

Cechy fenotypowe i genotypowe szczepów *Clostridium perfringens* izolowanych od prosiąt ssących*)

BERNARD WASIŃSKI, ZYGMUNT PEJSAK

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

Wasiński B., Pejsak Z.

Evaluation of phenotypic and genotypic features of *Clostridium perfringens* strains isolated from suckling piglets

Summary

The aim of present study was to determine α and β toxin expression as well as the prevalence of α , β , ϵ , ι , β 2 toxin genes and the enterotoxin gene of *Clostridium perfringens* strains isolated from suckling piglets with diarrhea. Rectal swabs, feces samples and intestine sections originating from 15 farms were examined during the study. All isolated through ELISA *Cl. perfringens* strains demonstrated α toxin expression and none of them demonstrated β toxin. All isolates were positive for the α and negative for the β , ϵ , ι and enterotoxin gene, implying that only non-enterotoxigenic type A strains were detected. Over 41% of the isolates demonstrated β 2 toxin gene. The β 2 positive strains were isolated from samples originating from 9 farms. The lack of type C strains among isolates collected during the study was also noted, as well as the different intensity of pathological changes in the intestines of piglets from which β 2 positive strains were isolated.

Keywords: *Clostridium perfringens*, diarrhea, pig

Bakterie z gatunku *Clostridium perfringens* stanowią czynnik etiologiczny wielu chorób człowieka i zwierząt (6, 18, 24). Zróżnicowanie objawów chorobowych wywoływanych przez te drobnoustroje związane jest z aktywnością wytwarzanych przez nie toksyn. Zdolność wytwarzania czterech tzw. głównych toksyn letalnych o symbolach α , β , ϵ , ι umożliwia rozróżnienie w obrębie gatunku *Cl. perfringens* pięciu typów toksynogennych, oznaczanych jako A, B, C, D, E (27, 28). Poza wymienionymi toksynami drobnoustroje omawianego gatunku posiadają zdolność wytwarzania kilkunastu innych. Mogą one odgrywać istotną rolę w patogenezie zakażeń wywoływanych przez *Cl. perfringens*, choć nie mają znaczenia przy typowaniu tych drobnoustrojów. Najczęściej wymienianymi spośród wspomnianej grupy toksyn są: enterotoksyna (CPE) oraz odkryta niedawno toksyna β 2 (CPB2) (12, 28).

Znaczenie poszczególnych typów toksynogennych *Cl. perfringens* w etiologii zakażeń wywoływanych u ludzi i różnych gatunków zwierząt jest niejednakowe. U świń najczęściej opisywane są zakażenia wywoływane przez *Cl. perfringens* typu C i typu A (27, 28).

Pierwszy z wymienionych jest czynnikiem etiologicznym zakaźnego martwicowego zapalenia jelit prosiąt, nazywanego również zakaźną enterotoksemią prosiąt (*enterotoxaemia infectiosa porcellorum*) (6, 22, 27, 28). Objawy kliniczne choroby stwierdza się u prosiąt zwykle w pierwszym tygodniu życia (najczęściej w ciągu pierwszych 3 dni po urodzeniu). Zależnie od postaci choroby u prosiąt obserwuje się krwawe biegunki o różnym nasileniu. Ich konsekwencją jest odwodnienie i wyniszczenie zwierząt, prowadzące niezadko do zejść śmiertelnych w ciągu 1-3 dni. Spotykane są również przypadki poprzedzonych zapaścią nagłych padnięć.

Zapalenia jelit wywołane przez *Cl. perfringens* typu A mogą występować u prosiąt w pierwszym tygodniu życia, jak też u starszych osobników, również po odsadzeniu. Mają one zwykle przebieg łagodniejszy od wywoływanych przez szczepy *Cl. perfringens* typu C (5, 27, 28). Rozpoznanie metodami laboratoryjnymi *Cl. perfringens* typu A jako czynnika etiologicznego w konkretnych przypadkach zwłaszcza u starszych zwierząt jest utrudnione z powodu występowania tych drobnoustrojów w składzie normalnej flory jelitowej świń. Jako wskazanie do podejrzeń w tym kierunku wymienia się np. stwierdzenie w posiewach intensyw-

*) Badania wykonano w ramach grantu KBN nr 2 P06K 047 26.

nego wzrostu szczepów typu A i wykazanie u nich dodatkowo zdolności wytwarzania CPB2 (28).

