MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2016, 68: 13 - 21

Zastosowanie metody MALDI-TOF do identyfikacji szczepów *Clostridium perfringens*

Application of the MALDI-TOF for identification of Clostridium perfringens strains

Klaudia Brodzik[1], Ewa Augustynowicz[2], Agnieszka Korzeniowska-Kowal[3], Anna Lutyńska[4]

[1,2,4]Zakład Badania Surowic i Szczepionek,
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie
[3]Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda,
Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej

Beztlenowe laseczki *Clostridium perfringens* powszechnie występują w glebie i ściekach, a także wchodzą w skład naturalnej bioty przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt. Zatrucia pokarmowe o etiologii *C. perfringens* należą do jednych z najczęstszych chorób przenoszonych przez skażoną żywność na świecie. W pracy wykorzystano metodę MALDI-TOF do identyfikacji archiwalnych szczepów *C. perfringens* izolowanych od chorych z objawami zatruć pokarmowych i próbek żywności włącznie z weryfikacją uzyskanych wyników metodą sekwencjonowania 16S rRNA. Potwierdzono przydatność metody MALDI-TOF do identyfikacji gatunkowej szczepów *C. perfringens*. Uzyskano zgodne wyniki identyfikacji metodą MALDI-TOF, sekwencjonowania 16S rRNA oraz wykrywania obecności genu *cpa*.

Słowa kluczowe: *Clostridium perfringens typu A, zatrucie pokarmowe, enterotoksyna, MALDI-TOF, sekwencjonowanie 16S rRNA*

ABSTRACT

Introduction: The anaerobic bacilli *Clostridium perfringens* are commonly found in soil and sewage and are also part of the gastrointestinal tract of humans and animals. Food poisoning caused by *C. perfringens* are regarded the most common diseases transmitted by contaminated food in the world. Bacteria of this species due to their pathogenic properties sustain the constant object of studies in order to elucidate mechanisms of toxinogenesis, to determine the roads of transmission and to develop better diagnostic tools. The objective of the study was to verify the suitability of the MALDI-TOF method for the identification of *C. perfringens* species.

Methods: In order to identify anaerobic bacteria *C. perfringens* MALDI-TOF method, sequencing of 16S rRNA and detection of *cpe* and *cpa* gene by duplex PCR were used.
Results: MALDI-TOF confirmed *C. perfringens* identification in 39 isolates out of 41 archival isolates under study. The correctness of the results was verified by 16S rRNA sequencing and *cpa* gene detection.
Conclusions: The study confirmed the usefulness of MALDI-TOF method in rapid identification of anaerobic bacteria *C. perfringens* and thereby its applicability epidemiological investigations.

Key words: *Clostridium perfringens type A, food poisoning, enterotoxin, MALDI-TOF, 16S rRNA sequencing*

Beztlenowe laseczki *Clostridium perfringens* powszechnie występują w glebie, ściekach, a także wchodzą w skład naturalnej bioty przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt (8). Zatrucia pokarmowe o etiologii *C. perfringens* należą do jednych z najczęstszych chorób przenoszonych przez skażoną żywność na świecie (11,12). Przykładowo w latach 1998-2010 w Stanach Zjednoczonych odnotowano 289 ognisk epidemiologicznych i 15208 przypadków zatruć pokarmowych o etiologii *C. perfringens*, które doprowadziły do hospitalizacji 83 pacjentów i 8 zgonów (7). Źródłem zatruć było najczęściej spożycie skażonej wołowiny, drobiu i wieprzowiny, odpowiednio w 50%, 30% i 16% analizowanych przypadków (7). W Wielkiej Brytanii diagnozuje się rocznie średnio od 50 do 100 przypadków zatruć pokarmowych, wywoływanych najczęściej przez spożycie mięsa wołowego, przetworów drobiarskich lub innych produktów mięsnych skażonych endosporami *C. perfringens* typu A (21). W Polsce w porównaniu z innymi rozwiniętymi krajami rejestrowana jest niewielka (od kilku do kilkunastu przypadków) liczba zatruć pokarmowych o etiologii *C. perfringens* (5). W 2015 roku zarejestrowano 109 przypadków zachorowań, z których większość została poddana hospitalizacji (14). Ze względu na ograniczenia w diagnostyce *C. perfringens* można podejrzewać, że są to dane niedoszacowane.

Chorobotwórczość szczepów *C. perfringens* jest uzależniona od profilu wytwarzanych toksyn, których dotychczas opisano 17. Zdolność do wytwarzania głównych toksyn, tj. alfa, beta, epsilon, iota oraz enterotoksyny CPE (*Clostridium perfringens* enterotoxin) jest podstawą podziału szczepów *C. perfringens* na biotypy: A, B, C, D lub E. Każdy z biotypów jest związany z inną jednostką chorobową ludzi lub zwierząt (11,15). Szczepy gatunku *C. perfringens* typu A są czynnikiem etiologicznym chorób przenoszonych przez skażoną żywność, tj. martwicze zapalenie jelit, zakażenie tkanek miękkich u ludzi (zgorzel gazowa), a także enterotoksemia zwierząt (20). Szczepy *C. perfringens* typu A, które posiadają zdolność wytwarzania enterotoksyny CPE powodują zatrucia pokarmowe, biegunki poantybiotykowe (AAD - antibiotic associated diarrhoea) lub tzw. biegunki sporadyczne (SD - sporadic diarrhoea), które nie są związane ze spożyciem skażonej żywności (10,20).

Do identyfikacji oraz typowania szczepów *C. perfringens* związanych z zatruciami pokarmowymi coraz częściej stosowane są najnowsze metody genotypowania, tj. rybotypowanie, PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) lub MLVA (Multilocus Variable Number of Tandem Repeats) (13,17). Możliwość określenia genotypu danego szczepu *C. perfringens* odgrywa szczególne znaczenie w przypadku toksykogennych szczepów o zmienio-

nych właściwościach morfologicznych lub biochemicznych, które utrudniają ich identyfikację z zastosowaniem klasycznych metod diagnostycznych. W diagnostyce mikrobiologicznej, w ciągu ostatnich kilku lat, coraz częściej stosowana jest metoda MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) polegająca na analizie profili białkowych uzyskanych w wyniku spektrometrii masowej z jonizacją laserem wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu. Uzyskane widma masowe, stanowiące odzwierciedlenie profili białkowych, charakterystyczne dla danego gatunku/izolatu, porównywane są z widmami referencyjnymi zamieszczonymi w bazie danych (18,19).

Celem pracy było wykorzystanie metody MALDI-TOF do identyfikacji archiwalnych szczepów *C. perfringens* izolowanych od chorych z objawami zatruć pokarmowych i próbek żywności włącznie z weryfikacją uzyskanych wyników metodą sekwencjonowania 16S rRNA oraz potwierdzeniem wykrywania obecności genu *cpa* oraz *cpe*.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne. Łącznie w badaniach wykorzystano 41 szczepów zaklasyfikowanych do gatunku *C. perfringens* na podstawie archiwalnych wyników badań biochemicznych. Szczepy zostały zgromadzone w latach 1946-1987 i stanowią część archiwalnej kolekcji Zakładu Badania Surowic i Szczepionek Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny. Badaniom poddano 32 szczepy wyizolowane z próbek klinicznych pobranych od chorych z objawami zatruć pokarmowych, 7 szczepów wyizolowanych z próbek żywności oraz 2 szczepy wyizolowane z tkanek pobranych od chorych z objawami zgorzeli gazowej użyte do celów porównawczych. Jako szczep kontrolny *C. perfringens* typu A wykorzystano CN3352 *cpe*-. Szczepy przechowywano w postaci liofilizatów.

Hodowla szczepów *C. perfringens*. Liofilizaty ożywiano na podłożu TSA (Tryptone Soja Agar) lub TSA z krwią baranią (Grasco). Inkubację prowadzono w warunkach beztlenowych (95% H_2, 5% CO_2), w temp. 37°C przez 48-72 h.

Metoda MALDI-TOF. Pomiar widm masowych prowadzono przy użyciu spektrometru masowego MALDI-TOF UltrafleXtreme (Bruker Daltonics). Na stalową płytkę MSP nanoszono kolonie (2-5), a następnie pokrywano ją kwasem α-cyjano-4-hydroksycynamonowym rozpuszczonym w mieszaninie: 500 µl acetonitrylu, 450 µl wody i 25 µl TFA (Trifluoroacetic acid). W celu krystalizacji płytki suszono w temperaturze pokojowej, po czym poddano działaniu lasera, a uzyskane w programie FlexControl widma masowe porównano z widmami referencyjnymi bazy danych MALDI BioTyper 3.1 (Bruker Daltonics) w zakresie masy cząsteczkowej białek 2-20 kDa (2,4). Zastosowano następujące kryteria identyfikacji izolatów w zależności od uzyskanego przedziału ufności wartości score value: 2,300-3,000 – wysoce prawdopodobna identyfikacja gatunku; 2,000-2,299 – prawdopodobna identyfikacja gatunku; 1,700-1,999 – prawdopodobna identyfikacja do rodzaju; 0,000-1,699 – niewiarygodna identyfikacja.

Izolacja genomowego DNA. Genomowe DNA izolowano z 48-godzinnych hodowli bakterii na podłożu TSA z zastosowaniem komercyjnego zestawu Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) zgodnie z zaleceniami producenta. Stężenie oraz stopień czystości wyizolowanego DNA określono metodą spektrofotometryczną (BioPhotometer, Eppendorf). Za kryterium czystości przyjęto stosunek długości fali 260 nm/280 nm o wartości mieszczącej się w granicach 1,8-2,0.

Sekwencjonowanie genu 16S rRNA. W celu potwierdzenia identyfikacji gatunkowej wyników MALDI-TOF zastosowano reakcję PCR z wykorzystaniem starterów P2 (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3') oraz 63f-mod (5' GCCTAATACATGCAAGTC 3') wyznaczających do amplifikacji fragment genu 16S rRNA. Uzyskane produkty reakcji PCR oczyszczano enzymatycznie z zastosowaniem komercyjnego zestawu ExoProStar, zgodnie z zaleceniami producenta (GE Healthcare). Sekwencjonowanie wykonano przy użyciu zestawu BigDye® Terminator v.3.1 (Applied Biosystems). Produkty sekwencjonowania rozdzielano w sekwenatorze kapilarnym 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Do analizy i interpretacji wyników, uzyskanych w postaci fluorogramów, wykorzystano program FinchTV (http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml), a otrzymane sekwencje porównano z sekwencjami zdeponowanymi w GenBanku (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

Amplifikacja fragmentów genów *cpa* oraz *cpe*. Fragmenty genów kodujących toksynę alfa (*cpa*) oraz enterotoksynę (*cpe*) amplifikowano metodą duplex PCR stosując dwie pary starterów: PL3/PL7; PL145/PL146 oraz warunki reakcji amplifikacji opisane przez *Augustynowicz* i wsp. (2002).

WYNIKI

Diagnostyka metodą MALDI-TOF. Wyniki MALDI-TOF, przedstawione w Tabeli I, w oparciu o uzyskaną wartość score value ≥ 2,000, tj. wskazującą jako identyfikację wysoce prawdopodobną, pozwoliły jednoznacznie przyporządkować gatunkowe dopasowanie 39 izolatów *C. perfringens* z 41 badanych. W przypadku izolatu 545 pozyskanego z próbki kału, zaklasyfikowanego jako *C. perfringens,* uzyskana wartość score value wynosiła 1,967, wskazując na prawdopodobne przyporządkowanie do rodzaju *Clostridium*. Izolat 146 pozyskany z próbki kału, zidentyfikowano jako *Clostridium sporogenes*, natomiast izolat 527 pozyskany z próbki żywności zidentyfikowano jako *Propionibacterium acnes*.

Sekwencjonowanie genu 16S rRNA. Dla wszystkich izolatów wykonano sekwencjonowanie fragmentu genu 16S rRNA. Po przeprowadzeniu analizy sekwencji stwierdzono, iż sekwencje genu 16S rRNA były w 100% identyczne z sekwencjami *C. perfringens* zdeponowanymi w GeneBanku w 38 przypadkach, natomiast w przypadku izolatu 545 potwierdzono zgodność z sekwencją *C. perfringens* w 99%. Sekwencja fragmentu genu 16S rRNA izolatu 146 była w 100% identyczna z sekwencją gatunku *C. sporogenes*, sekwencja genu 16S rRNA izolatu 527 była w 99% identyczna z sekwencją gatunku *P. acnes*.

Wykrywanie genu *cpa* oraz *cpe* metodą duplex PCR. Gen *cpa* (Ryc.1) wykryto u wszystkich 39 badanych izolatów, przyporządkowanych do gatunku *C. perfringens* metodą MALDI-TOF o wartości score value w zakresie 2,382-1,967. Gen *cpe* wykryto w próbkach DNA 6 (15,4%) izolatów pochodzących od chorych z objawami zatruć pokarmowych lub próbek żywności.

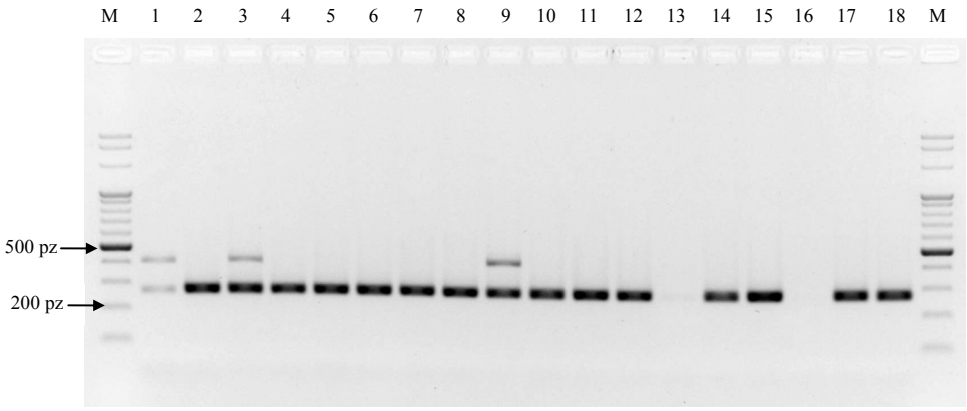
W próbkach DNA szczepów 146 i 527, które metodą sekwencjonowania 16S rRNA zidentyfikowano, odpowiednio jako *C. sporogenes* i *P. acnes*, nie wykryto obecności żadnego z badanych fragmentów genów.

Tabela I. Wyniki identyfikacji izolatów metodą MALDI-TOF, sekwencjonowania 16S rRNA oraz oznaczania toksynotypu

Lp.	Numer izolatu	Pochodzenie szczepu	Gatunek (najlepsze dopasowanie metodą MALDI-TOF)/Wynik sekwencjonowania*	Score value	Obecność genu *cpa*	Obecność genu *cpe*
1	344	Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa	*C. perfringens*	2,219	+	+
2	416	Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa	*C. perfringens*	2,373	+	+
3	417	Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna, Kraków	*C. perfringens*	2,331	+	-
4	431	Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna, Wrocław	*C. perfringens*	2,361	+	-
5	543	Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna, Wrocław	*C. perfringens*	2,272	+	-
6	645	Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa	*C. perfringens*	2,263	+	-
7	859	Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa	*C. perfringens*	2,163	+	-
8	954	Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa	*C. perfringens*	2,382	+	-
9	955	Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa	*C. perfringens*	2,066	+	+
10	1001	Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa	*C. perfringens*	2,235	+	-
11	1025	Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna, Wrocław	*C. perfringens*	2,344	+	-
12	1037	Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna, Katowice	*C. perfringens*	2,108	+	-

13	1270	Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa	*C. perfringens*	2,27	+	-
14	1116	Well Research Laboratory Norwegia	*C. perfringens*	2,301	+	+
15	1121	Well Research Laboratory, Norwegia	*C. perfringens*	2,276	+	-
16	80	Instytut Pasteura, Paryż	*C. perfringens*	2,235	+	-
17	233	Instytut Pasteura, Paryż	*C. perfringens*	2,264	+	-
18	626	Instytut Pasteura, Paryż	*C. perfringens*	2,325	+	-
19	629	Instytut Ceutanzino, Londyn	*C. perfringens*	2,287	+	-
20	1172	Instytut Wielka Brytania	*C. perfringens*	2,211	+	-
21	1126	Well Research Laboratory, Niemcy	*C. perfringens*	2,364	+	-
22	267	Instytut Eksperymentalny, Moskwa	*C. perfringens*	2,275	+	-
23	211	Instytut Alabama, USA	*C. perfringens*	2,334	+	-
24	150	nz	*C. perfringens*	2,369	+	-
25	151	nz	*C. perfringens*	3,316	+	-
26	286	nz	*C. perfringens*	2,357	+	-
27	384	nz	*C. perfringens*	2,371	+	-
28	478	nz	*C. perfringens*	2,264	+	-
29	512	nz	*C. perfringens*	2,152	+	-
30	526	nz	*C. perfringens*	2,042	+	-
31	545	nz	*C. perfringens*	1,967	+	-
32	547	nz	*C. perfringens*	2,323	+	-
33	597	nz	*C. perfringens*	2,157	+	
34	926	nz	*C. perfringens*	2,279	+	
35	927	nz	*C. perfringens*	2,253	+	-
36	928	nz	*C. perfringens*	2,189	+	+
37	958	nz	*C. perfringens*	2,315	+	
38	1266	nz	*C. perfringens*	2,366	+	+
39	ATCC CN3352	Instytut Pasteura, Paryż	*C. perfringens*	2,37	+	-
40	146	nz	*C. sporogenes*	1,736	-	-
41	527	nz	*P. acnes*	2,135	-	-

*jeśli różny niż wynik uzyskany metodą MALDI-TOF



Ryc. 1. Przykładowe wyniki reakcji duplex PCR próbek DNA izolatów *C. perfringens* z zastosowaniem dwóch par starterów PL3/PL7 oraz PL145/PL146: 1- izolat 1116, 2- 80, 3- 344, 4- 629, 5- 645, 6- 859, 7- 926, 8- 927, 9- 928, 10- 954, 11- 545; 12- 1001, 14- 1025, 15- 1037, 17- 1126, 18- 1172; inne gatunki: 13 – *C. sporogenes*; 16 – *P. acnes*; M- marker wielkości Perfect 100 pz DNA Ladder (EURx)

DYSKUSJA

Spektrometria masowa typu MALDI-TOF jest coraz częściej stosowana w diagnostyce mikrobiologicznej. Czas potwierdzenia gatunkowej identyfikacji w porównaniu do analiz biochemicznych uzyskiwany z jej zastosowaniem jest znacznie krótszy (3,18). Istotną zaletą metody jest także niewielka ilość materiału niezbędna do analizy, tj. 1 kolonia (10^5 komórek). Wiarygodność MALDI-TOF wiąże się z dostępnym zakresem bazy danych drobnoustrojów, czyli bazy widm referencyjnych (19). Pierwsze analizy MALDI-TOF umożliwiały identyfikację zaledwie 51-61% gatunków bakterii beztlenowych, co wiązało się ze zbyt ubogą liczbą widm referencyjnych (19). W ostatnich latach w wyniku powiększenia baz danych i możliwości uzyskania wyniku w stosunkowo krótkim czasie, metoda jest coraz powszechniej stosowana również w diagnostyce bakterii rodzaju *Clostridium* (19). Większość z nich dotyczy jednak szczepów *Clostridium difficile* (9,16). Badania Kiyosuke i wsp. (2015) potwierdziły niższą siłę dyskryminującą metody MALDI-TOF w stosunku do rybotypowania metodą PCR w identyfikacji gatunku *C. difficile*.

Przydatność metody MALDI-TOF w identyfikacji *C. perfringens* oceniono w grupie 41 archiwalnych szczepów izolowanych z próbek klinicznych od pacjentów wykazujących objawy zatrucia pokarmowego oraz z próbek żywności. Badane szczepy stanowiły niepowiązane ze sobą epidemiologicznie izolaty, przechowywane przez wiele lat w postaci liofilizatów i zidentyfikowane do gatunku klasycznymi metodami fenotypowymi. Zastosowanie MALDI BioTyper firmy Bruker – obecnie często stosowanego systemu diagnostycznego w laboratoriach mikrobiologicznych, umożliwiło potwierdzenie tożsamości 39 szczepów *C. perfringens* zidentyfikowanych szereg lat temu metodami biochemicznymi. W przypadkach wątpliwych, wskazujących na nieprawidłową klasyfikację do gatunku *C. perfringens*, zastosowanie sekwencjonowania, umożliwiło potwierdzenie wiarygodnej identyfikacji izolatów 146, 527, 545 odpowiednio z sekwencją *C. sporogenes*, *P. acnes i C.*

perfringens. Podobne wyniki potwierdzające wiarygodność metody MALDI-TOF w przypadkach identyfikacji *C. difficille* izolowanych z próbek klinicznych uzyskano z zastosowaniem innych systemów identyfikacji, tj. IVD lub SARAMIS (100% i 91,7%) (9).

Pomimo tego, że system MALDI-TOF stosowano dotychczas również do badań wewnątrzgatunkowego pokrewieństwa (3,18), nasze wyniki badań podobnie do wcześniej wykonanych przez Kiyosuke i wsp. (2015), tego nie potwierdziły. Badania 500 izolatów, pozyskanych z próbek klinicznych w 2015 roku w Szwecji wykonane przez Rizzardi i Äkerlund (2015) wykazały obecność aż 35 odmiennych typów. Różnice te mogą wynikać z liczby analizowanych szczepów, czasu ich izolacji lub różnic populacyjnych wpływających na poziom zmienności na danym obszarze geograficznym.

Rodzaj toksyny/toksyn wytwarzanych przez dany szczep *C. perfringens* warunkuje jego chorobotwórczość, dlatego też określenie genotypu szczepu jest ważnym elementem dobrze przeprowadzonej identyfikacji szczepu w celu potwierdzenia rozpoznania klinicznego (15). Identyfikację gatunkową badanej grupy szczepów potwierdzono metodą duplex PCR. Podobnie jak we wcześniejszych badaniach Augustynowicz i wsp. (2002) lub Wen i McClane (2004) potwierdzono obecność genu *cpa* w próbkach DNA wszystkich izolatów zidentyfikowanych metodą MALDI-TOF jako *C. perfringens*. Wykrywanie obecności genu *cpe*, łączonego z wytwarzaniem enterotoksyny wykorzystano w pracy jako dodatkowe, pośrednie narzędzie potwierdzające źródło pochodzenia badanych szczepów łączonych z zatruciami pokarmowymi. Obecność genu *cpe* potwierdzono w genomach 15,4% badanych szczepów izolowanych od chorych z objawami zatruć pokarmowych i próbek żywności. W piśmiennictwie dostępne są zróżnicowane wyniki badań dotyczące oceny częstości występowania genu *cpe* w genomach szczepów *C. perfringens* izolowanych z różnych źródeł, od 5-6% izolatów pozyskiwanych z próbek klinicznych lub próbek żywności (11) do nawet 43% izolatów pochodzących z próbek pozyskiwanych w czasie epidemii (6).

PODSUMOWANIE

Przedstawione wyniki badań potwierdziły przydatność metody MALDI-TOF do identyfikacji gatunkowej szczepów *C. perfringens*. MALDI-TOF może znaleźć zastosowanie w diagnostyce szczepów izolowanych z próbek klinicznych lub próbek żywności w badaniach ognisk epidemicznych zatruć pokarmowych o etiologii *C. perfringens* ze względu na szybkość i stosunkowo proste wykonanie oznaczania tożsamości gatunkowej.

PIŚMIENNICTWO

1. *Augustynowicz E, Gzyl A, Ślusarczyk J*. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* with a duplex PCR. J Med Microbiol 2002; 51: 169-72.
2. *Bizzini A, Durussel C, Bille J, Gerub G, Prod'hom G*. Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry for Identificatin Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. J Clin Microbiol 2010; 48: 1549-54.
3. *Carbonnelle CW, Grohs P, Jacquier H, Day N* i inni. Robustness of two MALDI-TOF mass spctrometry systems for bacterial identification. J Microbiol Methods 2012; 89: 133-6.
4. *Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, Schrenzel J*. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotipic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. J Clin Microbiol 2010; 48: 1169-75.

5. *Czarkowski MP, Cielebak E, Kondej B i Staszewska E*. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2013 roku. Biuletyn roczny 2013: 23.
6. *Dolan GP, Foster K, Lawler J* i inni. An epidemiological review of gastrointestinal outbreaks associated with *Clostridium perfringens*, North East of England, 2012-2014. Epidemiol Infect 2015; 16: 1-8.
7. *Grass EJ, Gould HL, Mahon EB*. Epidemiology of Foodborne Disease Outbreaks Caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998-2010. Foodborne Pathog Dis 2013; 10: 131-6.
8. *Kądzielska J, Obuch-Woszczatyński P, Pituch H, Młynarczyk G*. *Clostridium perfringens* jako czynnik etiologiczny biegunki poantybiotykowej. Postępy Mikrobiologii 2012; 51: 1.
9. *Kiyosuke M, Kibe Y, Oho M* i inni. Comparison of Two Types of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometers for the Identification and Typing of *Clostridium difficile*. J Med Microbiol 2015; 64: 1144-50.
10. *Kokai-Kun JF i McClane BA*. Deletion Analysis of the *Clostridium Perfringens* Enterotoxin. Infect Immun 1997; 65: 1014–22.
11. *Li J i McClane BA*. Comparative Effects of Osmotic, Sodium Nitrite-Induced, and pH-Induced Stress on Growth and Survival of *Clostridium Perfringens* Type A Isolates Carrying Chromosomal or Plasmid-Borne Enterotoxin Genes. Appl Environ Microb 2006; 72: 7620–5.
12. *Lindström M, Heikinheimo A, Lahti P, Korkeala H*. Novel Insights into the Epidemiology of *Clostridium perfringens* Type A Food Poisoning. Food Microbiol 2011; 28: 192–8.
13. *Maslanka SE, Kerr JG, Williams G* i inni Molecular Subtyping of *Clostridium perfringens* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis To Facilitate Food-Borne-Disease Outbreak Investigations. J Clin Microbiol 1999; 37; 7: 2209–14.
14. Meldunki o zachorowaniach na choroby zakaźne, zakażeniach i zatruciach w Polsce. Zakład Epidemiologii NIZP-PZH, Departament Zapobiegania oraz Zwalczania Zakażeń i Chorób Zakaźnych u Ludzi GIS. Dwutygodniowa 12/B/15; 1.01-31.12.
15. Miyamoto K, Jihong L i McClane BA. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: Detection and Identification. Microbes and Environments 2012; 27: 343-9.
16. Rizzardi K i Äkerlund T. High Molecular Weight Typing with MALDI-TOF MS – A Novel Method for Rapid Typing of *Clostridium difficile*. PLoS One 2015; 4: 1-8.
17. Sawires YS i Songer JG. *Clostridium perfringens*: Insight into virulence evolution and population structure. Anaerobe 2006; 12: 23-43.
18. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM i Raoult D. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. Clin Infect Dis 2009; 49: 543-1.
19. Sogawa K, Watanabe M, Sato K, Segawa S, Ishii C, Miyabe A, Murata S, Saito T i Nomura F. Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. Anal Bioanal Chem 2011; 400: 1905-11.
20. Sparks SG, Carman RJ, Sarker MR i McClane BA. Genotyping of Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* Fecal Isolates Associated with Antibiotic-Associated Diarrhea and Food Poisoning in North America. J Clin Microbiol 2001; 39: 883-8.
21. Wen Q i McClane BA. Detection of Enterotoxigenic *Clostridium Perfringens* Type A Isolates in American Retail Foods. Appl. Environ. Microbiol. 2004; 70: 2685–91.

Otrzymano: 22 II 2016

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Badania Surowic i Szczepionek, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny