

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

*Clostridium perfringens*

Michal Vaněk

Bakalářská práce

2018

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Michal Vaněk**  
Osobní číslo: **C15294**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Název tématu: **Clostridium perfringens**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování:

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na *Clostridium perfringens*. Zaměřte se na obecnou charakteristiku, výskyt, patogenезi, geny kódující tvorbu enterotoxinů, klinické obrazy onemocnění a případnou prevenci.
2. Dále rozpracujte metody diagnostiky užívané v praxi, tak rychlé metody, především metody molekulárně-biologické.
3. Uveďte jednotlivé studie zabývající se výskytem a stanovením *Clostridium perfringens* za posledních 10 let.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí Upa č. 9/2012 ve znění dodatku č. 1 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu".

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Petra Mořková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan



L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

## Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 4.7.2018

Michal Vaněk

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych poděkoval mé vedoucí bakalářské práce Ing. Petře Mořkové, Ph.D. za cenné rady, pomoc, ochotu, trpělivost a velmi vstřícný přístup při vypracování bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval rodině, přítelkyni a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

## **ANOTACE**

Tato práce se zabývá bakterií *Clostridium perfringens*. V práci je nejprve uvedena taxonomie rodu *Clostridium*, kterou následuje charakteristika a výskyt *Clostridium perfringens*. Dále je v práci zmíněna patogenita, průběh onemocnění, léčba a prevence.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

*Clostridium perfringens*, anaerobní bakterie, alfa toxin, enterotoxin, plynná gangréna

## **TITLE**

*Clostridium perfringens*

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with *Clostridium perfringens*. The taxonomy of the genus *Clostridium*, followed by the general characteristics and the occurrence of *Clostridium perfringens* is described. Furthermore, the pathogenicity, course of the disease, treatment and prevention are mentioned.

## **KEYWORDS**

*Clostridium perfringens*, anaerobic bacteria, alpha toxin, enterotoxin, gas gangrene

# Obsah

<b>SEZNAM ILUSTRACÍ.....</b>	<b>10</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>11</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>12</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>13</b>
<b>1 CHARAKTERISTIKA RODU <i>CLOSTRIDIUM</i>.....</b>	<b>14</b>
1.1 TAXONOMIE .....	14
<b>2 <i>CLOSTRIDIUM. PERFRINGENS</i> .....</b>	<b>15</b>
2.1 MORFOLOGIE .....	15
2.2 BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI .....	16
<b>3 VÝSKYT .....</b>	<b>18</b>
3.1 VÝSKYT V ROSTLINÁCH .....	18
3.2 VÝSKYT V ŽIVOČIŠNÉ STRAVĚ .....	18
<b>4 PATOGENITA .....</b>	<b>19</b>
4.1 ALFA TOXIN .....	20
4.2 BETA TOXIN.....	21
4.3 EPSILON TOXIN.....	21
4.4 IOTA TOXIN .....	22
4.5 CPE TOXIN.....	22
4.6 NETB TOXIN .....	22
<b>5 GENY KÓDUJÍCÍ TVORBU ENTEROTOXINU .....</b>	<b>23</b>
<b>6 ONEMOCNĚNÍ .....</b>	<b>25</b>
6.1 PLYNATÁ SNĚŽ (GANGRAENA EMPHYSEMATOSA).....	25
6.1.1 <i>5 fází průběhu onemocnění</i> .....	25
6.1.1.1 Vstup <i>C. perfringens</i> do tkání .....	25
6.1.1.2 Rozmnožování organismu .....	26
6.1.1.3 Ztlumení tkáňové odpovědi proti zánětu .....	26
6.1.1.4 Progrese lokální a regionální destrukce tkání .....	27
6.1.1.5 Šok a selhání orgánů .....	27
6.2 PRŮJEM VYVOLANÝ BĚHEM ANTIBIOTICKÉ LÉČBY .....	28
6.3 NEKROTIZUJÍCÍ ENTERITIDA.....	28
6.4 PIGBEL.....	29
6.5 SMRTELNÉ, NEKROTIZUJÍCÍ KLOSTRIDIÁLNÍ INFEKCE U INJEKČNÍCH UŽIVATELŮ DROG.....	29

<b>7</b>	<b>PREVENCE ONEMOCNĚNÍ.....</b>	<b>30</b>
7.1	TEPELNÉ ZPRACOVÁNÍ POTRAVIN .....	30
7.2	OŠETŘENÍ POTRAVIN POMOCÍ VYSOKÉHO TLAKU .....	30
7.3	PROBIOTIKA .....	31
7.4	PREBIOTIKA.....	31
7.5	VAKCINACE .....	32
7.6	HYGIENICKÉ ZÁSADY .....	32
<b>8</b>	<b>LÉČBA ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÁ C. PERFRINGENS.....</b>	<b>34</b>
8.1	LÉČBA POMOCÍ ANTITOXINU ALFA .....	34
8.2	CHIRURGICKÁ LÉČBA .....	34
8.3	LÉČBA ANTIBIOTIKY .....	35
<b>9</b>	<b>METODY STANOVENÍ C. PERFRINGENS.....</b>	<b>37</b>
9.1	STANOVENÍ POMOCÍ SELEKTIVNÍCH AGARŮ .....	37
9.1.1	<i>mCP agar</i> .....	37
9.1.2	<i>TSCF agar</i> .....	38
9.1.3	<i>Clostridium perfringens chromogenní selektivní agar</i> .....	38
9.1.4	<i>Porovnání mCP, TSCF a CPC agaru při stanovení C. perfringens ve vzorcích vody</i> .....	38
9.1.5	<i>Žloutkový agar (EYA)</i> .....	39
9.1.6	<i>Naglerova reakce</i> .....	39
9.2	AUTOMATIZOVANÉ SYSTÉMY VYUŽÍVANÉ PŘI IDENTIFIKACI MIKROORGANISMŮ.....	40
9.2.1	<i>Systém VITEK®</i> .....	40
9.2.1.1	Stanovení anaerobních bakterií pomocí VITEK® MS.....	41
9.2.2	<i>Ionizace laserovou desorpčí v přítomnosti matrice s průletovým analyzátozem</i> .....	41
9.2.2.1	Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF-MS .....	41
9.3	MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY .....	42
9.3.1	<i>Polymerázová řetězová reakce (PCR)</i> .....	42
9.4	IMUNOCHEMICKÉ METODY .....	43
9.4.1	<i>Enzymová imunoanalýza na pevné fázi</i> .....	43
<b>10</b>	<b>STUDIE VÝSKYTU CLOSTRIDIUM PERFRINGENS ZA POSLEDNÍCH 10 LET .....</b>	<b>44</b>
10.1	VÝSKYT C. PERFRINGENS U DIVOKÝCH ZVÍŘAT DRŽENÝCH V ZAJETÍ .....	44
10.2	VÝSKYT C. PERFRINGENS V POTRAVINÁCH V LAGOSU.....	44
10.3	VÝSKYT C. PERFRINGENS V MASE DODÁVANÉHO DO ŠKOLNÍCH JÍDELEN V JIŽNÍ KOREJI .....	46
10.4	VÝSKYT C. PERFRINGENS V KUŘECÍM MASE V KANADĚ .....	46
10.5	VÝSKYT C. PERFRINGENS V ÍNDII U HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT.....	47
<b>11</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>48</b>



12	CITOVANÁ LITERATURA.....	49
----	--------------------------	----

## SEZNAM ILUSTRACÍ

OBRÁZEK 1 - BARVENÍ PODLE GRAMA.....	15
OBRÁZEK 2 - SPORY <i>C. PERFRINGENS</i> .....	16
OBRÁZEK 3 - TABULKA ROZDĚLENÍ PODLE TOXINŮ (AWAD <i>ET AL.</i> , 1995) .....	20
OBRÁZEK 4 - PLYNATÁ SNĚŽ ..... 28	
OBRÁZEK 5 - DOLNÍ KONČETINA POSTIŽENÁ BAKTERIÍ <i>C. PERFRINGENS</i> (FINKELSTEIN <i>ET AL.</i> , 2003) .....	35
OBRÁZEK 6 - AMPUTOVANÁ ČÁST DOLNÍ KONČETINY (FINKELSTEIN <i>ET AL.</i> , 2003) .....	35
OBRÁZEK 7 - PRŮKAZ FOSFOLIPÁZY NAGLEROVOU REAKCÍ (RIJAL 2015).....	40

## **SEZNAM TABULEK**

TABULKA 1 - VÝSKYT <i>C. PERFRINGENS</i> V POTRAVINÁCH (CHUKWU <i>ET AL.</i> , 2017).....	45
---	----

## SEZNAM ZKRATEK

<b>AAD</b>	průjem způsobený antibiotickou léčbou
<b>C.</b>	<i>Clostridium</i>
<b>CPE</b>	<i>C. perfringens</i> enterotoxin
<b>DNA</b>	kyselina deoxyribonukleová
<b>ELISA</b>	Enzymová imunoanalýza na pevné fázi
<b>FISH</b>	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
<b>GTPáza</b>	Guanosintrifosfatáza
<b>HHP</b>	Vysoký hydrostatický tlak
<b>MALDI</b>	ionizace laserovou desorpčí v přítomnosti matrice
<b>MALDI-TOF</b>	ionizace laserovou desorpčí v přítomnosti matrice s průletovým analyzátozem
<b>mCP</b>	<i>Clostridium perfringens</i> membránový agar
<b>MIC</b>	minimální inhibiční koncentrace
<b>NASA</b>	Národní úřad pro letectví a kosmonautiku
<b>NetB</b>	toxin nekrotické enteritidy B
<b>ORF</b>	otevřený čtecí rámec
<b>PAF</b>	faktor aktivující destičky
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce
<b>PLC</b>	fosfolipáza C
<b>RCMB</b>	masový bujón vařený podle Robertse
<b>RFLP</b>	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
<b>rTM</b>	rekombinovaný trombomodulin
<b>S.</b>	<i>Staphylococcus</i>
<b>spp.</b>	poddruh
<b>TNF</b>	faktor tumorové nekrózy
<b>TSC</b>	agar s tryptózou, siřičitanem a cykloserinem
<b>TSCF</b>	agar s tryptózou, siřičitanem, cykloserinem a fluorogenní sloučeninou 4-methylumbelliferyl-beta-D-glukuronid
<b>UV</b>	ultrafialové záření

## ÚVOD

*Clostridium perfringens* je grampozitivní, anaerobní, tyčinkovitá, sporulující bakterie, která se běžně vyskytuje v půdě, prachu, vodě a obecně v životním prostředí. Kvůli tomu často dochází ke kontaminaci potravin či lidských ran. Dále nacházíme *Clostridium perfringens* v trávicí soustavě člověka a zvířat.

Konzumací kontaminovaných potravin může dojít k alimentárním nákazám, které se projeví za velmi krátkou dobu. Pokud jsou bakterií *Clostridium perfringens* kontaminovány rány u lidí, dochází ke vzniku závažných onemocnění, které mohou končit i smrtí.

Nejprve je v práci uvedena obecná charakteristika a výskyt bakterie, dále se v práci pojednává o patogenezi *Clostridium perfringens* a léčbě daných onemocnění, mezi které patří plyná gangréna, průjmy a infekce trávicího traktu zvířat.

V práci jsou uvedeny metody stanovení jak kultivační, pomocí speciálních médií, tak metody molekulárně-biologické, například PCR. Poslední část práce se zabývá výskytem *Clostridium perfringens* za posledních 10 let, a to jak u zvířat, tak u lidí.

# 1 CHARAKTERISTIKA RODU *CLOSTRIDIUM*

## 1.1 Taxonomie

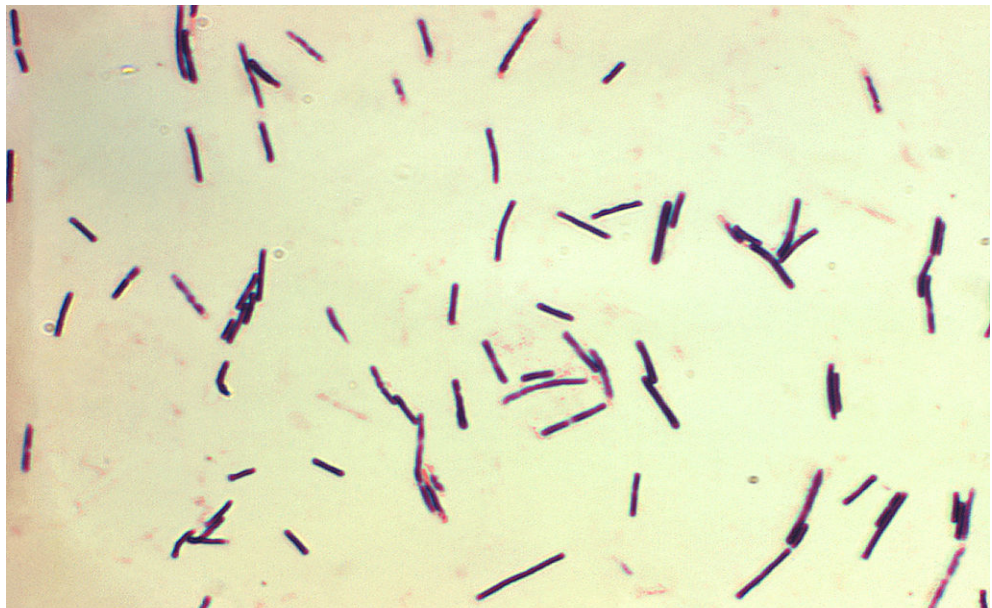
První zmínky o rodu *Clostridium* se datují na konec 17. století. V Německu byla řada ohnisek nemoci, která byla spojena s otravou po požití klobás. V roce 1817 zjistil německý neurolog Justinus Kerner, že otrava po požití klobás je způsobena tyčinkovitou buňkou. V roce 1897 napsal belgický profesor biologie Emile van Ermengem zprávu o izolaci sporulujícího organismu, který byl získán ze zkažené šunky. Biologové klasifikovali van Ermengemův objev jako rod *Bacillus* na základě barvení dle Grama a tvorby spor. Tato klasifikace však představovala problémy, protože izolát rostl pouze v anaerobních podmínkách, ale *Bacillus* dobře rostl i za přítomnosti kyslíku. Rod *Clostridium* z řeckého názvu kloster byl formálně navržen v roce 1920 a *Clostridium perfringens* a *Clostridium welchii* byly uvedeny v publikaci Society for American Bacteriologists (Maczulak, 2011).