Diagnostyka laboratoryjna zakażeń wywołanych przez *Cl. perfringens* oprócz potwierdzenia przynależności gatunkowej wyizolowanych szczepów, wymaga określenia ich typu toksycznego i zdolności wytwarzania poszczególnych toksyn.

Używany przy standardowych sposobach typowania *Cl. perfringens* odczyn seroneutralizacji toksyn jest, mimo swoich zalet, metodą uciążliwą i długotrwałą. Wymaga znacznych ilości toksyny, swoistych surowic, a także wykorzystania zwierząt laboratoryjnych, co przy obecnych uwarunkowaniach prawnych może stwarzać dla niektórych laboratoriów dodatkowe utrudnienia. Jako metoda alternatywna w ostatnich latach coraz częściej proponowana jest reakcja polimeryzacji łańcuchowej (PCR) (2, 3, 7, 19, 21). W odniesieniu do *Cl. perfringens* wykorzystywana jest ona zwykle do wykrywania genów poszczególnych toksyn u wyizolowanych szczepów.

Wśród metod umożliwiających stwierdzenie ekspresji wybranych genów kodujących toksyny omawianych drobnoustrojów coraz częściej wykorzystywany jest enzymatyczny odczyn immunoadsorpcyjny (ELISA). Dostępne na rynku zestawy ELISA pozwalają na wykrywanie, między innymi, obecności toksyn α , β i enterotoksyny. Zaletą wykorzystania obu wspomnianych metod w rozpoznawaniu zakażeń wywołanych przez *Cl. perfringens* jest, oprócz usprawnienia procesu diagnostycznego, możliwość odstąpienia od badań prowadzonych na zwierzętach laboratoryjnych.

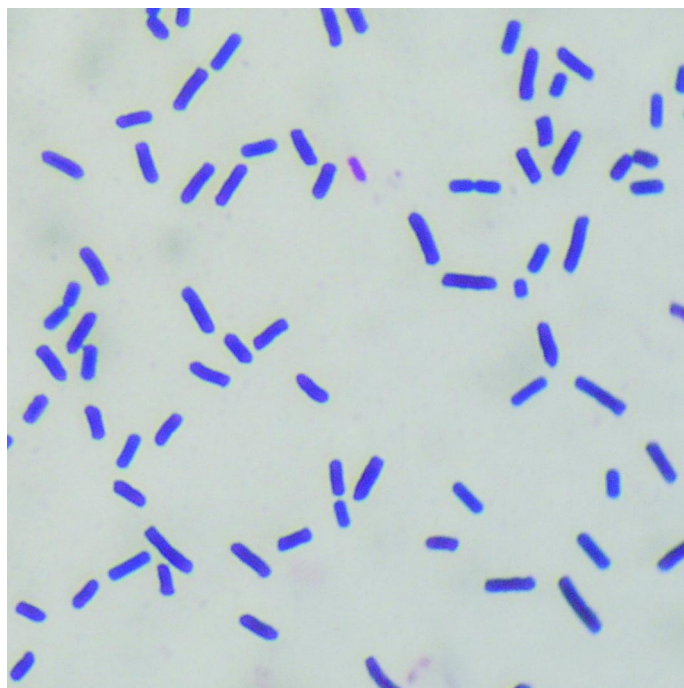
Celem badań była charakterystyka wybranych cech fenotypowych i genotypowych szczepów *Cl. perfringens* izolowanych od prosiąt ssących wykazujących objawy biegunki oraz próba oceny występowania drobnoustrojów wymienionego gatunku u prosiąt.

Materiał i metody

Pobieranie próbek. Materiał do badań pochodził z 15 ferm (o symbolach od P 1 do P 15), w których stwierdzano występowanie biegunek u prosiąt w wieku 1-10 dni. Gospodarstwa te usytuowane były na terenie województw: lubelskiego, łódzkiego, mazowieckiego, pomorskiego, świętokrzyskiego i wielkopolskiego.

