

Joanna Kądziała<sup>1\*</sup>, Piotr Obuch-Woszczatyński<sup>1</sup>, Hanna Pituch<sup>1</sup>, Grażyna Młynarczyk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

Wpłynęło w czerwcu 2011 r.

1. Wstęp. 2. Enterotoksyna *Clostridium perfringens* (CPE). 2.1. Budowa enterotoksyny. 2.2. Molekularne podstawy toksynotwórczości szczepów *C. perfringens* typu A. 2.3. Mechanizm działania enterotoksyny *C. perfringens* (CPE). 3. Sporulacja *C. perfringens*. 4. Biegunka poantybiotykowa o etiologii *C. perfringens*. 5. Diagnostyka biegunki o etiologii *C. perfringens* typu A. 6. Nowe czynniki zjadliwości *C. perfringens* typu A. 7. Podsumowanie

#### ***Clostridium perfringens* as the etiological agent of antibiotic associated diarrhoea**

**Abstract:** *Clostridium perfringens* strains are classified into one of five types (A-E) based on their ability to produce four major toxins:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\iota$ . *C. perfringens* strains belonging to biotype A may cause gas gangrene and different gastrointestinal infections such as antibiotic-associated diarrhoea (AAD), sporadic diarrhoea (SD), necrotizing enterocolitis and food poisoning. The major role in the pathogenesis of *C. perfringens* diarrhoea plays the enterotoxin (CPE). Presented review describes structure, mechanism of action and molecular background of *C. perfringens* enterotoxin (CPE). Mechanism of *C. perfringens* type A sporulation and its importance in causing case of diarrhoea is described. In addition literature reports of cases of AAD and sporadic diarrhoea, risk groups and available diagnostic methods are discussed. Special attention is paid to new virulence factors produced by *C. perfringens* such as beta2 toxin ( $\beta_2$ ), isolated from AAD cases, and its possible influence on clinical picture of the disease.

1. Introduction. 2. *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE). 2.1. Structure of enterotoxin. 2.2. Molecular background of toxicity of *C. perfringens* type A strains. 2.3. Mechanism of action of *C. perfringens* enterotoxin (CPE). 3. Sporulation of *C. perfringens*. 4. Antibiotic-associated diarrhoea caused by *C. perfringens*. 5. Diagnosis of diarrhoea caused by *C. perfringens* type A. 6. New virulence factors of *C. perfringens* type A. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** beta2 toksyna, biegunka poantybiotykowa, biegunka sporadyczna, enterotoksyna (CPE), sporulacja, zatrucie pokarmowe *C. perfringens*

**Key words:** beta2 toxin, antibiotic-associated diarrhoea, sporadic diarrhoea, enterotoxin (CPE), sporulation, *C. perfringens* food poisoning

## 1. Wstęp

*Clostridium perfringens* (dawniej *Bacillus aerogenes capsulatus*) jest Gram-dodatnią, ściśle beztlenową, przetrwalnikującą laseczką opisaną po raz pierwszy w 1892 roku. Od tego czasu drobnoustrój ten zaczęto postrzegać jako ważny patogen wywołujący wiele schorzeń u ludzi i zwierząt [71, 91]. *C. perfringens* występuje powszechnie w glebie i ściekach oraz w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt [41, 56, 57, 60, 63, 71, 72]. Wśród zdrowych osób odsetek nosicieli szczepów *C. perfringens* wynosi od 6 do 31% [72]. Szczególnie nosicielstwo obserwuje się u osób w podeszłym wieku [5, 7, 12, 17, 30, 36], a także u pracowników zatrudnionych przy produkcji i dystrybucji żywności [12, 26], którzy też mogą stanowić ważny jego rezerwuuar [41]. Zdolność *C. perfringens* do przeżywania w różnych środowiskach związana jest z wytwarzaniem bakteriocyn oraz licznych enzymów takich jak: dysmutaza nadtlenkowa, reduktaza siarczkowa, peroksydaza, a także deiminaza argininowa, która odgrywa istotną rolę w adaptacji do kwaśnego

środowiska przewodu pokarmowego, przekształcając argininę do amoniaku [56].

Szczepy należące do gatunku *C. perfringens* podzielono na 5 toksynotypów/biotypów (A-E) na podstawie zróżnicowanych zdolności do wytwarzania czterech toksyn takich jak: toksyna alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ) i jota ( $\iota$ ) [16, 24, 41, 51, 52, 56, 60]. Każdy z toksynotypów jest związany z inną jednostką chorobową u ludzi lub u zwierząt [63, 69, 71, 74, 75, 91].

Szczepy należące do gatunku *C. perfringens* typu A wytwarzają duże ilości toksyny alfa ( $\alpha$ ), a także toksynę theta ( $\theta$ ) czyli perfringolizynę O (PFO). Niektóre z nich mogą wytwarzać również enterotoksynę (CPE) oraz toksynę beta2 ( $\beta_2$ , CBP2) [16, 26, 71]. Szczepy *C. perfringens* należące do toksynotypu A, które wytwarzają toksynę  $\alpha$ , a także perfringolizynę O oraz szereg enzymów proteolitycznych, wywołują u ludzi zgorzel gazową [60, 63, 71, 75]. Szczepy, które dodatkowo posiadają zdolność wytwarzania enterotoksyny (CPE) powodują zatrucia pokarmowe, biegunkę poantybiotykową (antibiotic associated diarrhoea – AAD) oraz tzw. biegunki

\* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; e-mail: joanna.kadzielska@wum.edu.pl

sporadyczne (sporadic diarrhoea – SD) [6, 7, 12, 16, 18, 19, 24, 26, 51, 52, 63, 71]. Do innych patogenów związanych z przypadkami AAD lub SD należą *Clostridium difficile* (10–25% przypadków), *Klebsiella oxytoca*, enterotoksynotwórcze szczepy *Staphylococcus aureus* i grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida* [1, 2, 4, 20, 21, 23, 28, 66, 73].

W piśmiennictwie opisano pojedyncze przypadki martwiczego zapalenia jelit o etiologii *C. perfringens* typ A – często śmiertelnego schorzenia, zazwyczaj powodowanego przez szczepy należące do toksynotypu C *C. perfringens*, które wytwarzają beta-toksynę [18, 72, 74].