Některé bakterie z rodu *Clostridium* patří do přirozeného intestinálního a zažívacího traktu lidí, ale jsou také všudypřítomné v půdě. Několik členů rodu *Clostridium* může způsobit rychlé, a dokonce smrtící infekce. Byla založena identifikace kmenů *Clostridium* na základě jejich biochemických vlastností, ale konfirmace založená na biochemických testech je časově náročná a vyžaduje standardizované médium a podmínky růstu pro zajištění reprodukovatelných výsledků. Navíc některé druhy, jako je *Clostridium bifermentans* a *Clostridium. sordellii*, nemohou být těmito tradičními metodami rozlišeny, protože jejich biochemické vlastnosti jsou téměř totožné. Proto se používají rychlé metody založené na rozdílné DNA jednotlivých bakterií a jiných specifických vlastnostech (Sanchez Ramos a Rodloff, 2018).

## 2 *CLOSTRIDIUM. PERFRINGENS*

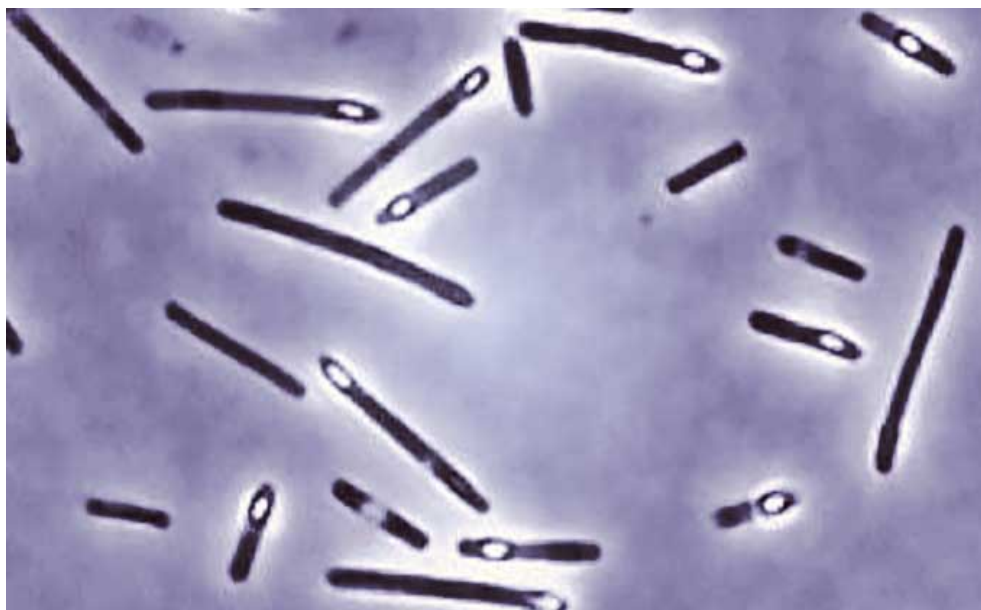
### 2.1 Morfologie

Bakterie *Clostridium (C.) perfringens* je grampozitivní bakterie (Obr.1) z rodu *Clostridium*. *C. perfringens* je nepohyblivá, tyčinková, anaerobní bakterie o délce 4-8  $\mu\text{m}$  a průměru 0,8-1,5  $\mu\text{m}$ . Bakterie za nepříznivých podmínek jako například vysychání, úbytek živin potřebných pro další vývoj, a další změny ohrožující život bakterie, začíná tvořit spory, díky kterým může přežít i několik set let. Spora je u *C. perfringens* uložena subterminálně (Obr.2). Tyčinky jsou rovné a jejich délka závisí na růstovém médiu. Pokud je médium bohaté na glukózu, *C. perfringens* roste v krátkých rovných tyčinkách, zatímco v zásaditém médiu rostou dlouhé tyčinky (Maczulak, 2011).



Obrázek 1 - Barvení podle Grama

<https://pixnio.com/free-images/science/microscopy-images/C.-perfringens/photomicrograph-reveals-C.-perfringens-grown-in-schaedlers-broth-using-gram-stain-725x482.jpg> [cit. 2018-07-03]



Obrázek 2 - Spory *C. perfringens*

<https://reliawire.com/wp-content/uploads/2017/03/C.-perfringens-cells.jpg> [cit. 2018-07-03]

## 2.2 Biochemické vlastnosti

*C. perfringens* je anaerobní až mikroaerofilní bakterie. Byl zjištěn růst vegetativních buněk této bakterie v uvařeném hovězím a krutím mase, a to jak za anaerobních, tak aerobních podmínek. Rozdíl je však v počtu narostlých. V anaerobních podmínkách rostou kolonie *C. perfringens* lépe a rychleji. Například v uvařeném krutím mase při anaerobních podmínkách naroste  $10^7$  kolonie tvořících jednotek za 8 hodin, ale za aerobních podmínek potřebujeme trojnásobek času, než za striktně anaerobních podmínek (Juneja a Sofos, 2010)

Optimální teplota růstu je 43-45 °C, ale teplotní rozmezí je velice široké, uvádí se od 10 °C až po 55 °C. Růst mimo toto teplotní rozmezí je možný, ale generační doba je delší a také bude trvat déle, než začne *C. perfringens* růst. Při teplotách nižších, než je 10 °C je uváděn pokles nebo úplné zastavení růstu kolonií *C. perfringens*. Díky tomu chlazení potravin, které jsou kontaminovány spory nebo vegetativními buňkami *C. perfringens*, nezaručí nepříznivé podmínky pro růst a je stále možný další růst kolonií (Juneja a Sofos, 2010).

Optimální pH pro *C. perfringens* se pohybuje v rozmezí mezi 6,0 až 7,0. Avšak rozmezí, ve kterém může *C. perfringens* růst je mezi hodnotami pH 5,0 až 9,0. V kyselých pokrmech, kde pH klesne pod hodnoty  $\text{pH} \leq 5,0$ , není již nárůst kmenů *C. perfringens* možný (Dejong, 1989).



Růst *C. perfringens* je také závislý na obsahu soli v potravinách. Při obsahu soli okolo 4 %, nebylo zjištěno žádné omezení růstu, při 5–6 % některé kolonie přestávají růst, a téměř všechny kolonie přestávají růst při obsahu soli mezi 7–8 %. Hodnoty koncentrace solí jsou ale vyšší, než hodnoty solí, které jsou běžně nalezeny v potravinách připravených pro konzumaci (Mead *et al.*, 1999).

### 3 VÝSKYT

*C. perfringens* je všude přítomná v životním prostředí. Můžeme ji najít v půdě, prachu, vodě atd. Kvůli svému výskytu v životním prostředí je kontaminovaná flóra i fauna. Dále také najdeme *C. perfringens* ve střevech lidí a zvířat (Voidarou *et al.*, 2011).

#### 3.1 Výskyt v rostlinách

*C. perfringens* se běžně vyskytuje v rostlinách a rostlinných produktech. Výskyt této bakterie, je kvůli kontaktu rostlin s půdou velice běžný.

Při špatném umytí pitnou vodou se tak bakterie může běžně vyskytovat na zelenině, která se před konzumací nemusí tepelně opracovávat, jako je například rajčata, ledový salát, papriky apod.

Dalšími rostlinnými produkty jsou bylinky a koření. Ve studii zabývající se výskytem *C. perfringens* bylo použito 54 různých druhů bylin a koření. V 80 % vzorků byly nalezeny spory *C. perfringens*. Toto je velký zdravotní problém, protože tyto byliny a koření nejsou dále tepelně zpracovávány a kontaminují, již opracované potraviny (Voidarou *et al.*, 2011).

#### 3.2 Výskyt v živočišné stravě

Výskyt v živočišné stravě je velmi běžný. Kontaminace živočišné stravy je způsobena výskytem *C. perfringens* ve střevech zvířat, která nejsou správně vykolována a dochází tím ke kontaminaci masa při jeho zpracování.

Například v Maroku byla provedena studie, která se zabývala izolací *C. perfringens* z masných výrobků. Do studie bylo vybráno 156 vzorků z různých zdrojů. Výsledky této studie ukázaly přítomnost *C. perfringens* u 77,6 % vzorků. U pouličních prodejců bylo 89 % vzorků pozitivních, dále bylo 79 % pozitivních vzorků na trzích, 70,8 % pozitivních vzorků v řeznictví a 62,5 % pozitivních vzorků v supermarketu. Tato studie potvrzuje, že byly zanedbány hygienické předpisy při výrobě, skladování a prodeji těchto potravin (Ed-Dra *et al.* 2017).

Při studiích drůbeže, kromě brojlerů byl nález *C. perfringens* v rozmezí 10 až 80 %.

*C. perfringens* bylo stanoveno ve 38,4 % vepřových párků a v syrovém a vařeném hovězím určeném pro potravinářské zařízení. Okolo 50 % syrového a mraženého masa a drůbeže obsahovalo *C. perfringens* (Juneja a Sofos, 2010).

## 4 PATOGENITA

Půdní patogeny jako je *C. perfringens* často kolonizují nízko nutriční prostředí, kde si začnou vytvářet spory, chráněnou a odolnou formu bakterií, která se dokáže velice rychle šířit hostitelským prostředím. Tyto spory se rozšíří do tkání střev a svalů, kde se dále replikují. Když osoba pozře kontaminovanou potravu touto bakterií, poskytne tím prostředí s vysokým obsahem živin a díky tomu se může bakterie začít rychle rozmnožovat. Rychlá replikace způsobuje poškození tkáně, což vede k nekrotickým lézím (mrtvým buňkám), ale většina poškozených tkání a buněčná smrt pochází z toxinů, které bakterie vylučuje. Příznaky otravy jídlem se projevují 8-18 h po infekci a zahrnují břišní křeče, nevolnost a průjem.

Pomalé vaření spojené s nízkými teplotami a dlouhou dobou nedokáže zničit spory *C. perfringens*. Teploty, při kterých by bylo docíleno inaktivace spor, by mohli mít za následek výrazné snížení kvality a složení daného jídla. Díky tomu dokáží spory přežít teploty, které jsou použity při vaření. Vaření často zvýší anaerobní prostředí v jídle a snižuje počet organismů, které se v jídle vyskytují. To má dobrý vliv pro *C. perfringens*, protože sama nedokáže získat potřebné živiny pro další růst v konkurenci jiných mikroorganismů. Vaření potravin kontaminovaných spory *C. perfringens* může mít za následek aktivaci těchto spor, které začnou klíčit. Většinou je tímto aktivačním krokem právě teplotní šok. Uvádí se, že pokud již 3 % spor v syrovém hovězím mase začne klíčit, tak po teplotním šoku, jakým je například vaření, začnou klíčit téměř všechny spory (Juneja a Sofos, 2010).

*C. perfringens* lze rozdělit do sedmi subtypů (A až G) založených na rozdílné produkci toxinů (Obr. 3). Každý subtyp může způsobit odlišné a specifické onemocnění u zvířat a lidí. Klíčovým rysem těchto onemocnění je, že jsou zprostředkovány produkcí silných proteinových toxinů, z nichž většina je extracelulární. Tyto toxiny se obecně podílejí na specifických onemocněních. Například  $\alpha$ -toxin je nezbytný pro lidskou klostridiální myonekrózu nebo plynou gangrénu, *C. perfringens* enterotoxin (CPE) je nutný pro otravu potravinami.  $\beta$ -toxin je nezbytný pro specifické enterální infekce *C. perfringens*,  $\epsilon$ -toxin je klíčový toxin u mnoha enterotoxemických infekcí *C. perfringens* u ovcí a koz a toxin NetB je nezbytný pro nekrotickou enteritidu u kuřat (Awad *et al.*, 1995).

### Rozdělení na základě produkce toxinu

Toxinotype	$\alpha$ -toxin	$\beta$ -toxin	$\epsilon$ -toxin	$\iota$ -toxin	CPE	NetB
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	+/-	-
D	+	-	+	-	+/-	-
E	+	-	-	+	+/-	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+

Obrázek 3 - Tabulka rozdělení podle toxinů (Awad *et al.*, 1995)

Systém subtypů *C. perfringens* je cenný pro diagnózu infekcí *C. perfringens* u lidí i zvířat, ale je zastaralý a v současné době neposkytuje vždy svůj původní diagnostický a epidemiologický účel. Například kmeny *C. perfringens* produkující CPE jsou uznávány již více než padesát let a představují jednu z hlavních příčin otrav potravinami u lidí (Freedman *et al.*, 2016). Toxin NetB se ukázal jako nezbytný pro nekrotickou enteritidu u kuřat (Awad *et al.*, 1995). Kmeny *C. perfringens* produkují velmi odlišné toxiny a způsobují různorodá onemocnění. V současné době jsou klasifikovány jako *C. perfringens* typ A spolu s kmeny *C. perfringens* způsobujícími plynou gangrénu. Dospělo se proto k závěru, že současný systém subtypů je třeba aktualizovat, aby se zlepšila jeho epidemiologická a diagnostická hodnota.

Rozšíření typizačního systému bylo předmětem diskuse mezi mnoha autory již několik let a bylo předloženo a schváleno na 10. mezinárodní konferenci o molekulární biologii a patogenezi klostridií, která se konala v srpnu 2017 v Ann Arbor v USA. Hlavním principem, který byl dohodnut, je to, že je zapotřebí rozšíření, které staví na existujícím typizačním systému na bázi toxinů než úplně nový systém. Usoudilo se, že rozšíření schématu bude snadněji přijato a bude více využíváno jak diagnostickými, tak výzkumnými laboratořemi (Rood *et al.*, 2018).