Z każdej z ferm przesyłano do badań po 4-6 wymazów z prostnicy lub próbek kału. W przypadku wystąpienia zejść śmiertelnych dodatkowo przesyłano po 1-3 wycinków jelit lub padłych prosiąt. Do pobierania materiału od prosiąt używano wymazówek transportowanych w podłożach agarowych z węglem drzewnym (prod. Copan, Włochy). Próbkę kału i wycinki jelit pobierano do szczelnie zamykanych plastikowych pojemników, które umieszczano na czas transportu w izolowanych termicznie opakowaniach, umożliwiających schłodzenie przewożonego materiału.

Badania. Z przesłanych próbek wykonywano posiewy na podłoża mikrobiologiczne. Szczepy podejrzane o przynależność do gatunku *Cl. perfringens* po wyizolowaniu poddawano badaniom mikroskopowym (preparaty barwio-



Ryc. 1. *Cl. perfringens* preparat barwiony metodą Grama

ne metodą Grama) (ryc. 1), biochemicznym oraz typowaniu metodą PCR. Zidentyfikowane szczepy *Cl. perfringens* badano w kierunku zdolności wytwarzania toksyn α i β z użyciem metody ELISA.

Hodowla szczepów. Do izolacji i hodowli szczepów *Cl. perfringens* wykorzystywano selektywny agar TSC z peptonem tryptozowym, dwusiarczanem sodowym, cykloseryną i emulsją żółtka jaja kurzego (prod. Oxoid), agar Columbia z dodatkiem 5% krwi owczej i bulion Wrzowska. Do uzyskiwania warunków beztlenowych dla hodowli na podłożach stałych wykorzystywano zestawy systemu AnaeroGen firmy Oxoid. Zestawy te wraz z zainokulowanymi podłożami umieszczano w szczelnych pojemnikach poliwęglanowych o pojemności 2,5 dm³ lub 3,5 dm³, które wstawiano do cieplarki. Warunki beztlenowe dla hodowli w podłożach płynnych uzyskiwano przez pokrycie ich warstwą parafiny. Inkubację hodowli na obu rodzajach podłoży prowadzono w temperaturze 37°C.

Badania biochemiczne. Do identyfikacji szczepów *Cl. perfringens* na podstawie właściwości biochemicznych wykorzystywano zestawy Api ID32 A (prod. Biomerieux, Francja).

Ekstrakcja DNA. Do pozyskiwania matrycowego DNA ze szczepów referencyjnych i izolatów terenowych wykorzystywano metodę termiczną przygotowaną na podstawie procedury opisanej przez Møllera i Ahrensa (21). Z czystych hodowli na podłożach stałych pobierano 1-2 kolonie, które zawieszano w 200 μ l buforu PBS. Zawiesinę gotowano przez 10 min., a po schłodzeniu wirowano ją przy prędkości 10 000 obr./min. przez 20 s. Supernatant rozcieńczano w wodzie dejonizowanej w stosunku 1 : 10 i w takiej postaci wykorzystywano go jako źródło matrycowego DNA.

Amplifikacja DNA. Do amplifikacji wykorzystano zestaw starterów zaproponowany przez Songera i Bueschela (<http://microvet.arizona.edu:16080/Faculty/songer/multi->

Tab. 1. Charakterystyka stosowanych w reakcji multiplex PCR starterów umożliwiających amplifikację fragmentów genów kodujących poszczególne toksyny *Cl. perfringens*

