

Rola *Clostridium difficile* i *Clostridium novyi* w wywoływaniu chorób świń

Marian Truszczyński, Zygmunt Pejsak

z Zakładu Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Ważnymi chorobami, które wywołująmi przez drobnoustroje beztlenowe z rodzaju *Clostridium*: zakaźne martwicze zapalenie jelit (powodowane przez *C. perfringens* typu C); zapalenie jelit (prosiąt, które wywołuje typ A *C. perfringens*); choroba prosiąt, której czynnikiem etiologicznym jest *C. difficile* (CDAD); nagła śmierć tuczników i loch (sudden death) wywołana przez *C. novyi*.

Celem tego artykułu jest omówienie dwóch chorób wymienionych na końcu. Dwie poprzednie zostały scharakteryzowane wcześniej (1).

CDAD prosiąt oseków

Wywołujący CDAD *C. difficile* jest Gram-dodatni, beztlenowy, pałeczkowaty, tworzący przetrwalniki. Ma fimbrie umożliwiające adhezję do błony śluzowej jelit. Czynnikiem chorobotwórczym wymienionego drobnoustroju są: enterotoksyna A lub TcdA, cytotoksyna B lub TcdB oraz ADP-rybotransferaza. Są one egzotoksynami. W obrębie gatunku wyróżniono 12 serogrup (A-I, K, X, S; 2).

Clostridium difficile jest ważnym patogenem człowieka. Wywołuje biegunkę i rzekomobłoniaste zapalenie okrężnicy (pseudomembranous colitis), zwłaszcza w wyniku zakażeń szpitalnych. Występuje one zazwyczaj w następstwie podawania pacjentom antybiotyków (3). Głównymi odmianami o szczególnej chorobotwórczości dla ludzi jest toksynotyp III, czyli rybotyp 027 (4, 5). Wymieniony drobnoustroj ma również znaczenie jako przyczyna chorób przebiegających z biegunką u zwierząt, głównie bydła i wici (6, 7, 8, 9, 10) oraz koni (11, 12, 13, 14). Istnieją nie w pełni udokumentowane podstawy do obaw, że zwierzęta mogą być rezerwuarem zoonotycznych zakażeń ludzi za pośrednictwem produktów i żywności pochodzenia zwierzęcego (5, 8, 9, 15, 16, 17, 18, 19). Będzie o tym mowa szerzej w kolejnym tekście.

Wzrost *C. difficile* na podłożach bakteriologicznych przy zastosowaniu hodowli w warunkach beztlenowych nie zawsze się udaje, gdy nie zawsze udaje się uzyskać odpowiedniej liczby beztlenowców. Z tego powodu przy braku wzrostu istotnie

warto diagnostycznie wykryć toksyny wytwarzanych przez *C. difficile* (20).

Ze względu na występowanie w obrębie gatunku *C. difficile* licznych odmian różnej zjadliwości i znaczeniu epidemiologicznym do ich identyfikacji zastosowanie znajdują następujące metody molekularne: rybotypowanie PCR (10, 15, 21, 22, 23, 24), elektroforeza pulsacyjna w żelu agarowym (pulsed field gel electrophoresis – PFGE; 21, 23, 25) i określanie egzotoksyn czyli toksynotypowanie (24, 26, 27, 28).

Dostępny w handlu zestaw ELISA do identyfikacji toksyn A i B *Clostridium difficile* oceniano w identyfikowaniu odmian tego gatunku występujących u prosiąt noworodków. W tym celu test ten porównano z metodą efektu cytotoksycznego w hodowli tkankowej, która uważana jest jako referencyjna do wykrywania toksyn *C. difficile* (29). Okazało się, że przy porównaniu z wymienionym standardem, zestaw ELISA daje bardzo zbliżone wyniki i ma podobną wartość diagnostyczną, a jest prostsza w wykonaniu.

Do metod rozpoznawania poszczególnych wariantów *C. difficile* należą inne testy wymienione przez Bakera i wsp. (30).