#### 4.1 Alfa toxin

Alfa toxin, nalezený u kmenů typu *C. perfringens*, způsobuje plynou gangrénu a také hemolýzu u infikovaných jedinců. Alfa toxin má strukturní podobnost s toxiny produkovanými jinými bakteriemi a také vykazuje podobnost s přirozeně se vyskytujícími enzymy. Pokud jde o mechanismus působení toxinu, alfa toxin *C. perfringens* vyžaduje zinek pro aktivaci, po které se toxin váže na povrch hostitelské buňky, čímž dochází ke zvýšení propustnosti v cévách. Jako takový podporuje alfa toxin infekci tím, že snižuje přívod krve do tkání, což vede k nekróze. Tento toxin produkují všechny typy *C. perfringens*. Již v roce 1937 vědci vyhledávali vakcínu pro toxin alfa, ale teprve relativně nedávno zprávy naznačovaly, že aktivní složka těchto vakcín

mohla být odvozena od samotného toxinu. Jedna ze zajímavých prací byla zkoumání možnosti geneticky modifikované vakcíny proti alfa toxinu. V této studii vědci použili izolovaný gen kódující alfa toxin a dokázali lokalizovat fragmenty genu, které by mohly být modifikovány tak, aby produkovaly protilátky proti smrtelným složkám alfa toxinu. (Williamson a Titball, 1993)

## 4.2 Beta toxin

Tento letální toxin se vyskytuje u kmenů *C. perfringens* typu B a typu C a také vede k nekróze prostřednictvím zvýšeného krevního tlaku, který je vyvolán přítomností katecholaminu. Beta toxin je hlavní faktor způsobující onemocnění u kmenů *C. perfringens* typu B, které se obvykle projevují jako enterotoxemie u mláďat savců, zejména selat, telat, hříbat a jehňat. U lidí je tento stav známý jako „pigbel“ a ve většině rozvinutých zemí není příliš běžný. Tento toxin je citlivý na poškození proteolytickými enzymy například trypsinem. V podmínkách, kde nejsou přítomny proteolytické enzymy vzrůstá koncentrace tohoto toxinu. Mechanismus účinku tohoto jevu je stále neznámý, ale je zřejmé, že endogenní hladiny proteolytických enzymů ve střevním traktu u lidí a savců působí jako ochrana proti infekci beta toxinem (Titball, 2009)

## 4.3 Epsilon toxin

Tento typ toxinu je produkován kmeny *C. perfringens* typu B a typu D, epsilonový toxin je nejčastěji izolován ze zvířat, zejména z ovcí, koz a skotu a jen zřídka od lidí. Podobně jako u ostatních toxinů vytváří epsilonový toxin póry v tkáních, které způsobují únik iontů draslíku a úniku tekutin, což vede k velkým komplikacím. Dvě nejčastější nemoci pozorované u zvířat jsou úplavice u jehňat a onemocnění ledvin ovcí. Tato onemocnění nejsou infekční, spíše se objevují po určité změně střevní flóry zvířat, obvykle spojené s přejídáním, což vede k výživově bohatým podmínkám, které jsou velmi příznivé pro růst *C. perfringens*. S tímto zrychleným růstem přichází vyšší koncentrace toxinů, které ničí střevo. Zatímco většina výzkumů týkajících se exotoxinových vakcín byla zaměřena na alfa toxin, došlo také k určité práci s epsilonovým toxinem. Jedna konkrétní studie zjistila, že několik lokálně specifických mutací genu u epsilon toxinu zlikvidovalo toxin *in vivo*, což nabízí možnost vakcinace proti onemocnění spojenému s epsilon toxinem u zvířat (Nagahama *et al.*, 2015)

#### 4.4 Iota toxin

Iota toxin je produkován pouze kmenem *C. perfringens* typu E a je složen ze 2 nespojených proteinů. Je známý jako AB toxin kvůli 2 doménám nazvaných A a B. U těchto typů toxinů je doména A obvykle aktivní částí, zatímco doména B je částí toxinu, který se váže na receptorové místo na membráně hostitelské buňky. Složka A způsobuje rozpad cytoskeletu inhibicí polymerizace aktinu, zatímco složka B zprostředkovává absorpci toxinu do buňky. Ačkoli Iota toxin může způsobit odumření tkáně u infikovaných jedinců, infekce kmeny typu E nejsou tak časté jako infekce jinými kmeny (Nagahama *et al.*, 2015).

#### 4.5 CPE toxin

Kmeny patřící do skupiny *C. perfringens* typu F jsou definovány jako izoláty, které nesou gen alfa-toxinu a cpe gen a produkují CPE při sporulaci, ale nenesou strukturní geny pro  $\beta$ -toxin,  $\epsilon$ -toxin nebo i-toxin. Tyto kmeny prokázaly, že jsou zodpovědné za průjem zprostředkovaný *C. perfringens*, včetně některých případů průjmu souvisejícího s antibiotickou léčbou (Rood *et al.*, 2018).

#### 4.6 NetB toxin

Kmeny patřící do *C. perfringens* typu G jsou definovány jako izoláty, které produkují  $\alpha$ -toxin a toxin NetB, ale nevytvářejí  $\beta$ -toxin,  $\epsilon$ -toxin nebo iota-toxin. Tímto došlo k dalšímu rozdělení skupiny A, protože kmeny *C. perfringens* typu A jsou nyní definovány jako kmeny, které produkují  $\alpha$ -toxin, ale nevytvářejí  $\beta$ -toxin,  $\epsilon$ -toxin, iota-toxin, CPE nebo NetB.

Bylo prokázáno, že kmeny *C. perfringens* typu G jsou odpovědné za nekrotickou enteritidu u kuřat. Genetické důkazy o podstatné roli NetB toxinu v této nemoci jsou jasné a jsou podporovány velmi silnými epidemiologickými důkazy. Kmeny *C. perfringens* produkující NetB toxin způsobují hlavně u kuřat nekrotickou enteritidu doprovázenou lézemi. Toto onemocnění je pro kuřata smrtelné. Z tohoto důvodu je nekrotická enteritida velkým problémem pro drůbežářství. V současné době se tyto kmeny označují jako kmeny ptačí nekrotické enteritidy *C. perfringens* typu A. Jejich změna označení na *C. perfringens* typu G opět poskytne spolehlivý základ pro diagnózu a epidemiologickou analýzu těchto odlišných izolátů (Rood *et al.*, 2018).

## 5 GENY KÓDUJÍCÍ TVORBU ENTEROTOXINU

*C. perfringens* typ A (podle nového označení typ F) je jedním z nejčastějších původců chorob lidského gastrointestinálního traktu. Nedávné studie ukázaly, že izoláty *C. perfringens* typu A, které způsobují otravu potravinami nebo onemocnění lidského gastrointestinálního traktu, se zařazují do tří skupin na základě lokusu genu pro enterotoxin (cpe). Tyto skupiny zahrnují izoláty chromozomálních cpe (nesoucí cpe-IS1470 lokus) a dva plazmidy nesoucí cpe skupiny, které nesou buď lokus cpe-IS1151 nebo lokus cpe-IS1470 (Li *et al.*, 2013).

Použitím PCR testu, který je schopen rozlišovat mezi těmito třemi lokusy, bylo zjištěno několik cpe-pozitivních izolátů z výkalů zdravých lidí nebo z prostředí, které mají dosud necharakterizované uspořádání cpe lokusů. Význam těchto izolátů je nejasný, ale některé jsou cytotoxické a mohou produkovat CPE. Další šetření těchto izolátů, které nesou nspecifikovaný cpe lokus, může vysvětlit jejich potenciální klinický význam a vývoj samotného genu cpe (Freedman *et al.*, 2016).

Většina (~ 70 %) kmenů způsobující otravu jídlem typu A nese chromozomální kopii genu cpe. Tento chromozomální cpe gen je proximálně asociován s inserčními sekvencemi, včetně sekvence IS1469. Bylo navrženo, ač dosud nebylo prokázáno, že tento chromozomální cpe gen se svými dvěma lemujícími IS1470 sekvencemi odpovídá transpozonu. Navíc k přenosu tohoto předpokládaného transpozonu jsou kmeny chromozomálního cpe typu A fylogeneticky odlišné od jiných *C. perfringens*. Toto zjištění pomáhá vysvětlit jejich silnou souvislost s otravou potravinami. Většina chromozomálních kmenů typu Cpe typu A produkuje bílkovinu málo rozpustnou v kyselinách, která se pevně váže na DNA spory. To poskytuje tomuto chromozomálnímu druhu spory mnohem silnější odolnost, například proti teplotám při vaření, než vykazují spory jiných kmenů *C. perfringens*.

Zbývajících asi 30 % kmenů způsobují otravu jídlem typu A a choroby gastrointestinálního traktu, nesou svůj gen cpe na plazmidech. U kmenů typu A všechny známé cpe-pozitivní plazmidy patří buď do rodiny plazmidů pCPF5603 nebo pCPF4969. U obou kmenů cpe plazmidu v kmenech typu A se předpokládá, že pocházejí ze společného prekurzorového plazmidu. Stejně jako chromozomální cpe gen, gen cpe nesený plazmidem v kmenech typu A je úzce spojen s inserčními sekvencemi, které by mohly mobilizovat tento toxinový gen. V obou cpe plazmidových rodinách nal je gen cpe ohraničen inzertivní sekvencí 5' IS1469 (Miyamoto *et al.*, 2011).

Bylo prokázáno, že se rodinné plazmidy pCPF4969 konjugativně přenášejí pravděpodobně díky jejich transportu podobných tcp sekvencí, které prokázaly, že zprostředkovávají konjugační přenos jiných plazmidů u *C. perfringens*. Plazmidy rodiny pCPF5603 pravděpodobně budou také konjugovány, protože nesou podobné sekvence tcp (Miyamoto *et al.*, 2008).



## 6 ONEMOCNĚNÍ

### 6.1 Plynatá sněť (*gangraena emphysematosa*)

Gangréna je druh onemocnění způsobené nedostatkem krve, při kterém dochází k odumření tkáně. Symptomy mohou zahrnovat změnu barvy kůže na červenou nebo černou, znecitlivění, otok, bolest, rozpad pokožky a chlad. Nejčastěji postižená místa jsou ruce a nohy. Některé typy gangrén se mohou vyskytnout s horečkou nebo sepsí (Bryant *et al.*, 2000).

Plynová gangréna je charakterizována nesnesitelnou bolestí v místě infekce, jejíž nástup je někdy tak náhlý, že naznačuje vaskulární katastrofu. Ničení zdravých tkání může probíhat rychlostí několika centimetrů za hodinu i přes vhodnou antibiotickou terapii, a proto radikální amputace zůstává nejlepším řešením pro záchranu života. Šok a selhání orgánů často doprovází plynovou gangrénu a mortalita přesahuje 50 % (Alouf *et al.*, 2015).

Mechanismy zodpovědné za časný nástup silné bolesti a rychlou regionální destrukci tkání jsou zprostředkovány *C. perfringens* Typu A, která způsobuje mikrovaskulární trombózu. Mikrovaskulární trombóza je onemocnění, které nevratně snižuje perfúzi tkáně a způsobuje ischemickou nekrózu tkáně. Rychlost, s níž jsou kůže, subkutánní tkáň, fascia a svaly zničeny během plynové gangrény, je podobná rychlosti tkáňové smrti po akutní arteriální trombóze. Intenzivní bolest je význačná v klinických stavech, které zahrnují uzavření arteriálního zásobení krví, jako je infarkt myokardu. Tkáně jsou zničeny rychle a nekrvácí (Alouf *et al.*, 2015).

#### 6.1.1 5 fází průběhu onemocnění

##### 6.1.1.1 Vstup *C. perfringens* do tkání

Vegetativní klostridie nebo jejich spory často kontaminují traumatické rány; avšak proliferace *C. perfringens* v tkáních je možná pouze u zranění, která způsobí přerušení přívodu krve do velkých svalových skupin. Ztráta perfúze rychle vede k poklesu oxidačně-redukčního potenciálu z 170 na 50 mV, což je při neutrálním pH dostatečné pro růst většiny anaerobních bakterií, včetně klostridií. Hypoxické svaly se posouvají na anaerobní metabolismus, což má za následek zvýšení koncentrace vodíkových iontů, které umožňují růst klostridií při redoxních potenciálech vyšších než + 50 mV. Kromě toho hypoxie indukuje uvolňování endogenních lysosomálních enzymů, které štěpí svalový protein na peptidy, které jsou životně důležité pro růst klostridií a tvorbu toxinů.

### 6.1.1.2 Rozmnožování organismu

Vzhledem k tomu, že se *C. perfringens* začínají rozmnožovat v infikovaném místě, konečné produkty bakteriálního metabolismu dále snižují pH tkáně a bakteriální proteázy pokračují v degradaci tkáně, čímž optimalizují podmínky pro další růst a produkci toxinů. Produkce toxinu PLC *C. perfringens* se zvyšuje v přítomnosti peptidů obsahujících glycin a aminokyseliny s rozvětveným řetězcem, jako jsou valin nebo tyrosiny, které obsahují peptidy o nízké molekulové hmotnosti a uhlovodíkový zdroj škrobu jako je dextran nebo fruktóza, ale nikoliv glukózy.

### 6.1.1.3 Ztlumení tkáňové odpovědi proti zánětu

Histologicky se plynová gangréna vyznačuje skutečnou absencí tkáňové zánětlivé odpovědi a je tedy výrazně odlišná od infekcí způsobených bakteriemi, jako jsou *S. aureus*, *Haemophilus influenzae* nebo *Streptococcus pneumoniae*. Studie provedené během první poloviny dvacátého století naznačovaly, že tento charakteristický nález byl zapříčiněn bakteriálním toxinem. Zpráva z roku 1917 v britském lékařském časopise popisuje histopatologii sériových úseků jednotlivých svalových svazků z čerstvě amputovaných končetin vojáků, kteří trpěli plynovou gangrénou. Na okraji postižené tkáně bylo přítomno jen málo bakterií *C. perfringens* a svalová vlákna byla ischemická a nekrotická. Svalová vlákna byla degradována toxickou tekutinou, která se nacházela mezi svalovými vlákny před samotnými mikroorganismy. Leukocyty byly "obecně nápadné jejich nepřítomností" v napadených tkáních, ale byly pozorovány v interfasciálních rovinách. V této oblasti vykazovaly leukocyty výrazně změněnou morfologii a karyolýzu, což ukazuje na fakt, že exotoxiny klostridií jsou cytotoxické.

