

## Infections with *Clostridium perfringens* in animals

Rypuła K.<sup>1</sup>, Płoneczka-Janeczko K.<sup>1</sup>, Kita J.<sup>2</sup>, Kumala A.<sup>1</sup>, Division of Infectious Diseases and Veterinary Administration, Department of Epizootiology with the Clinic for Birds and Exotic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences<sup>1</sup>, Division of Infectious Diseases and Epidemiology, Department of Large Animal Diseases with the Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW<sup>2</sup>.

The purpose of this paper was to present the problems of *Clostridium perfringens* infections in animals. Anaerobic infections are often underestimated epizootic problem in animals and also in humans. The growth conditions for clostridia are oxygen deficiency (vel hypoxia) and decreased redox potential, which leads to clostridial toxins production. *C. perfringens* exotoxins are enterotoxic and histotoxic and cause severe destruction of host tissues leading to development of serious anaerobic diseases in various animal species. There are five types of *C. perfringens* depending on the toxins synthesized, namely types: A, B, C, D and E. Types of *C. perfringens* are responsible for different diseases like malignant edema, dysentery in lambs, enterotoxemia, struck in sheep and necrotic enteritis in piglets and also other serious anaerobic infections in animals. Diagnostic approach in clostridial infections includes bacteriological examination with the isolation of pathogen and toxins detection with specific ELISA and other serological tests.

**Keywords:** *Clostridium perfringens* infections, enterotoxemia, diagnosis, prophylactic approach.

Zakażenia beztlenowcami stanowią często niedoceniany problem epizootyczny u zwierząt. Pierwsze opisy przypadków klinicznych pochodzą sprzed ponad 200 lat, natomiast w XIX wieku poznano naturę zakażeń beztlenowcowych.

# Zakażenia zwierząt przez *Clostridium perfringens*

Krzysztof Rypuła<sup>1</sup>, Katarzyna Płoneczka-Janeczko<sup>1</sup>, Jerzy Kita<sup>2</sup>, Aleksandra Kumala<sup>1</sup>

z Zakładu Epizootologii i Administracji Weterynaryjnej Katedry Epizootologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej we Wrocławiu<sup>1</sup> oraz Zakładu Chorób Zakaźnych i Epidemiologii Katedry Chorób Dużych Zwierząt z Kliniką Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie<sup>2</sup>

Badania te kontynuowano przez kolejne 50 lat.

Warunkiem wzrostu wszystkich drobnoustrojów beztlenowych w tkankach jest ich niedotlenienie i spadek potencjału oksydoredukcyjnego (Eh). W tkankach zdrowych potencjał oksydoredukcyjny wynosi od +126 do +248 mV, natomiast w warunkach beztlenowych Eh ma wartość bliską zeru lub ujemną (nawet do -50 mV w tkankach zwierząt padłych).

Bakterie beztlenowe można podzielić na ściśle beztlenowce (anaeroby bezwzględne), które nie mogą rosnąć w obecności więcej niż 0,5% tlenu, beztlenowce umiarkowane, które są zdolne do wzrostu w środowisku o stężeniu od 2 do 8% tlenu, oraz beztlenowce względne, których wzrost jest możliwy również przy nieznacznym obniżeniu stężenia tlenu.

Z punktu widzenia klinicznego wśród bakterii pospolitych Gram-dodatnich (*Firmicutes*) rozróżnia się następujące klasy: *Bacilli*, *Clostridia*, *Mollicutes* i *Erysipelotrichia*. Z kolei *Clostridia* można podzielić na wytwarzające endospory – *Clostridium* spp., wśród których w praktyce mają znaczenie: *Cl. perfringens*, *Cl. difficile*, *Cl. tetani*, *Cl. botulinum*, *Cl. haemolyticum*, *Cl. novyi* i *Cl. oedematiens* oraz ich niewytwarzające – *Peptostreptococcus*, wśród których praktyczne znaczenie mają: *P. magnus* (18% – procent izolowanych

z zakażeń bakteryjnych wszystkich beztlenowych bakterii Gram-dodatnich i mikroaerofilnych paciorkowców), *P. saccharolyticus* (17%), *P. anaerobius* (16%), *P. prevotii* (13%), *P. micros* (4%) (1, 2). Pierwsza z opisanych grup ma istotne znaczenie w weterynaryjnej praktyce klinicznej, a zakażenia przez nie powodowane prowadzą do objawów ze strony: przewodu pokarmowego (prowadząc do enterotoksemii); narządów wewnętrznych, mięśni (prowadząc do martwicy i toksemii), układu nerwowego (dając objawy neurologiczne).