Ocenia się, że tylko 5 do 6% izolatów *C. perfringens*, głównie typu A, wytwarza enterotoksynę (CPE+). Zatrucie pokarmowe wywoływane przez szczepy CPE+ jest jednym z najczęściej występujących schorzeń związanych z konsumpcją żywności. Objawy ostrej biegunki i bóle brzucha występują zwykle po 8 do 24 godzin od spożycia skażonych produktów [6, 60]. Do grupy podwyższonego ryzyka należą osoby starsze oraz chorzy z obniżoną odpornością. Ocenia się, że z powodu tego schorzenia umiera rocznie około 7 osób w USA i około 50–100 w Wielkiej Brytanii, gdzie notuje się 85 000 przypadków zatruc pokarmowych każdego roku [42, 43, 74, 83]. W USA drobnoustrój ten znajduje się na 3 miejscu jako czynnik powodujący zatrucia pokarmowe i szacuje się, że rocznie około 250 000 przypadków zatruc pokarmowych powodują szczepy *C. perfringens* typu A [9, 14, 41–43, 46, 47, 52, 74–76, 83]. Źródłem zakażeń w 90% przypadków jest wołowina, drób oraz przetwory mięsne [46, 63, 68, 74, 75, 83, 89]. W związku z zaprzestaniem stosowania antybiotyków w hodowli drobiu w Europie, notuje się u tych zwierząt większą liczbę przypadków martwiczego zapalenia jelit o etiologii *C. perfringens* typu A. Wystąpieniu choroby sprzyja nieodpowiednia dieta. Drobnoustrój izoluje się ze środowiska fermy i z około 80% próbek pobranych z przewodu pokarmowego kurcząt. Szczepy *C. perfringens* typu A można izolować z woreczka żółciowego i wątroby ptaków [89], co stanowi podwyższone ryzyko transmisji tych patogenów na człowieka po spożyciu skażonej żywności [75, 83, 88]. Szczególnie dotyczy to produktów ogrzewanych, schładzanych powoli i następnie mrożonych i potem nieodpowiednio podgrzanych [63, 83, 88]. W USA wyizolowano szczepy CPE+ z około 1,4% próbek produktów spożywczych (kurczaki, wieprzowina) oraz z 6% próbek kału pobranych od pracowników zajmujących się technologią żywności [12, 26, 41, 74, 84]. Enterotoksynotwórcze szczepy *C. perfringens* typu A izolowano z innych źródeł takich jak próbki pochodzące od: bydła (22%), koni (14%), psów (2%), małży (12%) czy próbki wody (10%) [75]. Przypadki zatruc pokarmowych o etiologii *C. perfringens* opisano już 70 lat temu, natomiast przypadki biegunek poantybiotykowych o etiologii *C. perfringens* CPE+ opisano dopiero w 1984 roku [4,

6, 63]. Obecnie uważa się, że szczepy CPE+ odpowiadają za około 5–20% przypadków biegunki poantybiotykowej [9, 14, 42, 52, 69, 76].

## 2. Enterotoksyna *C. perfringens* (CPE)

### 2.1. Budowa enterotoksyny

Enterotoksynę *C. perfringens* opisano po raz pierwszy w 1970 roku [69]. Jest białkiem złożonym z 319 aminokwasów (35,3 kDa) o unikalnej sekwencji i nie wykazuje dużej homologii z innymi toksynami bakteryjnymi [46, 47, 65, 69, 74]. Wykazano jedynie niewielką homologię z białkiem Antp70/C1 wytwarzanym przez niektóre szczepy *C. botulinum* [46]. N-końcowy fragment białka enterotoksyny zlokalizowany pomiędzy 45 a 53 aminokwasem, odpowiada za aktywność biologiczną tego białka. Proteazy jelitowe takie jak chymotrypsyna i trypsyna mogą trawić zewnętrzny fragment N-końcowego odcinka do 38 aminokwasu, co zwiększa 2–3-krotnie aktywność biologiczną tego białka *in vitro*. Przypuszcza się, że podobny mechanizm zachodzi *in vivo* w przewodzie pokarmowym. C-końcowy fragment zawiera region wiążący się z receptorem komórki enterocyta [46, 47, 65, 69, 75].

### 2.2. Molekularne podstawy toksynotwórczości szczepów *C. perfringens* typu A

Laseczka *C. perfringens* była pierwszą bakterią Gram-dodatnią, dla której skonstruowano mapę genetyczną. Dotychczas określono położenie dla 24 regionów genów na pojedynczym, kolistym chromosomie o wielkości 3,6 Mbp. Geny kodujące toksyny *C. perfringens* ulokowane są w rejonie o wielkości 250 kbp, mieszczącym się w pobliżu *oriC*.

Gen *cpe* kodujący enterotoksynę położony jest na transpozonie (Tn5565 o wielkości 6,3 kbp) obok sekwencji insercyjnej IS1469. Na obu końcach transpozonu Tn5565 znajdują się sekwencje insercyjne IS1470 [7, 9, 16, 46, 47, 51, 65]. Odkryto również, że gen *cpe* może być zlokalizowany na plazmidach (~75 kbp), które nazwano *cpe+/IS1151+* oraz *cpe+/IS1470-like+*, ponieważ obok genu *cpe* znajdują się sekwencje insercyjne odpowiednio IS1151 i IS1470-like. Każdy plazmid zawiera też drugą sekwencję insercyjną IS1469 [19, 46, 51, 52, 60, 65, 71, 76].

Większość zatruc pokarmowych (ok. 75%) wywołują szczepy *C. perfringens* typu A niosące gen *cpe* na chromosomie (chromosomal IS1470-*cpe*). W około 21% przypadkach mogą to być szczepy niosące plazmid *cpe+/IS1470-like+* a w 4% przypadkach są to szczepy zawierające plazmid *cpe+/IS1151+* [8, 38, 42, 46, 52, 57, 78, 79]. Szczepy, które mają gen *cpe* na chromosomie często izoluje się z żywności a także od zdrowych ludzi, co prawdopodobnie jest przyczyną znacznego udziału

tych szczepów w zatruciach pokarmowych [12, 16, 38, 41, 42, 51]. Szczepy, w których gen *cpe* znajduje się na plazmidzie izoluje się z próbek gleby [41]. Szczepy takie częściej izoluje się z próbek kału pobranych od chorych z biegunką poantybiotykową lub z tzw. biegunką sporadyczną (prawdopodobnie nie związaną ze spożyciem żywności) niż szczepy posiadające gen *cpe* położony na chromosomie [16, 41, 46, 51].

Plazmidy *C. perfringens* mogą być przekazywane w procesie koniugacji do szczepów *cpe*- [9, 26, 69, 76]. Ponieważ dawka zakaźna bakterii w przypadku biegunki poantybiotykowej lub sporadycznej może być niewielka (w porównaniu do wysokiej dawki  $10^6$ – $10^7$ /ml komórek *C. perfringens* w przypadku zatrucia pokarmowego) przypuszcza się, że plazmid może być przekazywany w przewodzie pokarmowym do innych szczepów *C. perfringens*, obecnych jako składnik normalnej mikroflory jelita grubego, co przyczynia się do zwielokrotnienia zjadliwości. Biegunki poantybiotykowe i sporadyczne wywołane przez szczepy *C. perfringens* typu A zwykle trwają dłużej i mają cięższy przebieg niż biegunki towarzyszące zatruciu pokarmowemu o tej samej etiologii [9, 26, 46, 69].

### 2.3. Mechanizm działania enterotoksyny *C. perfringens* (CPE)

Badania na modelach zwierzęcych oraz ludzkich komórkach nabłonka CaCo-2, I407 i Hep3b prowadzone *in vitro* dowiodły, że enterotoksyna *C. perfringens* ma działanie cytotoksyczne [14, 46, 50, 69]. Największą aktywność wykazuje w obrębie jelita krętego [46, 50, 69]. Duża dawka toksyny w ciągu 30 minut inicjuje zmiany histopatologiczne, które początkowo obejmują mikrokosmki, a następnie stopniowo zostaje zaburzone wchłanianie płynów i elektrolitów. W pierwszej fazie dochodzi do zahamowania absorpcji, a następnie na skutek zatarcia mikrokosmków i złuszczenia komórek nabłonka dochodzi do kumulacji płynów i elektrolitów w jelicie cienkim, co manifestuje się biegunką [46, 69]. Enterotoksyna CPE działa w sposób unikatowy i wieloetapowy [46, 69, 74, 75].

**Etap 1.** Enterotoksyna (CPE) przyłącza się do receptorów. Są nimi małe białka (około 22 kDa) obecne w połączeniach międzykomórkowych: klaudyna-3 i klaudyna-4 [35, 46, 69, 74, 84]. W połączeniu z drugą zewnętrzną pętlą klaudyny-3, a receptorem rejonem enterotoksyny uczestniczącą oddziaływania elektrostatyczne [35, 86]. Wraz z tymi receptorami CPE tworzy mały kompleks o masie cząsteczkowej 90 kDa, wrażliwy na SDS (dodecylsulfian sodu) [46, 47, 69].

**Etap 2.** Podczas wzrostu temperatury do 37°C mały kompleks (w temperaturze 4°C jest on całkowicie nie-

aktywny) przyłącza inne białka i tworzy duży kompleks CPE o masie cząsteczkowej 155 kDa [46, 47, 69].

**Etap 3.** Prawdopodobnie duży kompleks lub jego oligomery tworzą pory w błonie komórkowej przepuszczalne dla  $Ca^{2+}$ , innych jonów, aminokwasów i nukleotydów [14, 46, 47, 69]. Małe dawki (1 µg/ml) enterotoksyny prowadzą do umiarkowanego napływu jonów wapnia i apoptozy komórek na drodze klasycznej, z udziałem mitochondriów i kaspazy-3. Duże dawki (10 µg/ml) enterotoksyny powodują duży napływ jonów wapnia do komórki, co powoduje jej śmierć na drodze onkozy [14, 46, 47, 64]. W przewodzie pokarmowym człowieka na skutek zatrucia pokarmowego czy biegunki poantybiotykowej oba procesy mogą zachodzić jednocześnie [47].

**Etap 4.** Obie drogi degradacji komórek za pośrednictwem kalpajny i kalmomoduliny prowadzą do zmian morfologicznych [46, 47, 68]. Enterotoksyna przyłącza się następnie do nowych receptorów klaudynowych obecnych w części boczno-podstawnej i tworzy więcej dużych (155 kDa) kompleksów [46, 47, 69].

**Etap 5.** Duże kompleksy łączą się z okludyną i tworzą kompleksy o wielkości ~200 kDa [46, 69].

**Etap 6.** Kompleksy o wielkości ~200 kDa wnikają do wnętrza komórki i uszkodzane są w niej liczne połączenia międzykomórkowe, co prowadzi do zwiększonej przepuszczalności. Duże dawki CPE niszczą enterocyty na drodze onkozy i rozwija się stan zapalny, co prowadzi do biegunki i innych objawów towarzyszących [46, 47].

### 3. Sporulacja *C. perfringens*

Synteza enterotoksyny rozpoczyna się kiedy komórka wegetatywna zaczyna przechodzić w fazę sporulacji. Enterotoksyna uwalniana jest w przewodzie pokarmowym w trakcie lizy komórki wegetatywnej i uwalniania przetrwalników. Proces sporulacji kontroluje sygnał ze środowiska, którym jest stężenie nieorganicznego fosforu [56–60, 70, 71]. Synteza CPE zachodzi w komórce macierzystej tworzącej przetrwalnik i zależy od białka regulatorowego Spo0A, które jest bezpośrednio fosforylowane przez kinazę histydynową [29, 56, 59]. Ekspresja genu *cpe* jest regulowana na poziomie transkrypcji. Gen *cpe* jest transkrybowany z udziałem 3 promotorów (P1, P2, P3). Czynniki sigma K reguluje P1, natomiast sigma E reguluje P2 i P3 [25, 46, 59, 60, 65]. W fazie logarytmicznej i początkowej fazie stacjonarnej, niski poziom sigma K jest potrzebny do nieznanego, początkowego etapu tworzenia przetrwalnika, następnie czynnik sigma E jest wydzielany pod wpływem czynnika sigma K a wzajemne oddziaływanie obu czynników

sigma wpływa na ich wysoki poziom w późniejszej fazie sporulacji [24]. Syntezę czynników sigma (Sig E, Sig K) reguluje białko represorowe CcpA (carbon catabolite protein). Białko to działa jak represor na transkrypcję genu *cpe* w fazie intensywnego wzrostu komórek, ale jest niezbędne w procesie sporulacji i transkrypcji *cpe* w momencie wejścia w fazę stacjonarną [8, 59, 90]. Niezależnie od białka CcpA również glukoza jest katabolizującym represorem procesu sporulacji [90]. Tak unikalny sposób kontroli procesu pozwala komórkom *C. perfringens* szybko wytworzyć spory w odpowiednich warunkach środowiska [25]. Szczepy posiadające gen *cpe* na chromosomie, tworzą spory mniej wrażliwe na działanie wysokiej i niskiej temperatury niż szczepy z plazmidowym genem *cpe* [40, 42, 43, 46, 49, 57, 58, 63, 64, 70, 74], co tłumaczy znaczny ich udział w zatruciach pokarmowych. Ponadto są one bardziej odporne na działanie środków konserwujących, dodawanych do żywności [39]. Odporne na temperaturę przetrwalniki tworzone przez *C. perfringens* z chromosomalnym genem enterotoksyny posiadają więcej jonów metali, szczególnie  $Fe^{2+}$  oraz wyższe stężenie kwasu dipikolinowego (DPA) oraz grubszą ścianę [58], a także mniejszą zawartość wody [59]. We wnętrzu przetrwalnika DNA bakterii chroni grupa małych, rozpuszczalnych w kwasie, białek SASP typu  $\alpha/\beta$  ( $\alpha/\beta$ -type small, acid-soluble spore proteins), które są syntetyzowane w czasie dojrzewania spory i degradowane w czasie uwalniania jej z komórki. U *C. perfringens* kodowane są one przez geny *ssp* (*ssp* 1, 2 i 3). Białka SASP zwiększają odporność przetrwalników na parę wodną i promieniowanie UV [43, 59, 70]. Odkryto niedawno czwarte białko Ssp4, które różni się jednym aminokwasem, w zależności od źródła pochodzenia izolatu *C. perfringens*. Szczepy tworzące wysoce odporne spory, izolowane z zatruc pokarmowych, posiadają białko Ssp4 z kwasem asparaginowym w pozycji 36, natomiast u szczepów pochodzących z przypadków biegunki poantybiotykowej, których przetrwalniki są bardziej wrażliwe, białko Ssp4 w pozycji 36 posiada glicynę [42, 43, 59, 70]. Proces sporulacji, zależna od niego synteza enterotoksyny oraz wysoka oporność przetrwalników na temperaturę to podstawowe elementy patogeny schorzeń wywołanych przez szczepy *C. perfringens* typu A, odpowiadające za zakażenia przewodu pokarmowego i zatrucia pokarmowe [59].