Tento charakteristický nedostatek tkáňové zánětlivé odpovědi u plynové gangrény způsobené *C. perfringens* je zpočátku nečekaný, protože organismus je schopen aktivovat komplementární kaskádu, generací chemotaktických faktorů a opsoninů, která je schopna zastavit rozvoj tohoto onemocnění. Tato imunitní reakce zastaví ve vysoké míře bakteriální množení a infikování organismu, ale stejně dochází v některých případech k rozvoji tohoto onemocnění. Studie uvádí vývoj onemocnění pouze u 0,03-5,2 % traumaticky otevřených ran i přes to, že je kontaminováno až 39 % histotoxickým druhem klostridií (Altemeier, 1971).

#### 6.1.1.4 **Progrese lokální a regionální destrukce tkání**

Agregace trombocytů je známý biologický účinek *C. perfringens*. PLC je toxin, který byl popsán v polovině 70. let. Aplikace PLC na okruží mezi střevy potkanů odhalila trombocyty v sousedních cévách, které uzavřely mezenterický průtok krve, což vedlo vědce k závěru, že trombóza je pravděpodobně prvním krokem při nekróze způsobené PLC. Podobným pokusem bylo prokázáno, že podání intramuskulární injekce PLC indukovalo rychlý (méně než 2 min.) a nevratný pokles průtoku krve kostního svalstva, který se objevil souběžně s tvorbou intravaskulárních agregátů aktivovaných destiček, leukocytů a fibrinu. Tyto agregáty se volně pohybovaly, dokud nedosáhly dostatečné velikosti k úplnému a nevratnému zastavení kapilár, žil a arteriol. Tímto dochází k odumírání tkání (Bryant *et al.*, 2000).

#### 6.1.1.5 **Šok a selhání orgánů**

Kardiovaskulární kolaps a selhání postiženého orgánu se objevují později v průběhu plynové gangrény. Tachykardie se slabostí pulzu následuje po nástupu bolesti a typicky je nepřiměřená stupni zvýšení teploty. Během plynové gangrény je na počátku tachykardie krevní tlak normální, ale pak klesá. Při testování na morčatech bylo zjištěno následující. PLC způsobuje významné poklesy srdečního výdeje již 90 minut po infuzi příslušných toxinů, což naznačuje, že jeden mechanismus kardiovaskulární dysfunkce indukovaný PLC může souviset s přímou toxicitou myokardu. U PLC bylo také prokázáno, že ovlivňuje iontropní srdeční odpověď u izolovaných embryonálních kuřecích srdcových přípravků. PLC však může také nepřímo přispět k šoku stimulováním produkce endogenních mediátorů, jako je faktor tumorové nekrózy (TNF) a faktor aktivující destičky (PAF) (Alouf *et al.*, 2015).



**Obrázek 4 - Plynatá sněť**

<https://mechpath.files.wordpress.com/2015/11/figure21.png> [cit. 2018-07-03]

## **6.2 Průjem vyvolaný během antibiotické léčby**

Průjem vyvolaný během antibiotické léčby (AAD) je přítomnost průjmu, který vznikl v průběhu léčby a pro který není jiné vysvětlení. Bylo testováno celkem 135 vzorků stolice dodaných do laboratoře pro stanovení toxinu *C. difficile*. Cílem bylo detekovat toxiny *C. difficile* a *C. perfringens*. Celkem bylo nalezeno 10 různých druhů bakterií a 5 virů. *C. perfringens* byla objevena ve 14 vzorcích stolice ze 135 (10,4 %). 92 testovaných vzorků bylo negativních. AAD bylo dříve spojováno pouze s *C. difficile*, ale v poslední době se studie začínají soustředit právě na identifikaci *C. perfringens* jako významný patogen při AAD (Kim *et al.*, 2017).

## **6.3 Nekrotizující enteritida**

Formy nekrotizující enteritidy se vyskytovaly endemicky v Nové Guineji, v epidemickém rozměru v Německu po druhé světové válce a sporadicky v Africe, jihovýchodní Asii a Spojených státech. Všechny případy souvisejí s požitím masa kontaminovaného *C. perfringens*. Klinické průběhy onemocnění začínají bolestí břicha, horečkou a průjmem, které se spontánně rozvinou v krvavý průjem, potrhaná střeva a smrt. Beta toxin *C. perfringens* typu C je hlavní příčinou těchto infekcí. Beta toxin je termolabilní a vysoce citlivý vůči enzymatickým účinkům trypsinu a pepsinu a způsobuje nekrózu střevní stěny. Nedávné důkazy naznačují, že beta-toxin se specificky váže na vaskulární endoteliální buňky

střevní sliznice, což způsobuje destrukci endotelu, trombózu a následnou ischemickou nekrózu střevní tkáně, která je charakteristická pro tuto infekci. Mezi faktory podporující vznik onemocnění patří podvýživa, a to zejména u lidí konzumující potraviny s nízkým obsahem bílkovin a bohatých na inhibitory trypsinu, kterými jsou sladké brambory nebo sójové boby. Kromě toho se u takových pacientů vyskytuje škrkavka dětská, která také vylučuje inhibitor trypsinu. Tyto inhibitory chrání beta toxin před intraluminální proteolýzou (Alouf *et al.*, 2015).

#### **6.4 Pigbel**

„Pigbel“, vzácná forma klostridiální nekrotické enteritidy, pokud infekční kmen produkuje správný toxin. Mezi příznaky choroby Pigbel patří, krvavá stolice, bolesti břicha a příležitostně otravy krve toxiny. Tato choroba byla poprvé popsána na konci čtyřicátých let 20. století. Největší výskyt byl v roce 1948, kdy úmrtnost dosahovala 40 %. Poté nemoc vymizela (Sobel *et al.*, 2005).

#### **6.5 Smrtelné, nekrotizující klostridiální infekce u injekčních uživatelů drog**

Ohniska těžké infekce měkkých tkání byla popsána mezi uživateli injekčně aplikovaných drog (heroin) ve Skotsku, Irsku, Anglii a Spojených státech. Klinická zjištění zahrnují závažnou nekrózu v místě vpichu injekce s masivním edémem a rychlým fatálním systémovým onemocněním charakterizovaným hypotenzí, plicním edémem, perikardiálními a pleurálními výpotky a leukocytózou. Z 23 definitivních případů popsaných ve skotské epidemii 20 zemřelo. U těchto případů byla *C. perfringens* jedním ze dvou hlavních izolátů. U devíti případů popsaných v Kalifornii se vyvinula nekrotizující fasciitida, výrazná leukocytóza a hypotenze. Z devíti případů čtyři zemřeli. Zatímco mechanismy, které vedou k nekrotizující fasciitidě u těchto infekcí, jsou zcela objasněny, měkké tkáně a plicní edém, hypotenze a hemokontrace jsou pravděpodobné kvůli kapilárnímu rozrušení endotelových buněk klostridiovými cytotoxiny, včetně toxinu *C. novyi* alfa a *C. sordellii* hemoragické a letální toxiny. Tyto toxiny mají aktivitu glukosyltransferázy a specificky modifikují malé GTPázy, kontrolující polymeraci aktinu. Naproti tomu edém spojený s případy infekce *C. histolyticum* může souviset s produkcí bradykininu indukovaného beta toxinem (Salmon *et al.*, 2002, Black *et al.*, 2002).

## 7 PREVENCE ONEMOCNĚNÍ

### 7.1 Tepelné zpracování potravin

Tepelné ošetření je jedním z nejčastějších způsobů sterilizace produktů, protože nadměrné teplo ničí většinu bakteriálních buněk. Bylo zjištěno, že spory *C. perfringens* jsou vysoce tepelně odolné, ačkoliv se rezistence značně liší podle kmene, fyziologického stavu, typu média a inkubační teploty. Nicméně významná inaktivace spor *C. perfringens* může být dosažena jejich vystavením vysokým teplotám po delší časové období. Ukázalo se, že více než 90 % spor *C. perfringens* bylo inaktivováno, když byly inkubovány ve vodě při 90 až 100 °C po dobu 10 až 30 minut. Dále bylo zjištěno, že pro snížení počtu spor *C. perfringens* v mase je zapotřebí vyšší teploty (110 °C).

Pomocí fyzikálních metod v kombinaci se středně vysokými až vysokými teplotami byla prokázána účinnost při inaktivaci jak vegetativních buněk, tak spor *C. perfringens*. Například použití ozonu a následné tepelné zpracování účinně inaktivovalo jak vegetativní buňky, tak spory *C. perfringens* v masovém produktu. Současným použitím tepelného ošetření s ultrazvukem, nebo tepelného ošetření, následovaného ultrazvukem se významně zvýšila účinnost tepelné inaktivace spor *C. perfringens* v hovězí kaši. Ošetření gama zářením, po kterém následovalo opět tepelné ošetření, významně snížilo počet spor (Novak a Yuan, 2004, Evelyn a Silva, 2015, Talukdar *et al.*, 2016).

### 7.2 Ošetření potravin pomocí vysokého tlaku

Vysoký hydrostatický tlak (HHP) je jednou z nepoužívanějších pasterizačních technik pro potravinářské výrobky, pokud není nutná pasterizace pomocí teploty. HHP ošetření potravin je účinnější pro usmrcení vegetativních buněk a do jisté míry bakteriálních spor než při konvenčním tepelném zpracování potravin. Zachovává také nutriční a senzoryckou kvalitu potravinářských produktů a spotřebovává méně energie než ostatní způsoby zpracování. Kombinované ošetření pomocí HHP (650 MPa), teploty (75 °C) a nízkého pH (4,75) vedla k 5,1 násobnému snížení izolátů spor *C. perfringens* typu A P-cpe, ale nebyla tak účinná u izolátů spor C-cpe *C. perfringens* v laboratorním médiu (Sarker *et al.*, 2015).

### 7.3 Probiotika

Bakteriální druhy, které mohou hostiteli poskytnout zdravotní přínos po orálním podání, např. inhibicí škodlivých bakterií se nazývají probiotika (Mikelsaar a Zilmer 2009). Inhibice škodlivých bakterií je zprostředkována soupeřením o živiny, snižováním pH a produkcí specifických antibakteriálních látek (Crost *et al.*, 2010). Probiotické kmeny by měly být pro hostitele neškodné, odolné vůči kyselinám a žlučovým solím a měly by být schopné přetrvávat a množit se uvnitř střevního traktu (Crost *et al.*, 2010). Inhibiční kapacita a odolnost vůči kyselinám a žlučovým solím je rozdílná u každého kmene probiotik.

Jak ukázaly studie *in vivo* u myší, prasat a kuřat, několik probiotických kmenů je schopno kolonizovat střevní trakt po orální inokulaci a snížit kolonizaci a perzistenci *C. perfringens* a mortalitu po perorálním podání touto bakterií. Jak bylo prokázáno *in vitro*, transkripce *cpb2*, genu kódujícího beta2 toxin a produkci beta2 toxinu *C. perfringens*, byla snížena po společné kultivaci *C. perfringens* s *Lactobacillus fermentum*, který snížil pH prostředí. Na životaschopnost *Lactobacillus fermentum* tato změna neměla vliv.

Studie ukázaly, že probiotika mohou snížit růst, kolonizaci a tvorbu toxinu *C. perfringens* ve střevním traktu a tím výskyt intestinálního onemocnění spojeného s *C. perfringens* (Allaart *et al.*, 2013).

### 7.4 Prebiotika

Stimulace růstu střevních bakterií, které snižují růst a produkci toxinu *C. perfringens* jako jsou laktobacily a bifidobakterie, může být dalším způsobem, jak zabránit růstu *C. perfringens* ve střevním traktu. Prebiotika jsou nestravitelné složky potravin, především nestravitelné sacharidy, které pozitivně ovlivňují hostitele, protože selektivně stimulují růst a aktivitu neškodných bakterií v tlustém střevě, což příznivě ovlivňuje mikroflóru tlustého střeva a tím zvyšuje celkové střevní zdraví. Nestravitelné sacharidy jsou fermentovány bifidobakteriemi a laktobacily na mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které snižují intestinální pH a mimo jiné potlačují růst patogenů.

Laktóza je disacharid, který se vyskytuje přirozeně v mléce savců. Disacharid je štěpen enzymem laktázou na glukózu a galaktózu. Laktóza může být použita jako prebiotikum u zvířat, kteří nejsou savci a nemají enzym laktázu jako kuřata. Fermentace laktózy cévní mikroflórou zvyšuje hladinu mastných kyselin v cévách a snižuje intestinální pH. Pomocí dvou studií bylo prokázáno, že laktóza pomáhá ke snížení intestinálních počtu *C. perfringens* a srdeční choroby

související s *C. perfringens* u kuřat, což naznačuje možnost použití laktózy jako potenciální alternativy k antibiotikům u drůbeže (McReynolds *et al.*, 2007).

## 7.5 Vakcinace

Toxoidové vakcíny pro použití u domácích ovcí a koz jsou komerčně široce dostupné a v posledních desetiletích byly značně využívány. Vakcíny jsou připraveny toxoidizujícím filtrátem *C. perfringens* typu D a pravděpodobně obsahují řadu proteinů kromě  $\epsilon$ -toxoidu. Šarže vakcín musí být testovány na bezpečnost, reziduální toxicitu a účinnost. Typický imunizační režim zahrnuje počáteční průběh dvou dávek vakcíny v rozmezí 2-6 týdnů, po nich následuje každoroční přeočkování u ovcí a posílení každé 3-4 měsíce u koz. Vakcíny se často podávají s adjuvans, jakým je hydroxid hlinitý, nebo jiná anorganická či organická chemická látka, makromolekula nebo celé buňky některých usmrcených bakterií, které zesilují imunitní reakci na podaný antigen a pokouší se o zlepšení účinnosti s použitím liposomové formulace. Tyto pokusy však nebyly úspěšné (Uzal *et al.*, 1999).

