmierne namnożenie drobnoustroju w przewodzie pokarmowym na skutek nagłej zmiany diety, przekarmienie, dieta wysokobiałkowa (1, 27),

dieta bogata w polisacharydy nieskrobiowe (31), niska zawartość błonnika, nadmierna podaż niektórych mikroelementów (cynk), inhibicja trypsyny, zanieczyszczenie paszy przez toksyczne metabolity pleśni (3) czy benzochinony (45), współistniejąca kokcydioza (64), antybiotykoterapia czy immunosupresja na tle stresu środowiskowego (transport, przegrzanie) (6, 8, 13, 41, 62). Szczepy pozostałych toksotypów (B-E) są wiązane zawsze z procesem chorobowym, a ich obecność w przewodzie pokarmowym uważana jest za zakażenie.

Toksyna α jest produkowana przez niemal wszystkie szczepy *C. perfringens*, a jej poziom ekspresji decyduje o właściwościach letalnych szczepów typu A (21). Zdolność licytynolizy i hemolizy niecałkowitej warunkuje jej właściwości cytotoksyczne (tab. 2.). Toksyna β jest przyczyną zachorowań zwierząt (bydło, owce, kozy, świnie, konie) i ludzi (19). Toksyna ϵ wywołująca zwykle choroby kóz i owiec uznawana jest za trzecią najniebezpieczniejszą toksynę wytwarzaną przez rodzaj *Clostridium*, po toksynie botulinowej i tężcowej, przez co została zaliczona do czynników bioterrorystycznych kategorii B (18). Toksyna ι jest przyczyną zachorowań bydła, owiec, królików i psów (19, 56). Wśród toksyn pobocznych *C. perfringens* największe znaczenie mają: enterotoksyna, nekrotyczna toksyna β_2 oraz perfringolizyna (27, 36, 48, 68, 73). Ostatnio opisane toksyny poboczne to NetB, NetF, NetE i NetG, które tworzą pory w błonie komórkowej (26, 37, 58). Toksyna NetB jest uważana za podstawowy czynnik wirulencji martwicowego zapalenia jelit kurcząt (26, 58), a toksyna NetF pełni ważną rolę w krwotocznym zapaleniu jelit i żołądka psów oraz martwicowym zapaleniu jelit żrebiąt (20, 25). Ekspresja poszczególnych toksyn podlega wpływom genów regulatorowych, faz wzrostu oraz czynników środowiskowych, a synteza enterotoksyny ma miejsce jedynie w trakcie sporulacji (1, 73). Powszechną cechą gatunku *C. perfringens* jest utrata i nabywanie genów plazmidowych i nukleoidowych przez transfer koniugacyjny, zarówno w trakcie pasażowania *in vitro*, jak i *in vivo*, w efekcie czego populacja zyskała miano panmiktycznej (42, 61). Utrata genów dotyczy najczęściej *cpb*, *cpb2*, *cpe* i ma miejsce wraz ze zmianą gospodarza lub niszy środowiskowej, co określane jest „wyjściem z jelita”. Może to być przyczyną rzadkiego izolowania typów B-E od zwierząt podejrzanych o zachorowanie na tle *C. perfringens* czy z takich matryc, jak żywność, pasze i gleba. Ponadto, zdolność koniugacji wśród szczepów tego gatunku sprawia, że patogenne szczepy środowiskowe przekazują plazmidy z determinantami zjadliwości szczepom stanowiącym naturalną mikroflorę jelit, przekształcając je w szczepy enteropatogenne (1).

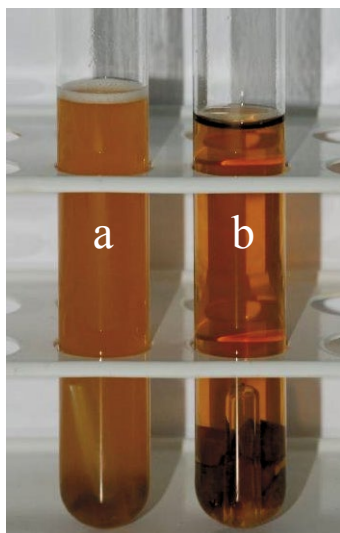
Dochodzenie epidemiologiczne

Głównym powodem trudności diagnostycznych w zachorowaniach na tle *C. perfringens* i niedoszacowania rzeczywistej skali zachorowań jest fakt, że