Według Songera i wsp. (6) wiecej niż 1/3 padłych w USA prosiąt, dostarczanych do laboratoriów diagnostycznych z wcześniejszymi objawami biegunki, wykazuje CDAD niewykłane drobnoustrojami innymi niż *C. difficile*. Dodatkowo zachorowania i zejścia śmiertelne z udziałem, oprócz *C. difficile*, innych enteropatogenów drobnoustrojów stanowi dalsze 20–30%. Dowodzi to stosunkowo dużej, nie przez wszystkich wiadomemu, roli *C. difficile* w produkcji trzody chlewnej. Jest to konsekwencją nie wszędzie opanowanej i stosowanej nowoczesnej diagnostyki laboratoryjnej w identyfikacji tego drobnoustroju. Dodatkowo, liczba biegunek prosiąt wywołanych przez *C. difficile* jest wysoka, wynika to z przeprowadzanych badań laboratoryjnych. Główną przyczyną tego problemu diagnostycznego jest niestabilność toksyn *C. difficile*, które degradują się w czasie transportu do laboratorium. Próbkibadane następnie na ich obecność dają wynik fałszywie ujemny (7, 20, 31).

W patogenezie CDAD u prosiąt oseków istotną rolę odgrywają toksyny A i B.

The role of *Clostridium difficile* and *Clostridium novyi* in pathogenesis of swine diseases

Truszczyński M., Pejsak Z., Department of Swine Diseases, National Veterinary Research Institute, Pulawy

The aim of this paper was to overview the role of *Clostridium difficile* and *Clostridium novyi* in pathogenesis of swine diseases. *Clostridium difficile* associated disease (CDAD) occurring in humans was shortly characterized. Properties of *C. difficile* were presented with particular description of its main toxins: enterotoxin A and cytotoxin B. Tests for the identification of *C. difficile* variants were enumerated as follows: PCR-ribotyping, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and toxinotyping. The major part of this article is related to the importance of CDAD in 1–7 day old piglets. Etiologically dominant ribotype 078 of *C. difficile* was presented. The role of zoonotic reservoir of swine origin *C. difficile* strains was discussed with the statement that this may present a serious risk for humans. Possibility of immunoprophylactic measures was suggested. Prevention of *C. difficile* spread using effective antibiotics in sows before parturition and for some days afterwards was advised. Also the method of early treatment of piglets with antitoxins and antibiotics was characterized. The next topic was the occurrence of sudden death in sows and finishers caused by *C. novyi*, particularly type B and type A. The laboratory diagnostic procedures were discussed and the stress has been put on the risk of numerous false negative and false positive results. Therefore, it must be supported by the results of autopsy characterized by rapid post mortem decomposition and hepatic degeneration with gas bubbles and emphysema. For the identification of alpha toxin, the most important virulence factor of *C. novyi*, seroneutralisation test performed in culture of Chinese hamster ovary cells and ELISA was presented. The growing importance of sudden death cases in pig farms was underlined. It was also indicated that this category of illness can be controlled by specific antitoxins administration and by the reduction of pneumonia, metritis and enteritis cases in swine herds.

Keywords: *C. difficile*, *C. novyi*, pathogenesis, swine.

Wywołują one zaburzenia ze strony jelita lepego i okrężnicy (6, 32).

Podobnie jak w przypadku zakaźnego martwiczego zapalenia jelit prosiąt, powodowanego przez typ C *C. perfringens* i ujawniającego się już nawet pierwszego dnia po porodzie, z nasilającymi się zakażeniami do 7 dni życia, również w przypadku CDAD występuje w tym samym okresie masowe zachorowania i nagłe zejścia śmiertelne.

Zmiany anatomopatologiczne charakteryzują się obrzękiem cian okrężnicy oraz nadciśnieniem jej nabłonka. Dodatkowo

stwierdza się nagromadzenie płynu w jamach opłucnej i otrzewnej.

Z badań Keela i wsp. (10) wynika, że wśród izolatów *C. difficile* wyisobnionych od prosi najczęściej (83%) był rybotyp 078. W przeciwieństwie do tego tylko jeden spośród 23 izolatów *C. difficile* od człowieka zaliczono do rybotypu 078 (10). Dane te potwierdzają liczne publikacje (5, 18, 33, 34, 35). Cytowani autorzy wskazują na możliwość chorobotwórczości izolowanych od wiś szczepów dla człowieka, chociaż Baker i wsp. (30) uważają, że do zajęcia ostatecznego stanowiska konieczne są dalsze prace badawcze.