Přestože tyto toxoidní vakcíny jsou účinné při prevenci enterotoxémie u zvířat, objevují se studie o variabilní imunitní odpovědi po očkování a reakce na záněty po očkování vedly ke snížení spotřeby krmiva u zvířat. Neexistují žádné zprávy o tom, že tyto vakcíny byly použity u lidí a vzhledem k tomu, že jsou připraveny z relativně hrubých preparátů toxinu, zdá se nepravděpodobné, že by byly povoleny pro použití u lidí (Titball, 2009).

## 7.6 Hygienické zásady

V provozech zabývajících se zpracováním, výrobou, distribucí nebo prodejem potravin platí velmi přísná hygienická nařízení, které určují, jak má být s potravinami pracováno, aby nedošlo ke kontaminaci biologické, chemické nebo mechanické. Mikrobiologické požadavky na potraviny udávají, že potraviny nesmí obsahovat mikroorganismy nebo jejich toxiny v takových množstvích, které by představovali riziko pro lidské zdraví.

**Zde jsou uvedeny některé předpisy pro potravinářské podniky:**

- **ČSN 56 9609 (569609) Pravidla správné hygienické a výrobní praxe- Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace**  
Tato norma je doporučením pro stanovení a aplikaci mikrobiologických kritérií v rámci celého potravinového řetězce. Uvádí se definice mikrobiologického kritéria, popisují se jeho jednotlivé součásti a stanoví se principy a návod k



provádění hodnocení mikrobiologického rizika tak, aby potravina určená pro konečného spotřebitele byla zdravotně nezávadná a vhodná ke konzumaci.

- **Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005**  
Nařízení o mikrobiologických kriteriích pro potraviny
- **Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002,**  
Stanovuje obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin
- **Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004**  
O úředních kontrolách za účelem ověření dodržování právních předpisů týkajících se krmiv a potravin a pravidel o zdraví zvířat a dobrých životních podmínkách zvířat
- **Zákon č. 258/2000 Sb. Zákon o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů.**  
Zákon definující tzv. Hygienické minimum
- **Vyhláška č. 69/2016 Sb. Vyhláška o požadavcích na maso, masné výrobky, produkty rybolovu a akvakultury a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich**  
Další hygienické zásady jsou definovány například touto vyhláškou (Státní zemědělská a potravinářská inspekce, 2016)

## 8 LÉČBA ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÁ *C. PERFRINGENS*

### 8.1 Léčba pomocí antitoxinu alfa

V nedávné studii z ledna 2018 byl zkoumán plynový gangrénový antitoxin, který by mohl zastavit hemolýzu neutralizací  $\alpha$ -toxinu, ale neprokázal významné protizánětlivé nebo koagulační účinky. Do studie byl také použit rekombinovaný trombomodulin (rTM), což je protein, který má antikoagulační účinky. rTM ale nevykazoval žádný účinek proti hemolýze. Tyto výsledky tedy silně podporují hypotézu, že kombinovaná terapie s plynovým gangrénovým antitoxinem a rTM je použitelná jako pomocná terapie fatální sepse *C. perfringens*.

Yoshida *et al.* (2015) uvedl první a jediný klinický případ sepse *C. perfringens*, který byl léčen antitoxinem s plynovou gangrénou. Nicméně, plynový gangrénový antitoxin byl podán poté, co pacient trpěl kardiopulmonální zástavou a pacient zemřel 8 hodin po podání plynového gangrénového antitoxinu. Dosavadní účinek plynového gangrénového antitoxinu na sepse *C. perfringens* nebyl v klinickém prostředí dobře prozkoumán.

Podání antitoxinu je opodstatněné, protože  $\alpha$ -toxin je kontinuálně a značně produkován, dokud není *C. perfringens* odstraněna a lze očekávat, že způsobí těžké zánětlivé a koagulační reakce. Proto by měly být na neutralizační léčbu přidány anti-zánětlivé a anti-koagulační léky (Hifumi *et al.*, 2018).

### 8.2 Chirurgická léčba

Plynová gangréna vyžaduje okamžitý chirurgický zákrok a podání parenterálních antibiotik, aby se zabránilo ztrátě končetiny nebo života pacienta. V případě, který byl použit pro tuto studii, je uveden pacient s plynovou gangrénou, která postihuje levou dolní končetinu, přesněji oblast chodidla. Vynechání okamžitého chirurgického zákroku by mohlo vést ke ztrátě celé končetiny. Přestože míra úmrtnosti a míra ztráty končetiny u infekcí měkkých tkání způsobené plynovou gangrénou se liší, je zřejmé, že agresivní abscesy vyžadují chirurgickou léčbu, zvláště když jsou doprovázeny systémovými projevy, jakými jsou například sepse.

Ačkoli odmítnutí včasné léčby tímto pacientem nakonec nevedlo k jeho smrti, včasný chirurgický zákrok v kombinaci s širokospektrálními intravenózními antibiotiky a lokální péčí o rány, by pravděpodobně zabránil ztrátě končetiny od kotníku dolů a byla by snížena rizika ohrožující život pacienta (Finkelstein *et al.*, 2003).



Obrázek 5 - Dolní končetina postižená bakterií *C. perfringens* (Finkelstein *et al.*, 2003)



Obrázek 6 - Amputovaná část dolní končetiny (Finkelstein *et al.*, 2003)

### 8.3 Léčba antibiotiky

V Thajsku byla provedena studie na účinnost různých druhů antibiotik u selat. V této studii bylo izolováno 122 izolátů *C. perfringens* ze 148 vzorků rektálních výtěrů. Bylo prokázáno, že peniciliny, tetracykliny a cyklické peptidové sloučeniny jsou účinné při inhibici *C. perfringens*. Ampicilin vykazoval vynikající účinnost 0,5  $\mu\text{g/ml}$  a pouze 0,8% rezistencí. Zdá se, že penicilinová antibiotika jsou velmi účinné proti *C. perfringens* a rezistence nebyla popsána ani v jiných studiích. Tetracykliny byly rovněž účinné proti *C. perfringens*, kde nejnižší MIC<sub>50</sub> činil 0,5  $\mu\text{g/ml}$  pro doxycyklin, 1  $\mu\text{g/ml}$  pro chlortetracyklin a 8  $\mu\text{g/ml}$  pro

oxytetracyklin. Ve studii byla rezistence vůči tetracyklinům relativně nízká (3,2 - 4,1 %). Další antibiotikum bacitracin také vykazoval dobrou účinnost proti testovaným kmenům. Bylo prokázáno, že bacitracin snižuje morbiditu a mortalitu u *C. perfringens* a představuje dobrou léčbu nekrotické enteritidy. Bacitracin byl také používán jako přísada do krmiv v prasečím průmyslu v některých zemích, ale oproti ostatním druhům antibiotik, vykazoval bacitracin vysokou míru rezistence.

Antibiotika patřící do skupiny cefalosporinů, linkosamidů, makrolidů a chinolonů nebyly v této studii zcela účinné proti izolátům *C. perfringens*. Na rozdíl od dříve hlášených nízkých hodnot MIC, měl například ceftiofur hodnoty MIC<sub>50</sub> 16 µg / ml. Ačkoli cefalosporiny jsou obvykle považovány za alternativní léky pro pacienty s alergií na penicilin, studie prokázala, že to nemusí být vhodné, protože je zde vyšší rezistence (31,1 %). Linkomycin je již dlouho používán jako antibiotikum první linie při léčbě infekce *C. perfringens*. Výsledky této studie stanovily MIC<sub>50</sub> 16 µg/ml a navíc vysokou mírou rezistence. U makrolidů, zatímco erythromycin vykazoval vysokou hodnotu MIC<sub>50</sub> (128 µg/ml) a vysokou míru rezistence (54,9 %), tylosin vykazoval pouze MIC<sub>50</sub> 4 µg/ml a míru rezistence (13,1 %). Enrofloxacin vykazoval MIC<sub>50</sub> ve výši 64 µg/ml a vysokou míru rezistence (40,2 %). Vysoká míra rezistence byla pozorována také v jiných studiích.

V současné době se antimikrobiální rezistence u *C. perfringens* stále zvyšuje a izoláty, které jsou schopné odolat více druhům antibiotik, se objevují alarmujícím způsobem. V této studii bylo hlášeno ~ 67,2 % multirezistentních izolátů *C. perfringens*.

Celkově je potřeba omezit použití antibiotik a tím snížit zvyšující se rezistenci. Dále je potřeba volit vhodná antibiotika a kombinovat je s dalšími druhy léčby. Především je ale potřeba zlepšit prevenci, aby se omezil výskyt této bakterie, která nepostihuje pouze selata, ale i jiná zvířata (Ngamwongsatit *et al.*, 2016).

## 9 METODY STANOVENÍ *C. PERFRINGENS*

Metody stanovení bakterií jsou velice různorodé od klasických až po moderní rychlé metody. Mezi klasické metody patří očkování na speciální kultivační média, kde můžeme pozorovat morfologii kolonií a díky tomu rozlišit bakterie do jednotlivých druhů právě podle morfologie a biochemických vlastností. Všechny média podléhají přísným podmínkám, které jsou definovány pomocí norem.

Nejvíce využívanými metodami jsou metody rychlé, pomocí kterých dostaneme během několika minut výsledky a nemusíme bakterie kultivovat za specifických podmínek na speciálních půdách. Díky těmto metodám je výrazně zkrácen čas, který je potřebný pro určení nejlepší možné léčby u pacientů (Sandle, 2016).

### 9.1 Stanovení pomocí selektivních agarů

Pro průkaz *C. perfringens* ve vodě, se používají média jako je například mCP agar nebo agar s tryptózou, siřičitanem a cykloserinem (TSC agar). Většina z těchto médií, s výjimkou mCP, je založena na redukci sulfidů. Tato reakce se však neomezuje pouze na klostridie. Jiné bakterie jako *Salmonella*, *Proteus spp.* a *Citrobacter freundii* mohou také produkovat černé kolonie. Pro zvýšení selektivity média pro *C. perfringens* se přidávají antibiotika, zejména cykloserin.

Česká norma, která zavádí recentní horizontální metodu stanovení počtu *Clostridium perfringens* v potravinách, krmivech, ale také pro vzorky z potravinářských závodů a prodejen technikou počítání kolonií se nazývá ČSN EN ISO 13401 (560091).

#### 9.1.1 mCP agar

Membránový agar mCP je doporučen pro stanovení a izolaci *Clostridium perfringens* ve vodách při použití techniky membránové filtrace. Principem mCP agaru je absence enzymu  $\beta$ -D-glukosidázy u bakterie *Clostridium perfringens*, který se podílí na fermentaci celobiózy. K odlišení *C. perfringens* od ostatních druhů klostridií se používá fermentace sacharózy a tvorba kyselé fosfatázy. Pokud bakterie nemá enzym  $\beta$ -D-glukosidázu nedochází ke štěpení chromogenu indoxylného  $\beta$ -D-glukosidu v médiu. Jelikož *C. perfringens* fermentují sacharózu v médiu snižují tak pH a dochází ke změně barvy kolonií z fialové na žlutou. Výsledkem jsou charakteristické neprůhledné žluté kolonie *C. perfringens*. Ostatní druhy rodu *Clostridium* mají většinou z důvodu nedostatečné fermentaci sacharózy barvu purpurovou nebo modro-zelené. Pozitivní kolonie *C. perfringens* mohou být dále testovány na aktivitu kyselé fosfatázy

vystavením parám hydroxidu amonného po dobu 20–30 sekund. Při pozitivním výsledku dojde ke změně barvy na růžovou až červenou, jelikož dochází ke štěpení fenoftalein difosfátu právě kyselou fosfatázou (Manafi *et al.*, 2013).

### 9.1.2 TSCF agar

TSCF je připravený z agaru s tryptózou, siřičitanem a cykloserinem (TSC) doplněného o Fluorocult TSC, který obsahuje d-cykloserin. Agar TSCF obsahuje metabisulfit sodný a citrát amonno-železitý jako indikátor pro redukci sulfidu a disodnou sůl 4-methylumbelliferyl fosfátu jako substrát pro detekci kyselé fosfatázy. Všechny černé kolonie na TSCF agaru, které emitují světle modré fluorescenční světlo při vystavení UV lampě o vlnové délce 365 nm jsou kolonie *C. perfringens* (Manafi *et al.*, 2013).

### 9.1.3 *Clostridium perfringens* chromogenní selektivní agar

*C. perfringens* chromogenní selektivní agar (CPC) obsahuje citrát amonno-železitý, chromogenní směs, L-cystein hydrochlorid, heptahydrát síranu hořečnatého, sójový pepton, sacharózu, tris pufr, tryptosu a kvasničný extrakt. Sacharóza je fermentována a L-cystein hydrochlorid je redukční činidlo a snižuje redoxní potenciál média. Heptahydrát síranu hořečnatého je zdrojem hořčíkových iontů požadovaných v různých enzymatických reakcích, zatímco citrát amonno-železitý zvyšuje fermentační reakce tím, že poskytuje důležité ionty a substráty. pH se stabilizuje pomocí tris pufru. Chromogenní směs obsahuje enzymové substráty, inhibitory a různé promotory, které zlepšují růst.

Přidání D-cycloserinu a polymyxinu B má za následek inhibici všech bakterií kromě klostridií a umožňuje tak analýzu vegetativních buněk a spor. Další selektivitu poskytuje inkubace za anaerobních podmínek při teplotě 44 ° C (Manafi *et al.*, 2013).

Zeleně zbarvené kolonie na agaru jsou počítány jako izoláty *C. perfringens*, které se dále potvrzují negativní indolovou reakcí (Manafi *et al.*, 2013).