#### 4. Biegunka poantybiotykowa o etiologii *C. perfringens*

Biegunka, to zgodnie z definicją, oddanie 2–3 luźnych, półpłynnych lub wodnistych stolców w ciągu doby [4, 11, 37, 45, 77]. Jest ona częstym, niepożądanym objawem po zastosowaniu antybiotyków, a w szczególności klindamycyny, cefalosporyn, penicylin o szer-

kim spektrum działania jak też makrolidów [11, 45, 77]. Biegunka poantybiotykowa (AAD) określana jest jako biegunka, która rozwija się w ciągu kilku godzin od wdrożenia terapii antybiotykowej aż do 6–8 tygodni po jej zaprzestaniu [4]. Dotyczy ona zwykle 5–39% pacjentów, w zależności od stosowanego leczenia [11, 23, 37, 53, 77]. Do czynników ryzyka należą podeszły wiek pacjenta [3, 23, 30, 36, 53, 54, 77, 85], przedłużony pobyt w szpitalu [3, 36, 77, 85], zabiegi endoskopowe, operacje jamy brzusznej, lewatywa [2], a także przewlekłe choroby nerek, cukrzyca, nowotwory, szczególnie gdy wymienione czynniki wzajemnie współistnieją [77, 85]. Stosowanie antybiotyków o szerokim spektrum działania prowadzi do zmian jakościowych i ilościowych składu naturalnej mikroflory przewodu pokarmowego [4, 15, 23, 77], co z kolei wpływa negatywnie na metabolizm krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych i soli kwasów żółciowych [4, 77] oraz kolonizację przewodu pokarmowego przez szczepy odporne na antybiotyki [4, 23, 77].

*Clostridium difficile* odpowiada za 10–20% przypadków AAD [4, 45], a według niektórych źródeł może stanowić 25% [20] lub nawet 33% [2] przypadków. Szacuje się że enterotoksynotwórcze szczepy *C. perfringens* (CPE+) wywołują biegunkę AAD w 5–20% zachorowań [2, 3, 15, 21, 28, 32, 44, 45, 82, 86] lub niekiedy mogą stanowić zaledwie 1% przypadków [1, 61]. Natomiast w 70–80% przypadków czynnik etiologiczny biegunki AAD pozostaje nierozpoznany [45, 53]. Przypadki biegunki poantybiotykowej o etiologii *C. perfringens* CPE+ opisano dopiero w 1984 roku. W próbkach kału 11 pacjentów z ujemnym wynikiem w kierunku toksyn *C. difficile*, wykazano obecność enterotoksyny *C. perfringens* [3, 4, 6, 28, 53, 63, 73]. Pacjenci podlegali hospitalizacji i byli w podeszłym wieku, co stanowi szczególne ryzyko kolonizacji przewodu pokarmowego laseczkami z rodzaju *Clostridium* spp. [17, 30, 54]. U tej grupy pacjentów opisuje się też przypadki biegunki sporadycznej o etiologii CPE+ [17, 23, 36, 53, 55]. Udowodniono, że krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, produkowane przez naturalną mikroflorę, hamują proces sporulacji *C. perfringens*. Antybiotykoterapia prowadząca do zmniejszenia się kwasu bursztynowego, octowego, izomasłowego, izowalerianowego w jelicie pacjenta może stać się czynnikiem predysponującym do rozwoju biegunki o etiologii *C. perfringens* (CPE+) [86].

W tabeli I zestawiono wyniki badań w kierunku enterotoksynotwórczych szczepów *C. perfringens* (CPE+) próbek kału pobranych od pacjentów z biegunką poantybiotykową (AAD) i biegunką sporadyczną. Możemy zaobserwować różnice w częstości wykrywania enterotoksyny *C. perfringens*. Wykazano, że u pacjentów w podeszłym wieku, leczonych na oddziałach gastroenterologicznych, należących do grup ryzyka, szczepy CPE+ mogą stanowić bardzo istotny czynnik etiolo-

Tabela I  
Częstość występowania enterotoksyny (CPE) i szczepów *C. perfringens* w próbkach kału pacjentów z biegunką poantybiotykową lub biegunką sporadyczną oznaczona w różnych krajach

| Kraj/Rok             | N    | CPE (%) | n    | Piśmiennictwo |
|----------------------|------|---------|------|---------------|
| Wielka Brytania/1991 | 721  | 25      | 3,5  | [67]          |
| Wielka Brytania/1995 | 370  | 99      | 18,0 | [55]          |
| Wielka Brytania/2002 | 200  | 12      | 8,0  | [3]           |
| Wielka Brytania/2002 | 249  | x       | 1,6  | [13]          |
| Wielka Brytania/2003 | 843  | x       | 2,3  | [21]          |
| Niemcy/2005          | 89   | 5       | 1,0  | [1]           |
| Wielka Brytania/2005 | 63   | x       | 9,5  | [45]          |
| Niemcy/2005          | 693  | 147     | 0,14 | [28]          |
| Indie/2005           | 285  | x       | 8,77 | [87]          |
| Indie/2006           | 100  | 20      | 1,0  | [33]          |
| Indie/2006           | 150  | 13      | 2,6  | [32]          |
| Wielka Brytania/2006 | 4659 | 130     | 3,3  | [2]           |
| Polska/2007          | 52   | 15      | 40,0 | [61]          |
| Japonia/2008         | 294  | 70      | 2,0  | [82]          |
| Kostaryka/2008       | 104  | 29      | 3,0  | [11]          |

N – liczba pacjentów = liczba próbek, n – liczba próbek kału, z których wyhodowano *C. perfringens*, x – nie oznaczano, CPE – odsetek próbek kału dodatnich w kierunku enterotoksyny *C. perfringens* (CPE+)

giczny biegunki AAD (40%) [61]. Dodatkowo u 31% pacjentów wykryto jednocześnie toksyny *C. difficile* i *C. perfringens* w kale. M p a m u g o i wsp. [55] również wykryli duży odsetek szczepów CPE+ (18%) u osób starszych i potwierdzili, że mogą być one przyczyną biegunek poantybiotykowych jak i sporadycznych, utrzymujących się nawet przez wiele tygodni. V a i s h n a v i i wsp. [87] badając pacjentów z oddziału gastroenterologii uzyskał 8,77% przypadków biegunki CPE+ i aż 36% przypadków o mieszanej etiologii *C. difficile* i *C. perfringens*. W badaniach A s h a i wsp. [2] toksyny *C. difficile* i *C. perfringens* współwystępowały na poziomie 2–3%, a sama enterotoksyna CPE występowała na poziomie 8%. Badacze podkreślają różną czułość stosowanych metod diagnostycznych oraz jednoczesną obecność szczepów CPE-, co pociąga za sobą konieczność izolacji kilku kolonii, nawet do 10, w celu poszukiwania izolatów niosących gen *cpe* [2, 12, 32, 61]. L o y [45] opisuje znaczący udział szczepów CPE+ w biegunce AAD (9,5%) i zwraca uwagę na konieczność badania pacjentów, u których nie wykrywa się toksyn *C. difficile* w kale, w kierunku enterotoksynotwórczych *C. perfringens* typu A. W wielu ośrodkach udział tych szczepów w biegunkach AAD wciąż wynosi zaledwie 2–3% [11, 21, 32, 53, 67, 82]. Podkreśla się jednak możliwość obecności izolatów CPE+ w środowisku szpitalnym i możliwej transmisji patogenów, co może prowadzić do gwałtownego wzrostu zachorowań pacjentów z grup