Toksyna	Sekwencje starterów	Długość amplifikowanego fragmentu DNA	Piśmiennictwo
α	5'GCTAATGTTACTGCCGTTGA'3 5'CCTCTGATACATCGTGAAG'3	324 pz	29
β	5'GCGAATATGCTGAATCATCTA'3 5'GCAGGAACATTAGTATATCTTC'3	196 pz	16
ϵ	5'GCGGTGATATCCATCTATTC'3 5'CCACTTACTTGTCTACTAAC'3	655 pz	17
ι	5'ACTACTCTCAGACAAGACAG'3 5'CTTTCCTTCTATTACTATACG'3	446 pz	23
$\beta 2$	5'AGATTTTAAATATGATCCTAAC'3 5'CAATACCTTCACCAATACTC'3	567 pz	12
enterotoksyna	5'GGAGATGGTTGGATATTAGG'3 5'GGACCAGCAGTTGTAGATA'3	233 pz	9

plexprocedure.pdf). Umożliwił on wykrywanie genów 4 toksyn głównych oraz CPB2 i CPE. Opisy starterów podano w tab. 1. Wszystkie startery stosowane były w reakcji multiplex PCR.

Mieszanina reakcyjna w objętości 50 μ l zawierała: 3 μ l zawiesiny matrycowego DNA, 5 μ l 10 \times stężonego buforu Tris-HCl (o pH 8,8 w temp. 25°C) (prod. Fermentas, Litwa), po 0,25 μ M każdego ze starterów, 3,0 mM MgCl₂ (prod. Fermentas, Litwa), 0,2 mM mieszaniny dNTP (prod. Fermentas, Litwa) i 1,5 jednostki polimerazy Taq DNA Polymerase (prod. Fermentas, Litwa).

Amplifikację prowadzono w termocyklerze T3 Thermocycler (prod. Biometra) w następujących warunkach: wstępna denaturacja DNA 94°C – 3 min., 34 cykle denaturacji (1 min. – 94°C), przyłączenie starterów (1 min. – 55°C) i wydłużanie starterów (1 min. – 72°C). Końcowe wydłużanie produktów amplifikacji prowadzono przez 10 min. w temperaturze 72°C.

Elektroforeza produktów PCR. Produkty PCR poddawano elektroforezie w 2% żelu agarozowym. Do baseników w żelu wprowadzano po 10 μ l mieszaniny poreakcyjnej i 2 μ l buforu obciążającego. Elektroforezę prowadzono przez około 30 min. w buforze 1 \times TAE przy stałym natężeniu 350 mA. Żel barwiono w roztworze bromku etydyny o stężeniu 1 μ l/ml. Wielkość produktów oceniano przez porównanie z markerem masy molekularnej Gene-Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (prod. Fermentas, Litwa).

Badania przy użyciu ELISA. Zdolność wytwarzania toksyn przez wyizolowane szczepy *Cl. perfringens* badano przy użyciu zestawów Bio-X Alpha Toxin Elisa Kit i Bio-X Bbeta Toxin Elisa Kit (prod. Bio-X Diagnostics, Belgia).

Wyniki i omówienie

Z przesłanego materiału wyizolowano łącznie 39 szczepów *Cl. perfringens*. Próbkę dodatnie, z których dokonano izolacji omawianych drobnoustrojów pochodziły ze wszystkich 15 objętych badaniami ferm (tab. 2). Badanie metodą PCR (ryc. 2) wykazało występowanie kodującego toksynę α genu *plc* u wszystkich wyizolowanych szczepów. U żadnego z tych izolatów nie stwierdzono obecności genów pozostałych

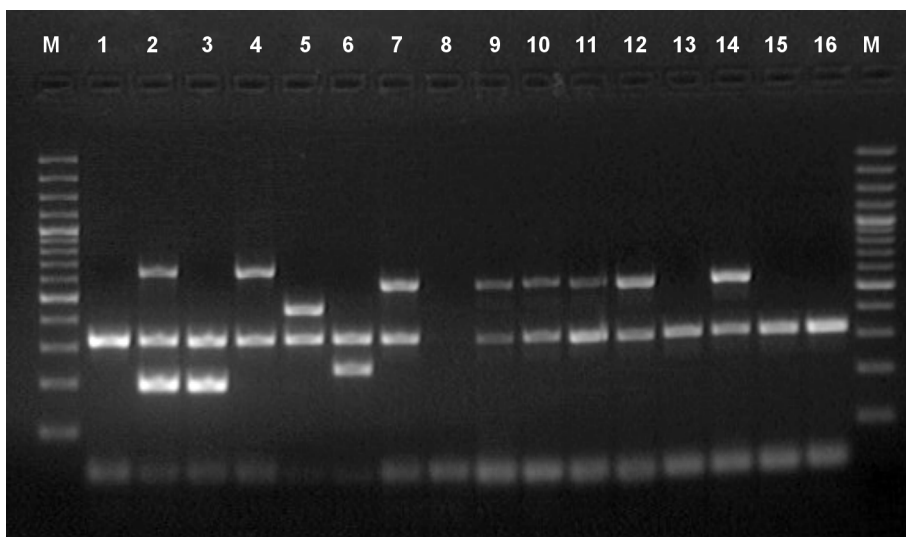
toksyn głównych. Wyniki te wskazują na przynależność omawianych szczepów *Cl. perfringens* do typu A. U 16 szczepów tej grupy, pochodzących z 9 ferm, stwierdzono występowanie genu toksyny $\beta 2$. U żadnego z izolatów nie stwierdzono występowania genu *cpe* kodującego enterotoksynę.

Badanie testem ELISA wykazało ekspresję toksyny α *Cl. perfringens* u wszystkich wyizolowanych szczepów. Wyniki te stanowiły potwierdzenie dla obserwowanego w trakcie hodowli każdego z tych szczepów na agarze TSC z dodatkiem żółtka zjawiska zmętnienia podłoża wokół kolonii, związanego z aktywnością lecytynazy charakterystyczną dla wytwarzanej przez te drobnoustroje toksyny α . U żadnego z omawianych izolatów nie stwierdzono metodą ELISA ekspresji toksyny β , co stanowi potwierdzenie wyników PCR.

Wszystkie szczepy *Cl. perfringens* izolowane z przesłanych próbek wykazywały cechy typu toksycznego A. Interesujący jest brak przypadków izolacji *Cl. perfringens* typu C szczególnie w zestawieniu z faktem pochodzenia próbek od wykazujących biegunki prosiąt w wieku 1-10 dni. Przy wyjaśnieniu przyczyn takich wyników należy brać pod uwagę kilka czynników. Jednym z istotniejszych wydaje się coraz szersze ostatnio stosowanie w profilaktyce biegunek prosiąt szczepionek skojarzonych przeciwko zakażeniom

Tab. 2. Charakterystyka genotypowa szczepów *Cl. perfringens* izolowanych od prosiąt ssących z poszczególnych ferm

Ferma	Województwo	Liczba izolatów <i>Cl. perfringens</i>	Liczba izolatów wykazujących obecność genów toksyn		
			α	β	$\beta 2$
P 1	świętokrzyskie	2	2	–	2
P 2	lubelskie	4	4	–	4
P 3	lubelskie	1	1	–	1
P 4	lubelskie	1	1	–	1
P 5	lubelskie	3	3	–	2
P 6	łódzkie	3	3	–	–
P 7	lubelskie	2	2	–	–
P 8	pomorskie	3	3	–	–
P 9	mazowieckie	1	1	–	–
P 10	mazowieckie	5	5	–	–
P 11	wielkopolskie	3	3	–	1
P 12	wielkopolskie	3	3	–	–
P 13	wielkopolskie	4	4	–	2
P 14	wielkopolskie	2	2	–	1
P 15	lubelskie	2	2	–	2
Razem		39	39	–	16



Ryc. 2. Obraz elektroforezy produktów PCR szczepów *Cl. perfringens*

Objaśnienia: M – wzorzec masy molekularnej; ścieżki 1-7 – szczepy kontrolne, 1 – typu A (gen toksyny α), 2 – typu B (geny toksyn α , β , ϵ), 3 – typu C (geny toksyn α , β), 4 – typu D (geny toksyn α , ϵ), 5 – typu E (geny toksyn α , ι), 6 – typu A z genem enterotoksyny (geny toksyn α i enterotoksyny), 7 – typu A z genem toksyny β 2 (geny toksyn α , β 2); 8 – kontrola negatywna; 9-16 – szczepy terenowe wykazujące obecność genu toksyny α oraz (na ścieżkach 9, 10, 11, 12, 14) genu toksyny β 2

wywoływanym przez *Escherichia coli* oraz *Cl. perfringens* typ C.