### 9.1.4 Porovnání mCP, TSCF a CPC agaru při stanovení *C. perfringens* ve vzorcích vody

V této studii byly použity tři média mCP, TSCF a CPC agar pro stanovení *C. perfringens* v různých vzorcích povrchových vod. Ze 139 vzorků vody bylo 131 vzorků (94 %) pozitivních na *C. perfringens* alespoň na jednom z kultivačních médií. Zelené kolonie na chromogenním selektivním agaru (CPC agar) byly počítány jako suspektní izoláty *C. perfringens*. Ze 483

zelených kolonií na agaru CPC bylo 96,5 % potvrzeno jako *C. perfringens* pomocí negativní indolové reakce. Použití mCP agaru pro rutinní testování je velmi obtížné, protože po důkazu kolonií pomocí hydroxidu amonného, nejde kolonie použít pro další biochemické testování, které by *C. perfringens* potvrdilo. Kolonie na CPC agaru a TSCF agaru bylo snadné počítat a použít pro další testy. Identifikace kolonií izolovaných ze všech médií ukázala, že CPC agar je nejlepším médiem pro průkaz *C. perfringens* ve vzorcích vody. (Manafi *et al.*, 2013)

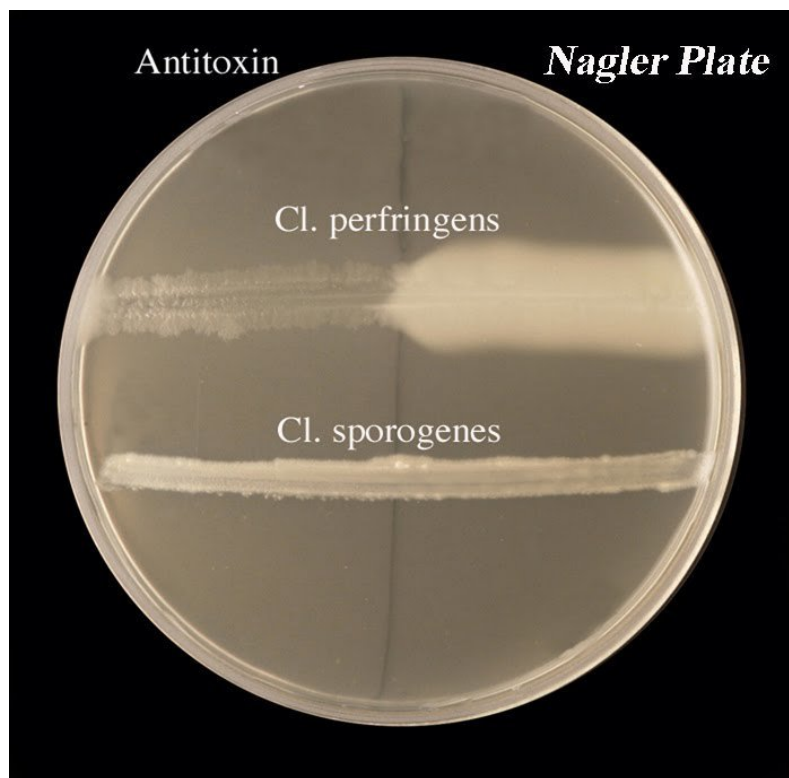
Dále byla provedena studie, kde byl porovnáván mCP a TSC agar pro růst *C. perfringens* v environmentální a částečně upravené pitné vodě. U vzorků říční vody a částečně upravené pitné vody vyrostlo na TSC agaru větší počet kolonií *C. perfringens* než na mCP agaru. Na rozdíl od jiných studií byl na mCP agaru významný počet falešných pozitivních a negativních izolátů. V jiné studii s použitím vysoce znečištěných vod se uvádí srovnatelné výtěžky a míra průkazu pro mCP agar a TSC agar. V méně znečištěných vodách však byla efektivita využití TSC výrazně vyšší (Weenk *et al.*, 1991).

#### 9.1.5 Žloutkový agar (EYA)

Agarové médium z vaječného žloutku obsahuje suspenzi vaječného žloutku pro identifikaci rodů *C.*, *Fusobacterium* a *Prevotella spp.* Suspenze vaječného žloutku umožňuje detekci aktivity lecithinázy a lipázy. Degradace lecitinu ve vaječném žloutku vede k neprůhledné sraženině okolo kolonií. Enzym lipáza hydrolyzuje tuky uvnitř vaječného žloutku, což vede k dráždivému lesku na povrchu kolonie. Další pozorovanou reakcí je proteolýza vaječného žloutku, jak je naznačeno vyčištěním média kolem kolonií. Toto médium je doplněno vitamínem K1 a heminem, které usnadňují regeneraci anaerobních bakterií (Gubash, 1991).

#### 9.1.6 Naglerova reakce

Lecithinázový test nebo Naglerova reakce je biochemický test používaný k identifikaci organismů, které uvolňují fosfolipázy (lecithinázy), např. *C. perfringens*. Alfa toxin *C. perfringens* má fosfolipázovou aktivitu, a proto pomáhá při odlišení *C. perfringens* od jiných *C. spp.*, které také produkují lecithinázu (*C. baratti*, *C. absonum*, *C. bifermantans*, *C. sordelli* a *C. novyi*). Hodnocení se provádí vizuální kontrolou agaru. Výsledek kultivace s popisem viz Obrázek 7 (Rijal, 2015).



Obrázek 7 - Průkaz fosfolipázy Naglerovou reakcí (Rijal 2015)

## 9.2 AUTOMATIZOVANÉ SYSTÉMY VYUŽÍVANÉ PŘI IDENTIFIKACI MIKROORGANISMŮ

### 9.2.1 Systém VITEK®

Systém VITEK® je rychlý, automatický systém, který dokáže identifikovat mikroorganismus a současně dokáže provést stanovení citlivosti mikroorganismu na různé antimikrobiální látky. Na konci 60. let minulého století byl systém vytvořen pro NASA, aby byla možnost detekovat a přesně identifikovat mikroorganismy v moči kosmonautů. Systém měl označení MLM. V roce 1977 vzniklo samostatné oddělení Vitek Systems. Postupem času se zvyšovalo využití tohoto systému v různých odvětvích mikrobiologie.

Novou generací je systém VITEK® 2, který byl na trh uveden v roce 2007. Systém dokáže identifikovat mikroorganismus a současně dokáže provést stanovení citlivosti mikroorganismu na různé antimikrobiální látky.

Nejnovějším systémem je VITEK® MS. Systém využívá principu hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF). Největší výhodou je rychlost a přesnost tohoto systému. Výsledky jsou dostupné v řádu několika minut (Sanchez Ramos a Rodloff, 2018)



### 9.2.1.1 Stanovení anaerobních bakterií pomocí VITEK® MS

Ve studii bylo analyzováno 651 anaerobních bakteriálních izolátů pomocí VITEK® MS. Správně identifikovaných izolátů na úrovni rodu bylo 92,5 %. Zbýlých 7,5 % izolátů nebylo možné přesně identifikovat. Celkem bylo analyzováno osm rodů gram pozitivních anaerobních bakterií (265 izolátů) a dále hodnoceno systémem VITEK® MS. VITEK® MS dokázal identifikovat na úrovni druhu 91,7 % izolátů a 92,5 % izolátů na úrovni rodu. 20 izolátů nemělo žádnou identifikaci.

Byly identifikovány čtyři různé druhy klostridií a ty poté rozděleny s 96,3% přesností. *C. perfringens* byla potvrzena v 61 izolátech s 98,5% přesností (Garner *et al.*, 2014).

### 9.2.2 Ionizace laserovou desorpcí v přítomnosti matrice s průletovým analyzátozem

Ionizace laserovou desorpcí v přítomnosti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF) je identifikace založená na analýze buněčných proteinů daných mikroorganismů. Tyto buněčné proteiny jsou specifické pro každý bakteriální druh a kvůli tomu jsou tyto proteiny používány jako biomarkery.

Pro identifikaci proteinů se používá matricová laserová desorpční ionizace (MALDI). Vzorek se odpařuje a ionizuje. Měří se doba letu iontů k detektoru, aby se zjistila hmotnost proteinu. Tento proces je asistovaný pomocí matrice. Vzorek je smíchán s matricí, která přenáší energii laseru na vzorek (Foxman, 2012).

#### 9.2.2.1 Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF-MS

Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF-MS se používá více než deset let a ukázalo se, že je to rychlá, levná a přesná metoda identifikace mikroorganismů, včetně anaerobních bakterií. Ve studii se pomocí MALDI-TOF-MS správně identifikovalo 89 % mikroorganismů na druhovou úroveň a 92 % na rodovou úroveň. Identifikace různých druhů klostridií z této studie, s využitím MALDI-TOF-MS, ukázalo, že 144 izolátů klostridií MALDI-TOF-MS správně identifikoval 88,8 % (128/144) na druhové úrovni a 92,3 % (133 / 144) na rodové úrovni. Izoláty *C. perfringens* byly identifikovány správně z 96 % (AlMogbel, 2016a).

V jiné studii, která zahrnovala 179 anaerobních bakterií, bylo pomocí MALDI-TOF-MS identifikováno 70,8 % na druhovou úroveň a 91,7 % na rodovou úroveň (Schmitt *et al.*, 2013).

Několik studií porovnálo MALDI-TOF-MS a VITEK 2 pro identifikaci anaerobních bakterií, aby bylo možno prokázat, která technika je vhodnější a většina z těchto studií jasně dospěla k závěru, že technika MALDI-TOF-MS je rychlá, spolehlivá a přesnější (AlMogbel, 2016b).

### **9.3 Molekulárně biologické metody**

Molekulárně-biologické metody jsou jednou z nejčastěji používaných postupů pro analýzu potravin a biologických materiálů, kde kontrolujeme například mikrobiologickou kontaminaci. Mezi nejvýznamnější a nejrozšířenější metodu patří polymerázová řetězová reakce (PCR). Mezi další metody patří polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP), metoda fluorescenční in situ hybridizace (FISH) nebo metoda Blízká infračervená spektroskopie (AlMogbel, 2016).

#### **9.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda, pomocí které můžeme rychle a snadno namnožit úseky DNA. Principem metody je replikace nukleových kyselin. Potřebné úseky DNA, které se mají namnožit musí být ohraničeny na začátku a na konci tzv. primery, což jsou krátké oligonukleotidy DNA. PCR slouží k vytvoření až několika milionů stejných kopií vzorového fragmentu DNA. Jako maximální velikost se uvádí 10 tisíc nukleotidů, ale v některých publikacích se uvádí délka i 40 tisíc nukleotidů. Díky této možnosti můžeme analyzovat DNA i ze vzorků, kterých je velice málo. PCR probíhá v zařízení nazvaném termocykler. Zařízení je zkonstruováno tak, aby během několika málo sekund dokázalo ohřát nebo naopak ochladit reakční prostředí i o několik desítek stupňů Celsia.

Metoda je využívána ve velké míře v lékařství pro prenatální vyšetření DNA, při transplantaci orgánů, při léčbě rakoviny, vyšetření krevních skupin atd. Další využití je v mikrobiologii pro rychlou analýzu mikroorganismů, kontrolu kvality potravin, pro zjišťování GMO a geneticky modifikovaných složek, nebo v kriminalistice při identifikaci osob (Clark a Pazdernik, 2013).

## 9.4 Imunochemické metody

Základem imunochemických metod je vysoce specifická reakce mezi antigenem a protilátkou. Na imunologických metodách je založena celá řada testů, které jsou používány v potravinářské mikrobiologii pro průkaz toxinů a alimentárních patogenů.

### 9.4.1 Enzymová imunoanalýza na pevné fázi

Enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA) je jedna z nejvíce používaných imunochemických metod, které slouží k průkazu a stanovení antigenů nebo protilátek. Metoda je založena na imunoenzymatické reakci bezbarvého substrátu, který je hydrolyzován v barevný produkt a měří se intenzita zbarvení pomocí spektrofotometru. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci zjišťovaného antigenu nebo protilátky.

Existuje několik různých typů testů ELISA včetně nepřímých, sendvičových, kompetitivních a reverzních testů ELISA. Nejběžnější metodou ELISA použitou pro toxické látky je nepřímá ELISA. Tento test lze použít k analýze specifického analytu nebo skupiny sloučenin, které zkříženě reagují s antigenem, který je potažen na pevné nosné ploše, kterou je nejčastěji mikrotitrační destička (Tijssen, 1985).

Principem metody je nadávkování antigenu do jamek mikrotitrační destičky, ke kterým se poté přidá protilátka označená enzymem. Reakcí protilátky s antigenem vzniká imunokomplex, který je detekovatelný například pomocí UV záření. Absorbance každé jamky v mikrotitrační destičce se porovnává s kontrolními vzorky. Vzorky, které jsou pozitivní pro protein nebo toxické látky, odrážejí jejich schopnost kompetitivně vázat antigen. I když redukce pozadí a zesílení signálu jsou potenciálními omezeními při analýzách ELISA, tyto testy prokazují vysoký stupeň specifčnosti a citlivosti (Wilson, 2010).

## 10 STUDIE VÝSKYTU *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ZA POSLEDNÍCH 10 LET

### 10.1 Výskyt *C. perfringens* u divokých zvířat držených v zajetí

Vzorky pro tuto studii byly získány z různých zoologických zahrad a přírodních rezervací v Indii od srpna 2014 do května 2015. Celkem 370 vzorků obsahovalo 314 čerstvých fekálních vzorků od zdravých zvířat, třicet vzorků stolice od ošetřovatelů a 26 vzorků potravin a krmiv (maso, zelenina, krmivo pro zvířata) a vzorky vody poskytnuté zvířatům. Vzorky stolice byly odebrány za použití transportních tampónů obsahujících Cary-Blair médium, zatímco vzorky vody a krmiva byly odebírány do aseptických nádob a transportovány do laboratoře.

Jeden gram fekálních a krmných vzorků, 1 ml vzorků vody a stolice bylo naočkováno do 10 ml bujónu dle Robertsona (RCMB) a inkubováno při teplotě 37 ° C po dobu 18–24h. Naočkované RCMB zkumavky byly umístěny do vodní lázně po dobu 10 až 15 minut při 80 ° C, aby se eliminovaly nesporetné bakterie. Poté se přeočkovalo na krevní agar se 7 % beraní krve a inkubovalo anaerobně při teplotě 37 ° C po dobu 24 hodin. Na agaru byly identifikovány kolonie *C. perfringens* pomocí dvojí zóny hemolýzy. Z těchto izolátů byla extrahována DNA, která pak byla identifikována pomocí metody PCR a porovnána s databází genů pro identifikaci.

Výskyt *C. perfringens* u zvířat chovaných v zajetí činila 30,9 %. Výskyt u přežvýkavců byl 34,1 %, nepřežvýkavců 36 %, ptáků 22,5 % a ošetřovatelů 6,7 %. Žádný ze vzorků krmiva a vody nebyl pozitivní na přítomnost *C. perfringens* (Kim *et al.*, 2017).

### 10.2 Výskyt *C. perfringens* v potravinách v Lagosu

Vzorky byly shromažďovány dvakrát měsíčně po dobu jednoho roku od května 2014 do dubna 2015. Studie byly mapovány tak, aby odrážely tři senátorské okresy ve státě Lagos a dvě místní samosprávy, které byly náhodně vybrány z každé zóny. Místní potravinářské komodity byly rozděleny do kategorií maso a masné výrobky, mléčné výrobky, zelenina, konzervy a med. Tyto potraviny byly získávány z otevřených trhů, kaváren a supermarketů v okolí Lagosu (Tabulka 1). Vzorky byly odebrány do sterilních plastových sáčků a transportovány do laboratoře ke zpracování do 2 hodin po odběru. Vzorky byly naočkovány do RCMB a inkubovány anaerobně po dobu 24 hodin při 37 ° C. Bakteriální kolonie vykazovaly dvojitou zónu beta-hemolýzy na krevním agaru, černé kolonie na TSC agaru a byly dále identifikovány

pomocí biochemických testů. Následně byly izoláty potvrzeny jako *C. perfringens* přítomností genu kódujícího produkci alfa toxinu za použití PCR (Chukwu *et al.*, 2017).

**Tabulka 1 - Výskyt *C. perfringens* v potravinách (Chukwu *et al.*, 2017)**

Druhy potravin	Počet testovaných vzorků	Počet pozitivních vzorků na <i>C. perfringens</i>
<b>Masné výrobky</b>		
Masový koláč	15	2
Párky	10	4
Kořeněné maso	20	1
Syrové maso	20	4
<b>Mléčné výrobky</b>		
Místní jogurt	20	1
Syrové mléko	20	0
<b>Zelenina</b>		
Zelený pepř	10	5
Dýňové listy	10	1
Hlávkové zelí	10	6
Mrkev	10	0
<b>Místní konzervované potraviny</b>		
Sardinky	10	2
Hovězí maso	10	0
Tuňák	10	1
Rajčata	10	0
Med	15	0
Makrela	10	0
<b>Celkem</b>	210	27

Většina izolátů byla získána ze zeleniny (44,4 %) a masných výrobků (40,7 %). Nižší míra kontaminace byla pozorována u konzervovaných potravin (11,2 %) a mléčných výrobků (3,7 %). Místní med bakterii *C. perfringens* neobsahoval (Chukwu *et al.*, 2017).

### **10.3 Výskyt *C. perfringens* v mase dodávaného do školních jídelen v Jižní Koreji**

Následující studie se zabývala výskytem *C. perfringens* ve školních jídelnách a supermarketech Jižní Koreje. Bylo odebráno 232 vzorků čerstvého masa (hovězí, vepřové, kuřecí, kachní) ze školních jídelen a supermarketů. Každý vzorek byl zpracován do čtyř hodin od odebrání, a to homogenizací s peptonovou vodou a následnou kultivací a vyšetřením homogenátu. Genomová DNA izolátu byla extrahována pomocí soupravy pro extrakci DNA a následně byla provedena PCR. Pomocí PCR byly identifikovány geny pro produkci toxinů.

Ve školní jídelně bylo z celkem 207 vzorků pozitivní na *C. perfringens* 19 vzorků. V supermarketu byl z celkem 18 vzorků pozitivní jeden vzorek. Z této studie vyplývá poměrně velké ohrožení studentů, kteří se stravují ve školních jídelnách, a to hlavně z důvodu špatné hygieny v kuchyních daných zařízení či skladováním potravin (Chon *et al.*, 2018)

### **10.4 Výskyt *C. perfringens* v kuřecím mase v Kanadě**

Čerstvá kuřecí stehna nebo křídla byla zakoupena v maloobchodech s potravinami v Ontariu, ve kterém byly náhodně vybrány supermarkety po celé provincii. V každém supermarketu byl zakoupen pouze jeden vzorek kuřecího masa. Všechna kuřata byla vychována v Kanadě. 64 vzorků kuřete bylo uchováváno při teplotě 4 ° C jeden den před zpracováním. Bylo 24 vzorků zmrazeno na -70 ° C a poté rozmrazeno a zpracováno ve stejný den. Zmrazení bylo provedeno pro usnadnění zpracování. Pro izolaci *C. perfringens* bylo 50 g kuřecího masa z každého maloobchodního balení vzorku umístěno ve sterilním pytlíku. Bylo přidáno 50 ml tekutého thioglykolátu (FTG) a vzorky byly zhomogenizovány a poté inkubovány anaerobně při 45 ° C po dobu 24 hodin. Poté se na médium Shahidi-Ferguson-*Perfringens* (SFP) naočkovaly čerstvé kuřecí vzorky a na tryptikázo-sójový agar (Difco) s 5 % beraní krve zmrazené kuřecí vzorky. Média byla inkubována anaerobně při 45 ° C po dobu 1-2 dnů. Izoláty byly potvrzeny jako *C. perfringens* pomocí PCR (Nowell *et al.*, 2010).

*C. perfringens* byla izolována u 42 čerstvých kuřecích vzorků z 64 (66 %) a ze 16 ze 24 zmrazených vzorků (67 %). U žádného z těchto izolátů nebyl detekován *cpe* gen, který je původcem otravy z jídla, ale to neznamená, že by nebyla možnost otravy pomocí jiných genů, protože funkce některých genů u *C. perfringens* není zcela objasněna (Nowell *et al.*, 2010).

## 10.5 Výskyt *C. perfringens* v Indii u hospodářských zvířat

Studie zaměřená na kozy a ovce probíhala v Indii, oblasti údolí Kašmír. Celkem bylo analyzováno 177 vzorků (152 ovcí a 25 koz). Metodou PCR bylo zjištěno 110 pozitivních vzorků *C. perfringens* pocházejících od ovcí a 15 pozitivních vzorků pocházejících od koz. Vzorky byly odebrány 125 zdravým ovcím, 21 ovcím, které trpěly průjmem a z 6 jatečných těl. Od koz byl odebrán vzorek 20 zdravým kozám, 3 kozám, které trpěly průjmem a ze 2 jatečných těl. Vzorky byly shromážděny do dvou hodin po smrti zvířat. Izolace a identifikace *C. perfringens* proběhla po kultivaci při 37 °C po dobu 24 hodin. Čisté vzorky bez kontaminujících bakterií byly identifikovány demonstrací typické buněčné morfologie barvením dle Grama, standardními biochemickými testy a PCR (Nazki *et al.*, 2017).

Výsledky studie byly následující. Ze 152 vzorků zdravých ovcí bylo 110 pozitivních na infekci *C. perfringens* (72,36 %), konkrétně ze 125 vzorků zdravých ovcí bylo 86 pozitivních (68,8 %), zatímco z 21 ovcí, které trpěly průjmem bylo 19 pozitivních (90,47 %). Z 6 mrtvých ovcí bylo 5 pozitivních (83,33 %). Mezi kozami bylo 11 z 20 zdravých koz pozitivních (55 %), 2 pozitivní ze 3 koz trpících průjmem (66 %) a obě mrtvé kozy byly na infekci *C. perfringens* pozitivní. Z celkového počtu pozitivních vzorků u ovcí bylo 12 vzorků kontaminováno *C. perfringens* typu D, z čeho ve 3 (6,97 %) byl izolován cpe-gen. Z celkového počtu vzorků koz byly 2 vzorky pozitivní na přítomnost *C. perfringens* typu D, z čehož u jednoho byl izolován cpe-gen. (Nazki *et al.*, 2017).

## 11 ZÁVĚR

Tato práce je zaměřena na bakterii *C. perfringens*. V práci je popsán všeobecný výskyt této bakterie, patogenese, metody stanovení, onemocnění a jejich léčba. *C. perfringens* je bakterie, která se nachází přirozeně ve střevním traktu lidí a zvířat a je také přítomná v životním prostředí (prach, voda, půda). Kvůli tomu dochází k mikrobiologické kontaminaci potravin a krmiv, které mohou způsobit nákazu lidí a zvířat. Jedná se o velký zdravotní problém, protože *C. perfringens* způsobuje zdravotní komplikace, jakými jsou například nevolnost, průjemy nebo plynná gangréna.

V dnešní době nalézáme *C. perfringens* v potravinách, jako například ovoce a zelenina, které jsou kontaminovány půdou, a před konzumací není nutné tyto komodity tepelně opracovávat, a dále je bakterie *C. perfringens* přítomna především mase, které je kontaminováno při vykolování zvířat. Při nedostatečném tepelném opracování a při nedodržení hygienických zásad při zpracování takto kontaminovaného masa mohou být kontaminovány i masné výrobky a produkty z masa. Proto je nejdůležitějším faktorem dodržování správných hygienických zásad a výrobní praxe při zpracování potravin.

V dnešní době stále neexistuje vakcína, kterou by se mohli očkovat lidé, a tak zůstává pro člověka jedinou ochranou prevence.



## 12 CITOVANÁ LITERATURA

ALLAART, Janneke G., Alphons J.A.M. VAN ASTEN a Andrea GRÖNE. Predisposing factors and prevention of Clostridium perfringens-associated enteritis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2013, **36**(5), 449–464. DOI:10.1016/j.cimid.2013.05.001. ISSN 01479571.

ALMOGBEL, Mohammed Suliman, 2016a. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry for identification of Clostridium species isolated from Saudi Arabia. *Brazilian Journal of Microbiology*. **47**(2), 410–413. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.01.027. ISSN 15178382.

ALMOGBEL, Mohammed Suliman, 2016b. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry for identification of Clostridium species isolated from Saudi Arabia. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. **47**(2), 410–413. ISSN 15178382. Dostupné z: doi:10.1016/j.bjm.2016.01.027

ALOUF, J. E, Daniel LADANT a Michel R POPOFF. *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 2015. ISBN 978-0-12-800589-7.

ALTEMEIER, William A. Prevention and Treatment of Gas Gangrene. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1971, **217**(6), 806. DOI:10.1001/jama.1971.03190060046011 ISSN 0098-7484.

AWAD, Miilena M., Amy E. BRYANT, Dennis L. STEVENS a Julian I. ROOD. Virulence studies on chromosomal alpha-toxin and theta-toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential role of alpha-toxin in Clostridium perfringens-mediated gas gangrene. *Molecular Microbiology*. 1995, **15**(2), 191–202. DOI:10.1111/j.1365-2958.1995.tb02234.x. ISSN 0950-382X, 1365-2958.

BLACK, Marjorie, Jane E. SALMON, Gillian M. PENRICE, Christopher C. MCGUIGAN, Laurence GRUER, John HOOD, David GOLDBERG a Syed AHMED. Lethal outbreak of infection with Clostridium novyi type A and other spore-forming organisms in Scottish injecting drug users. *Journal of Medical Microbiology*. 2002, **51**(11), 971–977. DOI:10.1099/0022-1317-51-11-971. ISSN 0022-2615, 1473-5644.

BRYANT, Amy E., Richard Y. Z. CHEN, Y. NAGATA, Y. WANG, C. H. LEE, Sydney FINEGOLD, Paul H. GUTH a Dennis L. STEVENS. Clostridial Gas Gangrene. I. Cellular and Molecular Mechanisms of Microvascular Dysfunction Induced by Exotoxins of

*Clostridium perfringens*. *The Journal of Infectious Diseases*. 2000, **182**(3), 799–807. DOI:10.1086/315756. ISSN 0022-1899.

CLARK, David P. a Nanette J. PAZDERNIK. Polymerase Chain Reaction. *Molecular Biology*. 2013, 55–61. DOI:10.1016/B978-0-12-378594-7.00030-5. ISBN 978-0-12-378594-7.

CROST, E.H., A. PUJOL, M. LADIRÉ, J. DABARD, P. RAIBAUD, J.P. CARLIER a M. FONS. Production of an antibacterial substance in the digestive tract involved in colonization-resistance against *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*. 2010, **16**(6), 597–603. DOI:10.1016/j.anaerobe.2010.06.009. ISSN 10759964.

DEJONG, J. Spoilage of an acid food product by *Clostridium perfringens*, *C. barati* and *C. butyricum*. *International Journal of Food Microbiology*. 1989, **8**(2), 121–132. DOI:10.1016/0168-1605(89)90066-4. ISSN 01681605.

ED-DRA, Abdelaziz, Fouzia Rhazi FILALI, Abdellah EL ALLAOUI a Anis SFENDLA, 2017. Occurrence of *Clostridium perfringens* in sausages sold in Meknes city, Morocco. *Open Veterinary Journal*. **7**(4), 323. DOI: 10.4314/ovj.v7i4.6. ISSN 2218-6050, 2226-4485.

EVELYN a Filipa V.M. SILVA. Use of power ultrasound to enhance the thermal inactivation of *Clostridium perfringens* spores in beef slurry. *International Journal of Food Microbiology*. 2015, **206**, 17–23. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.013. ISSN 01681605.

FINKELSTEIN, Barry, Ravi KAMBLE, Edward FERDINANDO a Neville MOBARAKAI. Autoamputation of the foot caused by untreated gas gangrene: a case report. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*. 2003, **42**(6), 366–370. DOI:10.1053/j.jfas.2003.09.002. ISSN 10672516.