dominujący w populacji toksotyp A, jest komensalem w jelitach zdrowych osobników i stwierdzenie jego obecności lub produkowanej przez niego toksyny α w przewodzie pokarmowym ma znikome znaczenie diagnostyczne. Inną przyczyną, to brak jednej, odpowiednio czułej i specyficznej metody diagnostycznej wykrywającej wszystkie toksyny tego mikroorganizmu istotne w danym dochodzeniu epidemiologicznym. Należy pamiętać, że obecność tego beztlenowca w tkankach czy narządach (wątroba, śledziona) pobranych pośmiertnie od zdrowych klinicznie zwierząt nie jest dowodem zakażenia organizmu, lecz wynikiem jego lawinowego namnażania w przewodzie pokarmowym przy spadającym potencjale oksydoredukcyjnym i migracji drogą płynów ustrojowych (55). Ponadto, zjawisko pośmiertnej dominacji bakterii z rodzaju *Clostridium* utrudnia izolację innych patogenów z przewodu pokarmowego, co zwykle dyskwalifikuje tego rodzaju próbki w diagnostyce laboratoryjnej. Potwierdzenie zachorowania na tle *C. perfringens* obejmuje stwierdzenie objawów klinicznych toksoinfekcji pokarmowej, zanieczyszczenie podejrzonej żywności przez *C. perfringens* w ilości powyżej 10^5 jtk/g, obecność tego drobnoustroju w świeżo pobranym kale pacjenta w ilości powyżej 10^6 jtk/g oraz wysokie podobieństwo filogenetyczne tych izolatów (66).

Metody wykrywania

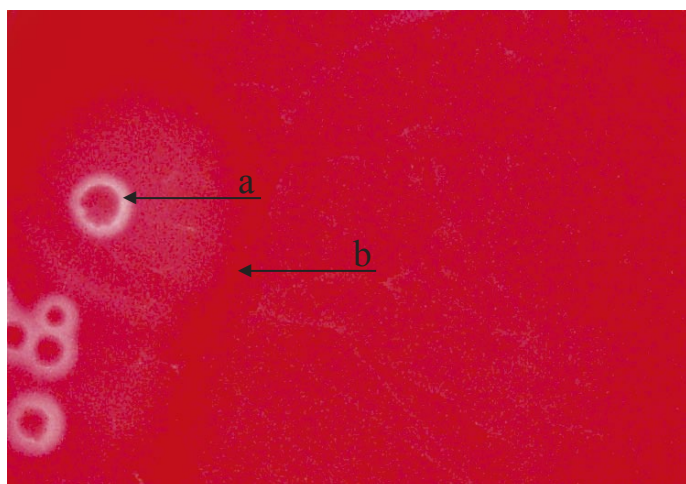
Do wykrywania laseczki zgorzeli gazowej stosowana jest najczęściej klasyczna metoda hodowlana prowadzona w anaerobiozie, a izolaty są oceniane pod kątem cech typowych dla gatunku. *C. perfringens* wytwarza owalne przetrwalniki niezwykle rzadko obserwowane *in vitro* (63), które ulegają inaktywacji po 2-3 minutach w temperaturze 100°C , choć niektóre z nich przeżywają działanie tej temperatury nawet przez 5 godz. (43, 52). W środowisku spory mogą przetrwać przez kilka lat, a najwyższa termooporność cechuje spory szczepów epidemicznych (62). Mikroorganizm ten namnaża się w szerokim zakresie temperatur, od 20 do 50°C (14), cechuje go krótki czas generacji (8-10 min), relatywnie wysoka tolerancja na tlen (35), a optymalne pH wzrostu i produkcji toksyn wynosi od 6,5 do 7,5 (1). Metodą zalecaną przez AOAC Official Methods of Analysis (53) do wykrywania i oznaczania liczby *C. perfringens* w żywności jest metoda zalewowa w podłożu TSC (Tryptose-Sulfite-Cycloserine agar), prowadzona beztlenowo w 35°C . Typowe kolonie na TSC z żółtkiem jaja są czarne z 2-4 mm nieprzezroczystą strefą powstałą w wyniku licytynolizy. Przynależność do gatunku *C. perfringens* potwierdza się badaniem mikroskopowym po barwieniu preparatu metodą Grama oraz sprawdzeniem na pożywce laktozowo-żelatynowej zdolności szczepu do produkcji gazu, fermentacji laktozy (zmiana barwy pożywki z czerwonej na żółtą), zdolności ruchu i redukcji azotanów. Nieruchliwe, Gram-dodatnie laseczki,