ryzika [2, 13, 36, 53]. K o b a y a s h i i wsp. [36] otrzymał aż 60–70% szczepów CPE+ w grupie pacjentów z biegunką na oddziałach geriatrycznych. Część ośrodków uważa, że biegunka AAD o etiologii *C. perfringens* CPE+ ma marginalne znaczenie w diagnostyce tych zakażeń, gdyż udział szczepów CPE+ wynosi 1–1,6% [1, 13, 33]. H e i m e s a a t i wsp. [28] przebadali prawie 700 próbek kału i otrzymali wynik dodatni dla enterotoksyny CPE+ tylko u 0,14% (1 pacjent), ale uzyskali jednocześnie więcej izolatów niosących gen *cpe*. Rodzi się pytanie, czy być może u części pacjentów poziom enterotoksyny w kale występuje poniżej progu detekcji? Autorzy dyskutują czułość stosowanych metod diagnostycznych oraz wpływ sposobu opracowania materiału do badań (przechowywanie, mrożenie, rozmrażanie próbek kału, wielkość próbki użytej do testu), a także czas pobrania próbki – największe szanse wykrycia enterotoksyny są w ostrej fazie choroby [27, 28, 53]. Inni badacze nie poszukują enterotoksyny *C. perfringens* w kałach pacjentów z biegunką AAD, a w przypadku wyników ujemnych w kierunku toksyn *C. difficile* rozważają inne czynniki etiologiczne jak np. *Klebsiella oxytoca*, enterotoksynotwórczy *S. aureus* czy *Candida* spp. [20, 23, 66, 73]. Hodowla laseczek z rodzaju *Clostridium* spp. wymaga wyposażenia laboratorium w specjalną aparaturę. Ze względu na doniesienia o pojawiających się szczepach *C. perfringens* o obniżonej wrażliwości na metronidazol, czy wręcz opornych na ten lek [11, 61], leczenie empiryczne może być niewystarczającym sposobem ratowania życia pacjenta.

## 5. Diagnostyka biegunki o etiologii *C. perfringens* typu A

W przypadku biegunki poantybiotykowej materiałem diagnostycznym jest próbka kału pobrana od pacjenta w ostrej fazie choroby [11]. Zaleca się poszukiwanie enterotoksyny (CPE) oraz zakładanie hodowli ze świeżych próbek lub ewentualnie przechowywanych w temperaturze 4°C do 24h [13, 28, 83]. Część badaczy rekomenduje przechowywanie kału w temperaturze –20°C [21, 32] lub nawet –80°C, do czasu jego opracowania [11]. W celu wykrycia enterotoksyny w badanej próbce kału stosowane są 4 metody: test ELISA [1, 2, 3, 13, 21, 28, 32, 33, 45, 53, 61], test odwrotnej biernej aglutynacji lateksowej (RPLA) [11, 21, 32, 33, 36, 53, 55, 82], metoda PCR [3, 32, 33, 44, 53, 61] oraz metoda hodowli komórkowej z użyciem linii Vero [2, 21]. Tylko niewielki odsetek próbek dodatnich w kierunku enterotoksyny w teście ELISA wypada dodatnio na linii Vero [2]. Wydaje się, że jest to metoda najmniej czuła [2, 21, 32, 53]. Test RPLA jest czuły i daje powtarzalne wyniki, ale prawidłowy odczyt może utrudniać niespecyficzne wiązanie się masy kałowej [21, 32, 53].

Najbardziej rekomendowany do rutynowej diagnostyki jest test ELISA [21, 32, 48, 53, 63], w którym można wykryć 1 µg/ml enterotoksyny [21]. Jeśli stężenie enterotoksyny w próbce kału jest niższe, gdyż np. dostarczony materiał pochodzi z późniejszej fazy choroby, najbardziej dokładny i wiarygodny wydaje się być test PCR wykonywany z próbek kału [53, 61]. *C. perfringens* może być obecny (do 10<sup>3</sup> cfu/g kału) w kale zdrowych osób jako składnik naturalnej mikroflory jelita grubego. U pacjentów oddziałów geriatrycznych może osiągać do > 10<sup>7</sup> cfu/g kału [53]. W celu wyhodowania szczepu *C. perfringens* z kału biegunkowego należy zastosować podłoża wybiórcze, np. agar TSN. Posiewy inkubuje się przez 48 godzin w temperaturze 37°C, w warunkach ściśle beztlenowych [61, 62]. Do poszukiwania izolatów niosących gen *cpe* zaleca się badanie kilku kolonii [3, 11, 32, 33, 61, 63], ponieważ szczepy CPE+ stanowią 1–5% i wśród nich mogą być obecne izolaty CPE- [2, 32, 33, 53]. Do poszukiwania genu *cpe* stosuje się metodę PCR [2, 3, 11, 28, 32, 36, 82], natomiast do porównywania szczepów używana jest metoda PFGE [2, 6, 36], zwłaszcza jeśli biegunka poantybiotykowa o etiologii *C. perfringens* ma charakter zakażenia szpitalnego [2, 82].

## 6. Nowe czynniki zjadliwości *C. perfringens* typu A

W roku 1997 Gibert i wsp. [22] wykryli nową toksynę tzw. toksynę beta2 (CPB2), kodowaną przez gen *cpb2*. Gen *cpb2* *C. perfringens* wykryto po raz pierwszy w szczepach należących do typu C u prosiąt z wrzodzącym zapaleniem jelit [10, 60, 82, 88]. Później okazało się, że gen *cpb2* może występować u szczepów należących do różnych toksynotypów *C. perfringens* [80, 81], które mogą wywoływać schorzenia przewodu pokarmowego koni, psów, słońi oraz innych zwierząt [10, 24, 31]. Toksynę beta2 wykryto również w próbkach kału biegunkowego ludzi zakażonych *C. perfringens* typu A [12, 60, 81, 82]. W badaniach środowiskowych (gleba, żywność, pasza) wykazano, że ponad 3% szczepów *C. perfringens* typu A posiada gen *cpb2* [10, 34]. Izolowano również takie szczepy od zdrowych osób [12, 88] oraz od chorych u których doszło do zatrucia pokarmowego (około 15–20%) [19, 81, 83]. W roku 2005 Fisher i wsp. wykonali analizę sekwencji nukleotydowych (stosując metody PCR, PFGE, sekwencjonowanie) genu *cpb2* *C. perfringens* pochodzących z przypadków biegunki poantybiotykowej i biegunki sporadycznej i wyróżnili dwa warianty CPB2. Pierwszy wariant oznaczony jako CPB2h1 znajduje się na plazmidzie *cpe*+/*IS1151*+, a drugi określany jako CPB2h2 mieści się na plazmidzie *cpe*+/*IS1470*-like+ [8, 19, 24, 81]. Toksyna beta2 jest białkiem o masie cząsteczkowej 31 kDa i działa cytotoksycznie na liniach komórkowych

I407 i CaCo-2. Gen *cpb2* jest pierwszym plazmidowym genem *C. perfringens*, który podlega regulacji przez dwuskładnikowy układ genów zlokalizowanych na chromosomie [24, 81]. Ta regulacja na poziomie transkrypcji nie zawsze prowadzi do ekspresji genu *cpb2* [24, 34]. Stymulująco mogą działać np. antybiotyki aminoglikozydowe (gentamycyna, streptomycyna) wiążące podjednostkę 30S rybosomu, co powoduje inne odczytanie mRNA prowadzące do ekspresji toksyny beta2 [81, 88]. CPB2 należy do toksyn tworzących pory o większych rozmiarach niż CPE, prawdopodobnie na skutek polimeryzacji jej cząstek [19, 81]. Istnieje przypuszczenie, że w przypadku trwającej często kilka tygodni biegunki poantybiotykowej lub biegunki sporadycznej, toksyna beta2 może nasilać objawy choroby poprzez oddziaływanie na ściany komórek nabłonka jelit i zwiększanie absorpcji innych toksyn (np. enterotoksyny) [19, 24, 81]. Istnieje konieczność dalszych badań potwierdzających rolę toksyny beta2 w patogenezie biegunek o etiologii *C. perfringens* typu A.