Jak wynika z danych Avberseka i wsp. (36), izolaty uzyskane od prosi należały do dwóch toksynotypów (V i O), czterech PCR-rybotypów (066, 029, SI 011, SI 010) oraz sześciu profili elektroforetycznych (PFGE). Nie wykazano różnic przy porównaniu zestawów odmian *C. difficile* izolowanych od prosi i zdrowych lub od wykazujących objawy kliniczne biegunki. Zatem wśród zidentyfikowanych wariantów *C. difficile* nie można było określić takich, które uznano za bezwzględnie chorobotwórcze. Beztlenowce te stanowiły w związku z tym bakterie warunkowo chorobotwórcze, przy niepoznanym dotychczas mechanizmie nabywania patogenności, to jest zdolności wytwarzania chorobotwórczych egzotoksyn.

Goorhuis i wsp. (18) wskazali, że rybotyp 078 często stwierdzany jest w produktach mięsnych, co sugeruje możliwość transmisji od zwierząt do człowieka bardziej jednoznacznie, niż sformułował Baker i wsp. (30). W Holandii (18) w próbkach ze szpitali wykazano testem PCR rybotyp 078 stosunkowo często od pacjentów z biegunką. Reprezentował on trzeci najczęściej typ w typie 027 (16%) i typie 014 (16%) oraz występował w 10,6% przypadków. Wszystkie zidentyfikowane szczepy należały do toksynotypu V i zawierały geny TcdA i TcdB. Badacze holenderscy (18) wnioskują zatem, że *C. difficile* rybotyp 078 stwierdzany jest dość często w przypadkach CDAD w populacjach ludzi w tym kraju. Jako że 078 jest również uznany za ważny patogen prosi i osieków z CDAD, kontynuowane są badania, zmierzające do określenia znaczenia tego potencjalnego zwierzęcego źródła zakażenia człowieka.

Ze względu na niewywoływanie przez *C. difficile* biegunek u tuczników oraz jego niskie u nich nosicielstwo (do 3,9%) przeniesienie bezpośrednio z tego źródła drobnoustroju za pośrednictwem żywności i produktów odwiś wydaje się raczej mało prawdopodobne (37). Natomiast źródłem CDAD dla człowieka mogą być wtórnie zanieczyszczenia surowców i produktów mięsnych przetrwalnikami *C. difficile*

ze środowiska, które zanieczyszczają wymienionym drobnoustrojem człowiek lub zwierzęta.

Zgodnie z pracami Ihunga i wsp. (5) zanieczenie CDAD w wywoływaniu biegunek u ludzi w USA również. Cytowani autorzy uważają, że w głównej części zwiś zanieżenie jest to z pojawianiem się w wyniku zmienności *C. difficile* nowych, bardziej zjadliwych odmian tego gatunku u człowieka, niezależnie od rezerwuaru zwierzęcego. Taką odmianą jest szczep NAP1 (zgodnie z wzorcem elektroforezy pulsacyjnej w celu agarowym – PFGE). *Clostridium difficile* występuje jednakże w produktach mięsnych, co może nie wyklucza źródła również od zwierzęcego nowych grup odmian *C. difficile* (8). Do tych informacji należy dodać, że wśród toksynotypów wykazanych u człowieka stwierdzano toksynotyp V (10, 16). Okazało się, że wywoływał on te CDAD u ludzi, będąc również częstą przyczyną masowych zachorowań prosi i osieków i u cieląt w latach 1998–2008 (7, 16, 38). Jednak podobnie jak poprzednio stwierdza się (5), że brakuje wystarczających do wiarygodnych dowodów na potwierdzenie jednoznacznie tego źródła zakażenia człowieka. Ostateczne wyjaśnienie tego problemu wymaga dalszych badań (22).

W pracy Arroyo i wsp. (15) wskazano, że rybotypowanie służy do wykrywania genów kodujących toksyny A i B, jest przydatne w śledzeniu transmisji szczepów od zwierząt do człowieka.