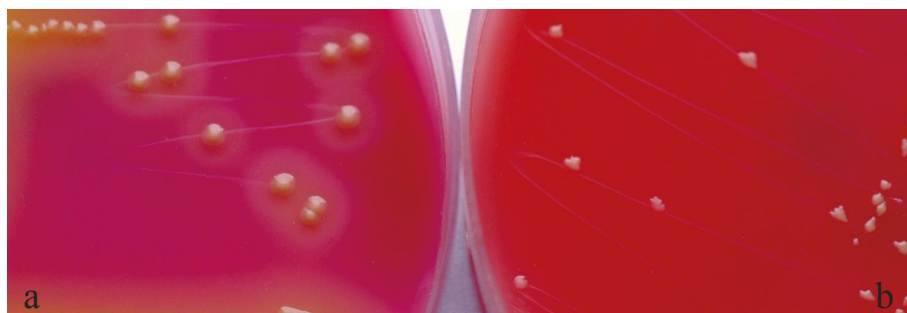
Ryc. 1. a – 24-godzinna hodowla *C. perfringens* w bulionie Wrzoska, b – bulion Wrzoska przed posiewem

rosnące na pożywce TSC w postaci czarnych kolonii, redukujące azotany, fermentujące laktozę do kwasu i gazu uznawane są za *C. perfringens*. W bulionie Wrzoska drobnoustroj ten powoduje jednolite zmętnienie pożywki z jasnoszarym osadem na dnie probówki. Cechą typową jest burzliwa fermentacja glukozy z obfitą produkcją gazu widocznego jako piana na powierzchni bulionu oraz gromadzącego się w probówce Durhama (ryc. 1). Na podłożu z krwią barania kolonie są najczęściej

okrągłe, kuliście wypukłe, jasnoróżowe, o równych brzegach, wytwarzające podwójną strefę hemolizy (wąska strefa hemolizy całkowitej i położona obwodowo szeroka strefa hemolizy niecałkowitej) (ryc. 2). Na podłożu Willis-Hobbs typowe szczepy *C. perfringens* rosną w formie cytrynowożółtych kolonii, wytwarzając dookoła opalizującą strefę lecytynolizy (reakcja Naglera) (ryc. 3). Kształt kolonii i szerokość strefy lecytynolizy wokół kolonii jest zmienny.



Ryc. 2. *C. perfringens* na podłożu Muller-Hinton: a – hemoliza całkowita, b – hemoliza niecałkowita



Ryc. 3. Szczepy *C. perfringens*: a – lecytynazo-dodatni, b – lecytynazo-ujemny

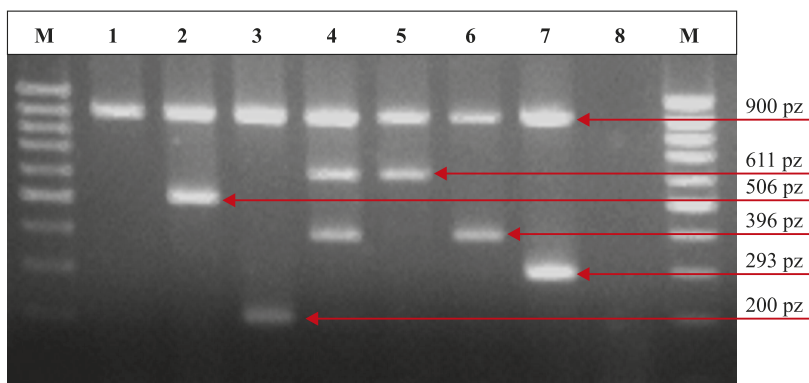
W chwili obecnej wynik badania uzyskany metodą hodowlaną jest zwykle weryfikowany testem PCR (21, 63). Identyfikację potwierdza wykrycie fragmentów DNA unikatowych dla *C. perfringens*, jak 16S rRNA czy genów kodujących toksyny główne i poboczne (7, 11). Detekcja genu kodującego enterotoksynę określa potencjalną zdolność izolatu do produkcji enterotoksyny i wywołania zatrucia pokarmowego (28). Metody oparte na technice PCR w odmianie multiplex wykrywają jednocześnie kilka genów (5), informując o przynależności gatunkowej, typie i podtypie toksycznym. Coraz częściej stosowana jest identyfikacja drobnoustroju w oparciu o profil białkowy techniką MALDI-TOF (7).