Innym czynnikiem, związanym bardziej z technicznymi aspektami izolacji *Cl. perfringens*, jest występowanie kodującego toksynę β genu *cpb* na plazmidzie. Warunkuje to znaczne prawdopodobieństwo utraty wspomnianego genu w trakcie pasażowania na podłożach mikrobiologicznych. Chociaż w trakcie izolacji z materiału terenowego liczbę pasaży przed zastosowaniem metody PCR ograniczono do niezbędnego minimum, nie można wykluczyć wpływu wspomnianego czynnika na skuteczność wykrywania niosących gen *cpb* szczepów typu C lub B.

W badaniach przeglądowych stad świń szczepy *Cl. perfringens* typu C izolowane są rzadziej niż szczepy typu A (6, 7, 28, 30). Wynika to, między innymi, z faktu, że *Cl. perfringens* typu A wchodzi w skład normalnej flory przewodu pokarmowego tych zwierząt. Prezentowane w ostatnich latach przez autorów z wielu krajów wyniki badań coraz częściej wydają się wskazywać na istotną rolę szczepów *Cl. perfringens* typu A w etiologii zakażeń przewodu pokarmowego świń (1, 3, 7, 11, 15, 19, 26, 30). Jedną z zasadniczych przyczyn tego stanu może być brak szczepionek dla świń umożliwiających profilaktykę zakażeń wywoływanych przez *Cl. perfringens* typ A.

Badania metodą PCR nie wykazały występowania genu enterotoksyny (*cpe*) u żadnego z badanych szczepów terenowych. Dane z piśmiennictwa wskazują, że rozpowszechnienie szczepów niosących *cpe* lub wykazujących zdolność wytwarzania CPE bywa wśród prosiąt zróżnicowane i waha się od 0% do około 25% pozyskiwanych izolatów (4, 10, 19, 27). W przeciwieństwie do szczepów *Cl. perfringens* izolowanych od

ludzi, gdzie *cpe* zlokalizowany jest zwykle na chromosomie u izolatów pochodzących od zwierząt, wymieniony gen ulokowany jest częściej na plazmidzie (8, 25). Może to, podobnie jak w przypadku genu *cpb*, wpływać na obniżenie liczby identyfikowanych szczepów *cpe* +.

U ponad 41% wyizolowanych w badaniach szczepów stwierdzono obecność genu *cpb2* kodującego toksynę β 2. Prowadzone w ostatnich latach badania wykazały, że *cpb2* może występować u szczepów należących do różnych typów toksycznych *Cl. perfringens*. Obecność wspomnianego genu stwierdzano m.in. u izolatów pochodzących z próbek materiału pozyskiwanych od koni (14), bydła i małych przeżuwaczy (11, 13, 20). Od świń szczepy takie izolowane są częściej niż od innych gatunków zwierząt (3). Gen *cpb2* wykrywano zarówno u izolatów należących do typu tok-

sycznego A, jak i typu C (3, 12, 19, 26, 30). Klaasen i wsp. (19) w badaniach 44 prosiąt z objawami biegunki pochodzących z 18 ferm wyizolowali od 18 (41%) z nich szczepy *Cl. perfringens* wykazujące obecność genu *plc* kodującego toksynę α oraz genu *cpb2*. Prowadzone przez Watersa i wsp. (30) badania 21 szczepów *Cl. perfringens* typu A izolowanych od prosiąt z biegunką wykazały obecność *cpb2* u 20 z nich. W innych badaniach amerykańscy autorzy (3), badając kilkadziesiąt szczepów typu A izolowanych od prosiąt z biegunką, stwierdzili występowanie *cpb2* u prawie 91% z nich. Oba wspomniane zespoły (3, 30) wykazały również występowanie *cpb2* u szczepów typu A izolowanych od świń nie wykazujących objawów chorobowych. Ich liczba była jednak niższa.

