

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS BIJ PLUIMVEE: UBIQUITAIRE KIEM, NORMALE DARMBEWONER OF PATHOGEEN?

**F. Van Immerseel, L. Timbermont, A. Lanckriet, A.R. Gholamiandehkordi, F. Pasmans,
F. Haesebrouck, R. Ducatelle**

Onderzoeksgroep Veterinaire Volksgezondheid en Zoönosen, Vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

filip.vanimmerseel@UGent.be

SAMENVATTING

Ziekten bij landbouwhuisdieren veroorzaakt door *Clostridium perfringens* blijken toe te nemen wanneer groeipromotoren met antibacteriële activiteit op vrijwillige of verplichte basis weggelaten worden uit voeders. De alomtegenwoordige bacterie *C. perfringens* bezit een waaier van toxinen en enzymen die kunnen bijdragen tot de inductie van bepaalde pathologieën. Het is momenteel nog niet volledig duidelijk welke van deze virulentiefactoren belangrijk zijn voor de inductie van de specifieke aandoeningen bij de desbetreffende diersoorten, en het is zeker dat niet alle virulentiefactoren gekend zijn. Het lijkt erop dat er een bepaalde vorm van gastheerspecificiteit bestaat maar dit is eveneens nog niet volledig opgehelderd. Bij pluimvee komt necrotische enteritis voor gepaard gaand met darmnecrose en plotse sterfte. Er komt eveneens een subklinische vorm van *C. perfringens*-infectie voor die gepaard gaat met verminderde zoötechnische prestaties. Momenteel is de bestrijding beperkt tot het vermijden van predisponerende factoren, waaronder het tegengaan van coccidiose. Het is echter noodzakelijk om verder te gaan dan dat, gezien het niet echt duidelijk is of bepaalde coccidiostatica in de toekomst nog zullen mogen gebruikt worden. In dit literatuuroverzicht worden de toxinen en andere virulentiefactoren van *C. perfringens* besproken, waarna een uitgebreid overzicht wordt gegeven van de pathogenese en de bestrijding van *C. perfringens*-geïnduceerde necrotische enteritis bij vleeskippen. Tenslotte wordt dieper ingegaan op het zoönotische aspect, namelijk het belang van enterotoxine positieve *C. perfringens* bij voedselbesmettingen bij de mens.

INLEIDING

C. perfringens is een grampositieve, anaërobe, sporevormende bacterie die alomtegenwoordig is in de omgeving. Deze bacterie wordt gevonden in de bodem, in organisch materiaal en is een onderdeel van de normale darmmicrobiota van dier en mens. Door haar capaciteit om resistente endosporen te vormen kan deze bacterie persisteren in de omgeving. Ze wordt beschouwd als de meest wijdverspreide pathogene bacterie in de natuur (Shimizu *et al.*, 2002). Hoewel *C. perfringens* vrijwel overal aanwezig is, inclusief in de darm van dieren, is het niet zo dat de bacterie wereldwijde epidemieën bij mens en dier veroorzaakt. Ziekte bij dieren blijkt vooral voor te komen in de intensieve veehouderij waar eiwitrijke voeders gebruikt worden. De incidentie van *C. perfringens*-geïnduceerde ziekte bij landbouwhuisdieren is sinds enkele jaren explosief toegenomen (Williams, 2004). Bij vleeskippen wordt de toename van necrotische enteritis

in verband gebracht met de verplichte (EU) of vrijwillige verwijdering van groeipromotoren met antibacteriële werking uit het voer. Bij het gebruik van groeipromotoren moest in het verleden geen rekening worden gehouden met factoren die een potentieel risico vormen op selectieve proliferatie van bepaalde grampositieve, potentiële pathogenen, zoals het gebruik van eiwitrijke voeders en het gebruik van tarwe en andere graansoorten in plaats van maïs als energiebron. Nu de groeipromotoren verboden zijn en het om economische redenen niet meer mogelijk is om bepaalde risicofactoren (bijvoorbeeld eiwitrijke voeders) te wijzigen, werd dus een opening gecreëerd waar *C. perfringens* gebruik van maakt om ziekte te induceren. *C. perfringens* invadeert geen cellen maar produceert een waaier van toxinen en enzymen die verantwoordelijk zijn voor de laesies en de symptomen. Deze virulentiefactoren blijken nochtans bij gezonde individuen met een normaal dieet niet voldoende te zijn om ernstige ziekte te induceren. Bepaalde predisponerende

factoren zijn dus noodzakelijk. In het onderstaand overzicht worden de bekende toxinen van de bacterie beschreven en wordt dieper ingegaan op het ontstaan van necrotische enteritis bij kippen, alsook op de bestrijding van de aandoening. Tevens wordt aandacht besteed aan het zoönotische aspect. De bewustmaking van dierenartsen, pluimveehouders en van de overheid voor dit acute probleem is noodzakelijk om de uitbreiding van de *C. perfringens*-geïnduceerde ziekten tegen te gaan.

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS-TOXINEN

C. perfringens is in staat verschillende toxinen en enzymen te produceren die verantwoordelijk zijn voor de symptomen en laesies bij ziekte. *C. perfringens*-stammen worden in 5 toxinetypen (A, B, C, D en E) ingedeeld, naargelang ze al dan niet één of meerdere van vier toxinen (, , ,) produceren (Songer, 1996; Petit *et al.*, 1999). Stammen van alle toxinetypen produceren alfatoxine. Hiernaast produceren stammen van toxinetype C beta-toxine, stammen van toxinetype D epsilon-toxine en stammen van toxinetype E iota-toxine. Stammen van toxinetype B produceren zowel alfa-, beta- als epsilon-toxine. Eveneens van belang is het enterotoxine, dat in een minderheid van de isolaten voorkomt en de oorzaak is van humane voedselbesmettingen. Naast deze toxinen produceren alle toxinetypen nog verschillende andere toxinen die minder goed gekarakteriseerd zijn.

Alfatoxine

Het gen dat codeert voor het alfatoxine is gelegen op een stabiel gebied van het bacteriële chromosoom, wat verduidelijkt waarom alle *C. perfringens*-stammen het gen bevatten (Canard *et al.*, 1989). Het alfatoxine is een fosfolipase C-sfingomyelinase dat fosfolipiden hydrolyseert en dus celmembraanschade toebrengt. Het eiwit is 370 aminozuren lang en de driedimensionele structuur bestaat uit twee domeinen die worden verbonden door een korte, flexibele linkerregio. Het N-terminale domein bevat een Zn^{2+} -afhankelijke, actieve zone met enzymactiviteit, terwijl het C-terminale domein Ca^{2+} kan binden en instaat voor de binding aan membranen (Naylor *et al.*, 1998; Titball *et al.*, 1999). Alfatoxine hydrolyseert specifiek fosfatidylcholine en sfingomyeline, twee componenten van eukaryote celmembranen (Krug en Kent, 1984; Nagahama *et al.*, 1996).