Poza detekcją specyficznych kwasów nukleinowych, wykrywane mogą być także toksyny *C. perfringens*, mające budowę białek. Służą temu testy ELISA wykrywające np. enterotoksynę w przypadku zatrucia pokarmowego (71), aglutynacji lateksowej (49) czy odwróconej biernej aglutynacji lateksowej (32).

Określenie enterotoksyczności izolatów z kału lub żywności wymaga indukowania sporulacji szczepu w specjalnych podłożach stymulujących przetrwalnikowanie i produkcję toksyn jak bulion Ellnera, podłoża AEA czy Duncan & Strong (16, 33, 39). Do wykrywania toksyny ϵ stosowane są przeciwciała mono- i poliklonalne, testy immunoenzymatyczne, test aglutynacji lateksowej i technika chromatografii cieczowej (18).

W dochodzeniu epidemiologicznym zachorowań na tle *C. perfringens* stosowane są zarówno metody fenotypowe, jak i genotypowe. Fenotypowanie obejmuje detekcję toksyn produkowanych przez *C. perfringens* poprzez ich neutralizację odpowiednimi surowicami czy ocenę oporności izolatów na substancje przeciwbakteryjne (26, 63, 73). Duża zmienność w produkcji toksyn *in vitro* w obrębie tego gatunku sprawia, że fenotypowanie oparte na cechach serologicznych jest wysoce problematyczne, stąd kluczową rolę pełnią obecnie metody genotypowe, niezależne od ekspresji genów i mające znacząco wyższą moc różnicowania. Umożliwiają one identyfikację izolatu (gatunek, typ i podtyp toksyczny), a przez określenie pokrewieństwa z innymi izolatami – wskazanie źródła zakażenia, dróg szerzenia się choroby i stopnia jej rozprzestrzenienia, co ułatwia nie tylko diagnostykę i terapię, ale także profilaktykę zachorowań w przyszłości. Stosowane

są tu zarówno metody typu non-sequence-based, jak i sequence-based (22). Typowanie non-sequence-based prowadzono jak dotąd metodą polimorfizmu genomowego DNA przy użyciu elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE) (26, 38), polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP) (72), metody multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)



Ryc. 4. Elektroforogram produktów PCR referencyjnych szczepów *C. perfringens*. Ścieżki: M – wzorzec masy molekularnej; 1-3 – *C. perfringens* typu A (2 – podtyp enterotoksyczny, 3 – podtyp β 2); 4 – *C. perfringens* typu B; 5 – *C. perfringens* typu C; 6 – *C. perfringens* typu D; 7 – *C. perfringens* typu E; 8 – kontrola ujemna reagentów

(9, 10) polegającej na analizie zmian zachodzących w sekwencji powtórzeń nukleotydowych, polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNPs) (46) oraz techniką mikromacierzy (10). Typowanie oparte na sekwencji genomu *C. perfringens* prowadzono metodą multilocus sequence typing (MLST) (50), multispacer sequence typing (MST) i techniką sekwencjonowania całego genomu (WGS) (22, 51).

Krótki czas generacji, zdolność produkcji wielu toksyn i termoopornych spor, lokalizacja wielu genów wirulencji na ruchomych elementach genetycznych, a przede wszystkim powszechne występowanie w środowisku sprawiają, że *C. perfringens* to drobnoustrój bardzo istotny z punktu widzenia ochrony zdrowia publicznego. Jest czynnikiem etiologicznym wielu jednostek chorobowych ludzi i zwierząt o charakterze zarówno histotoksemii, jak i infekcji jelitowych, których przebieg zależy od zestawu produkowanych toksyn przez dany szczep. O ile diagnostyka zatruc pokarmowych ludzi zwykle nie sprawia trudności, to diagnostyka zachorowań zwierząt jest wysoce problematyczna zarówno dla lekarzy weterynarii, jak i laboratoriów diagnostycznych. Największym wyzwaniem pozostaje nadal warunkowo chorobotwórczy *C. perfringens* typu A i chociaż w ostatniej dekadzie opisano sześć kolejnych czynników zjadliwości w obrębie tego gatunku (NetB, BEC, TpeL, NetE, NetF, NetG), to mechanizm uruchomienia zjadliwości szczepów oportunistycznych pozostaje wciąż niewyjaśniony.