W odniesieniu do wyników badań własnych należy zwrócić uwagę, że wyizolowane szczepy wykazujące obecność *cpb2* pochodziły z przypadków o zróżnicowanym przebiegu i obrazie zmian patologicznych. Szczepy z ferm P 1, P 3 i P 4 pozyskano z przypadków o przebiegu ostrym. Szczep z fermy P 3 izolowano ze zmian krwotoczno-martwicowych błony śluzowej jelita czczego, a szczep z fermy P 4 – ze zmian zapalnych o charakterze krwotocznym bez martwicy. W fermach P 7, P 13 i P 14 omawiane szczepy wyizolowano ze zmian zapalnych o charakterze śluzowym. Izolaty *cpb2* + z ferm P 2 i P 5, a również jeden z izolatów z fermy P 14 wyosobniono z wymazów lub próbek kału o konsystencji od wodnistej do pastawatej.

Zastosowana do typowania szczepów *Cl. perfringens* metoda PCR wykorzystywana może być do badań szczepów wyizolowanych metodami mikrobiologicznymi. Użycie PCR do bezpośredniego wykry-

wania poszczególnych typów toksycznych *Cl. perfringens* w próbkach materiału klinicznego nie jest, jak dotąd, rutynowo stosowane. Wprowadzenie PCR pozwoliło na szybkie i precyzyjne typowanie omawianych drobnoustrojów. Wykorzystanie tej metody stwarza również możliwość rezygnacji z badań na zwierzętach laboratoryjnych.

Wyniki przeprowadzonych badań terenowych wykazały występowanie w pozyskanym materiale szczepów *Cl. perfringens* typu A. Zwraca uwagę fakt, że z materiału klinicznego o różnicowanym stopniu zaawansowania zmian patologicznych izolowano szczepy wykazujące obecność genu kodującego toksynę β_2 . Uzyskane wyniki mogą wskazywać na ograniczone występowanie zakażeń *Cl. perfringens* typu C w populacji świń. Wydają się one również skłaniać do weryfikacji poglądów na temat znaczenia zakażeń wywoływanych przez *Cl. perfringens* typu A u tego gatunku zwierząt. Powyższe przesłanki wskazują też na potrzebę prowadzenia badań nad opracowaniem metod zwalczania, a w szczególności profilaktyki swoistej zakażeń wywoływanych przez *Cl. perfringens* typu A u świń.