Szczegółowe zestawienie zakażeń powodowanych przez laseczki *Clostridium* spp. przedstawiono w tabeli 1. Wśród drobnoustrojów z rodzaju *Clostridium* spp. za najważniejsze i najczęściej występujące można uznać *Clostridium perfringens*, które możemy podzielić na pięć toksynotypów (A, B, C, D i E) produkujących cztery toksyny nazwane alfa – α (CPA), beta – β (CPB), epsilon – ε (ETX) oraz jota – ι (ITX). Jednakże *Clostridium perfringens* produkują łącznie 15 toksyn w różnych kombinacjach, w tym toksynę letalną – perfringolizynę O (PFO), enterotoksynę (CPE) oraz toksynę beta2 (CPB2). Toksyny te produkowane są w przewodzie pokarmowym, często w wyniku zmiany diety lub pod wpływem innych czynników środowiskowych (3, 4). W tabeli 2 przedstawiono toksyny produkowane przez poszczególne toksynotypy *Cl. perfringens*.

## Obraz kliniczny zakażeń *Clostridium perfringens*

### Zakażenia *Clostridium perfringens* typu A

Rola *Clostridium perfringens* typu A w patogenezie chorób nie jest do końca poznana, co jest związane ze stałą obecnością bakterii w przewodzie pokarmowym. Ich liczba zwykle wzrasta w procesie chorobowym oraz u zwierząt padłych. Drobnoustroje te produkują alfa-toksynę, która ma aktywność fosforylasy C i sfingomielinazy. Oba enzymy towarzyszą obecnej w procesie chorobowym hemolizie. Zatem w przebiegu procesu chorobowego obserwujemy zwykle krwotoczne zapalenie jelit, któremu

towarzyszy często także obecność *Clostridium perfringens* typu B (5).

### Enterocolitis u koni

Zapalenie jelit na tle *Clostridium perfringens* typu A opisywane jest zarówno u źrebiąt, jak i u osobników dorosłych. Proces chorobowy opisywany jest jako zespół chorobowy, gdzie enterokolitis związane jest z obecnością również *Clostridium difficile*. Dodatkowo w przebiegu tej toksemii u źrebiąt izoluje się *Clostridium perfringens* typu C, co związane jest z ich indywidualną wrażliwością, a obecność inhibitorów trypsyny w świetle jelita wpływa na zachowanie aktywności wytwarzanej toksyny beta.

Jako pierwsze objawy w przebiegu zakażenia pojawiają się bóle mierzwiowe i biegunka. Kał staje się wodnisty i żółtawy, niekiedy z domieszką krwi. Wskutek postępującej toksemii zwierzę ginie po 4–8 godzinach, a zapalenie jelit rozpoznawne jest zwykle dopiero po śmierci (6).

### Zapalenie jelit u prosiąt

Zapalenie jelit u prosiąt na tle *Clostridium perfringens* typu A związane jest, podobnie jak u ludzi, z zatruciem pokarmowym.

Chorobę u prosiąt osesków obserwujemy do 5 dnia życia, zwykle między 1–3 dniem. Odsetek zwierząt chorujących do 7 dnia życia wynosi 85%. W tym

Tabela 1. Zakażenia powodowane przez laseczki *Clostridium* spp.

Drobnoustrój	Rodzaj produkowanych toksyn	Postacie zakażeń	Gatunki wrażliwe	Uwagi
<i>C. perfringens</i> A	1. toksyna alfa (CPA) 2. beta 2 (CPB2) 3. enterotoksyna (CPE)	- enterotoksemia owiec - enterotoksemia kóz - enterotoksemia cieląt - krwotoczne zapalenie jelit u prosiąt - <i>enterocolitis</i> u koni	owce, kozy, bydło, świnię, konie	postać enterotoksemiczna występuje stosunkowo rzadko i jedynie w niektórych rejonach świata; dane na temat patogenyzy zakażeń u przeżuwaczy są ograniczone; zakażenia związane z produkcją toksyny CPB2 ograniczają się do jagniąt i koźląt
<i>C. sordellii</i>	1. toksyna letalna 2. toksyna krwotoczna	- toksemia - zapalenie trawieńca u jagniąt - krwotoczne zapalenie jelit u źrebiąt, owiec i bydła	owce (w każdym wieku), konie, bydło	Wielka Brytania, Nowa Zelandia; bakteria obecna jest w środowisku oraz w przewodzie pokarmowym zwierząt
<i>C. septicum</i>	alfa+++	- bradsot północny, paraselestnic trawieńca	najczęściej u odsadzonych jagniąt i po strzyży (jesienią)	Wielka Brytania, Skandynawia
<i>C. chauvoei</i>	toksyna letalna	- u bydła zapalenie mięśni - zgorzel poporodowa (także obrzęk złośliwy)	owce, bydło	bakteria bytująca w glebie; przetrwalniki mogą występować w tkance mięśniowej zdrowego klinicznie bydła (zakażenia endogenne)
<i>C. septicum</i>	alfa+++	- obrzęk złośliwy	owce	choroba rzadko występuje w Europie
<i>C. novyi</i> A	alfa+++	- obrzęk złośliwy	owce (głównie bary)	spotykana na suchych, gorących terenach
<i>C. perfringens</i> A	1. alpfa (CPA) 2. toksyna beta 2 (CPB2) 3. enterotoksyna (CPE)	- zgorzel gazowa/ obrzęk złośliwy - martwicze zapalenie trawieńca u bydła	owce, kozy, bydło	występuje sporadycznie
<i>C. perfringens</i> D	1. epsilon (ETX) 2. alfa (CPA)	- wrzodząco-martwicze zapalenie trawieńca u cieląt	bydło	występuje sporadycznie
<i>C. sordellii</i>	1. toksyna zgorzeliowa 2. toksyna krwotoczna	- obrzęk złośliwy owiec i bydła - poporodowe zapalenie macicy u owiec	owce, bydło	USA, Nowa Zelandia
<i>C. perfringens</i> D	1. epsilon (ETX) 2. alfa (CPA)	- ostre, podostre lub przebiegające przewlekłe zaburzenia neurologiczne u owiec - ogniskowa, symetryczna encefalomalacja	owce	zmiany histopatologiczne rzadko dotyczą tylko mózgu, lokalizują się w mózdku (w postaci ostrej i podostrej) albo mają charakter symetrycznie występujących ognisk (w postaci przewlekłej)
<i>C. tetani</i>	neurotoksyna tężcowa	tężec	owce (głównie jagnięta), kozy	powszechnie na całym świecie
<i>C. botulinum</i> C i D	neurotoksyna botulinowa	botulizm	owce, bydło, kozy, ptaki, konie	głównie w warunkach suchych, rozprzeczona w Afryce Południowej i Australii
<i>C. sordellii</i>	1. toksyna zgorzeliowa, 2. toksyna krwotoczna	- <i>omphalitis</i> u źrebiąt - przypadki zespołu nagłej śmierci u bydła i owiec (sudden death)	konie, bydło, owce	zapalenie sznura pępowinowego u źrebiąt pomiędzy 12 a 21 dniem życia