Piśmiennictwo

- Allaart J. G., Van Asten A. J., Gröne A.: Predisposing factors and prevention of *Clostridium perfringens*-associated enteritis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2013, 36, 449-464.
- Andreoletti O., Budka H., Buncic S.: Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals. Scientific opinion of the panel on biological hazards. *EFSA J.* 2008, 720, 1-84.
- Antonissen G., van Immerseel F., Pasmans F., Ducatelle R., Haesebrouck F., Timbermont L., Verlinden M., Janssens G. P. J., Eeckhaut V., Eeckhaut M., De Saeye S., Henssenberger S., Martel A., Croubels S.: The mycotoxin deoxynivalenol predisposes for the development of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broiler chickens. *PLoS One*, 2014, 9, 1-8.
- Banach J. L., Stratakou I., van der Fels-Klerx H. J., den Besten H. M. W., Zwietering M. H.: European alerting and monitoring data as inputs for the risk

assessment of microbiological and chemical hazards in spices and herbs. *Food Control* 2016, 69, 237-249.

- Baums C. G., Schotte U., Amsberg G., Goethe R.: Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet. Microbiol.* 2004, 100, 11-16.
- Branton S. L., Reece F. N., Hagler W. M.: Influence of a wheat diet on mortality of broiler chickens associated with necrotic enteritis. *Poult. Sci.* 1987, 66, 1326-1330.
- Brodzik C., Augustynowicz E., Korzeniowska-Kowal A., Lutyhska A.: Application of the MALDI-TOF for identification of *Clostridium perfringens* strain. *Med. Dośw. Microbiol.* 2016, 68, 13-21.
- Brynstad S., Marker M. R., McClane B. A., Graunum P. E., Rood J. I.: Enterotoxin plasmid from *Clostridium perfringens* is conjugative. *Infect. Immun.* 2001, 69, 3483-3487.
- Chalmers G., Martin S. W., Prescott J. F., Boerlin P.: Typing of *Clostridium perfringens* by multiple-locus variable number of tandem repeats analysis. *Vet. Microbiol.* 2008, 128, 126-135.
- Charlebois A., Jalbert L. A., Harel J., Masson L., Archambault M.: Characterization of Genes Encoding for Acquired Bacitracin Resistance in *Clostridium perfringens*. *PLoS One*, 2012, 7: e44449.
- Chukwu E. E., Nwaokorie F. O., Coker A. O., Avila-Campos M. J., Solis R. L., Llanco L. A., Ogunola F. T.: Detection of toxigenic *Clostridium perfringens* and *Clostridium botulinum* from food sold in Lagos, Nigeria. *Anaerobe* 2016, 42, 176-181.
- Coffman J.: Regulation of antibiotic resistance in the US. *J. Agrobiotechnol. Manag. Econ.* 2000, 2, 141-147.
- Dahiya J. P., Wilkie D. C., van Kessel A. G., Drew M. D.: Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. *Anim. Feed Sci. Tech.* 2006, 129, 60-88.
- Dave C. A.: A rapid qualitative assay for detection of *Clostridium perfringens* in canned food products. *Acta. Biochim. Pol.* 2017, 64, 207-213.
- Dhillon A. S., Roy P., Lauerman L., Schaberg D., Weber S., Bandli D., Wier F.: High mortality in egg layers as a result of necrotic enteritis. *Avian Dis.* 2004, 48, 675-680.
- Duncan C., Strong D.: Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.* 1969, 16, 82.
- European Food Safety Authority: Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to *Clostridium* spp. in foodstuffs. *EFSA J.* 2005, 199, 1-65.
- Féraudet-Trisse C., Mazuet C., Pauillac S., Krüger M., Lacroux C., Popoff M. R., Dorner B. G., Andrèoletti O., Plaisance M., Volland H., Simon S.: Highly sensitive Sandwich immunoassay and immunochromatographic test for the detection of *Clostridium* epsilon toxin in complex matrices. *Plos one* 2017, 12, 1-23.
- Fernandez-Miyakawa M. E., Redondo L. M.: Role of *Clostridium perfringens* Alpha, Beta, Epsilon and Iota toxins in Enterotoxemia of monogastrics and ruminants. *Microbial Toxins. Toxinology*. Springer, Dordrecht 2018, 93-118, https://doi.org/10.1007/978-94-007-6449-1_16
- Finley A., Gohari I. M., Parreira V. R., Abrahams M., Staempfli H. R., Prescott J. F.: Prevalence of netF-positive *Clostridium perfringens* in foals in south-western Ontario. *Can. J. Vet. Res.* 2016, 80, 242-244.
- Fohler S., Klein G., Hoedemaker M., Scheu T., Seyboldt C., Campe A., Jensen K. C., Abdulmajood A.: Diversity of *Clostridium perfringens* toxin-genotypes from dairy farms. *BMC Microbiol.* 2016, 16, 199: doi 10.1186/s12866-016-0812-6.
- Fournier P. E., Dubourg G., Raoult D.: Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era. *Genome Med.* 2014, 6, 1-15.
- Gkiourtzidis K., Frey J., Bourtzzi-Hatzopoulou E., Iliadis N., Sarris K.: PCR detection and prevalence of α -, β -, β 2-, ϵ -, ι -, and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery. *Vet. Microbiol.* 2001, 82, 39-43.
- Gobeli S., Gorset C., Burgener A., Perreten V.: Antimicrobial susceptibility of canine *Clostridium perfringens* strains from Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 2012, 154, 247-250.
- Gohari I. M., Kropinski A. M., Weese S. J., Whitehead A. E., Parreira V. R., Boerlin P., Prescott J. F.: NetF-producing *Clostridium perfringens*: Clonality and plasmid pathogenicity loci analysis. *Infect. Genet. Evol.* 2017, 49, 32-38.
- Gohari I. M., Parreira V. R., Nowell V. R., Nicholson V. M., Oliphant K., Prescott J. F.: A novel pore-forming toxin in type A *Clostridium perfringens* is associated with both fatal canine hemorrhagic gastroenteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis. *PLoS One*, 2015, 10(4):e0122684, doi: 10.1371/journal.pone.0122684. eCollection 2015.