## 7. Podsumowanie

Współcześnie za najważniejszy czynnik biegunek poantybiotykowych uważa się laseczkę *C. difficile*. Niewiele jest natomiast prac, które wskazywałyby jaki jest rzeczywisty udział enterotoksynotwórczych szczepów *C. perfringens* (CPE+) typu A w powodowaniu biegunek po stosowaniu antybiotykoterapii. Enterotoksynę wytwarza niewielki odsetek (5–6%) izolatów *C. perfringens* typu A. Jednak szczepy, które powodują biegunki poantybiotykowe, niosąc gen *cpe* na plazmidzie, mogą być prawdopodobnie źródłem tego genu dla nieenterotoksynotwórczych szczepów *C. perfringens* wchodzących w skład flory fizjologicznej przewodu pokarmowego człowieka, co może skutkować cięższym przebiegiem schorzenia. Również niewiele jest wiadomo na temat roli szczepów *C. perfringens* izolowanych z próbek kału osób z biegunką, w których wykryto toksynę beta2, a której ekspresję mogą nasilać antybiotyki aminoglikozydowe. Badania dotyczące udziału szczepów *C. perfringens* w powodowaniu biegunek poantybiotykowych są niezwykle istotne ze względu na to, że w szczególności narażeni na rozwój tego schorzenia są pacjenci oddziałów geriatrycznych oraz chory z obniżoną odpornością, których liczba wzrasta każdego roku. Pacjentów z biegunką poantybiotykową, u których nie wykryto toksyn *C. difficile* w kale powinno się diagnozować w kierunku enterotoksynotwórczych szczepów *C. perfringens* typu A. Opisano również przypadki współwystępowania obu patogenów [61, 87]. Szczepy CPE+ mogą być obecne w środowisku szpitalnym, co może prowadzić do wzrostu zachorowań na danym oddziale [2].

## Piśmiennictwo

- Ackermann G., Thomalla S., Ackermann F., Schaumann R., Rodloff A., Ruf B.R.: Prevalence and characteristics of bacteria and host factors in an outbreak situation of antibiotic-associated diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* **54**, 149–153 (2005)
- Asha N.J., Tompkins D., Wilcox M.H.: Comparative analysis of prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of antibiotic-associated diarrhoea due to *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2785–2791 (2006)
- Asha N.J., Wilcox M.H.: Laboratory diagnosis of *Clostridium perfringens* antibiotic-associated diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* **51**, 891–894 (2002)
- Beaugerie L., Petit J.C.: Antibiotic-associated diarrhoea. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**, 337–352 (2004)
- Benno Y., Endo K., Mizutani T., Namba Y., Komori T., Mitsuoka T.: Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and urban areas of Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1100–1105 (1989)
- Borriello S.P.: Clostridial disease of the gut. *Clin. Infect. Dis.* **20** (Suppl. 2), S242–S250 (1995)
- Brett M.M., Rodhouse J.C., Donovan T.J., Tebbutt G.M., Hutchinson D.N.: Detection of *Clostridium perfringens* and its enterotoxin in cases of sporadic diarrhoea. *J. Clin. Pathol.* **45**, 609–611 (1992)
- Brüggemann H.: Genomics of clostridial pathogens: implication of extrachromosomal elements in pathogenicity. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 601–605 (2005)
- Brynstad S., Sarker M.R., McClane B.A., Granum P.E., Rood J.I.: Enterotoxin plasmid from *Clostridium perfringens* is conjugative. *Infect. Immun.* **69**, 3483–3487 (2001)
- Bueschel D.M., Jost B.H., Billington S.J., Trinh H.T., Songer J.G.: Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet. Microbiol.* **94**, 121–129 (2003)
- Camacho N., Espinoza C., Rodriguez C., Rodriguez E.: Isolates of *Clostridium perfringens* recovered from Costa Rican patients with antibiotic-associated diarrhoea are mostly enterotoxin-negative and susceptible to first choice antimicrobials. *J. Med. Microbiol.* **57**, 343–347 (2008)
- Carman R.J., Sayeed S., Li J., Genheimer Ch.W., Hiltonsmith M.F., Wilkins T.D., McClane B.A.: *Clostridium perfringens* toxin genotypes in the feces of healthy North Americans. *Anaerobe*, **14**, 102–108 (2008)
- Carney T., Perry J.D., Ford M., Majumdar S., Gould F.K.: Evidence for antibiotic induced *Clostridium perfringens* diarrhoea. *J. Clin. Pathol.* **55**, 240 (2002)
- Chakrabarti G., McClane B.A.: The importance of calcium influx, calpain and calmodulin for the activation of CaCo-2 cell death pathways by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Cell. Microbiol.* **7**, 129–146 (2005)
- Citron D.M., Kwok Y.Y., Appleman M.D.: In vitro activity of oritavancin (LY 333328), vancomycin, clindamycin, and metronidazole against *Clostridium perfringens*, *Propionibacterium acnes*, and anaerobic Gram-positive cocci. *Anaerobe*, **11**, 93–95 (2005)
- Deguchi A., Miyamoto K., Kuwahara T., Miki Y., Kaneko I., et al.: Genetic characterization of type A enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains. *PloS One*, **4**, e5598. doi:10.1371/journal.pone.0005598 (2009)
- Efuntoy M.O., Adetosoye A.I.: Sporadic diarrhoea due to *Clostridium perfringens* in children aged five years and below. *Afr. J. Biotechnol.* **3**, 366–369 (2004)
- Finegold S.M., Song Y., Liu Ch.: Taxonomy- general comments and update on taxonomy of clostridia and anaerobic cocci. *Anaerobe*, **8**, 283–285 (2002)
- 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 human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. *Mol. Microbiol.* **56**, 747–762 (2005)
- Fleming K., Ackermann G.: Prevalence of enterotoxin producing *Staphylococcus aureus* in stools of patients with nosocomial diarrhea. *Infection*, **5**, 356–358 (2007)
- Forward L.J., Tompkins D.S., Brett M.M.: Detection of *Clostridium difficile* cytotoxin and *Clostridium perfringens* enterotoxin in cases of diarrhoea in the community. *J. Med. Microbiol.* **52**, 753–757 (2003)
- Gibert M., Jolivet-Reynaud C., Popoff M.R.: Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene*, **203**, 65–73 (1997)
- Gorkiewicz G.: Nosocomial and antibiotic-associated diarrhoea caused by organisms other than *Clostridium difficile*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **33**, S37–S41 (2009)
- Harrison B., Raju D., Garmory H.S., Brett M.M., Titball R.W., Sarker M.R.: Molecular characterization of *Clostridium perfringens* isolates from humans with sporadic diarrhea: evidence for transcriptional regulation of the beta2-toxin-encoding gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8362–8370 (2005)
- Harry K.H., Zhou R., Kroos L., Melville S.B.: Sporulation and enterotoxin (CPE) synthesis are controlled by the sporulation-specific sigma factors SigE and SigK in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **191**, 2728–2742 (2009)
- Heikinheimo A., Lindström M., Granum P.E., Korkeala H.: Humans as reservoir for enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* type A. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 1727–1758 (2006)
- Heikinheimo A., Lindström M., Korkeala H.: Enumeration and isolation of *cpe*-positive *Clostridium perfringens* spores from feces. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3992–3997 (2004)
- Heimesaat M.M., Granzow K., Leidinger H., Liesenfeld O.: Prevalence of *Clostridium difficile* toxins A and B and *Clostridium perfringens* enterotoxin A in stool samples of patients with antibiotic-associated diarrhoea. *Infection*, **33**, 340–344 (2005)
- Huang I.H., Waters M., Grau R.R., Sarker M.R.: Disruption of the gene (*spo0A*) encoding sporulation transcription factor blocks endospore formation and enterotoxin production in enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A. *FEMS Microbiol. Lett.* **233**, 233–240 (2004)
- Jackson S.G., Yip-Chuck D.A., Clark J.B., Brodsky M.H.: Diagnostic importance of *Clostridium perfringens* enterotoxin analysis in recurring enteritis among elderly, chronic care psychiatric patients. *J. Clin. Microbiol.* **23**, 748–751 (1986)
- Johansson A., Aspan A., Bage E., Bäverud V., Engström B.E., Johansson K.E.: Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. *BMC Microbiol.* **6**, doi: 10.1186/1471-2180-6-47 (2006)
- Joshy L., Chaudhry R., Dhawan B., Kumar L., Das B.K.: Incidence and characterization of *Clostridium perfringens* isolated from antibiotic-associated diarrhoeal patients: a prospective study in an Indian hospital. *J. Hosp. Infect.* **63**, 323–329 (2006)
- Joshy L., Chaudhry R., Dhawan B., Das B.K., Kumar L., Broor S.: Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* and sporadic diarrhoea: a study from an Indian tertiary care hospital. *J. Med. Microbiol.* **55**, 1757–1758 (2006)
- Jost B.H., Billington S.J., Trinh H.T., Bueschel D.M., Songer J.G.: Atypical *cpb2* genes, encoding beta2-toxin in *Clostridium*

- perfringens* isolates of nonporcine origin. *Infect. Immun.* **73**, 652–656 (2005)
35. Kimura J., Abe H., Kamitani S., Tushima H., Fukui A., Miyake M., Kamata Y., Sugita-Konishi Y., Yamamoto S., Horiguchi Y.: *Clostridium perfringens* enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction. *J. Biol. Chem.* **285**, 401–408 (2010)
  36. Kobayashi S., Inamatsu T. i wsp.: Spread of a large plasmid carrying the *cpe* gene and the *tcp* locus amongst *Clostridium perfringens* isolates from nosocomial outbreaks and sporadic cases of gastroenteritis in a geriatric hospital. *Epidemiol. Infect.* **137**, 108–113 (2008)
  37. Kotowska M., Albrecht P., Józefczuk J., Armańska M., Ostapińska-Karaś G., Kochańska M., Szajewska H.: Częstość występowania biegunki poantybiotykowej u dzieci. *Pediatrics Współczesna, Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka*, **7**, 269–273 (2005)
  38. Lahti P., Heikinheimo A., Johansson T., Korkeala H.: *Clostridium perfringens* type A strains carrying a plasmid-borne enterotoxin gene (genotype IS1151-*cpe* or IS1470-like-*cpe*) as a common cause of food poisoning. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 371–373 (2008)
  39. Li J., McClane B.A.: Comparative effects of osmotic, sodium nitrite-induced, and pH-induced stress on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying chromosomal or plasmid-borne enterotoxin genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7620–7625 (2006)
  40. 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.* **72**, 4561–4568 (2006)
  41. Li J., Sayeed S., McClane B.A.: Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates in Pittsburgh (Pennsylvania) area soils and home kitchens. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7218–7224 (2007)
  42. Li J., Paredes-Sabja D., Sarker M.R., McClane B.A.: Further characterization of *Clostridium perfringens* small acid soluble protein-4 (Ssp4) properties and expression. *PLoS One.* **4** (7), e6249. doi: 10.1371/journal.pone.0006249 (2009)
  43. Li J., McClane B.A.: A novel small acid soluble protein variant is important for spore resistance of most *Clostridium perfringens* food poisoning isolates. *PLoS Pathogens*, **4**, e1000056 (2008)
  44. Loh J.P., Liu Y.C., Chew S.W., Ong E.S., Fam J.M., Ng Y.Y., Taylor M.B., Ooi E.E.: The rapid identification of *Clostridium perfringens* as the possible aetiology of a diarrhoeal outbreak using PCR. *Epidemiol. Infect.* **136**, 1142–1146 (2008)
  45. Loy C.E.: Antibiotic-associated diarrhoea: an overlooked aetiology? *Br. J. Biomed. Sci.* **62**, 166–169 (2005)
  46. McClane B.A.: *Clostridium perfringens* enterotoxin (w) The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, red. J.E. Alouf, M.R. Popoff, Institut Pasteur, Paris, 2006, s. 763–776.
  47. McClane B.A., Chakrabarti G.: New insights into the cytotoxic mechanisms of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Anaerobe*, **10**, 107–114 (2004)
  48. McClane B.A., Strouse R.J.: Rapid detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **19**, 112–115 (1984)
  49. Miwa N., Masuda T., Kwamura A., Terai K., Akiyama M.: Survival and growth of enterotoxin-positive and enterotoxin-negative *Clostridium perfringens* isolates in laboratory media. *Food Microbiol.* **72**, 233–238 (2002)
  50. Miyakawa M.E., Creydt P., Uzal F.A., McClane B.A., Ibarra C.: *Clostridium perfringens* enterotoxin damages the human intestine in vitro. *Infect. Immun.* **73**, 8407–8410 (2005)
  51. Miyamoto K., Fisher D.J., Li J., Sayeed S., Akimoto S., McClane B.A.: Complete sequencing and diversity analysis of the enterotoxin-encoding plasmids in *Clostridium perfringens* type A non-food-borne human gastrointestinal disease isolates. *J. Bacteriol.* **188**, 1585–1598 (2006)
  52. Miyamoto K., Wen Q., McClane B.A.: Multiplex PCR genotyping assay that distinguishes between isolates of *Clostridium perfringens* type A carrying a chromosomal enterotoxin gene (*cpe*) locus, a plasmid *cpe* locus with an IS1470-like sequence, or a plasmid *cpe* locus with an IS1151 sequence. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1552–1558 (2004)
  53. Modi N., Wilcox M.H.: Evidence for antibiotic induced *Clostridium perfringens* diarrhoea. *J. Clin. Pathol.* **54**, 748–751 (2001)
  54. Moosavian M., Hayati K.: A survey of *clostridia* in the patients with acute diarrhoea compared with the control group. *Pak. J. Med. Sci.* **24**, 209–212 (2008)
  55. Mpamugo O., Donovan T., Brett M.M.: Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* as a cause of sporadic cases of diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* **43**, 442–445 (1995)
  56. Myers G.S.A., Rasko D.A., Cheung J.K. i wsp.: Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. *Genome Res.* **16**, 1031–1040 (2006)
  57. Nakamura M., Kato A., Tanaka D., Gyobu Y., Higaki S., Karasawa T., Yamagishi T.: PCR identification of the plasmid-borne enterotoxin gene (*cpe*) in *Clostridium perfringens* strains isolated from food poisoning outbreaks. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**, 261–265 (2004)
  58. Orsburn B., Melville S.B., Popham D.L.: Factors contributing to heat resistance of *Clostridium perfringens* endospores. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 3328–3335 (2008)
  59. Paredes-Sabja D., Sarker M.R.: *Clostridium perfringens* sporulation and its relevance to pathogenesis. *Future Microbiol.* **4**, 519–525 (2009)
  60. Petit L., Gibert M., Popoff M.R.: *Clostridium perfringens*: toxin type and genotype. *Trends Microbiol.* **7**, 104–110 (1999)
  61. Pituch H., Obuch-Woszczatyński P., Wultańska D., van Belkum A., Meisel-Mikołajczyk F., Łuczak M.: Laboratory diagnosis of antibiotic-associated diarrhoea: a polish pilot study into the clinical relevance of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* toxins. *Diagnostic Microbiol. Infect. Dis.* **58**, 71–75 (2007)
  62. Pituch H., van den Braak N., van Belkum A., Van Leeuwen W., Obuch-Woszczatyński P., Łuczak M., Verbrugh H., Meisel-Mikołajczyk F., Martirosian G.: Characterization of *Clostridium perfringens* strains isolated from Polish patients with suspected antibiotic-associated diarrhoea. *Med. Sci. Monit.* **8**, BR 85–88 (2002)
  63. Poxton I.R.: Other *Clostridium* spp. (w) Principles and practice of clinical bacteriology, red. S.H. Gillespie, P.M. Hawkey, John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, 2006, s. 567–574
  64. Raju D., Sarker M.R.: Comparison of the levels of heat resistance of wild-type, *cpe* knockout, and *cpe* plasmid-cured *Clostridium perfringens* type A strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7618–7620 (2005)
  65. Rood J. I.: Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**, 333–60 (1998)
  66. Rożkiewicz D., Zaremba M.L., Fiedoruk K., Daniluk T., Ściepuk M., Kurzątkowska B., Sulik A., Ołdak E.: Toksyna A *Clostridium difficile* i inne enteropatogeny w kale dzieci hospitalizowanych z powodu ostrej biegunki. *Przegl. Epidemiol.* **59**, 711–721 (2005)
  67. Samuel S.C., Hancock P., Leigh D.A.: An investigation into *Clostridium perfringens* enterotoxin-associated diarrhoea. *J. Hosp. Infect.* **18**, 219–230 (1991)
  68. Schalh B., Sperner B., Eisgruber H., Stolle A.: Molecular methods for the analysis of *Clostridium perfringens* relevant to food hygiene. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **24**, 281–286 (1999)



69. Smedley III J.G., Fisher D.J., Chakrabarti G., McClane B.A.: The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **52**, 183–204 (2004)
70. Setlow P.: I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends Microbiol.* **15**, 172–180 (2007)
71. Sirous M., Namaki S., Mirshafiey A.: *Clostridia*. *J. Chinese Clin. Med.* **4**, 35–47 (2009)
72. Sobel J., Mixer Ch.G., Kolhe P., Gupta A., Guarner J., Zaki S., Hoffman N., Songer J.G., Fremont-Smith M., Fischer M., Killgore G., Britz P.H., MacDonald C.: Necrotizing enterocolitis associated with *Clostridium perfringens* type A in previously healthy North American adults. *J. Am. Coll. Surg.* **201**, 48–56 (2005)
73. Song H.J., Shim K.N., Jung S., Choi H.J., Lee M.A., Ryu K.H., Kim S.E., Yoo K.: Antibiotic-associated diarrhea: candidate organisms other than *Clostridium difficile*. *Korean J. Intern. Med.* **23**, 9–15 (2008)
74. Songer G.: Clostridia as agents of zoonotic disease. *Vet. Microbiol.* **140**, 399–404 (2010)
75. Songer G.: Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**, 216–234 (1996)
76. Sparks S.G., Carman R.J., Sarker M.R., McClane B.A.: Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 883–888 (2001)
77. Szajewska H., Mrukowicz J.: Metaanalysis: non-pathogenic yeast *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **22**, 365–372 (2005)
78. Tanaka D., Nagai Y. i wsp.: Genotyping of *Clostridium perfringens* isolates collected from food poisoning outbreaks and healthy individuals in Japan based on the *cpe* locus. *Jpn. J. Infect. Dis.* **60**, 68–69 (2007)
79. Tanaka D., Nakamura S. i wsp.: An outbreak of food-borne gastroenteritis caused by *Clostridium perfringens* carrying the *cpe* gene on a plasmid. *Jpn. J. Infect. Dis.* **56**, 137–139 (2003)
80. Wasiński B., Pejsak Z.: Cechy fenotypowe i genotypowe szczepów *Clostridium perfringens* izolowanych od prosiąt ssących. *Medycyna Vet.* **64**, 791–795 (2008)
81. Wasiński B.: Właściwości i chorobotwórczość toksyny  $\beta_2$  *Clostridium perfringens*. *Medycyna Wet.* **64**, 1275–1279 (2008)
82. Watanabe M., Hitomi S., Sawahata T.: Nosocomial diarrhea caused by *Clostridium perfringens* in the Tsukuba-Tsuchiura district, Japan. *J. Infect. Chemother.* **14**, 228–231 (2008)
83. Wen Q., McClane B.A.: Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2685–2691 (2004)
84. Winkler L., Gehring C., Wenzel A., Müller S.L., Piehl Ch., Krause G., Blasig I.E., Piontek J.: Molecular determinants of the interaction between *Clostridium perfringens* enterotoxin fragments and claudin-3. *J. Biol. Chem.* **284**, 18863–18872 (2009)
85. Wiström J., Norrby S.R., Myhre E.B., Eriksson S., Granström G., Lagergren L., Englund G., Nord C.E., Svenungsson B.: Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**, 43–50 (2001)
86. Wrigley D.M.: Inhibition of *Clostridium perfringens* sporulation by *Bacteroides fragilis* and short-chain fatty acids. *Anaerobe*, **10**, 295–300 (2004)
87. Vaishnavi Ch., Kaur S., Singh K.: *Clostridium perfringens* type A & antibiotic associated diarrhoea. *Indian J. Med. Res.* **122**, 52–56 (2005)
88. Van Asten A.J.A.M., Nikolaou G.N., Gröne A.: The occurrence of *cpb2*-toxigenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the  $\beta_2$ -toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *Vet. J.* **183**, 135–140 (2010)
89. Van Immerseel F., De Buck J., Pasmans F., Huyghebaert G., Haesebrouck F., Ducatelle R.: *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol.* **33**, 537–549 (2004)
90. Varga J., Stirewalt V.L., Melville S.B.: The CcpA protein is necessary for efficient sporulation and enterotoxin gene (*cpe*) regulation in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **186**, 5221–5229 (2004)
91. Yoo H.S., Lee S.U., Park K.Y., Park Y.H.: Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 228–232 (1997)