też okresie notowana jest najwyższa śmiertelność. W przebiegu choroby pojawia się żółta, wodnista biegunka, prowadząca do wychudzenia i odwodnienia zwierząt. Widoczne u zwierząt padłych zmiany anatomopatologiczne mają charakter enterokolitis średniego stopnia z postępującym zanikiem kosmków (7, 8).

### Nadżerki trawieńca u cieląt

Przypuszcza się, że *Clostridium perfringens* typu A jest także odpowiedzialne za powstanie nadżerek w trawieńcu u cieląt ssących bydła mięsnego diagnozowanych na terenie Ameryki Północnej. Jednak obecnie nic nie wiadomo na temat etiopatogenezy tej choroby.

### Enterotoksemia krwotoczna u bydła, owiec i kóz

Choroby opisywane jako krwotoczne enterotoksemie, powodowane przez *Clostridium perfringens* typu A, związane są często z izolacją dużej liczby tego drobnoustroju z treści jelit chorych zwierząt. Tu też widoczny jest bardzo dobrze proces oddziaływania alfa-toksyny w procesie hemolizy. Zachorowania występują krótko po porodzie i dotyczą dużego odsetka zwierząt. Pierwszym objawem choroby jest wzrost temperatury ciała do 41°C. Objawy zapalenia jelit cienkich pojawiają się do 12 godzin od zakażenia i rzadko utrzymują się przez kilka dni. Wtedy też widoczna jest bledźść błon śluzowych, żółtaczka i hemoglobiuria. Dochodzi do obrzęku nerek. Mają one ciemnobrązową barwę. Widoczne są liczne zawały. Podobnie obrzękowi ulega wątroba i płuca, a w jamach ciała i worku osierdziowym obecny jest płyn. Błona śluzowa jelita cienkiego ulega martwicy.

W przebiegu krwotocznego zapalenia jelit u cieląt, źrebiąt i dorosłego bydła w badaniu laboratoryjnym wykazuje się często obecność *Clostridium perfringens* typu B lub C (5, 9, 10, 11).

### Zakażenia *Clostridium perfringens* typów B i C

Toksyna beta produkowana przez *Clostridium perfringens* typów B i C jest

szczególnie wrażliwa na działanie trypsyny. Ponadto *Clostridium perfringens* typu B wytwarza także toksynę alfa oraz epsilon, a typ C toksyny alfa i beta. Produkowana przez te bakterie toksyna beta 2 jest istotna w patogenezie enterotoksemii prosiąt oraz źrebiąt. Te trzy toksynotypy *Clostridium perfringens* u poszczególnych gatunków zwierząt są przyczyną następujących chorób:

- dyzenterii jagniąt – *Clostridium perfringens* typu B, u młodych jagniąt zachorowania powoduje także *Clostridium perfringens* typu C;
- enterotoksemii kóz – *Clostridium perfringens* typu C i sporadycznie typu B;
- martwiczego zapalenia jelit prosiąt i enterotoksemii prosiąt – *Clostridium perfringens* typu C oraz rzadko we współudziale z *Clostridium perfringens* typu B;
- enterotoksemii źrebiąt – *Clostridium perfringens* typów B i C;
- enterotoksemii cieląt – *Clostridium perfringens* typów B i C;
- enterotoksemii krwotocznej owiec – *Clostridium perfringens* typu C (12, 13, 14, 15).