W immunoprofilaktyce CDAD, analogicznie jak w przypadku biegunki prosi i osieków, wywołanej przez *C. perfringens* typu C, mogłyby być skuteczne inaktywowane antytoksyny z *C. difficile*, podawane parenteralnie lochom w połowie ciąży i powtórnie 2 tygodnie przed porodem. Jednakże brak danych na temat do wiadczego w tym zakresie w odniesieniu do CDAD prosi i osieków. Również podawanie prosiom matki najwcześniej po urodzeniu parenteralnie antytoksyn swoistych dla toksyn *C. difficile*, to jest TcdA i TcdB, byłoby uzasadnione, co wynika z do wiadczego wykonanych na zwierzętach laboratoryjnych. Jednakże preparaty tego rodzaju nie są w handlu dostępne (39, 40). W celu zapobiegania beztlenowcowej biegunce prosi i noworodków wywołanej przez *C. difficile* zaleca się m.in. podawanie lochom wirginiamycyny przed i po porodzie. W leczeniu prosi z biegunką wyniki pozytywne mogą być uzyskane po podawaniu im tylozyny (32).

Nagła śmierć tuczników i loch

Clostridium novyi jest bezwzględnie beztlenowcem o bardzo opornych przetrwalnikach. Na podstawie wytwarzanych egzotoksyn oraz właściwości biochemicznych

i chorobotwórczości rozróżnia się w obrębie gatunku 3 typy – A, B i C. Do tego należy dodać typ D, który jako osobny gatunek stanowi *C. haemolyticum* (2, 41).

C. novyi typ A wywołuje zgorzel gazową u ludzi i zakażenia przyranne u zwierząt. Jest chorobotwórczy dla bydła i owiec. Typ B tego gatunku jest czynnikiem etiologicznym zakażenia martwiczego zapalenia w trawie owiec i bydła. *C. novyi*, typ C, nie ma znaczenia w wywoływaniu chorób u zwierząt domowych.

Typ B oraz w mniejszym stopniu A *C. novyi*, zwłaszcza ze względu na produkowanie przez nie toksyn alfa, stanowią czynniki etiologiczne nagłej śmierci tuczników i loch, choroby o coraz większym znaczeniu gospodarczym. Wymieniona egzotoksyna jest transferazą glikozylową. Związek przepuszczalny bariery komórkowej, niszczy połączenia międzykomórkowe i wywołuje martwicę (42, 43, 44). Typ B produkuje dodatkowo fosfolipazę C. Typ A wytwarza natomiast toksynę delta, będącą cytolyziny wiś cholesterol. Oprócz tych głównych egzotoksyn u *C. novyi* stwierdzono szereg innych egzotoksyn o raczej drugorzędnej i niepełnej roli w patogenezie choroby (2, 41, 45, 46).

Clostridium novyi u zdrowych wiś jest jednym z drobnoustrojów normalnej flory, zwłaszcza tylnego odcinka jelita (46). W trakcie rozwoju choroby przetrwalniki *C. novyi* znajdują się w trawie (przy nieznanemu ci drogi, którą tam przenikają) przechodzą w postać wegetatywną, która wydziela wymienione toksyny. Efektem są zmiany martwicze w trawie (48). W kolejności rozwija się toksemia (43).

W badaniu mikroskopowym wymazów z traw stwierdza się duże i Gram-dodatnie laseczki z subterminalnie ułożonymi owalnymi przetrwalnikami. Mogą one być identyfikowane metodą immunofluorescencyjną (FA). Hodowla *C. novyi* wymaga ciśle beztlenowych warunków, szczególnie w odniesieniu do typu B. Negatywny wynik badania mikroskopowego i hodowli *C. novyi* z materiału chorobowego niekoniecznie wyklucza *C. novyi* jako przyczynę zakażenia miertelnego. W przypadku badania hodowlanego należy się do konieczności dysponowania sprzętem do uzyskiwania szczególnie wysokiego stopnia warunków beztlenowych, jako niezbędnych do uzyskania wzrostu w pożywkach bakteriologicznych. Wymieniony drobnoustrój może występować również w narządach i jelitach zwierząt padłych z innego powodu, toteż jego wykazanie w badanej próbce nie może być wyłącznie podstawą rozpoznania nagłej śmierci tuczników i loch (46) i może stanowić wynik fałszywie dodatni. Przetrwalniki mogą bowiem przechodzić w postać wegetatywną już po śmierci

maciory z innego powodu i dopiero wtedy wytwarza toksyny, co należy brać pod uwagę przy rozpoznaniu. Wtedy bowiem miera jest wywołana nie przez *C. novyi*, a przez inny czynnik chorobowy. Może to mieć miejsce zwłaszcza wtedy, kiedy badania laboratoryjne wykonywane jest po okresie dłużej niż 12 godzin od zejścia miernego (46).

Identyfikację toksyny alfa typu B, oprócz próby na zwierzętach, przeprowadza się też w jednowarstwowej hodowli komórek jajników chomików chichich przy dysponowaniu odpowiednimi surowicami antytoksynnymi. Temu samemu celowi służy test immunoenzymatyczny ELISA (49).

Potwierdzenie diagnozy uzyskuje się, stosując chromatografię gazową wykazującą najwyższą zawartość w badanej próbce kwasu propionowego, oprócz wykazania kwasów octowego i butyrylowego (49).

Wymienione testy laboratoryjne wspierają w rozpoznaniu badania sekcyjne padłej wini, wykonane możliwie najwcześniej od padnięcia zwierzęcia. Po miernie stwierdzenia się zdemolowania lub obrzęku zwłok tucznika, lub lochy oraz szybko dokonuje się zmian barwy skóry na purpurową. Wygląd w trobie, zwłaszcza obecnie w niej małych pcherzyków lub kieszonek zawierających gaz, w połączeniu z wspomnianymi obrzękami i szybkimi zmianami barwy skóry oraz postępującymi zmianami o charakterze rozkładu, uznaje się jako charakterystyczne dla udziału *C. novyi* jako przyczyny w chorobie i nagłej mierci lochy lub pierwiastki. Szczególnie latem trudno określić, czy procesy rozkładu są wynikiem toksemii wywołanej przez *C. novyi*, czy też wysychających temperatur w miejscu padnięcia wini. Efektem jest rozpoznanie mniejszej liczby przypadków nagłej mierci tuczników i loch niż to rzeczywiście ma miejsce (48).

Mimo wymienionych zastrzeżeń co do interpretacji wyników badań laboratoryjnych, identyfikacja *C. novyi*, a zwłaszcza obecność toksyny alfa, w połączeniu z nagłym zejściem miernym dorosłej wini, z szybkim rozkładem zwłok, w tym narządów mięśniowych i obecnością pcherzyków gazu w mięszu w trobie, sugeruje, że przyczyną mierci był wymieniony gatunek beztlenowca, przy czym najistotniejszym diagnostycznie wskazanym badaniem sekcyjnym nagłej mierci tuczników i loch są zmiany w w trobie z pcherzykami i torbami wypełnionymi gazem.

Według Marco (45) blisko połowa wszystkich przypadków nagłej mierci pierwiastek i loch wywołana jest przez *C. novyi*, co podkreśla obecne znaczenie tego drobnoustroju w chorobach zakaźnych trzody chlewnej. Badacze Alparma Inc. (50) potwierdzają te wyniki badania. Według Schultza i wsp. (42) roczna miernota macior w USA wynosiła

w okresie ostatnich 10 lat 13,2%. W tej liczbie 39% stanowiła miernota nagła wywołana przez *C. novyi*, która występowała w czasie od 2 dni przed do 5 dni po porodzie (42, 51).

Stosunkowo częściej stwierdza się nagłą miernotę macior w wielokrotnych fermach wielkotowarowych (46, 48, 52, 53) oraz w chowie win poza pomieszczeniami (46, 53) niż w pomieszczeniach zamkniętych.

Niektóre choroby, jak zapalenie macicy, pcherza moczowego, zapalenie jelita z udziałem drobnoustrojów o niskiej patogenności, mogą stwarzać warunki predysponujące lochy do namnaiania się *C. novyi* w w trobie, wytwarzania egzotoksyn i nagłej mierci (48). Dodatkowo okres przedporodowy jest stanem szczególnie stresogennym, co wyraża się m.in. również zwińszaniem nagłej miernoty loch, wywołanej przez *C. novyi*. Zgodnie z opinią Garcii i wsp. (54) cały okres ciąży przy dokonaniu się obrony naturalnej przed zakażeniem może odgrywać rolę sprzyjającą rozwojowi hepatopatii wywołanej przez *C. novyi*.

W Polsce pierwsze przypadki nagłej mierci win opisali Pejsak i wsp. (55).

W zapobieganiu i zwalczaniu nagłej mierci tuczników i loch wywołanej przez *C. novyi*, pomocne jest ograniczanie występowania w stadzie win zespołu beztlenowości poporodowej oraz chorób układów oddechowego i pokarmowego. Zalecane jest też prewencyjne stosowanie tylozyny oraz natychmiastowe usuwanie i palenie padłych win w celu redukcji zanieczyszczenia przetrwalnikami *C. novyi* rodowiska, w którym prowadzony jest chów win. W profilaktyce przydatne są inaktywowane szczepionki – toksoidy, czyli antytoksyny (56). W Polsce dostępna jest wielowarstwowa szczepionka Suiseng (Hipra), zawierająca w swoim składzie m.in. antygeny *C. novyi*. Obserwacje terenowe związane ze stosowaniem tego biopreparatu u loch i tuczników dowodzą jego przydatności w ograniczaniu odsetka przypadków nagłej mierci w ród tych grup wiekowych win.

Nie istnieje efektywne leczenie, zwłaszcza że względu na krótki okres choroby poprzedzający nagłą miernotę.

Piśmiennictwo

- Truszczyński M., Pejsak Z.: Choroby prosi t wywołane przez przetrwalnikuj c beztlenowce. *Medycyna Wet.* 2008, 64, 253-256.
- Hirsh D.C., MacLachlan N.J., Walker R.L.: *Clostridium*. W: *Veterinary Microbiology*. 2nd ed., Blackwell Publishing Ames, Iowa, USA 2004, s. 202-208.
- Kelly C.P., Lament J.T.: *Clostridium difficile* infection. *Ann. Rev. Med.* 1998, 49, 375-390.
- Fawley W.N., Wilcox M.H.: Molecular epidemiology of endemic *Clostridium difficile* infection. *Epidemiol. Infect.* 2001, 126, 343-350.
- Jhung M.A., Tompson A.D., Killgore G.E., Zukowski W.E., Songer G., Warny M., Johnson S., Gording D.N.,

- McDonald L.C., Lumbago B.M.: Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerg. Infect. Dis.* 2008, 14, 1039-1045.
- Songer J.G., Post K.W., Larson D.J., Jost B.H., Glock R.D.: Infection of neonatal swine with *Clostridium difficile*. *Swine Health Prod.* 2000, 8, 185-189.
- Songer J.G., Anderson M.A.: *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe* 2006, 12, 1-4.
- Rodriguez-Palacios A., Stämpfli H.R., Dueld T., Peregrine A.S., Trotz-Williams L.A., Arroyo L.G., Brazier J.S., Weese J.S.: *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 2006, 12, 1730-1736.
- Hammit M.C., Bueschel D.M., Keel M.K., Glock R.D., Cuneo P., DeYoung D.W., Reggiardo C., Trinh H.T., Songer J.G.: A possible role for *Clostridium difficile* in the etiology of calf enteritis. *Vet. Microbiol.* 2008, 127, 343-352.
- Keel K., Brazier J.S., Post K.W., Weese S., Songer J.G.: Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45, 1963-1964.
- Magdesian K.G., Hirsh D.C., Jang S.S., Hansen L.M., Madigan J.E.: Characterization of *Clostridium difficile* isolates from foals with diarrhea: 28 cases (1993-1997). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2002, 220, 67-73.
- Baverud V.: *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. *Vet. Q* 2002, 24, 203-219.
- Baverud V., Gustafsson A., Franklin A., Aspan A., Gunnarsson A.: *Clostridium difficile*: prevalence in horses and environment, and antimicrobial susceptibility. *Equine Vet. J.* 2003, 35, 465-471.
- Arroyo L.G., Stämpfli H.R., Weese J.S.: Molecular analysis of *Clostridium difficile* isolates recovered from horses with diarrhea. *Vet. Microbiol.* 2007, 120, 179-183.
- Arroyo L.G., Kurth S.A., Willey B.M., Stämpfli H.R., Low D.E., Weese J.S.: PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources. *J. Med. Microbiol.* 2005, 54, 163-166.
- Rodriguez-Palacios A., Stämpfli H.R., Dueld T., Weese J.S.: *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 2007, 13, 485-487.
- Rupnik M.: Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? *Clin. Microbiol. Infect.* 2007, 13, 457-459.
- Goorhuis A., Debat S.B., van Leengoed L.A.M.G., Harmanus C., Notermans D.W., Bergwerf A.A., Kuijper E.J., Songer J.G.: *Clostridium difficile* PCR ribotype 078: an emerging strain in humans and in pigs? *J. Clin. Microbiol.* 2008, 46, 1157-1158.
- Rodriguez-Palacios A., Reid-Smith R.J., Stämpfli H.R., Daignault D., Janeco N., Afery B.P., et al.: Possible seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 2009, 15, 802-805.
- Songer J.G., Uzal F.A.: Clostridial enteric infections in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2005, 17, 528-536.
- Bidet P., Lalonde V., Salauze B., Burghoer B., Avesani V., Delmée M., Rossier A., Barbet F., Petit J.: Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 2482-2487.
- Indra A., Schmid D., Huhulescu S., Hell M., Gattringer R., Hasenberger P., Fieldler A., Wewalka G., Allerberger F.: Characterization of clinical *Clostridium difficile* isolates by PCR ribotyping and detection of toxin genes in Austria, 2006-2007. *J. Med. Microbiol.* 2008, 57, 702-708.
- Killgore G., Tompson A., Johnson S., Brazier J., Kuijper E., Pepin J., Frost E.H., Savelkoul P., Nicholson B., van den Berg R.J., Kato H., Sambol S.P., Zukowski W., Woods C., Lumbago B., Gording D.N., McDonald L.C.: Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 2008, 46, 431-437.
- Rupnik M., Brazier J.S., Duerden B.I., Grabnar M., Stubbs S.L.J.: Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes. *Microbiology* 2001, 147, 439-447.
- Nauerby B., Pedersen K., Madsen M.: Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Vet. Microbiol.* 2003, 94, 257-266.
- Rupnik M.: Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008, 32, 541-555.
- Rupnik M., Braun V., Soehn F., Janc M., Hofstetter M., Laufenberg-Feldmann R., von Eichel-Streiber C.:

- Characterization of polymorphisms in the toxin A and B genes of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997, **148**, 197-202.
28. Rupnik M., Avesani V., Janc M., von Eichel-Streiber C., Delmée M.: A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 2240-2247.
 29. Post K.W., Jost B.H., Songer J.G.: Evaluation of a test for *Clostridium difficile* toxins A and B for the diagnosis of neonatal swine enteritis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2002, **14**, 258-259.
 30. Baker A.A., Davis E., Rehberger T., Rosener D.: Prevalence and diversity of toxigenic *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* among swine herds in the Midwest. *Applied Environ. Microbiol.* 2010, **76**, 2961-2967.
 31. Yaeger M., Funk N., Ho mann L.: A survey of agents associated with neonatal diarrhea in Iowa swine including *Clostridium difficile* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2002, **14**, 281-287.
 32. Songer J.G., Taylor D.J.: Clostridial infections. Q: Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Taylor D. J.: *Diseases of Swine*. Blackwell Publishing, 9th ed., Iowa State University Press, Ames USA, 2006, s. 613-628.
 33. Debat S.B., van Leengoed A., Goorhuis A., Harmanus C., Kuijper E.J., Bergwer A.A.: *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 toxinotype V found in diarrhoeal pigs identical to isolates from a affected humans. *Environ. Microbiol.* 2009, **11**, 505-511.
 34. Goorhuis A., Bakker D., Corver J., Debat S.B., Harmanus C., Notermans D.W., Bergwer A.A., Dekker F.W., Kuijper E.J.: Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strains, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin. Infect. Dis.* 2008, **47**, 1162-1170.
 35. Pirs T., Ocepek M., Rupnik M.: Isolation of *Clostridium difficile* from food animals in Slovenia. *J. Med. Microbiol.* 2008, **57**, 790-792.
 36. Avbersek J., Janezic A., Pate M., Rupnik M., Zidaric V., Logar K., Vengust M., Zemljic M., Pirs T., Ocepek M.: Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and Rother animals in Slovenia. *Anaerobe* 2009, **15**, 252-255.
 37. Norman K.N., Harley R.B., Scott H.M., Hume M.E., Andrews K., Brawley A.D.: Varied prevalence of *Clostridium difficile* in an integrated swine operation. *Anaerobe* 2009, **15**, 256-260.
 38. Songer J.G.: e emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Anim. Health Res. Rev.* 2004, **5**, 321-326.
 39. Allo M., Silva J.Jr, Fekety R., Rifkin G.D., Baskin H.: Prevention of clindamycin-induced colitis in hamsters by *Clostridium sordellii* antitoxin. *Gastroenterol* 1979, **76**, 351-355.
 40. Kink J.A., Williams J.A.: Antibodies to recombinant *Clostridium difficile* toxins A and B are an e ective treatment and present relapse of *C. difficile*-associated disease in a hamster model of infection. *Infect. Immun.* 1998, **66**, 2018-2025.
 41. Anon.: http://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium_novyi.
 42. Schultz R., Dau D., Hoefling D., Duran O., Carson T., Betton L., Woodward C., Pollard K., Busker K., Kaster D., Steidinger M.: A sow mortality study – the real reason sows die. Identifying causes and implementing actions. *Proc. A.A.S.V.* Ames, Iowa, 2001, 387-395.
 43. Reeves D.E., Hormon B.: *Clostridium novyi* associated mortality in the sow. *Proc. Am. Ass. Swine Pract.* 33rd Ann. Meeting, Kansas City, Missouri, 2002, 153-154.
 44. Songer J.G.: *Clostridial diseases of animals*. W: Rood J.L., McClane B.A., Songer J.G., Titball R.W. (edit.): *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis*. New York, New York: Academic Press; 1997, s. 153-184.
 45. Marco E.: Sudden death in sows. *Pig J.* 1995, **35**, 157-163.
 46. Almand P., Bilkei G.: *Clostridium novyi* caused outdoor sow mortality in Croatia. *Berliner and Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 2005, **118**, 296-299.
 47. Schultz R., Carr J.: *Clostridium novyi* induction trial to evaluate the pathogenesis of clinical disease. W: *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners*. Toronto, Ontario, 2005, s.107-108.
 48. Duran C.O., Walton J.R.: *Clostridium novyi* sudden death in sows: Toxemia or post mortem invader? *Pig J.* 1997, **39**, 37-53.
 49. Itoh H., Uchida M., Sugiura H., Ogusu S., Yamakawa K.: Outbreak of *Clostridium novyi* infection in swine and its rapid diagnosis. *J. Jap. Vet. Med. Assoc.* 1987, **40**, 365-369.
 50. Alpharma Inc.: Defining sow productivity. 2006, 3.
 51. Wol T.: An overview of research on bacitracin methylene disalicylate (BMD) in sow diets. *Proc. Am. Assoc. Swine Vet.* 2005, s. 101-105.
 52. Walton J.R., Duran C.O.: Sow deaths due to *Clostridium novyi* infection. *Proc. IPVS Cong.* e Hague, Netherlands. 1992, s. 296.
 53. Friendship D., Bilkei G.: Mortality caused by *Clostridium novyi* in outdoor sows in Slovakia. *Vet. Rec.* 2006, **158**, 601.
 54. García A., Ayuso D., Berez J.M., García W.L., Martínez R., Sánchez S.: *Clostridium novyi* infection causing sow mortality in an Iberian pig herd raised in an outdoor rearing system in Spain. *J. Swin. Health Prod.* 2009, **17**, 264-268.
 55. Pejsak Z., Cygan Z., Buczek J.: Rola beztlenowców *C. novyi* w nagłych padni ciach wi . *Medycyna Wet.* 2000, **56**, 39-42.
 56. Amimoto K., Sasaki O., Isogai M., Kitajima T., Oishi E., Okada N., Yasuhara H.: e protective e ect of *Clostridium novyi* type B alpha-toxoid against challenge with spores in guinea pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 1998, **60**, 681.