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.
- Baums C. G., Schotte U., Amtsberg G., Goethe R.: Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of Clostridium perfringens isolates. Vet. Microbiol. 2004, 100, 11-16.
- 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.
- Collins J. E., Bergeland M. E., Bouley D., Doucommun A. L., Francis D. H., Yeske P.: Diarrhea associated with Clostridium perfringens type A enterotoxin in neonatal pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 1989, 1, 351-353.
- Cygan Z.: Właściwości, mechanizm działania i rola chorobotwórcza toksyny alfa C. perfringens. Medycyna Wet. 1997, 53, 73-76.
- Cygan Z. M.: Choroby beztlenowcowe zwierząt. Wydawnictwo Pol-Druk, Kraków 1999.
- Czanderlova L., Lány P., Hložek P., Žižlavský M.: Clostridium perfringens genotyping in suckling piglets: benefits for practice. Proc. 18th IPVS Congress, Hamburg 2004, 1, 296.
- Czczulin J., Colie R. E., McClane B. A.: Regulated expression of Clostridium perfringens enterotoxin in naturally cpe-negative type A, B and C isolates of Clostridium perfringens. Infect. Immun. 1996, 64, 3301-3309.
- Czczulin J., Hanna P. C., McClane B. A.: Cloning, nucleotide sequencing, and expression of the Clostridium perfringens enterotoxin gene in Escherichia coli. Infect. Immun. 1993, 61, 3429-3439.
- Damme-Jongsten M. Van, Haagsma J., Notermans S.: Testing strains of Clostridium perfringens type A isolated from diarrhoeic piglets for the presence of enterotoxin gene. Vet. Rec. 1990, 126, 191-192.
- Garmory H. S., Chanter N., French N. P., Bueschel D., Songer J. D., Tibball R. W.: Occurrence of Clostridium perfringens β_2 -toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. Epidemiol. Infect. 2000, 124, 61-67.
- Gibert M., Jolivet-Reynaud C., Popoff M.: Beta2 toxin, a novel toxin produced by Clostridium perfringens. Gene 1997, 203, 65-73.
- Gkiourtzidis K., Frey J., Bourti-Hatzopoulou E., Iliadis N., Sarris K.: PCR detection and prevalence of α -, β -, β_2 -, ϵ -, τ -, and enterotoxin-genes in Clostridium perfringens isolated from lambs with clostridial dysentery. Vet. Microbiol. 2001, 82, 39-43.
- Herholz C., Miserez R., Nicolet J., Frey J., Popoff M., Gibert M., Straub R.: Prevalence of β_2 -toxigenic Clostridium perfringens in horses with intestinal disorders. J. Clin. Microbiol. 1999, 37, 358-361.
- Holmgren N., Blverud V., Lindberg A., Linder A.: Clostridium perfringens type A from indoor and outdoor sows and piglets. Proc. 19th IPVS Congress, Copenhagen 2006, Vol. 2, s. 322.
- Hunter S. E. C., Brown E., Oyston P. C. F., Sakurai J., Tibball R. W.: Molecular genetic analysis of beta-toxin of Clostridium perfringens reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of Staphylococcus aureus. Infect. Immun. 1993, 61, 3958-3965.
- Hunter S. E. C., Clarke I. N., Kelly D. C., Tibball R. W.: Cloning and nucleotide sequencing of Clostridium perfringens epsilon-toxin gene and its expression in Escherichia coli. Infect. Immun. 1992, 60, 102-110.
- Jabłoński L.: Podstawy mikrobiologii lekarskiej. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1986.
- Klaasen 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., Mainil J. G.: A role for the Clostridium perfringens β_2 toxin in bovine enterotoxaemia? Vet. Microbiol. 2002, 86, 191-202.
- Møller C., Ahrens P.: Comparison of toxicity neutralization-, ELISA- and PCR tests for typing of Clostridium perfringens and detection of enterotoxin gene by PCR. Anaerobe 1996, 2, 103-110.
- Pejsak Z.: Choroby świń. Polskie Wydawnictwo Rolnicze, Poznań 2002.
- Perelle S., Gibert M., Boquet P., Popoff M. R.: Characterization of Clostridium perfringens iota-toxin genes and expression in Escherichia coli. Infect. Immun. 1993, 61, 5147-5156.
- Quin P. J., Carter M. E., Markey B. K., Carter G. R.: Clinical veterinary microbiology. Mosby International Limited, London 2000.
- Rood J. I., Cole S. T.: Molecular genetics and pathogenesis of Clostridium perfringens. Microbiol. Rev. 1991, 55, 621-648.
- 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.
- Songer J. G.: Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin. Microbiol. Rev. 1996, 9, 216-234.
- Songer J. G., Taylor D. J.: Clostridial infections, [in:] Straw B. E., Zimmerman J. J., D'Allaire S., Taylor D. J. (red.): Diseases of Swine, 9th Edition. Blackwell Publishing/Iowa State University Press, Ames, Iowa 2006, 613-627.
- Tibball R. W., Hunter S. E., Martin K. L., Morris B. C., Shuttleworth A. D., Rubidge T., Anderson D. W., Kelly D. C.: Molecular cloning and nucleotide sequence of the alpha-toxin (phospholipase C) of Clostridium perfringens. Infect. Immun. 1989, 57, 367-376.
- Waters M., Savoie A., Garmory H. S., Bueschel D., Popoff M. R., Songer J. G., Tibball R. W., McClane B. A., Sarker M. R.: Genotyping and phenotyping of Beta2-toxigenic Clostridium perfringens fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets. J. Clin. Microbiol. 2003, 41, 3584-3591.

Adres autora: dr Bernard Wasiński, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: wasinski@piwet.pulawy.pl