### Dyzenteria jagniąt

Do zachorowania dochodzi u jagniąt w wieku poniżej 3 tygodnia życia, zwykle zakażeniu ulegają zwierzęta między 1 a 4 dniem życia, przy czym proces chorobowy trwa od 2 do 3 tygodni, ze śmiertelnością sięgającą 20–30%. U młodych jagniąt śmierć następuje w ciągu 2–12 godzin, bez wcześniejszych objawów, a u starszych upadki pojawiają się po 2–3 dniach trwania choroby. W przebiegu choroby obserwuje się beczność zwierząt, częste spoglądanie na brzuch oraz objawy ze strony przewodu pokarmowego (biegunka wodnista, kał z domieszką krwi). U starszych jagniąt dyzenteria manifestuje się bólem brzucha i spadkiem chęci do ssania. Biegunka nie występuje. Objawy kliniczne znajdują swoje odzwierciedlenie w zmianach anatomopatologicznych (12, 14).

### Martwicze zapalenie jelit prosiąt i enterotoksemia prosiąt, źrebiąt i cieląt

Przebieg choroby jest bardzo szybki, prosięta giną w ciągu 1–2 dni. Szczególnie

wysoki odsetek zachorowań (do 85%) notowany jest u prosiąt młodych, od momentu urodzenia do 3 dnia życia, po czym znacząco spada po 3 tygodniu. Chore prosięta są osowiałe, a biegunka widoczna jest od 2–3 dnia i jest początkowo wodnista, następnie żółta, przechodząca w krwawą koloru brązowoczerwonego. U prosiąt na ogół brak biegunki. U źrebiąt zakażenie *Clostridium perfringens* typ B lub C przebiega z objawami posmutnienia, wyraźnej toksemii oraz bólem brzucha. Wrażliwe na zakażenie są także młode, kilkudniowe źrebięta, u których w ostrym przebiegu pojawia się krew w kale oraz przyspieszone tętno i oddechy. Zmiany kliniczne są krótkotrwałe, a biegunka nie zawsze występuje. Rozpoznanie jest trudne ze względu na szybki przebieg i sporadyczne występowanie (8).

U cieląt zmiany chorobowe manifestują się jako dyzenteria z ostrym bólem brzucha i ryczeniem niskim tonem. Do zmian tych dołączają się objawy nerwowe, jak: skurcze mięśni i *opisthotonus*. W ostrym przebiegu często nie obserwuje się biegunki, a śmierć następuje w ciągu kilku godzin. Z kolei w lekkim przebiegu zapalenie jelit trwa do czterech dni, a rekonwalescencja jest powolna (10–14 dni).

W przebiegu zakażenia, podobnie jak w przebiegu innych enterotoksemii, zmiany anatomopatologiczne zlokalizowane są w jelicie cienkim w postaci kwotocznego zapalenia z obecnością strzępów martwiczych błony śluzowej i krwi. U prosiąt w postaci przewlekłej dominują zmiany martwicze zlokalizowane na kilkunastocentymetrowym odcinku przewodu pokarmowego. Cechą znaną jest zgrubienie i pomarszczenie ściany jelita z naprzemiennie występującymi szarozółtymi podłużnymi bruzdami i wyniosłościami – tzw. jelito podłużnie prążkowane (7, 13, 16, 17).

### Zakażenia *Clostridium perfringens* typ D

Enterotoksemia ta jest wynikiem namnożenia *Clostridium perfringens* typ D w świetle jelita cienkiego i produkcji toksyny epsilon. Toksyna ta jest wytwarzana już po 6–8 godzinach od podania bezpośrednio do dwunastnicy kultury *Clostridium perfringens* typ D z dodatkiem dekstryny lub skrobi. Śmierć zakażonych zwierząt następuje po 1–9 godzinach od wystąpienia objawów choroby. Drobnoustroj ten, podobnie jak inne toksynotypy *Clostridium perfringens*, obecny jest w przewodzie pokarmowym zdrowych zwierząt. Do jego namnożenia dochodzi w sytuacji intensywnego żywienia młodych zwierząt, będących w bardzo dobrej kondycji. Zwykle ma to miejsce w okresie wypasania na pastwiskach w czasie intensywnego wzrostu traw.

Tabela 2. Główne toksyny wytwarzane przez *Clostridium perfringens*

Toksynotyp	Główna toksyna			
	alfa	beta	epsilon	jota
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+



Choroba ta nosi nazwę choroby z przejeżdżenia lub choroby miękkiej nerki (18, 19).