Bij hoge concentraties veroorzaakt alfatoxine een massale afbraak van fosfolipiden, membraanschade en cytolyse (Titball *et al.*, 1999). Lage concentraties zorgen voor een beperkte hydrolyse van fosfatidylcholine en sfingomyeline, leidend tot de productie van de secundaire

boodschappermoleculen diacylglycerol (DAG) en ceramide, die op hun beurt signaaltransductiewegen in gang zetten leidend tot de ongecontroleerde productie van verschillende intracellulaire mediators (Kent *et al.*, 1986; Titball *et al.*, 1999). Diacylglycerol kan gerecycleerd worden tot triacylglycerol of tot nieuwe fosfolipiden. Diacylglycerol kan ook proteïnekinase C activeren en zo het vrijkomen van Ca^{2+} uit het endoplasmatisch reticulum van cellen induceren, leidend tot een accumulatie van cytoplasmatisch Ca^{2+} (Schuess *et al.*, 1992; Flores-Diaz *et al.*, 2004). Dit verklaart de negatieve effecten van het alfatoxine op spiercellen en de cardiotoxische effecten (Titball *et al.*, 1999). Geactiveerd proteïnekinase C kan ook fosfolipase A_2 activeren, leidend tot een activatie van de arachidonzuurcascade, en dus tot de productie van tromboxanen, leukotriënen en prostaglandinen. Deze moleculen spelen een belangrijke rol in het ontstaan van lokale, inflammatoire responsen, ischemie, trombose en vasoconstrictie, wat kan leiden tot hypoxie in geïnfecteerde weefsels (Ellemor *et al.*, 1999; Titball *et al.*, 1999; Stevens en Bryant, 2000; Flores-Diaz *et al.*, 2004). Dit is gunstig voor de groei van de bacteriën. De effecten van alfatoxine op endotheelcellen die reeds werden vastgesteld, zijn de productie van prostacycline en platelet-activating factor (PAF), wat kan leiden tot verhoogde vasculaire permeabiliteit en neutrofiel adhesie aan endotheelcellen. Hierbij komt dat alfatoxine de expressie van adhesiemoleculen in endotheelcellen en neutrofielen kan opreguleren. Dit kan de migratie van neutrofielen naar weefsels beïnvloeden. Een ongewoon verhoogde opregulatie van ICAM-1 en ELAM-1 op endotheelcellen en een sterke verhoging van IL-8 expressie, in normale omstandigheden gebruikt voor de migratie van de neutrofielen naar weefsels, zouden de bloedvaten blokkeren en juist de migratie van immuuncellen tegengaan (Bryant *et al.*, 1996; Bunting *et al.*, 1997; Titball *et al.*, 1999). Tenslotte werd vastgesteld dat alfatoxine aanleiding kan geven tot aggregatie van bloedplaatjes en neutrofielen, leidend tot vasculaire occlusie (Bryant *et al.*, 2000).

De hogervermelde observaties en studies tonen aan dat het alfatoxine een brede waaier van effecten kan hebben. Er dient wel met enige voorzichtigheid te worden omgegaan met deze gegevens gezien al deze studies met cellijnen en met verschillende diersoorten werden uitgevoerd. Terwijl vele van de vernoemde activiteiten logische verklaringen geven voor de symptomen en laesies van gasgangreen bij de mens (zie verder), is het minder duidelijk welke van de hogervermelde acties van alfatoxine belangrijk zijn bij de inductie van necrotische enteritis bij landbouwhuisdieren. Voorzichtigheid is geboden bij de extrapolatie van studies uitgevoerd op celtypen

van andere diersoorten, inclusief van de mens, vermits de fosfolipidensamenstelling van de membraan van eukaryote cellen sterk verschilt naargelang de diersoort. Tevens verschilt ook de samenstelling van de verschillende celtypen en dus van de gevoeligheid voor alfatoxine (Flores-Diaz *et al.*, 2004). Naast de samenstelling van de membraan is eveneens de capaciteit van de cel om fosfolipiden te synthetiseren belangrijk. Aangezien er enkel toxinetype A-stammen uit de darminhoud van kippen worden geïsoleerd (Gholamiandehkordi *et al.*, 2006), wordt algemeen aanvaard dat het alfatoxine waarschijnlijk een rol speelt bij de inductie van necrotische enteritis bij kippen, al dan niet in combinatie met andere factoren. Het beta-, iota-, epsilon- en enterotoxine zijn daarentegen niet belangrijk bij het ontstaan van necrotische enteritis bij pluimvee. Voor de volledigheid worden deze hieronder kort besproken.

Betatoxine

Er is veel minder informatie voorhanden over de activiteit van het betatoxine dan over alfatoxine. Het is de oorzaak van necrotische enteritis bij de mens. Het betatoxine is een thermolabiel en proteasegevoelig toxine dat poriën vormt in gevoelige membranen door oligomerisatie resulterend in een in- en efflux van ionen en uiteindelijk in celdood. (Steinthorsdottir *et al.*, 2000; Shatursky *et al.*, 2000; Nagahama *et al.*, 2003). Het is niet duidelijk of darmcellen gevoelig zijn. Humane endotheelcellen blijken gelyseerd te worden (Steinthorsdottir *et al.*, 2000). Het is mogelijk dat het betatoxine in circulatie komt na opname vanuit de darm en neurotoxisch is, maar ook dit is niet duidelijk.

Ook van het in 1997 ontdekte beta2-toxine is de activiteit nog niet volledig duidelijk. Het toxine is cytotoxisch voor bepaalde darmepitheelcellijnen. Het zou een poriënvormend toxine zijn (Gibert *et al.*, 1997). De aanwezigheid van het beta2-toxine is sterk gelinkt aan de inductie van necrotische enteritis bij varkens (Bueschel *et al.*, 2003; Waters *et al.*, 2003; Jost *et al.*, 2005) en paarden (Herholz *et al.*, 1999; Bacciarini *et al.*, 2003) en aan de inductie van sporadische diarree bij de mens (in dit laatste geval dan wel samen met het enterotoxine) (Fisher *et al.*, 2005). Bij isolaten afkomstig van varkens blijkt het gen coderend voor het beta2-toxine samen voor te komen met het *cna*-gen coderend voor een collageen bindend eiwit, wat niet het geval is bij isolaten van andere diersoorten (Jost *et al.*, 2006). Bij pluimvee-isolaten komt het beta2-toxine slechts in zeer beperkte mate voor (Gholamiandehkordi *et al.*, 2006).

Epsilontoxine

Het epsilontoxine is, na het tetanus- en botulinumtoxine, het meest letale *Clostridium*-toxine en veroorzaakt fatale enterotoxemie bij schapen en geiten. Het wordt in de darm gesecreteerd als een relatief inactief prototoxine dat geactiveerd wordt door intestinale proteasen (Miyata *et al.*, 2001). Eens het door de mucosale barrière dringt, wordt het snel opgenomen in het bloed. Het veroorzaakt oedeem en hemorragische letsels in de hersenen, longen, het hart, de nieren en de lever (Tamai *et al.*, 2003; Petit *et al.*, 2003). Nadat het toxine deze organen bereikt heeft, zou het binden aan cellen met de gepaste receptoren voor het toxine en niet-selectieve poriën vormen door oligomerisatie in een heptameer. Deze poriën geven dan aanleiding tot een verlies van transepitheliale weerstand en finaal tot een opstapeling van vocht in de geïntoxiceerde weefsels, zoals hersenen en nieren. Het toxine zou de bloed-hersenbarrière kunnen passeren (Petit *et al.*, 2001, 2003; Miyata *et al.*, 2001).

Enterotoxine

Het enterotoxine veroorzaakt voedselintoxicatie bij de mens en wordt geproduceerd tijdens de sporulatie van de bacterie in de darm. Het toxine bindt aan receptoren op het oppervlak van het darmepitheel (waaronder claudinen) en vormt een complex dat permeabiliteitsveranderingen veroorzaakt leidend tot calciuminflux in de cel. Deze influx veroorzaakt activatie van calmoduline en calpeïne, waardoor een depolarisatie ontstaat van mitochondriale membranen en cytochroom c in het cytosol vrijkomt. Dit leidt finaal tot apoptose (Smedley *et al.*, 2004). Hoewel enterotoxinepositieve stammen voorkomen bij pluimvee vormen ze een minderheid van de isolaten (Gholamiandehkordi *et al.*, 2006) en hoogstwaarschijnlijk zijn ze niet relevant voor de inductie van necrotische enteritis bij kippen maar wel voor voedselintoxicatie bij de mens door de consumptie van pluimveevlees.

Iotatoxine

Het iotatoxine is een binair toxine bestaande uit een bindingscomponent (Ib) en een enzymecomponent (Ia) en het zorgt voor veranderingen in het actineskelet. Ib herkent een receptor op het oppervlak van cellen, beide componenten worden vervolgens opgenomen door receptorgemedieerde endocytose, waarna Ia wordt getransloceerd naar het cytosol. De Ia-component is een ADP-ribosylerende toxine en katalyseert de ADP-ribosylatie van actinemonomeren, leidend tot actinedepolymerisatie en de inhibitie van bepaalde celfuncties met celdood tot gevolg (Gibert *et al.*, 2000).

Het toxine wordt belangrijk beschouwd bij de inductie van enterotoxemie bij kalveren maar blijkt niet betrokken te zijn bij necrotische enteritis bij kippen.

Minder bekende toxinen

De hierboven beschreven toxinen zijn de meest bekende *C. perfringens*-toxinen, maar de bacterie bevat een waaier van andere toxinen en enzymen die een rol kunnen spelen in pathogeniciteit. Het θ -toxine (perfringolysine O) kan poriën vormen in de celmembraan en is hemolytisch, maar zijn rol in de pathogenese is onbekend. *C. perfringens* bevat enzymen die een rol kunnen spelen in de afbraak van de extracellulaire matrix, zoals collagenase (kappatoxine) en in de afbraak van celmateriaal (Rood, 1998). Dit zou zeer belangrijk kunnen zijn in de weefseldesorganisatie en nutriëntopname door de bacteriën in laesies. Er is weinig onderzoek voorhanden betreffende de rol van deze enzymen in de pathogenese. Deze enzymen zouden echter wel eens cruciaal kunnen zijn, al dan niet in synergie met de werking van toxinen. Vermits de functie van de meeste genen van het *C. perfringens*-genoom, dat recent werd gesequeneerd, nog onbekend zijn, lijkt het logisch dat nog andere onbekende virulentiefactoren aanwezig zijn dan deze die hierboven beschreven werden (Shimizu *et al.*, 2002).

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS BIJ PLUIMVEE

Voorkomen van *C. perfringens* bij pluimvee

C. perfringens komt voor in alle ecosystemen, inclusief het drinkwater en de bodem (Davies en Wray, 1996; Thakur en Grover, 2001; Desmarais *et al.*, 2002), en ook in de darm van de kip. In studies waarbij darminhoud werd onderzocht op *C. perfringens*, bleek steeds meer dan 75% van de stalen positief te zijn (Shane *et al.*, 1984; Miwa *et al.*, 1997; Craven *et al.*, 2001a,b). De kolonisatie van de darm met *C. perfringens* lijkt zeer vroeg te gebeuren, reeds in de broeierij. Daar is aangetoond dat zelfs eischalen en donsveren positief zijn voor *C. perfringens* (Craven *et al.*, 2001b). Dergelijke stammen zijn persistent: epidemiologische studies in de VS toonden aan dat *C. perfringens*-stammen die voorkomen op vleeskippenkarkassen afkomstig kunnen zijn van de broeierij. Dezelfde stammen kunnen worden teruggevonden op papier gebruikt in transportkragen en verder in stalen in de levende fase tot in het slachthuis (Craven *et al.*, 2001a, 2003). Op pluimveebedrijven werd *C. perfringens* gedetecteerd in muurswabs, ventilatiekanalen en laarzen (Craven *et al.*, 2001a). Het is dus onmogelijk om dergelijke sporenvormende, ubiquitaire bacteriën uit de pluimveestallen en het dier zelf te verwijderen.

Subklinische ziekte en necrotische enteritis

Necrotische enteritis bij kippen gaat dikwijls gepaard met plotse sterfte, meestal ongeveer 1% per dag gedurende verschillende opeenvolgende dagen. Dit gebeurt vaak rond de leeftijd van 3 à 4 weken bij vleeskippen. De klinische symptomen zijn depressie, dehydratie, dikzitten, diarree en een verminderde voederopname (Wijewanta en Senevirtna, 1971; Helmboldt en Bryant, 1971; Al-Sheikly en Truscott, 1976a; Al-Sheikly en Al-Saieg, 1979; Gadzinski en Julian, 1992; Riddell en Kong, 1992). Macroscopische laesies worden meestal gevonden in de dunne darm, maar laesies kunnen eveneens gevonden worden in de caeca, lever en nieren. De dunne darm is meestal dunwandig, gedilateerd en gevuld met gas en de mucosa kan bedekt zijn met een grijsgroene tot geelgroene pseudomembraan (Broussard *et al.*, 1986; Gadzinski en Julian, 1992). De histologische laesies die voorkomen, werden reeds uitvoerig beschreven en via experimenten waar *C. perfringens* intraduodenaal werd geïnoculeerd, kon het hele proces gedetailleerd worden gevolgd (Al-Sheikly en Truscott, 1976a,b,c). Een uur na de inoculatie is er een lichte oedeemvorming en vasodilatatie; er zijn ook dode cellen zichtbaar in het lumen. Enkele uren later is er sterke oedeemvorming te zien en komen de epitheelcellen in grote aantallen los van de lamina propria, vooral aan de apex van de villi. De toppen van de villi ondergaan een degeneratie en grote hoeveelheden dode cellen en fibrineus materiaal komen vrij in het lumen. Grote aantallen bacteriën hechten zich vast aan het eiwitmateriaal en aan de dode cellen en lijken zich sterk te vermenigvuldigen. Nog later is er coagulatieneecrose. De dode celmassa is een homogene eosinofiele massa geworden zonder zichtbare kernen door eiwitdenaturatie. Dikwijls is er ook een sterke stuwning van de bloedvaten en liggen er talrijke al dan niet gelyseerde rode bloedcellen in het lumen. Er is trombose van bloedvaten en de villi zijn sterk verkort. In een later stadium kunnen de necrotische zones zelfs de crypten bereiken. Heterofiele granulocyten infiltreren massaal de lamina propria en vormen een demarcatielijn met daarboven necrotisch materiaal met grote aantallen bacteriën. Onder deze demarcatielijn bevindt zich gezond weefsel. In de regeneratiefase is er een fusie van villi en initieel is er de vorming van korte villi. Macroscopische laesies van dieren uit de praktijk zijn identiek aan de laesies bij experimenteel geïnoculeerde dieren. Er kunnen ook meerdere necrosehaardjes voorkomen in de lever.

Naast de hierboven beschreven klinische vorm (necrotische enteritis) kan eveneens een subklinische vorm voorkomen, vooral leidend tot zoötechnische problemen (Kaldhusdal en Hofshagen, 1992; Løvland en Kaldhusdal, 1999). Schade aan de dunne darm leidt dan tot een

verminderde vertering en tot absorptie, verlaagde gewichtsaanzet en tot een verhoogde voederconversie (Elwinger *et al.*, 1992; Hofshagen en Kaldhusdal, 1992; Kaldhusdal *et al.*, 2001; Hofacre *et al.*, 2003). Het al dan niet voorkomen van de klinische of subklinische vorm heeft te maken met de ernst van de letsels. In de subklinische vorm is er enkel focale necrose van de dunne darm te zien. Ook hepatitis en cholangiohepatitis kunnen voorkomen in de subklinische vorm, eventueel leidend tot afkeuringen in het slachthuis. Door het hoge aantal *C. perfringens*-bacteriën in de darm kunnen de bacteriën dus via de bloedbaan in de lever terechtkomen.

Predisponerende factoren voor het ontstaan van necrotische enteritis

De aanwezigheid van *C. perfringens* in de darm van vleeskippen leidt niet per se tot subklinische ziekte of necrotische enteritis. Zoals al vermeld, is *C. perfringens* alomtegenwoordig in de omgeving en in de darm van dieren. Verschillende predisponerende factoren zijn nodig voor de inductie van ziekte. Epidemiologische gegevens wijzen erop dat het niet gebruiken van antibiotische groeipromotoren predisponerend werkt.

De meest gekende predisponerende factor voor de inductie van necrotische enteritis is echter coccidiose. Darmschade veroorzaakt door *Eimeria* leidt tot lekkage van plasmaeiwitten naar het lumen van de darm. *C. perfringens*-bacteriën hechten zich vast aan de celdebris en het eiwitmateriaal en vermenigvuldigen er zich massaal. De minimale groeivereisten voor *C. perfringens* omvatten meer dan 11 aminozuren (Boyd *et al.*, 1948). De lekkage van eiwitten naar het lumen kan een noodzakelijk groeisubstraat zijn voor de explosieve vermeerdering van de bacteriën. Door de lokale hoge aantallen *C. perfringens*-bacteriën zou toxineproductie dan voor verdere darmschade kunnen zorgen. Vooral *Eimeria*species die schade induceren in de dunne darm, zoals *Eimeria maxima* en *acervulina*, zijn predisponerend voor necrotische enteritis (Helmboldt en Bryant, 1971; Long *et al.*, 1974; Broussard *et al.*, 1986; Hofacre *et al.*, 1998; 2003; Jackson *et al.*, 2003). Het weglaten van coccidiostatica kan dus eveneens een sterke toename van *C. perfringens* geïnduceerde ziekte in de hand werken. Vermoedelijk kan zelfs eender welke behandeling die darmschade induceert, aanleiding geven tot een sterk verhoogde kans op *C. perfringens* geïnduceerde necrotische enteritis.

Een zeer belangrijke factor bij de inductie van necrotische enteritis is zonder twijfel de samenstelling van het dieet. Een dieet met hoge concentraties niet-verteerbare, wateroplosbare, niet-zetmeel polysacchariden werkt predisponerend voor necrotische enteritis. Dergelijke voeders verhogen de

viscositeit van de darminhoud. Voeders met tarwe, rogge en gerst bevatten meer van deze polysacchariden dan voeders met maïs als energiebron (Branton *et al.*, 1987; Kaldhusdal en Hofshagen, 1992; Riddell en Kong, 1992; Kocher, 2003). Ook hogere eiwitgehalten in de voeders verhogen de kans op necrotische enteritis. *In vivo*-modellen voor necrotische enteritis gebruiken dikwijls hoge concentraties vismeel in het voeder.

Preventie en bestrijding

Gezien er jarenlang groeipromotoren in pluimveevoeders werden gebruikt en veel grampositieve bacteriën op deze manier onderdrukt werden, was er tot nog toe geen nood aan preventie- en controlemaatregelen. Een overvloed aan literatuur is voorhanden die aantoont dat vele groeipromotoren heel efficiënt zijn tegen *C. perfringens* geïnduceerde necrotische enteritis (Van Immerseel *et al.* 2004). Na het EU-verbod op avoparcine in 1997, op ardacin, bacitracine, virginiamycine, tylosine en spiramycine in 1998 en sinds 2006 op monensin, salinomycine, avilamycine en flavofosfolipol (flavomycine) als groeipromotoren, is er een dringende nood aan efficiënte producten met een activiteit tegen *C. perfringens*.

Coccidiostatica

Momenteel kan het ergste nog worden vermeden door het gebruik van coccidiostatica, waarvan sommige eveneens een bacteriële werking hebben (ionoforen), maar of deze in de toekomst toegelaten zullen blijven, is zeer onzeker. Het onderzoek omtrent bestrijdingsproducten tegen *C. perfringens* zit in de lift, maar de vraag is of er snel genoeg kan worden gereageerd om een sterk opkomende aandoening efficiënt te bestrijden.

Vaccinatie

Vaccinatie kan een belangrijk hulpmiddel zijn om necrotische enteritis te voorkomen. Bij schapen, varkens, geiten en kalveren kunnen hoge antilichaamtiteren worden opgewekt na vaccinatie en het werd reeds duidelijk aangetoond dat vaccinatie bij verschillende zoogdieren, inclusief de mens, beschermend werkt tegen necrotische enteritis (Lawrence *et al.*, 1990; Troxel *et al.*, 1997; de la Rosa *et al.*, 1997; Uzal *et al.*, 1998; Springer en Selbitz, 1999; Schoepe *et al.*, 2001). Diverse volledige kiem- en toxoid vaccins zijn voorhanden voor runderen en schapen. Het lijkt dus mogelijk om ook voor pluimvee een vaccinatie te overwegen. Hoewel het beschermend effect van vaccinatie tegen necrotische enteritis bij pluimvee nog niet onderzocht werd, toonde een grootschalige studie in Noorwegen aan dat tomen met hoge maternale an-

tilichaamtiteren tegen het alfatoxine een lagere mortaliteit vertoonden dan tomen met lage maternale antilichaamtiteren (Heier *et al.*, 2001). In een subklinisch necrotische enteritis-model werd aangetoond dat vleeskippen afkomstig van moederdieren die gevaccineerd werden met een toxoid vaccin, minder darm- en leverletsels hadden dan de controle-dieren (Løvland *et al.*, 2004).

Het spreekt voor zich dat het tegengaan van predisponerende factoren voor de inductie van necrotische enteritis gunstig is bij het voorkomen van de ziekte. Coccidiostatica kunnen bescherming geven gezien de darmschade geïnduceerd door coccidiose de belangrijkste predisponerende factor is voor de inductie van necrotische enteritis door *C. perfringens*. Wat betreft de vaccinatie tegen coccidiose kunnen verschillende standpunten worden ingenomen. Als vooral ernstige darmschade door coccidiose aanleiding zou geven tot necrotische enteritis, dan kunnen vaccinstammen beschermend werken door het tegengaan van darmletsels door veldstammen van *Eimeria* (Williams *et al.*, 2003). Het is echter ook mogelijk dat de vaccinatie tegen coccidiose het ontstaan van necrotische enteritis onrechtstreeks in de hand werkt gezien een vaccinatie in de meeste gevallen betekent dat geen coccidiostatica, waarvan sommige (ionoforen) antibacterieel werken tegen *Clostridium*, worden toegevoegd aan het voeder. Een andere mogelijkheid is dat de vaccinstammen een lichte darmschade induceren die in bepaalde gevallen eveneens predisponerend zou werken voor necrotische enteritis (Williams, 2002). Door de auteurs van dit overzicht werd een necrotische enteritis-model op punt gesteld dat vaccinatie met een tienvoudige dosis coccidiosevaccin gebruikt om een lichte darmschade te induceren. Een tienvoudige dosis coccidiosevaccin of *C. perfringens*-inoculatie alleen geeft geen darmschade, maar de combinatie induceert bij ongeveer de helft van de dieren necrose in de dunne darm. Gevaccineerde kippen die geen coccidiostatica kregen, bleken in een studie van Waldenstedt *et al.* (1999) grotere aantallen *C. perfringens*-bacteriën in de darm te hebben dan dieren die coccidiostatica kregen. In een studie van Ernik en Bedrnik (2001) werden 6 opeenvolgende tomen gevolgd. Tomen 1, 2, 5 en 6 kregen coccidiostatica in het voer en tomen 3 en 4 kregen een verzwakt coccidiosevaccin toegediend. Vanaf het moment dat het coccidiostaticum werd vervangen door het vaccin (toom 3) bleek necrotische enteritis voor te komen, die terug verdween na de introductie van coccidiostatica in het voer (toom 5). Het is niet echt duidelijk of de effecten werden veroorzaakt door het weglaten van de coccidiostatica, de inductie van laesies door de vaccinstam of door een doorbraak van een veldinfectie in de gevaccineerde groepen.

Voedersamenstelling

De samenstelling van het dieet beïnvloedt in sterke mate het voorkomen van necrotische enteritis bij vleeskippen, en een juiste formulering van de voedersamenstelling is van cruciaal belang ter preventie van necrotische enteritis. Voeders gebaseerd op maïs als energiebron verminderen het voorkomen en de ernst van necrotische enteritis; dit in tegenstelling tot voeders rijk aan tarwe, rogge, gerst en haver (Branton *et al.*, 1987; Kaldhusdal en Hofshagen, 1992; Riddell en Kong, 1992; Kocher, 2003). Een grote epidemiologische studie in Noorwegen toonde aan dat de verhouding van tarwe en gerst tot maïs positief gecorreleerd was met de incidentie van necrotische enteritis (Kaldhusdal en Skjerve, 1996). Inoculaties van *C. perfringens* zorgden voor een hoge mortaliteit bij dieren die voeder kregen gebaseerd op tarwe, rogge of gerst in tegenstelling tot bij dieren die maïsvoer kregen (Branton *et al.*, 1987; Riddell en Kong, 1992). Gerst, tarwe, rogge en haver bevatten hoge concentraties van onverteerbare, wateroplosbare, niet-zetmeel polysacchariden, waarvan geweten is dat ze de intestinale viscositeit verhogen, de passagesnelheid vertragen en de verteerbaarheid van nutriënten tegengaan (Annison en Choct, 1991; Choct *et al.*, 1996). Er werd reeds aangetoond dat dit leidt tot een drastische stijging in het aantal anaërobe bacteriën in de darm (Hubener *et al.*, 2002; Kocher, 2003). In niet-maïsvoeders kunnen enzymen, zoals xylanasen, worden gebruikt om niet-zetmeel polysacchariden af te breken en dus de verteerbaarheid te verbeteren en de viscositeit van de darminhoud te verlagen. Dit gaat gepaard met een sterke daling van het aantal anaërobe bacteriën in de darm, inclusief van *C. perfringens* (Bedford en Classen, 1992; Riddell en Kong, 1992; Choct *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2003). Andere mogelijke verklaringen voor de verschillen in de inductie van necrotische enteritis bij dieren met een dieet rijk aan maïs ten opzichte van andere voeders zijn de vaststelling dat de pathogeniciteit van *Eimeria* hoger blijkt te zijn bij dieren die niet-maïsvoeders krijgen (Williams, 1992) en de vaststelling dat *C. perfringens* beter groeit in extracten van tarwe en gerst dan in extracten van maïs (Annett *et al.*, 2002). Ook het dierlijke eiwit- en vetgehalte in voer zou een correlatie vertonen met het voorkomen van necrotische enteritis bij vleeskippen (Knarreborg *et al.*, 2002; Kocher, 2003). Tenslotte dient nog vermeld te worden dat de vorm van het voer (meel, pellets) ook een rol kan spelen, maar dit is nog niet in detail onderzocht (Branton *et al.*, 1987; Engberg *et al.*, 2002).

Andere middelen

Zoals in verschillende studies reeds werd aangetoond, blijken competitieve exclusieproducten het voorkomen van necrotische enteritis en de kolonisatiegraad van *C. perfringens* in de darm te verlagen (Elwinger *et al.*, 1992; Hofacre *et al.*, 1998; Craven *et al.*, 1999; Kaldhusdal *et al.*, 2001), maar toch worden deze producten weinig gebruikt in de praktijk. Studies betreffende het gebruik van pre- en probiotica ter preventie of bestrijding van necrotische enteritis bij pluimvee zijn schaars. Hofacre *et al.* (1998) toonden aan dat een commercieel probiotisch preparaat de laesiescore van necrotische enteritis verlaagde, maar de bescherming was veel minder dan bij dieren die een competitief exclusieproduct hadden gekregen. In een ander experiment bleek de mortaliteit door necrotische enteritis te verlagen van 60 naar 30% na de orale inoculatie van lactobacillen op dag 1. Het toevoegen van manno-oligosacchariden en fructo-oligosacchariden bleek geen effect te hebben op de mortaliteit, het gewicht en de voederconversie in een necrotisch enteritismodel (Hofacre *et al.*, 2003).

HUMANE INFECTIES: EEN ONDERSCHAT PROBLEEM?

C. perfringens is de oorzaak van verschillende aandoeningen bij de mens. Het kan gasgangreen veroorzaken wanneer de kiem in de spieren terechtkomt via een diepe wonde en het kan spijsverteringsproblemen veroorzaken via de opname van besmet voedsel. Er zijn twee verschillende voedselgeassocieerde ziekten: type A-diarree en type C necrotische enteritis. Daarnaast wordt *C. perfringens* ook geassocieerd met antibiotica geassocieerde diarree (AAD; antibiotic-associated diarrhea). Al deze aandoeningen ontstaan op verschillende manieren.

Gasgangreen

Gasgangreen is niet geassocieerd met de opname van *C. perfringens* vanuit de voedselketen. Het gaat om een acute en levensbedreigende infectie die gepaard gaat met koorts, hevige pijnen, lokale oedeemvorming, sterke myonecrose en de accumulatie van gas op de plaats van infectie (Hoover en Siefert, 2000). Gasgangreen is meestal geassocieerd met traumatische of chirurgische wonden, na de introductie van *C. perfringens* diep in het weefsel. In deze anaërobe omgeving kan *C. perfringens* snel groeien en spiercellen beschadigen, zelfs binnen enkele uren. Zoals hoger beschreven kan de infiltratie van witte bloedcellen naar het weefsel worden geblokkeerd en de zuurstofvoorziening naar de weefsels nog verder worden geblokkeerd door vasculaire occlusie (Flores-Diaz en

Alape-Giron, 2003). Gasgangreen kan eveneens optreden zonder extern aangebrachte schade en is dan geassocieerd met bijvoorbeeld diabetes mellitus of met onderliggende gastro-intestinale aandoeningen. Als de infectie niet snel behandeld wordt of indien niet snel overgegaan wordt tot bijvoorbeeld de amputatie van de betrokken weefsels, zal gasgangreen resulteren in hypotensie, systemische toxemie, multi-orgaan falen en de dood (Yildiz *et al.*, 2006). Gasgangreen kan in sommige gevallen ook worden veroorzaakt door andere clostridia. Gasgangreen komt voor bij alle zoogdieren maar is geen zoönose. De aandoening wordt hier vermeld gezien de pathogenese ervan de basis is van heel wat onderzoek naar de virulentiefactoren en toxinen van *C. perfringens*.

Necrotische enteritis

Necrotische enteritis komt bij de mens slechts zeer zelden voor en dit in zeer specifieke omstandigheden, namelijk bij chronisch ondervoede personen die abrupt hun eiwitopname verhogen. Deze pathologie wordt veroorzaakt door *C. perfringens* type C. De symptomen zijn acute buikpijn en diarree, gepaard gaand met necrotische inflammatie van de dunne darmwand. De aandoening is dikwijls fataal en verloopt dusdanig snel dat zelfs met een behandeling de mortaliteit ongeveer 20% bedraagt (Brynestad en Granum, 2002). De aandoening werd voor het eerst beschreven in de jaren '40 in Duitsland bij chronisch ondervoede personen die grote hoeveelheden onvoldoende gekookt vlees hadden gegeten. Het syndroom werd 'Darmbrand' genoemd en verdween spontaan nadat de levensstandaard verhoogde na de wereldoorlog. Het meest bekende voorbeeld is het voorkomen van necrotische enteritis ('pigbel') in Papoea Nieuw-Guinea vanaf de jaren '60, waar het een vrij algemeen voorkomende aandoening was (Murrell en Walker, 1991). Dit had te maken met traditionele feesten, waarbij veel varkensvlees werd gegeten met zoete aardappelen, die trypsine-inhibitoren bevatten. Uiterst zelden kan de aandoening ook voorkomen bij geïsoleerde gevallen, meestal bij diabetici (Petrillo *et al.*, 2000; Gui *et al.*, 2002). Het beta-toxine, verantwoordelijk voor humane necrotische enteritis, is gevoelig voor pancreatrypsine, dus een normaal dieet zorgt voor de inactivatie van het toxine. Recentelijk werden bij de mens enkele gevallen van fatale necrotiserende enterocolitis geassocieerd met *C. perfringens* type A vastgesteld (Sobel *et al.*, 2005). Blijkbaar is het in uitzonderlijke gevallen dus ook mogelijk dat darmnecrose bij mensen veroorzaakt wordt door *C. perfringens*, onafhankelijk van de activiteit van het betatoxine.

Type A-voedselintoxicaties

Type A-voedselintoxicaties worden meestal gekenmerkt door relatief milde waterige diarree. Ze worden veroorzaakt door *C. perfringens* type A-stammen die enterotoxine produceren. De meeste gevallen van *C. perfringens* voedselgerelateerde uitbraken komen voor in instellingen (scholen, rusthuizen, ...) die grote hoeveelheden voedsel bereiden geruime tijd alvorens het te serveren. *Clostridium perfringens* kan zich vermenigvuldigen in vlees bij temperaturen van ongeveer 13 tot 50°C, uiteraard afhankelijk van de matrix (Juneja *et al.*, 2006). Wanneer het voedsel wordt verhit, overleeft de kiem door sporenvorming. Wanneer het dan te traag afkoelt of bewaard wordt bij te hoge temperatuur, dan stijgt het aantal bacteriën zeer snel. In de meeste gevallen gaat het om eiwitrijk voedsel, in het bijzonder vlees en vleesproducten. Wanneer het voedsel bij het opdienen niet of niet genoeg opnieuw verhit werd, komen deze levende kiemen (die nog kunnen sporuleren) in de darm terecht. Ze sporuleren en dit gaat gepaard met massale enterotoxineproductie. Zes tot 24 uur na de consumptie van het voedsel starten de symptomen met acute darmkrampen en diarree. Meestal is de ziekte zelflimiterend en kortstondig, maar bij baby's en ouderlingen kan de aandoening ernstig zijn door dehydratatie (Brynstad en Granum, 2002). Er zijn aanwijzingen dat voedselbesmetting door *C. perfringens* type A één van de meest voorkomende voedselgeassocieerde ziekten is in geïndustrialiseerde landen. Het rapport 'Trends and Sources of zoonotic agents in animals, feedingstuffs, food and man in the EU and Norway' (2005) vermeldt 18 uitbraken veroorzaakt door *C. perfringens*, resulterend in 600 besmette personen, 17 hospitalisaties en 2 doden. Door de relatief korte duur van de symptomen komen de meeste besmette mensen echter niet in contact met dokters of ziekenhuizen. Voorts is er geen meldingsplicht voor *C. perfringens*-geïnduceerde voedselintoxicatie. Daardoor wordt het totaal aantal besmette personen zwaar onderschat. Schattingen van het aantal gevallen van darmproblemen geïnduceerd door bacteriële pathogenen in Engeland en Wales tonen dat het aantal besmettingen door *C. perfringens* waarschijnlijk zeer hoog is. In 2000 zouden er 84 081 gevallen geweest zijn, met 5240 hospitalisatiedagen en 89 doden tot gevolg (Adak *et al.*, 2002). In Australië bleek 14% van de voedselgerelateerde ziekte-uitbraken tussen 1995 en 2000 veroorzaakt te zijn door *C. perfringens* (Dalton *et al.*, 2004).

Antibioticageassocieerde diarree

Tenslotte dient nog vermeld te worden dat enterotoxigene *C. perfringens*-type A-stammen eveneens verondersteld worden de oorzaak te zijn van gevallen van antibiotica-

geassocieerde diarree (voornamelijk met cefalosporinen, clindamycine, breedspectrumpenicillinen en amoxicilline/clavulaanzuur) (Beaugerie en Petit, 2004). *C. difficile* wordt beschouwd als de belangrijkste oorzaak van antibioticageassocieerde diarree met 10% van de gevallen. *Klebsiella oxytoca* is eveneens een mogelijke oorzaak. Dit betekent dus dat in de meeste gevallen de eigenlijke etiologie onbekend blijft. In enkele studies werden in *C. difficile* negatieve fecesstalen van patiënten met antibioticageassocieerde diarree enterotoxinepositieve *C. perfringens* gedetecteerd (Borriello *et al.*, 1981; Samuel *et al.*, 1991). Hoewel de isolatie van de bacterie uit feces niet direct een causaal verband aantoont, zijn enterotoxigene *C. perfringens* er dus mogelijk bij betrokken.

REFERENTIES

- Adak G.K., Long S.M., O'Brien S.J. (2002). Trends in indigenous foodborne diseases and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut* 51, 832-841.
- Al-Sheikly F., Al-Saieg A. (1979). Role of coccidia in the occurrence of necrotic enteritis of chickens. *Avian Diseases* 24, 324-333.
- Al-Sheikly F., Truscott R.B. (1976a). The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of broth cultures of *Clostridium perfringens* into the duodenum. *Avian Diseases* 21, 230-240.
- Al-Sheikly F., Truscott R.B. (1976b). The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of crude toxins of *Clostridium perfringens* into the duodenum. *Avian Diseases* 21, 241-255.
- Al-Sheikly F., Truscott R.B. (1976c). The interaction of *Clostridium perfringens* and its toxins in the production of necrotic enteritis of chickens. *Avian Diseases* 21, 256-263.
- Annett C.B., Viste J.R., Chirino-Trejo M., Classen H.L., Middleton D.M., Simko E. (2002). Necrotic enteritis: effect of barley, wheat and corn diets on proliferation of *Clostridium perfringens* type A. *Avian Pathology* 31, 599-602.
- Annison G., Choct M. (1991). Anti-nutritive activities of cereal non-starch polysaccharides in broiler diets and strategies minimizing their effects. *World's Poultry Science Journal* 47, 232-242.
- Bacciarini L.N., Boerlin P., Straub R., Frey J., Grone A. (2003). Immunohistochemical localization of *Clostridium perfringens* beta-2 toxin in the gastrointestinal tract of horses. *Veterinary Pathology* 40, 376-381.
- Beaugerie L., Petit J.C. (2004). Microbial-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhea. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* 18, 337-352.
- Bedford M.R., Classen H.L. (1992). Reduction of intestinal viscosity through manipulation of dietary rye and pentosanase concentration is effected through changes in the carbohydrate composition of the intestinal aqueous phase and results in improved growth rate and food conversion efficiency of broiler chicks. *Journal of Nutrition* 122, 560-569.
- Borriello S.P., Honour P. (1981). Simplified procedure for the routine isolation of *Clostridium difficile* from faeces. *Journal of Clinical Pathology* 34, 1124-1127.

- Boyd M.G., Logan M.A., Tytell A.A. (1948). The growth requirements of *Clostridium perfringens* (welchii) BP6K. *Journal of Biological Chemistry* 174, 1013-1025.
- Branton S.L., Reece F.N., Hagler W.M.Jr. (1987). Influence of a wheat diet on mortality of broiler chickens associated with necrotic enteritis. *Poultry Science*, 66, 1326-1230.
- Broussard C.T., Hofacre C.L., Page R.K., Fletcher O.J. (1986). Necrotic enteritis in cage-reared commercial layer pullets. *Avian Diseases* 30, 617-619.
- Bryant A.E., Stevens D.L. (1996). Phospholipase C and perfringolysin O from *Clostridium perfringens* upregulate endothelial cell-leukocyte adherence molecule 1 and intercellular leukocyte adherence molecule 1 expression and induce interleukin 8 synthesis in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Infection and Immunity* 64, 358-362.
- Bryant A.E., Chen R.Y., Nagata Y., Wang Y., Lee C.H., Finegold S., Guth P.H., Stevens D.L. (2000). Clostridial gas gangrene. II. Phospholipase C-induced activation of platelet gpIIb/IIIa mediates vascular occlusion and myonecrosis in *Clostridium perfringens* gas gangrene. *The Journal of Infectious Diseases* 182, 808-815.
- Brynstad S., Granum P.E. (2002). *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology* 74, 195-202.
- Bueschel D.M., Jost B.H., Billington S.J., Trinh H.T., Songer J.G. (2003). Prevalence of cpb2, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Veterinary Microbiology* 94, 121-129.
- Bunting M., Lorant D.E., Bryant A.E., Zimmerman G.A., McIntyre T.M., Stevens D.L., Prescott S.M. (1997). Alpha-toxin from *Clostridium perfringens* induces proinflammatory changes in endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation* 100, 565-574.
- Canard B., Cole S. (1989). Genome organization of the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 6676-6680.
- Choct M., Hughes R.J., Bedford M.R. (1999). Effects of a xylanase on individual bird variation, starch digestion throughout the intestine, and ileal and caecal volatile fatty acid production in chickens fed wheat. *British Poultry Science* 40, 419-422.
- Choct M., Hughes R.J., Wang J., Bedford M.R., Morgan A.J., Annison G. (1996). Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. *British Poultry Science* 37, 609-621.
- Craven S.E., Cox N.A., Bailey J.S., Cosby D.E. (2003). Incidence and tracking of *Clostridium perfringens* through an integrated broiler chicken operation. *Avian Diseases* 47, 707-711.
- Craven S.E., Cox N.A., Stern N.J., Mauldin J.M. (2001b). Prevalence of *Clostridium perfringens* in commercial broiler hatcheries. *Avian Diseases* 45, 1050-1053.
- Craven S.E., Stern N.J., Bailey J.S., Cox N.A. (2001a). Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during production and processing. *Avian Diseases* 45, 887-896.
- Craven S.E., Stern N.J., Cox N.A., Bailey J.S., Berrang M. (1999). Cecal carriage of *Clostridium perfringens* in broiler chickens given mucosal starter culture. *Avian Diseases* 43, 484-490.
- Dalton C.B., Gregory J., Kirk M.D., Stafford R.J., Givney R., Kraa E., Gould D. (2004). Foodborne disease outbreaks in Australia, 1995 to 2000. *Communicable Diseases Intelligence* 28, 211-224.
- Davies R.H., Wray C. (1996). Seasonal variations in the isolation of *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* from environmental samples. *Journal of Veterinary Medicine. Series B*, 43, 119-127.
- De La Rosa C., Hogue D.E., Thonney M.L. (1997). Vaccination schedules to raise antibody concentrations against -toxin of *Clostridium perfringens* in ewes and their triplet lambs. *Journal of Animal Science* 75, 2328-2334.
- Desmarais T.R., Solo-Gabriele H.M., Palmer C.J. (2002). Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1165-1172.
- Ellemor D.M., Baird R.N., Awad M.M., Boyd R.L., Rood J.I., Emmins J.J. (1999). Use of genetically manipulated strains of *Clostridium perfringens* reveals that both alpha-toxin and theta-toxin are required for vascular leukostasis to occur in experimental gas gangrene. *Infection and Immunity* 67, 4902-4907.
- Elwinger K., Schneitz C., Berndtson E., Fossum O., Teglof B., Engstrom B. (1992). Factors affecting the incidence of necrotic enteritis, caecal carriage of *Clostridium perfringens* and bird performance in broiler chicks. *Acta Veterinaria Scandinavica* 33, 369-378.
- Engberg R.M., Hedemann M.S., Jensen B.B. (2002). The influence of grinding and pelleting of feed on the microbial composition and activity in the digestive tract of broiler chickens. *British Poultry Science* 44, 569-579.
- Ernák F., Bedrník P. (2001). Controlling coccidiosis in broiler growing. *Poultry International* 40, 36-42.
- Fisher D.J., Miyamoto K., Harrison B., Akimoto S., Sarker M.R., McClane B.A. (2005). Association of beta2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. *Molecular Microbiology* 56, 747-762.
- Flores-Diaz M., Alape-Giron A. (2003). Role of *Clostridium perfringens* phospholipase C in the pathogenesis of gas gangrene. *Toxicon* 42, 979-986.
- Flores-Diaz M., Thelestam M., Clark G.C., Titball R.W., Alape-Girón A. (2004). Effect of *Clostridium perfringens* phospholipase C in mammalian cells. *Anaerobe* 10, 115-123.
- Gadzinski P., Julian R.J. (1992). Necrotic enteritis in turkeys. *Avian Diseases* 36, 792-798.
- Gibert M., Jolivet-Rebaud C., Popoff M.R. (1997). Beta-2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene* 203, 65-73.
- Gibert M., Petit L., Raffestin S., Okabe A., Popoff M.R. (2000). *Clostridium perfringens* iota-toxin requires activation of both binding and enzymatic components for cytopathic activity. *Infection and Immunity* 68, 3848-3853.
- Gholamiandehkordi A.R., Ducatelle R., Heyndrickx M., Haesebrouck F., Van Immerseel F. (2006). Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. *Veterinary Microbiology* 113, 143-152.
- Gui L., Subramony C., Fratkin J., Hughson M.D. (2002). Fatal enteritis necroticans (pigbel) in a diabetic adult. *Modern Pathology* 15, 66-70.

- Heier B.T., Løvland A., Soleim K.B., Kaldhusdal M., Jarp J. (2001). A field study of naturally occurring specific antibodies against *Clostridium perfringens* alpha toxin in Norwegian broiler flocks. *Avian Diseases* 45, 724-732.
- Helmholtz C.F., Bryant E.S. (1971). The pathology of necrotic enteritis in domestic fowl. *Avian Diseases* 15, 775-780.
- Herholz C., Miserez R., Nicolet J., Frey J., Popoff M., Gilbert M., Gerber H., Straub R. (1999). Prevalence of beta2-toxicogenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 358-361.
- Hofacre C.L., Beacorn T., Collett S., Mathis G. (2003). Using competitive exclusion, mannan-oligosaccharide and other intestinal products to control necrotic enteritis. *Journal of Applied Poultry Research* 12, 60-64.
- Hofacre C.L., Froyman R., Gautrias B., George B., Goodwin M.A., Brown J. (1998). Use of Aviguard and other intestinal bioproducts in experimental *Clostridium perfringens*-associated necrotizing enteritis in broiler chickens. *Avian Diseases* 42, 579-584.
- Hofshagen M., Kaldhusdal M. (1992). Barley inclusion and avoparcin supplementation in broiler diets. Effect on small intestinal bacterial flora and performance. *Poultry Science* 71, 959-969.
- Hoover T.J., Siefert J.A. (2000). Soft tissue complications of orthopedic emergencies. *Emergency Medicine Clinics of North America* 18, 115-139.
- Hubener K., Vahlen W., Simon O. (2002). Bacterial responses to different dietary cereal types and xylanase supplementation in the intestine of broiler chicken. *Archives of Animal Nutrition* 56, 167-187.
- Jackson M.E., Anderson D.M., Hsiao H.Y., Mathis G.F., Fodge D.W. (2003). Beneficial effect of α -mannanase feed enzyme on performance of chicks challenged with *Eimeria* sp. and *Clostridium perfringens*. *Avian Diseases* 47, 759-763.
- Jost B.H., Billington S.J., Trinh H.T., Bueschel D.M., Songer J.G. (2005). Atypical cpb2 genes, encoding beta2-toxin in *Clostridium perfringens* isolates of nonporcine origin. *Infection and Immunity* 73, 652-656.
- Jost B.H., Billington S.J., Trinh H.T., Songer J.G. (2006). Association of genes encoding beta2 toxin and a collagen binding protein in *Clostridium perfringens* isolates of porcine origin. *Veterinary Microbiology, in press*.
- Juneja V.K., Huang L., Thippareddi, H.H. (2006). Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* in cooked cured pork. *International Journal of Food Microbiology* 110, 85-92.
- Kaldhusdal M., Schneitz C., Hofshagen M., Skjerve E. (2001). Reduced incidence of *Clostridium perfringens*-associated lesions and improved performance in broiler chickens treated with normal intestinal bacteria from adult fowl. *Avian Diseases* 45, 149-156.
- Kaldhusdal M., Hofshagen M. (1992). Barley inclusion and avoparcin supplementation in broiler diets. 2. Clinical, pathological, and bacteriological findings in a mild form of necrotic enteritis. *Poultry Science* 71, 1145-1153.
- Kaldhusdal M., Skjerve E. (1996). Association between cereal contents in the diet and the incidence of necrotic enteritis in broiler chickens in Norway. *Preventive Veterinary Medicine* 28, 1-16.
- Kent C., Evers A., Haun S.S.L. (1986). Diacylglycerol metabolism in phospholipase C-treated mammalian cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 250, 519-525.
- Knarreborg A., Simon M.A., Engberg R.M., Jensen B.B., Tannock G.W. (2002). Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5918-5924.
- Kocher A. (2003). Nutritional manipulation of necrotic enteritis outbreak in broilers. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia* 14, 111-116.
- Krug E.L., Kent C. (1984). Phospholipase C from *Clostridium perfringens*: preparation and characterization of homogenous enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 231, 400-410.
- Lawrence G.W., Lehmann D., Anian G., Coakley C.A., Saleu G., Barker M.J., Davis M.W. (1990). Impact of active immunisation against enteritis necroticans in Papua New Guinea. *Lancet* 336, 1165-1167.
- Long J.R., Petit J.R., Barnum D.A. (1974). Necrotic enteritis in broiler chickens. II. Pathology and proposed pathogenesis. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 38, 467-474.
- Løvland A., Kaldhusdal M. (1999). Liver lesions seen at slaughter as an indicator of necrotic enteritis in broiler flocks. *FEMS Microbiology and Medical Microbiology* 24, 345-351.
- Løvland A., Kaldhusdal M., Redhead K., Skjerve E., Lillehaug A. (2004). Maternal vaccination against subclinical necrotic enteritis in broilers. *Avian Pathology* 33, 81-90.
- Miwa N., Nishina T., Kubo S., Honda H. (1997). Most probable numbers of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of domestic livestock detected by nested PCR. *Journal of Veterinary Medical Science* 59, 557-560.
- Miyata S., Matsushita O., Minami J., Katayama S., Shimamoto S., Okabe A. (2001). Cleavage of a C-terminal peptide is essential for heptamerization of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the synaptosomal membrane. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 13778-13783.
- Murell T.G., Walker P.D. (1991). The pigbel story of Papua New Guinea. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85, 119-122.
- Nagahama M., Michiue K., Sakurai J. (1996). Membrane-damaging action of *Clostridium perfringens* alpha-toxin on phospholipid liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1280, 120-126.
- Nagahama M., Hayashi S., Morimitsu S., Sakurai J. (2003). Biological activities and pore formation of *Clostridium perfringens* beta toxin in HL 60 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 36934-36941.
- Naylor C.E., Eaton J.T., Howells A., Justin N., Moss D.S., Titball R.W., Basak A.K. (1998). Structure of the key toxin in gas gangrene. *Nature Structure Biology* 5, 738-746.
- Petit L., Gibert M., Popoff M.R. (1999). *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends in Microbiology* 7, 104-110.
- Petit L., Maier E., Gibert M., Popoff M.R., Benz R. (2001). *Clostridium perfringens* epsilon toxin induces a rapid change of cell membrane permeability to ions and forms channels in artificial lipid bilayers. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 15736-15740.
- Petit L., Gibert M., Gourch A., Bens M., Vandewalle A., Popoff M.R. (2003). *Clostridium perfringens* epsilon toxin rapidly decreases membrane barrier permeability of polarized MDCK cells. *Cellular Microbiology* 5, 155-164.
- Petrillo T.M., Beck-Sague C.M., Songer J.G., Abramowsky C., Fortenberry J.D., Meacham L., Dean A.G., Lee H., Bue-

- schel D.M., Nesheim S.R. (2000). Enteritis necroticans (pigbel) in a diabetic child. *The New England Journal of Medicine* 342, 1250-1253.
- Riddell C., Kong X. (1992). The influence of diet on necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Diseases* 36, 499-503.
- Rood J.I. (1998). Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annual Review of Microbiology* 52, 333-360.
- Samuel S.C., Hancock P., Leigh D.A. (1991). An investigation into *Clostridium perfringens* enterotoxin-associated diarrhea. *The Journal of Hospital Infection* 18, 219-230.
- Schies K., Kaszkin M., Jordan P., Seidler L., Kinzel V. (1992). Mobilization of diacylglycerol in intact HeLa cells by exogenous phospholipase C from *Clostridium perfringens* is accompanied by release of fatty acids including arachidonic acid. *Biochimica et Biophysica Acta* 1137, 82-94.
- Schoepe H., Pache C., Neubauer A., Potschka H., Schlapp T., Wieler L., Baljer G. (2001). Naturally occurring *Clostridium perfringens* nontoxic alpha-toxin variant as a potential vaccine candidate against alpha-toxin-associated diseases. *Infection and Immunity* 69, 7194-7196.
- Shane S.M., Koetting D.G., Harrington K.S. (1984). The occurrence of *Clostridium perfringens* in the intestine of chicks. *Avian Diseases* 28, 1120-1124.
- Shatursky O., Bayles R., Rogers M., Jost B.H., Songer J.G., Tweten R.K. (2000). *Clostridium perfringens* beta-toxin forms potential-dependent cation-selective channels in lipid bilayers. *Infection and Immunity* 68, 5546-5551.
- Shimizu T., Ohtani K., Hirkawa H., Oshima K., Yamashita A., Shiba T., Ogasawara N., Hattori M., Hukara S., Hayashi H. (2002). Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 996-1001.
- Smedley J.G. 3rd, Fisher D.J., Sayeed S., Chakrabati G., McLane B.A. (2004). The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 152, 183-204.
- Sobel J., Mixter C.G., Kolhe P., Gupta A., Guarner J., Zaki S., Hoffman N.A., Songer J.G., Fremont-Smith M., Fisher M., Killgore G., Britz P.H., MacDonald C. (2005). Necrotizing enterocolitis associated with *Clostridium perfringens* type A in previously healthy north American adults. *Journal of the American College of Surgeons* 201, 48-56.
- Songer J.G. (1996). Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews* 9, 216-234.
- Springer S., Selbitz H.J. (1999). The control of necrotic enteritis in sucking piglets by means of a *Clostridium perfringens* toxoid vaccine. *FEMS Microbiology and Medical Immunology* 24, 333-336.
- Steinthorsdottir V., Halldórsson H., Andrésson O.S. (2000). *Clostridium perfringens* beta-toxin forms multimeric transmembrane pores in human endothelial cells. *Microbial Pathogenesis* 28, 45-50.
- Stevens D.L., Bryant A.E. (2000). The role of clostridial toxins in the pathogenesis of gas gangrene. *Clinical Infectious Diseases* 35, S93-100.
- Tamai E., Ishida T., Miyata S., Matsushita O., Suda H., Kobayashi S., Sonobe H., Okabe A. (2003). Accumulation of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the mouse kidney and its possible biological significance. *Infection and Immunity* 71, 5371-5375.
- Thakur K., Grover P.S. (2001). Bacterial indices of drinking water from natural sources. *Indian Journal of Pathology & Microbiology* 44, 131-134.
- Titball R.W., Naylor C.E., Basak A.K. (1999). The *Clostridium perfringens* -toxin. *Anaerobe* 5, 51-64.
- Troxel T.R., Burke G.L., Wallace W.T., Keaton L.W., McPeake S.R., Smith D., Nicholson I. (1997). Clostridial vaccination efficacy on stimulating and maintaining an immune response in beef cows and calves. *Journal of Animal Science* 75, 19-25.
- Uzal F.A., Kelly W.R. (1998). Protection of goats against experimental enterotoxaemia by vaccination with *Clostridium perfringens* type D epsilon toxoid. *The Veterinary Record* 142, 722-725.
- Van Immerseel F., De Buck J., Pasmans F., Huyghebaert G., Haesebrouck F., Ducatelle R. (2004). *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathology* 33, 537-549.
- Waldenstedt L., Elwinger K., Thebo P., Uggla A. (1999). Effect of betaine on broiler performance during an experimental coccidial infection. *Poultry Science* 78, 182-189.
- Waters M., Savoie A., Garmory H.S., Bueschel D., Popoff M.R., Songer J.G., Titball R.W., McClane B.A., Sarker M.R. (2003). Genotyping and phenotyping of beta-2 toxigenic *Clostridium perfringens* faecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 3584-3591.
- Wijewanta E.A., Seneviratna P. (1971). Bacteriological studies of fatal *Clostridium perfringens* type A infection in chickens. *Avian Diseases* 15, 654-661.
- Williams R.B. (1992). Differences between the anticoccidial potencies of monensin in maize-based or wheat-based chicken diets. *Veterinary Research Communications* 16, 147-152.
- Williams R.B. (2002). Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to success. *Avian Pathology* 31, 317-353.
- Williams R.B., Marshall R.N., La Ragione R.M., Catchpole J. (2003). A new method for the experimental production of necrotic enteritis and its use for studies on the relationships between necrotic enteritis, coccidiosis and anticoccidial vaccination of chickens. *Parasitology Research* 90, 19-26.
- Williams, R.B. (2004). Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathology* 34, 159-180.
- Yildiz T., Gundes S., Willke A., Solak M., Toker M. (2006). Spontaneous, nontraumatic gasgangrene due to *Clostridium perfringens*. *International Journal of Infectious Diseases* 10, 83-85.