FOXMAN, Betsy. A Primer of Molecular Biology. In: *Molecular Tools and Infectious Disease Epidemiology*. 2012, 53–78. DOI:10.1016/B978-0-12-374133-2.00005-8. ISBN 978-0-12-374133-2.

FREEDMAN, John, Archana SHRESTHA a Bruce MCCLANE. *Clostridium perfringens* Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications. *Toxins*. 2016, **8**(3), 73. DOI:10.3390/toxins8030073. ISSN 2072-6651.

GARNER, O., A. MOCHON, J. BRANDA, C.-A. BURNHAM, M. BYTHROW, M. FERRARO, C. GINOCCHIO, R. JENNEMANN, R. MANJI, G.W. PROCOP, S. RICHTER,

J. RYCHERT, L. SERCIA, L. WESTBLADE a M. LEWINSKI, 2014. Multi-centre evaluation of mass spectrometric identification of anaerobic bacteria using the VITEK® MS system. *Clinical Microbiology and Infection*. **20**(4), 335–339. DOI: 10.1111/1469-0691.12317. ISSN 1198743X.

GUBASH, S.M. Improved egg-yolk agar plate medium for the detection of clostridial phospholipase C activity. *Research in Microbiology*. 1991, **142**(1), 87–93. DOI:10.1016/0923-2508(91)90100-O. ISSN 09232508.

HIFUMI, Toru, Daisuke NAKANO, Joe CHIBA, Motohide TAKAHASHI, Akihiko YAMAMOTO, Yoshihide FUJISAWA, Kenya KAWAKITA, Yasuhiro KURODA a Akira NISHIYAMA. Combined therapy with gas gangrene antitoxin and recombinant human soluble thrombomodulin for *Clostridium perfringens* sepsis in a rat model. *Toxicon*. 2018, **141**, 112–117. DOI:10.1016/j.toxicon.2017.12.043. ISSN 00410101.

CHON, Jung-Whan, Kun-Ho SEO, Dongryeoul BAE, Ji-Hee PARK, Saeed KHAN a Kidon SUNG. Prevalence, toxin gene profile, antibiotic resistance, and molecular characterization of *Clostridium perfringens* from diarrheic and non-diarrheic dogs in Korea. *Journal of Veterinary Science*. 2018, **19**(3), 368. DOI:10.4142/jvs.2018.19.3.368. ISSN 1229-845X.

CHUKWU, Emelda E., Francisca O. NWAOKORIE, Akitoye O. COKER, Mario J. AVILA-CAMPOS a Folasade T. OGUNSOLA. Genetic variation among *Clostridium perfringens* isolated from food and faecal specimens in Lagos. *Microbial Pathogenesis*. 2017, **111**, 232–237. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.08.031. ISSN 08824010.

STÁTNÍ ZEMĚDĚLSKÁ A POTRAVINÁŘSKÁ INSPEKCE, 2016. *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online] [cit. 2018-07-07]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/informace-pravni-predpisy.aspx>

JUNEJA, Vijay K. a John Nikolaos SOFOS.. *Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions*. Washington, DC: ASM Press 2010. ISBN 978-1-55581-459-5.

KIM, Young Jin, Si Hyun KIM, Junggu AHN, Soongmoon CHO, Dongchun KIM, Kwanghyun KIM, Heegun LEE, Hyunwoo SON, Hee Joo LEE, Dongeun YONG, Jun Yong CHOI, Hye Ran KIM a Jeong Hwan SHIN. Prevalence of *Clostridium perfringens* toxin in patients suspected of having antibiotic-associated diarrhea. *Anaerobe*. 2017, **48**, 34–36. DOI:10.1016/j.anaerobe.2017.06.015. ISSN 10759964.

LI, J., V. ADAMS, T. L. BANNAM, K. MIYAMOTO, J. P. GARCIA, F. A. UZAL, J. I. ROOD a B. A. MCCLANE. Toxin Plasmids of Clostridium perfringens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2013, **77**(2), 208–233. DOI:10.1128/MMBR.00062-12. ISSN 1092-2172.

MACZULAK, Anne E. *Encyclopedia of microbiology*. New York, NY: Facts On File, 2011. ISBN 978-0-8160-7364-1.

MANAFI, Mammad, Kerstin WALDHERR a Michael KUNDI. Evaluation of CP Chromo Select Agar for the enumeration of Clostridium perfringens from water. *International Journal of Food Microbiology*. 2013, **167**(1), 92–95. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.012. ISSN 01681605.

MCREYNOLDS, J. L., J. A. BYRD, K. J. GENOVESE, T. L. POOLE, S. E. DUKE, M. B. FARNELL a D. J. NISBET. Dietary Lactose and its Effect on the Disease Condition of Necrotic Enteritis. *Poultry Science*. 2007, **86**(8), 1656–1661. DOI:10.1093/ps/86.8.1656. ISSN 0032-5791, 1525-3171.

MEAD, Paul S., Laurence SLUTSKER, Vance DIETZ, Linda F. MCCAIG, Joseph S. BRESEE, Craig SHAPIRO, Patricia M. GRIFFIN a Robert V. TAUXE. Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*. 1999, **5**(5), 607–625. DOI:10.3201/eid0505.990502. ISSN 1080-6040, 1080-6059.

MIKELSAAR, Marika a Mihkel ZILMER. Lactobacillus fermentum ME-3 – an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2009, **21**(1), 1–27. DOI:10.1080/08910600902815561. ISSN 1651-2235.

MIYAMOTO, K., J. LI, S. SAYEED, S. AKIMOTO a B. A. MCCLANE. Sequencing and Diversity Analyses Reveal Extensive Similarities between Some Epsilon-Toxin-Encoding Plasmids and the pCPF5603 Clostridium perfringens Enterotoxin Plasmid. *Journal of Bacteriology*. 2008, **190**(21), 7178–7188. DOI:10.1128/JB.00939-08. ISSN 0021-9193.

MIYAMOTO, Kazuaki, Natsuko YUMINE, Kanako MIMURA, Masahiro NAGAHAMA, Jihong LI, Bruce A. MCCLANE a Shigeru AKIMOTO, 2011. Identification of Novel Clostridium perfringens Type E Strains That Carry an Iota Toxin Plasmid with a Functional Enterotoxin Gene. *PLoS ONE*. **6**(5). DOI: 10.1371/journal.pone.0020376. ISSN 1932-6203.

NAGAHAMA, Masahiro, Masataka ODA, Hideaki TSUGE a Keiko KOBAYASHI,

2015. Enteric Toxins of *Clostridium perfringens*. In: *Molecular Medical Microbiology*. B.m.: Elsevier, s. 997–1013. DOI: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00056-1. ISBN 978-0-12-397169-2.

NAZKI, Salik, Shakil A. WANI, Rafia PARVEEN, Showkat A. AHANGAR, Zahid A. KASHOO, Syed HAMID, Zahoor A. DAR, Tanveer A. DAR a Pervaiz A. DAR. Isolation, molecular characterization and prevalence of *Clostridium perfringens* in sheep and goats of Kashmir Himalayas, India. *Veterinary World*. 2017, **10**(12), 1501–1507. DOI:10.14202/vetworld.2017.1501-1507. ISSN 09728988, 22310916.

NGAMWONGSATIT, Bhinyada, Wimonrat TANOMSRIDACHCHAI, Orasa SUTHIENKUL, Supanee URAIRONG, Wichian NAVASAKULJINDA a Tavan JANVILISRI. Multidrug resistance in *Clostridium perfringens* isolated from diarrheal neonatal piglets in Thailand. *Anaerobe*. 2016, **38**, 88–93. DOI:10.1016/j.anaerobe.2015.12.012. ISSN 10759964.

NOVAK, John S. a James T. C. YUAN. Increased Inactivation of Ozone-Treated *Clostridium perfringens* Vegetative Cells and Spores on Fabricated Beef Surfaces Using Mild Heat. *Journal of Food Protection*. 2004, **67**(2), 342–346. DOI: 10.4315/0362-028X-67.2.342. ISSN 0362-028X.

NOWELL, Victoria J., Cornelis POPPE, Valeria R. PARREIRA, Yan-Fen JIANG, Richard REID-SMITH a John F. PRESCOTT. *Clostridium perfringens* in retail chicken. *Anaerobe*. 2010, **16**(3), 314–315. DOI:10.1016/j.anaerobe.2009.11.004. ISSN 10759964.

RIJAL, N. *Nagler Reaction (Lecithinsae Test): Principle, Procedure, Results and Limitations*. 2015.[online] [vid. 2018-06-28]. Dostupné z: <https://microbeonline.com/nagler-reaction-lecithinsae-test-principle-procedure-results-limitations/>

ROOD, Julian I., Vicki ADAMS, Jake LACEY, Dena LYRAS, Bruce A. MCCLANE, Stephen B. MELVILLE, Robert J. MOORE, Michel R. POPOFF, Mahfuzur R. SARKER, J. Glenn SONGER, Francisco A. UZAL a Filip VAN IMMERSEEL. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*. 2018. DOI:10.1016/j.anaerobe.2018.04.011. ISSN 10759964.

SALMON, J.E., R.C. GEORGE, O.N. GILL, T. DJURETIC, J.A. JONES a G. NICHOLS. An outbreak of serious illness and death among injecting drug users in England during 2000. *Journal of Medical Microbiology*. 2002, **51**(11), 978–984. DOI:10.1099/0022-

1317-51-11-978. ISSN 0022-2615, 1473-5644.

SANDLE, Tim. 6 - Microbiology laboratory techniques. In: Tim SANDLE, ed. *Pharmaceutical Microbiology*. Oxford: Woodhead Publishing, 2016, s. 63–80. DOI:10.1016/B978-0-08-100022-9.00006-2. ISBN 978-0-08-100022-9.

SANCHEZ RAMOS, Lucia a Arne C. RODLOFF. Identification of Clostridium species using the VITEK® MS. *Anaerobe*. 2018. DOI:10.1016/j.anaerobe.2018.01.007. ISSN 10759964.

SARKER, Mahfuzur R., Saeed AKHTAR, J. Antonio TORRES a Daniel PAREDES-SABJA. High hydrostatic pressure-induced inactivation of bacterial spores. *Critical Reviews in Microbiology*. 2015, **41**(1), 18–26. DOI:10.3109/1040841X.2013.788475. ISSN 1040-841X.

SCHMITT, Bryan H., Scott A. CUNNINGHAM, Aaron L. DAILEY, Daniel R. GUSTAFSON a Robin PATEL, 2013. Identification of Anaerobic Bacteria by Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry with On-Plate Formic Acid Preparation. *Journal of Clinical Microbiology*. **51**(3), 782–786. DOI: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00056-1. ISSN 0095-1137.

SOBEL, Jeremy, Charles G. MIXTER, Priti KOLHE, Amita GUPTA, Jeannette GUARNER, Sherif ZAKI, Neil A. HOFFMAN, J. Glenn SONGER, Maurice FREMONT-SMITH, Marc FISCHER, George KILLGORE, Phyllis H. BRITZ a Clifford MACDONALD. Necrotizing Enterocolitis Associated with Clostridium perfringens Type A in Previously Healthy North American Adults. *Journal of the American College of Surgeons*. 2005, **201**(1), 48–56. . DOI:10.1016/j.jamcollsurg.2005.02.029. ISSN 10727515.

TALUKDAR, Prabhat K., Pathima UDOMPIJITKUL, Ashfaque HOSSAIN a Mahfuzur R. SARKER. Inactivation Strategies for *Clostridium perfringens* Spores and Vegetative Cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016. DOI:10.1128/AEM.02731-16. ISSN 0099-2240, 1098-5336.

TIJSSEN, P, 1985. *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. [online]. Burlington: Elsevier [vid. 2018-07-04]. ISBN 978-0-08-085884-5. Dostupné z: [http://www.123library.org/book\\_details/?id=45091](http://www.123library.org/book_details/?id=45091)

TITBALL, Richard W. Clostridium perfringens vaccines. *Vaccine*. 2009, **27**, 44–47. DOI:10.1016/j.vaccine.2009.07.047. ISSN 0264410X.

UZAL, F. A., J.P. WONG, W.R. KELLY a J. PRIEST. Antibody Response in Goats Vaccinated with Liposome-adjuvanted Clostridium perfringens Type D Epsilon Toxoid. 1999, **23**(3), 143–150. DOI: 10.1023/A:1006206216220. ISSN 1573-7446.

VOIDAROU, C., E. BEZIRTZOGLU, A. ALEXOPOULOS, S. PLESSAS, C. STEFANIS, I. PAPADOPOULOS, S. VAVIAS, E. STAVROPOULOU, K. FOTOU, A. TZORA a I. SKOUFOS. Occurrence of Clostridium perfringens from different cultivated soils. *Anaerobe*. 2011, **17**(6), 320–324. DOI:10.1016/j.anaerobe.2011.05.004. ISSN 10759964.

WEENK, G., E. FITZMAURICE a D.A.A. MOSSEL. Selective enumeration of spores of Clostridium species in dried foods. *Journal of Applied Bacteriology*. 1991, **70**(2), 135–143. DOI:10.1111/j.1365-2672.1991.tb04439.x. ISSN 00218847.

WILLIAMSON, E.D. a R.W. TITBALL. A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of Clostridium perfringens protects mice against experimental gas gangrene. *Vaccine*. 1993, **11**(12), 1253–1258. DOI:10.1016/0264-410X(93)90051-X. ISSN 0264410X.

WILSON, C.R. Methods for Analysis of Gastrointestinal Toxicants. In: *Comprehensive Toxicology*. 2010, s. 145–152. DOI:10.1016/B978-0-08-046884-6.00845-9. ISBN 978-0-08-046884-6.

YOSHIDA, J., H. NAKAMURA a N. YOSHIDA, 2015. A case of freeze-dried gas gangrene antitoxin for the treatment of Clostridium perfringens sepsis. **112**(2). DOI: 10.11405/nisshoshi.112.332. ISSN 04466586.