U owiec zakażenie *Clostridium perfringens* typ D dotyczy jagniąt w wieku od 4 do 10 tygodni. Jagnięta 6-miesięczne i starsze chorują sporadycznie. Wytwarzana przez bakterie toksyna prowadzi do uszkodzenia naczyń krwionośnych (receptor dla toksyny epsilon obecny jest na powierzchni komórek śródbłonna) oraz objawów nerwowych. Objawy zapalenia jelit u owiec pojawiają się bardzo szybko, bo zwykle już po 2 godzinach i nie później niż po 12 godzinach od zakażenia. Zwykle duży odsetek jagniąt nie wykazuje przed śmiercią objawów chorobowych. Natomiast pierwsze zauważalne objawy choroby to depresja, ziewanie oraz brak zainteresowania karmą. Natępnie pojawia się biegunka, kał jest zielonkawy, ciastowaty. Objawy nerwowe to: *opisthotonus*, a z czasem utrata świadomości. Temperatura ciała pozostaje w normie, a śmierć następuje wśród objawów konwulsji. U osobników dorosłych okres do wystąpienia objawów jest dłuższy, zwykle trwa 24 godziny. Objawy w początkowej fazie to szczerkościsk, ślinienie się, przyspieszone i nieregularne oddechy. W krótkim czasie dołączają się objawy nerwowe: drżenia mięśni, zgrzytanie zębami oraz utrzymujące ślinienie się.

U kóz natomiast po kilku dniach od zakażenia pojawia się biegunka, a temperatura ciała wzrasta do 40,5°C. U kózlat obserwuje się nagłe upadki. Niekiedy choroba trwa 4–36 godzin; pojawia się silna depresja, bóle okolic brzucha i wodnista biegunka. Z kolei u dorosłych kóz gorączka może nie występować, a objawy są mniej nasilone. W przypadku braku leczenia śmierć następuje po 2–4 dniach. Zwykle u kóz choroba przebiega jednak przewlekłe i może trwać nawet kilka tygodni. Kozy tracą apetyt, są apatyczne, zmieszają się zdecydowanie ich wydajność mleczna. Stopniowo pogarsza się kondycja zwierząt. Okresowo pojawia się biegunka, a w kale można dostrzec śluz i strzępy błony śluzowej lub krew (12, 19, 20).

Objawy obserwowane u cieląt są podobne do występujących u dorosłych owiec. W przebiegu nadostrym śmierć następuje nagle, bez wcześniejszych wyraźnych objawów. W łagodniejszym przebiegu objawy nerwowe pojawiają się po 1–2 dniach. Poza objawami nerwowymi obserwujemy niechęć do picia; zwierzęta mają zamknięte powieki, nie reagują na bodźce. Ciekawą cechą jest to, że w grupie cieląt możemy obserwować jednocześnie trzy formy przebiegu zakażenia (6, 13).

### Ogniskowa symetryczna encefalomalacja

Jest to sporadycznie występujące zakażenie u owiec młodych i dorosłych. Zwykle

objawy pojawiają się w ciągu 5–14 dni po zmianie pastwiska lub po zastosowaniu preparatów odrobaczających. Śmiertelność jest niska i na ogół nie przekracza 15%. Zakażone owce odstają od grupy i nie wykazują lęku przed człowiekiem i psami, błędzą z zamkniętymi powiekami. W legowiskach leżą na boku z wygiętym łukowato kręgosłupem. Zwierzęta tracą apetyt i nie pobierają wody. Kał jest nieuformowany, ale brak biegunki. Objawy utrzymują się od 1 do 14 dni, a w stadach o wysokim odsetku zakażenia od 5 do 7 dni (6, 21).

### Diagnostyka zakażeń *Clostridium perfringens*

Prowadząc rozpoznawanie należy pamiętać, że podstawowym źródłem beztlenowców jest przewód pokarmowy człowieka i zwierząt oraz gleba. Środowisko, w którym występują te drobnoustroje cechuje ujemny potencjał oksydoredukcyjny, a zatem warunki korzystne do ich bytowania.

Skuteczność izolacji szczepów bakterii jest różna i zależy od miejsca zakażenia. Mieszane zakażenia wywołane przez bakterie tlenowe i beztlenowe często obserwujemy w praktyce klinicznej. Ponieważ bakterie beztlenowe nie są dominującymi składnikami flory skóry i błon śluzowych i są one zwykle przyczyną zakażeń pochodzenia endogennego i nie są często izolowane ze zmienionych patologicznie miejsc. Zatem izolacja tych bakterii wymaga odpowiednich metod pobrania próbek, transportu i badania. Rodzaj i kierunek badania przy tych zakażeniach przedstawiono w tabeli 3. Jak wynika z przedstawionej tabeli, diagnostyka zakażeń powodowanych przez bakterie beztlenowe oparta jest głównie na izolacji drobnoustroju oraz wykazaniu obecności produkowanej przez nie toksyny.

Toksynotwórcze szczepy *Clostridium perfringens* typ A są obecne w jelitach zdrowych zwierząt, szczególnie u owiec i kóz ( $10^4$ – $10^7$  CFU/g), stąd izolacja tych szczepów nie jest podstawą do postawienia diagnozy. Natomiast wykazanie toksyny alfa (CPA) w treści jelita jest pomocne w rozpoznaniu zakażenia. W tym celu wykorzystuje się test ELISA cechujący się wysoką czułością. Wzrost stężenia toksyny jest trudny do interpretacji, ponieważ koncentracja CPA jest różna w różnych odcinkach jelit zdrowych zwierząt. Alternatywą jest wykazanie obecności toksyny przy użyciu testu neutralizacji na myszach (MNT), porównując jej stężenie u zdrowych i chorych zwierząt. Zatem diagnostyka *Clostridium perfringens* typ A opiera się na łączeniu obrazu zmian klinicznych i badaniu laboratoryjnym (4, 13, 22, 23).