27. Goossens E., Valgaeren B. R., Pardon B., Haesebrouck F., Ducatelle R., Deprez P. R., Van Immerseel F.: Rethinking the role of alpha toxin in Clostridium perfringens associated enteric diseases: a review on bovine necro-haemorrhagic enteritis. *Vet. Res.* 2017, 48, 2-17.
28. Grant K., Kenyon S., Nwafor I.: Identification and characterisation of Clostridium perfringens by real-time PCR, location of enterotoxin gene and heatresistance. *Foodborne Pathog. Dis.* 2008, 5, 629-639.
29. Grave K., Jensen V. F., Odensvik K., Wierup M., Bangen M.: Usage of veterinary therapeutic antimicrobials in Denmark, Norway and Sweden following termination of antimicrobial growth promoter use. *Prev. Vet. Med.* 2006, 75, 123-132.
30. Greco G., Madio A., Buonavoglia D., Totaro M., Corrente M., Martella V., Buonavoglia C.: Clostridium perfringens toxin-types in lambs and kids affected with gastroenteric pathologies in Italy. *Vet. J.* 2005, 170, 346-350.
31. Hanczakowska E., Koczyws E.: Zastosowanie enzymów rozkładających polisacharydy nieskrobiowe w żywieniu świń. *Wiad. Zootech.* XLVI, 2008, 9-16.
32. Harmon S. M., Kautter D.: Evaluation of a reversed passive latex agglutination test kit for Clostridium perfringens enterotoxin. *J. Food Prot.* 1986, 49, 523-526.
33. Harmon S. M., Kautter D.: Improved media for sporulation and enterotoxin production by Clostridium perfringens. *J. Food Prot.* 1986, 49, 706.
34. Jacobson M., Segerstad C. H., Gunnarsson A., Fellström C., Klingenberg K. V., Wallgren P., Jensen-Waern M.: Diarrhoea in the growing pig – a comparison of clinical, morphological and microbial findings between animals from good and poor performance herds. *Res. Vet. Sci.* 2003, 74, 163-169.
35. Jean D., Briolat V., Reyssat G.: Oxidative stress response in Clostridium perfringens. *Microbiology* 2004, 150, 1649-1659.
36. Johansson A., Aspan A., Bagge E., Baverud V., Engstrom B. E., Johansson K. E.: Genetic diversity of Clostridium perfringens type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. *BMC Microbiol.* 2006, 6, 47.
37. Keyburn A. L., Yan X., Bannam T. L., van Immerseel F., Rood J. I., Moore R. J.: Association between avian necrotic enteritis and Clostridium perfringens strains expressing NetB toxin. *Vet. Res.* 2010, 41, 8.
38. Kukier E., Kwiatek K.: Phenotypical and genotypical characterisation of Clostridium perfringens strains isolated from feedingstuffs. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2010, 54, 501-511.
39. Labbe R., Rey D.: Raffinose increases sporulation and enterotoxin production by Clostridium perfringens type A. *Appl. Environ. Microbiol.* 1979, 37, 1196-1200.
40. Lancriet A., Timmermont L., De Gussem M., Marien M., Vancraeynest D., Haesebrouck F., Ducatelle R., Van Immerseel F.: The effect of commonly used anticoccidials and antibiotics in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathol.* 2010, 39, 1-22.
41. Lebrun M., Mainil J. G., Linden A.: Cattle enterotoxaemia and Clostridium perfringens: description, diagnosis and prophylaxis. *Vet. Rec.* 2010, 167, 13-22.
42. Lepp D., Gong J., Songer G., Boerlin P., Parreira V. R., Prescott J. F.: Identification of accessory genome regions in poultry Clostridium perfringens isolates carrying the netB plasmid. *J. Bacteriol.* 2013, 195, 1152-1166.
43. Li J., McClane B. A.: Further comparison of temperature effects on growth and survival of Clostridium perfringens type A isolates carrying a chromosomal or plasmid-borne enterotoxin gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 4561-4568.
44. Lin Y. T., Labbe R.: Enterotoxigenicity and genetic relatedness of Clostridium perfringens isolates from retail foods in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 1642-1646.
45. Lis L. B., Bakula T., Baronowski M., Czarnewicz A.: The carcinogenic effects of benzoquinones produced by the flour beetle. *Polish J. Vet. Sci.* 2011, 14, 159-164.
46. Liu H., McCord K. D., Howarth J., Popham D. L., Jensen R. V., Melville S. B.: Hypermotility in Clostridium perfringens Strain SM101 is due to spontaneous mutations in genes linked to cell division. *J. Bacteriol.* 2014, 196, 2405-2412.
47. Manteca C., Daube G., Jauniaux T., Linden A., Pirson V., Detilleux J., Ginter A., Coppe P., Kaeckenbeeck A., Mainil J. G.: A role for the Clostridium perfringens β_2 toxin in bovine enterotoxaemia? *Vet. Microbiol.* 2002, 86, 191-202.
48. McClane B. A., Chakrabarti G.: New insights into the cytotoxic mechanisms of Clostridium perfringens enterotoxins. *Anaerobe* 2004, 10, 107-114.
49. McClane B., Snyder J.: Development and preliminary evaluation of a slide latex agglutination assay for the detection of Clostridium perfringens type A enterotoxin. *J. Immunol. Methods.* 1987, 100, 131.
50. Nakano V., Ignacio A., Llanco L., Bueris V., Sircili M. P., Avila-Campos M. J.: Multilocus sequence typing analyses of Clostridium perfringens type A strains harboring tpeL and netB genes. *Anaerobe* 2017, 44, 99-105.
51. Nowell V. J., Kropinski A. M., Songer J. G., MacInnes J. I., Parreira V. R., Prescott J. F.: Genome Sequencing and Analysis of a Type A Clostridium perfringens isolate from a Case of Bovine Clostridial Abomasitis. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32271, doi:10.1371/journal.pone.0032271.
52. Novak J. S., Juneja V. K., McClane B. A.: An ultrastructural comparison of spores from various strains of Clostridium perfringens and correlations with heat resistance parameters. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 86, 239-247.
53. Official Methods of Analysis of AOAC International. AOAC Int. Inc. 2010, 17, 112-114.
54. Orsburn B., Melville S. B., Popham D.: Factors contributing to heat resistance of Clostridium perfringens endospores. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74, 3328-3335.
55. Pedersen S.: Diversification of clostridial conditions in cattle and sheep. *Vet. Times* 2016, 6, 1-9.
56. Redondo L. M., Farber M., Venzano A., Jost B. H., Parma Y. R., Fernandez-Miyakawa M. E.: Sudden death syndrome in adult cows associated with Clostridium perfringens type E. *Anaerobe* 2013, 20, 1-4.
57. Revitt-Mills S. A., Rood J. I., Adams V.: Clostridium perfringens extracellular toxins and enzymes: 20 and counting. *Microbiology Australia* 2015, 36, 114-117.
58. Rood J. I., Keyburn L., Moore R. J.: NetB and necrotic enteritis: the hole movable story. *Avian Pathology* 2016, 45, 295-301.
59. Sagoo S. K., Little C. L., Greenwood M., Mithani V., Grant K. A., McLaughlin J., de Pinna E., Threlfall E. J.: Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom. *Food Microbiol.* 2009, 26, 9-43.
60. Sarker M. R., Shivers R. P., Sparks S. G., Juneja V. K., McClane B. A.: Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of Clostridium perfringens isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 3234-3240.
61. Sawires Y. S., Songer J. G.: Clostridium perfringens: Insight into virulence evolution and population structure. *Anaerobe* 2006, 12, 23-43.
62. Schotte U., Tryen U., Neubauer H.: Significance of β_2 -toxicogenic Clostridium perfringens infections in animals and their predisposing factors – a review. *J. Vet. Med. B.* 2004, 51, 423-426.
63. Selim A. M., Elhaig M. M., Zakaria I., Ali A.: Bacteriological and molecular studies of Clostridium perfringens in newly born calves. *Trop. Anim. Health Prod.* 2017, 49, 201-205.
64. Sivaseelan S., Vijayakumar S., Malmarugan S., Balachandran P., Balasubramaniam G. A.: Assessment of predisposing effect of coccidiosis to necrotic enteritis in experimentally induced broiler chicken. *Vet. Arhiv* 2013, 83, 653-664.
65. Stan sanitarny kraju w roku 2015. https://stansanitarny.gis.gov.pl/stan_sanitarny_kraju_za_rok_2015.pdf
66. Tessari E. N. C., Lúcia A. S., Cardoso P., Kanashiro A. M. I., Greice F., Stoppa Z., Luciano R. L., Machado de Castro A. G.: Analysis of the Presence of Clostridium perfringens in Feed and Raw Material Used in Poultry Production. *Food Nutrition Sci.* 2014, 5, 614-617.
67. Timmermont L., Haesebrouck F., Ducatelle R., Van Immerseel F.: Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathol.* 2011, 40, 341-347.
68. Uzal F. A., Freedman J. C., Shrestha A., Theoreh J. R., Garcia J., Awad M. M., Adams V., Moore R. J., Rood J. I., McClane B. A.: Towards an understanding of the role of Clostridium perfringens Toxins in human and animal disease. *Future Microbiol.* 2014, 9, 361-377.
69. Uzal F. A., Vidal J. E., McClane B. A., Gurjar A. A.: Clostridium Perfringens Toxins involved in mammalian veterinary diseases. *Open Toxinology J.* 2014, 2, 24-42.
70. Wen Q., McClane B. A.: Detection of enterotoxigenic Clostridium perfringens type A isolates in American retail foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 2685-2691.
71. Wimsatt J., Harmon S., Shah D.: Detection of Clostridium perfringens enterotoxin in stool specimens and culture supernatants by enzyme-linked immunosorbent assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1986, 4, 307-310.
72. Wu S. B., Rodgers N., Choct M.: Real-time PCR assay for Clostridium perfringens in broiler chickens in a challenge model of necrotic enteritis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, 77, 1135-1139.
73. Yonogi S., Matsuda S., Kawai T., Yoda T., Harada T., Kumeda Y., Gotoh K., Hiyoshi H., Nakamura S., Kodama T., Iida T.: BEC, a novel enterotoxin of Clostridium perfringens found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks. *Infect. Immun.* 2014, 82, 2390-2399.

Adres autora: mgr Nina Koziel, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: nina.koziel@piwet.pulawy.pl