Obecność toksyny beta (CPB) w badanym materiale uważa się za potwierdzenie

obecności szczepów *Clostridium perfringens* typ C, co nie jest jednoznaczne w przypadku typu B. Istotne znaczenie ma obecność w świetle jelita trypsyny. Ponieważ CPB jest przez nią inaktywowana, stąd stwierdza się jej niskie poziomy, szczególnie u młodych zwierząt. Wykazanie zatem aktywności CPB i ETX (toksyna epsilon), również przy zastosowaniu testu ELISA, przemawia za obecnością *Clostridium perfringens* typów B i C. Ta różnica z kolei jest podstawą do różnicowania enterotoksemii typu B lub C. Wspomniana wrażliwość CPB na trypsynę i jej szybka inaktywacja w świetle jelita sprawia, że zakażenie *Clostridium perfringens* typ B związane jest z produkcją CPA, CPB i ETX, natomiast wykazanie obecności CPA i ETX świadczy o zakażeniu *Clostridium perfringens* typ D. Zatem należy mieć na uwadze tę możliwość, opierając się jedynie na wykazaniu obecności toksyny. To powoduje, że rozpoznawanie zakażeń powodowanych przez *Clostridium perfringens* typów B lub C należy opierać na wykazaniu obecności toksyny w połączeniu ze zmianami patologicznymi, jak i izolacji bakterii (10).

Toksyna D występuje także w świetle jelit zdrowych zwierząt, lecz zwykle na bardzo niskim poziomie, stąd nie wykonuje się badań diagnostycznych w tym kierunku u chorych zwierząt. Jednakże stwierdzenie równoczesne obecności toksyny charakterystycznej dla enterotoksemii typ A oraz toksyny typu D daje podstawę do wskazania obecności toksynotypu D *Clostridium perfringens*. Liczba ta wynosi u zakażonych zwierząt  $10^4$ – $10^7$  CFU/g *Clostridium perfringens* typu D. Brak takich danych dla kóz i cieląt.

Wykazanie obecności toksyny ETX w treści jelita na poziomie <250 dawek letalnych/50 ml potwierdza kliniczne rozpoznawanie choroby u owiec.

W praktyce laboratoryjnej dostępnych jest wiele technik pozwalających na wykrycie ETX w zawartości jelita lub płynach ustrojowych. Porównując dostępne metody: test ELISA, MNT i immunoelektroforeza, potwierdzono wysoką czułość testu ELISA. Jednakże wykazanie toksyny nie zawsze jest zgodne z obrazem klinicznym. W przypadku tej toksyny ważne jest dodanie do pobranej treści jelita chloroformu przed wysłaniem materiału do badań. Ma to na celu utrzymanie toksyczności i koncentracji ETX (10, 20, 24, 25).

Pomocniczym badaniem dla wykazania obecności toksyny, szczególnie u owiec i kóz, jest stwierdzenie obecności glukozy w moczu. W takim przypadku istnieje duże prawdopodobieństwo enterotoksemii typu D. Brak glukozurii nie daje jednak podstaw do wykluczenia zakażenia

*Clostridium perfringens* typu D w diagnostyce różnicowej. Ponadto pomocne w rozpoznaniu *Clostridium perfringens* typu D może być badanie mikroskopowe i wykazanie w barwieniu dużej liczby bakterii Gram-dodatnich, przy braku w preparacie bakterii Gram-ujemnych (26).

Badanie uzupełniające rozpoznanie kliniczne lub anatomopatologiczne wymaga jednak szczegółowej analizy przypadku oraz właściwego pobrania i przesłania materiału do badań.

### Profilaktyka swoista

Choroby wywołane przez bakterie *Clostridium* spp. można łatwo zwalczać za pomocą szczepień. Nowoczesne szczepionki produkowane są na bazie oczyszczonych toksoidów (nieaktywne i nieszkodliwe dla zdrowia pochodne toksyny), odpowiedzialnych za chorobę. Z wyjątkiem *Clostridium chauvoei*, która do osiągnięcia wymaganego poziomu immunogenności wymaga zastosowania w preparatach materiału komórkowego bakterii, toksoidy pozostałych *Clostridium* spp. są wysoce immunogenne. O ile szczepionki monowalentne stosowane są nadal jedynie w określonych zagrożeniach epizootycznych, o tyle w przypadku tych bakterii odnotowuje się wzrost produkcji szczepionek poliwalentnych. Zapewniają one pełną ochronę, będąc jednocześnie preparatami dostosowanymi do różnego wieku immunizowanych zwierząt (głównie owiec) oraz do specyfiki zakażeń, związanej z występowaniem niektórych postaci zakażeń w wybranych regionach geograficznych świata.

Zapobieganie rozwojowi dyzenterii u jagniąt, krwotocznego zapalenia jelit czy tężca uzależnione jest od możliwości zapewnienia zwierzętom zaraz po urodzeniu wysokiego poziomu ochrony. W przypadku jagniąt nie można tego

osiągnąć poprzez ich szczepienie. Przeciwciała przeciwko antygenom *Clostridium* spp. nie przenikają do rozwijającego się płodu poprzez łożysko. Jeżeli jednak zapewni się matkom wysoki poziom odporności, koncentrują one w siarce przeciwciała już na ok. 13 dni przed porodem. Stąd główną zasadą, na której bazuje wytworzenie swoistej odporności przeciwko klostridiom, jest systematyczne szczepienie matek, przekazujących odporność potomstwu poprzez siarę. Szczepionki oparte o toksoidy są szczepionkami inaktywowanymi. Do osiągnięcia maksymalnego poziomu odpowiedzi immunologicznej wymagane jest dwukrotne ich podanie, w odstępie 4–6 tygodni (szczepienie podstawowe). Poziom wytworzonych przeciwciał spada w ciągu ok. roku, w kolejnych latach zaleca się więc coroczne doszczepianie zwierząt. Chcąc zapewnić najlepszą ochronę stadom, doszczepianie matek powinno się wykonywać na około 4 tygodnie przed planowanym terminem wykotów – uzyskujemy tym sposobem odporność trwającą ok. 12 tygodni. W świetle dostępnych danych krążące przeciwciała matczyne nie wydają się interferować z odpornością wytwarzaną przez młode jagnięta po ich pierwszych szczepieniach.

W przypadku bydła szczepienie wykonywane jest u matek, jeśli potomstwo w okresie 1–4 miesięcy po urodzeniu jest kastrowane lub kierowane do sprzedaży. Większość producentów szczepionek przeciwko klostridiom zaleca doszczepienie po 2–6 tygodniach od pierwszego szczepienia.

Istotnym elementem szczepień przeciwko *Clostridium* spp. jest sposób podania szczepionki. Szczepionki wprowadzane domięśniowo zwykle powodują powstanie w miejscu podania uszkodzenia tkanki mięśniowej utrzymującego się przez 7–12 miesięcy. Odczyny te stanowią

około 10% zmian stwierdzanych w tkance mięśniowej w rzeźniach na terenie USA i zależne są od składu antygenowego stosowanego preparatu. Zmiany poszczepienne w mięsie wołowym wpływają na jego niską ocenę przez konsumentów i w końcowym efekcie na cenę. Zapobieganie zmianom w mięśniach w miejscu podania szczepionki były przesłanką do stworzenia programu ochrony jakości mięsa wołowego wdrożonego w życie w kilku stanach USA. W ramach tego programu preferowane jest stosowanie tych szczepionek podskórnie, w okolicę karku. Ta droga podania z jednej strony nie jest przyczyną uszkodzenia tkanki mięśniowej, a z drugiej daje lepszą odpowiedź organizmu na podaną szczepionkę (11, 27).

Nieco inaczej sytuacja przedstawia się u owiec i kóz, gdzie obserwowana jest różnica między obu gatunkami w odpowiedzi na zakażenie drobnoustrojami z rodzaju *Clostridium* spp. U kóz obserwuje się większą różnorodność postaci klinicznych w przebiegu zakażeń powodowanych przez *Clostridium* spp., stąd też preparaty powinny zawierać większą gamę antygenów *Clostridium* spp.

### Piśmiennictwo

1. Błaszczak M.K.: *Mikrobiologia środowiska*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2010, s. 101.
2. Bourgault A. M., Rosenblatt J. E., Fitzgerald R.H.: *Peptococcus magnus*: a significant human pathogen. *Ann. Intern. Med.* 1980, 2, 244-248.
3. Cygan Z.M.: *Choroby beztlenowcowe zwierząt*. Wyd. 1, PPHU POL-DRUK, Kraków, s 55-62, 73-78, 82-86.
4. Rood I.J.: Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annu Rev. Microbiol.* 1998, 50, 333-360.
5. Dray T.: *Clostridium perfringens* type A and beta2 toxin associated with enterotoxemia in a 5-week-old goat. *Can. Vet J.* 2004, 45, 251-253.
6. Radosz O.M., Blood D.C., Gay C.G.: *Veterinary Medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*. 10<sup>th</sup> ed., 2007, Baillière Tindall, Londyn-Filadelfia-Sydney-Tokio-Toronto, ss. 820-840.
7. Songer J.G., Uzal F.A.: Clostridial enteric infections in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2005, 17, 528-36.

**Tabela 3.** Rodzaje próbek do badań i metody diagnostyczne stosowane w rozpoznawaniu zakażeń powodowanych przez *Clostridium perfringens*

Rodzaj próbk	Warunki transportu	Metoda diagnostyczna	Znaczenie diagnostyczne
Mózg	10% buforowana formalina	histopatologia	potwierdzające <sup>1)</sup>
Jelito	10% buforowana formalina	histopatologia	wysoko prawdopodobne <sup>2)</sup>
Wymaz z błony śluzowej jelita	wysuszony w temperaturze pokojowej	badanie mikroskopowe – barwienie metodą Grama	prawdopodobne <sup>3)</sup>
Treść jelit	fragment pętli jelita schłodzony do 4–8°C lub zamrożony	wykazanie obecności toksyny	CPA potwierdzenie typu A CPB i ETX potwierdzenie typu B CPB potwierdzenie typu C ETX potwierdzenie typu D ITX potwierdzenie typu E
Wymaz z błony śluzowej jelita lub treść jelita	schłodzenie do 4–8°C	hodowla w warunkach beztlenowych poprzedzona typowaniem techniką PCR	potwierdzające <sup>4)</sup> zgodna <sup>5)</sup>

Objaśnienia:

<sup>1)</sup> – badanie potwierdzające dla zakażeń *Clostridium perfringens* typu D

<sup>2)</sup> – *Clostridium perfringens* typu D u kóz

<sup>3)</sup> – dla wszystkich enterotoksymii powodowanych przez *Clostridium perfringens* typów A, B, C, D, duża liczba laseczek w polu widzenia

<sup>4)</sup> – enterotoksymia wywołana przez typy B, C i D

<sup>5)</sup> – jeśli jest to typ A i duża liczba wyizolowanych bakterii

8. Songer J.G., Taylor D.J.: Clostridial infection. W: *Diseases of Swine*. Edit.: Straw B., Zimmerman J.J., D'Allanin, Taylor D.J., 9<sup>th</sup> ed., Blackwell Publishing Oxford, UK, 2006.
9. Varga J.J., Nguyen V., O'Brien D.K.: Type IV piliddependent gliding motility in the Gram-positive pathogen *Clostridium perfringens* and other Clostridia. *Mol. Microbiol.* 2006, **62**, 680-694.
10. Uzal F.A., Songer J.G.: Diagnosis of Clostridial Perfringens intestinal infections in sheep and goats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2008, **20**, 253-265.
11. Lebrun M., Mainil J.G., Linden A.: Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens*: description, diagnosis and prophylaxis. *Vet Rec.* 2010, **167**, 13-22.
12. Lewis C.J.: Clostridial diseases. W: *Diseases of Sheep*, Martin W.B., Aitken I.D. (edit.), 4<sup>th</sup> ed., 2000, Blackwell Science, Oxford, UK, s. 131-142.
13. Songer J.G.: Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996, **9**, 216-234.
14. Songer J.G.: Clostridial diseases of small ruminants. *Vet. Res.* 1998, **29**, 219-232.
15. Morris W.E., Venzano A.J., Elizondo A., Vilte D.A., Mercado E.C., Fernandez-Miyakawa M.E.: Necrotic enteritis in young calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2011, **23**, 254-259.
16. Rings D.M.: Clostridial disease associated with neurologic signs: tetanus, botulism, and enterotoxemia. *Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 2004, **20**, 379-391.
17. Luginbühl A.: The necrotizing enteritis by *Clostridium perfringens* type C in piglets: practical observations, control and epidemiology in Schweiz. *Arch Tierheilkd.* 2002, **144**, 263-273.
18. Baker I.K., Van Dreumen A.A., Palmer N.: The alimentary system. W: *Pathology of Domestic Animals*. Jubb K.F., Kennedy P.C., Palmer N. (edit.), 4<sup>th</sup> ed., 1993, Academic Press, San Diego, CA, s. 237-245.
19. Blackwell T.E., Butler D.G., Prescott J.F.: Differences in signs and lesions in sheep and goats with enterotoxemia induced by intraduodenal infusion of *Clostridium perfringens* type D. *Am. J. Vet. Res.* 1991, **52**, 1147-1152.
20. Uzal F.A., Kelly W.R., Thomas R.: Comparison of four techniques for the detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in intestinal contents and other body fluids of sheep and goats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2003, **15**, 94-99.
21. Pienaar J.G., Thornton D.J.: Focal, symmetrical encephalomalacia in sheep in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.* 1964, **35**, 351-358.
22. Popoff M.R.: Bacteriological examinations in enterotoxemia of sheep and lamb. *Vet. Rec.* 1984, **114**, 324-329.
23. Uzal F.A.: Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *Anaerobe* 2004, **10**, 135-143.
24. Naylor R.D., Martin P.K., Sharpe R.T.: Detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin by ELISA. *Res. Vet. Sci.* 1987, **42**, 255-256.
25. Niilo L.: Bovine enterotoxemia. III. Factors affecting the stability of the toxins of *Clostridium perfringens* types A, C, and D. *Can. Vet. J.* 1965, **6**, 38-42.
26. Uzal F.A., Kelly W.R., Morris W.E.: The pathology of experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2004, **16**, 403-411.

---

Dr hab. Ryszard Rypuła, Zakład Epizootiologii i Administracji Weterynaryjnej, Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP we Wrocławiu, Plac Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław