

## Toxinas de *Clostridium perfringens*

W. E. MORRIS\*, M. E. FERNÁNDEZ-MIYAKAWA

Instituto de Patobiología, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Los Reseros y Las Cabañas, (1712) Castelar, Pcia. Buenos Aires, Argentina

\*Correspondencia. E-mail: wmorris@cnia.inta.gov.ar

### RESUMEN

*Clostridium perfringens* es un bacilo grampositivo anaerobio con capacidad de formar esporas. Es uno de los patógenos bacterianos con mayor distribución en el medio ambiente, ya que puede ser aislado de muestras de suelo y de agua y además forma parte de la microbiota intestinal de animales y humanos. Sin embargo, en ciertas ocasiones puede actuar como patógeno oportunista y causar enfermedades como la gangrena gaseosa, la enterotoxemia del ovino y del caprino y la disentería del cordero, entre otras. En humanos, está asociado a enfermedades como la intoxicación por alimentos, la enterocolitis necrotizante en niños y la enteritis necrótica o *pigbel* de las tribus de Papúa-Nueva Guinea. El renovado interés que existe actualmente en el estudio de *C. perfringens* como patógeno veterinario y humano, junto con el avance de la biología molecular, han hecho posible que la ciencia tenga hoy un conocimiento más profundo sobre la biología y la patogenia de esta bacteria. En esta revisión bibliográfica se discuten y actualizan los principales aspectos de la patogenia intestinal de *C. perfringens* teniendo en cuenta las toxinas con mayor importancia médica descritas hasta el presente.

**Palabras claves:** *Clostridium perfringens*, toxinas, enterotoxemia

### ABSTRACT

**Toxins of *Clostridium perfringens*.** *Clostridium perfringens* is an anaerobic gram-positive spore-forming bacillus. It is one of the pathogens with larger distribution in the environment; it can be isolated from soil and water samples, which also belongs to the intestinal flora of animals and humans. However, on some occasions it can act as an opportunistic pathogen, causing diseases such as gas gangrene, enterotoxemia in sheep and goats and lamb dysentery, among others. In human beings, it is associated to diseases such as food poisoning, necrotic enterocolitis of the infant and necrotic enteritis or *pigbel* in Papua-New Guinea tribes. The renewed interest existing nowadays in the study of *C. perfringens* as a veterinarian and human pathogen, together with the advance of molecular biology, had enabled science to have deeper knowledge of the biology and pathology of these bacteria. In this review, we discuss and update the principal aspects of *C. perfringens* intestinal pathology, in terms of the toxins with major medical relevance at present.

**Key words:** *Clostridium perfringens*, toxins, enterotoxemia

### INTRODUCCIÓN

*Clostridium perfringens* es un bacilo grampositivo anaerobio con capacidad de formar esporas (124). Perteneció al género *Clostridium*, el cual está compuesto por aproximadamente 150 especies, filogenéticamente heterogéneas, que no representan un taxón coherente (114). Algunos clostridios son patógenos y causan enfermedades, principalmente por efecto de potentes toxinas extracelulares. Entre las especies patógenas más conocidas se encuentran *Clostridium botulinum*, *C. tetani* y *C. difficile* (110).

En la última década, el uso generalizado de la PCR y el secuenciamiento genómico han producido importantes avances en el aislamiento, la identificación y la caracterización de distintas bacterias, incluyendo a los clostridios (131). Además, la posible utilización de estos

microorganismos como armas biológicas en acciones de bioterrorismo ha incrementado el interés de muchos gobiernos en su estudio (93, 107). Tal es el caso de algunas especies de *Clostridium* como *C. botulinum*, considerado clase A por el *Centers for Disease Control* de EE. UU. (CDC), y de la toxina épsilon de *C. perfringens* tipos B y D, que es considerada clase B por el citado organismo (61, 93, 108).

*C. perfringens*, previamente denominado *Clostridium welchii* (74), es uno de los miembros del género *Clostridium* que ha sido objeto de renovado interés en el campo científico por sus características biológicas y su importancia biomédica. *C. perfringens* es uno de los patógenos bacterianos más ampliamente distribuidos en el medio ambiente (128). Puede ser aislado de muestras de suelo y de agua y forma parte de la flora intestinal de animales y humanos (81). Sin embargo, *C. perfringens*

puede en ciertas ocasiones comportarse como un patógeno oportunista. En la producción ganadera este hecho reviste gran importancia por ser el agente causal de enfermedades como la gangrena gaseosa, la enterotoxemia del ovino y del caprino, y la disentería del cordero, entre otras (11, 66, 109, 121). En humanos, por su parte, está asociado a enfermedades como la intoxicación por alimentos, la enterocolitis necrotizante en niños y la enteritis necrótica o *pigbel* de las tribus de Papúa-Nueva Guinea (63, 109).

### La bacteria

*C. perfringens* no presenta motilidad y forma esporas *in vitro* sólo en medios de cultivo especiales (91). Crece rápidamente en medios ricos en carbohidratos en los que produce, mediante la fermentación de éstos, grandes cantidades de hidrógeno y dióxido de carbono, que ayudan a mantener el ambiente anaeróbico. Sin embargo, *C. perfringens* es relativamente aerotolerante (66). Ha sido, además, la primera bacteria grampositiva de la cual fue posible obtener el mapa genómico completo (15). Este hecho fue facilitado por su relativa tolerancia al oxígeno, rápido crecimiento y, sobre todo, por su capacidad para ser manipulado genéticamente (91).

Las cepas de *C. perfringens* pueden poseer una cápsula cuya composición en carbohidratos varía entre aislamientos; esto permite su serotipificación capsular (117). Este método de clasificación fue empleado con éxito entre los años 1950 y 1980 para investigar los brotes de intoxicación por alimentos asociados a *C. perfringens* en Inglaterra (117). Sin embargo, la técnica no fue tan efectiva durante la investigación de brotes ocurridos en EE.UU. y Japón. En la actualidad, la toxinotipificación es el método más difundido de clasificación de *C. perfringens*. Este método tipifica a la bacteria en cinco tipos (A, B, C, D y E) según la producción de las toxinas alfa, beta, épsilon y iota (Tabla 1). Sin embargo, la virulencia de *C. perfringens* se debe no solo a estas cinco toxinas, sino también a un repertorio compuesto, hasta el momento, de 15 toxinas proteicas (91, 110). Dentro del resto de las toxinas no utilizadas en la clasificación, pero importantes desde el punto de vista patológico, se encuentra la enterotoxina de *C. perfringens* o CPE, responsable de diarreas en humanos y animales; la recién

temente descubierta toxina NetB, relacionada con la enteritis necrótica en aves (53); y la toxina beta-2, aparentemente asociada a ciertos cuadros de enteritis (110).

*Clostridium perfringens* es un microorganismo con alto grado de intercambio genético; esto le permite la transferencia de factores de virulencia y le otorga la capacidad de producir las diferentes toxinas como resultado de la pérdida o la ganancia de los genes específicos (15, 44). Es decir que no existen grandes diferencias entre los diferentes tipos de *C. perfringens*, a no ser el acarreo de ciertos genes de virulencia. Por otro lado, cierta evidencia indica que algunos de estos factores de virulencia, codificados en plásmidos, pueden ser transferidos horizontalmente (7, 44, 83). El movimiento genético horizontal también está facilitado por transposones (12). En definitiva, la universalidad de *C. perfringens* sumada a la independencia de los factores de virulencia denota el potencial patogénico de esta bacteria, especialmente si se tiene en cuenta que es parte de la microbiota del intestino.

### La enterotoxina

La enterotoxina de *C. perfringens* –conocida como CPE según su sigla en inglés– fue purificada y caracterizada en la década de 1970 (41, 115). Desde entonces, se ha acumulado suficiente evidencia para proponer a esta toxina como causante principal de la intoxicación por alimentos producida por *C. perfringens* tipo A, una de las enfermedades más comunes relacionadas con la ingesta de comida. En Estados Unidos, la intoxicación alimentaria por *C. perfringens* tipo A se encuentra entre la 2ª y 3ª causa de intoxicación por alimentos en humanos (103, 126). Asimismo, esta toxina se asocia con el 5-15% de las enfermedades gastrointestinales humanas distintas de las intoxicaciones alimentarias; como por ejemplo la diarrea producida por antibióticos (9). Por otro lado, la enterotoxina tiene importancia en la medicina veterinaria por ser la causa de diarreas en diversas especies animales como los porcinos, los ovinos, los bovinos, los equinos, las aves y los cánidos (21, 48, 56, 75, 80, 110, 128, 129).

Las cepas de *C. perfringens* que llevan el gen *cpe* son en su mayoría del tipo A, aunque todos los toxinotipos pueden codificarla (66). La presencia del gen *cpe* es poco común: alrededor del 5% de los aislamientos globales de *C. perfringens* tipo A son positivos para *cpe* (23). El gen *cpe* puede encontrarse tanto en el cromosoma como en un plásmido de gran tamaño (20, 22), y se cree que la ubicación de este gen podría definir el tipo de enfermedad producida. Por ejemplo, las cepas de *C. perfringens* tipo A responsables de la intoxicación por alimentos usualmente presentan este gen en el cromosoma, mientras que las cepas de *C. perfringens* tipo A causantes de diarreas asociadas a antibióticos y diarreas esporádicas suelen presentarlo en un plásmido (20, 22). Hasta el momento, no se han producido aislamientos de cepas

**Tabla 1.** Clasificación de *C. perfringens* basada en la producción de toxinas

| Toxinotipo | Toxinas |      |         |      |
|------------|---------|------|---------|------|
|            | Alfa    | Beta | Epsilon | Iota |
| A          | +       | -    | -       | -    |
| B          | +       | +    | +       | -    |
| C          | +       | +    | -       | -    |
| D          | +       | -    | +       | -    |
| E          | +       | -    | -       | +    |

que codifiquen simultáneamente el gen de la enterotoxina en forma cromosómica y plasmídica. La causa de esta diferencia en las enfermedades producidas podría deberse a que las cepas de *C. perfringens* que codifican la enterotoxina en el cromosoma presentan una mayor resistencia a las altas temperaturas durante la cocción (126) que las cepas de *C. perfringens* con el gen *cpe* presente en plásmidos (102). En este último caso, la asociación con enfermedades no relacionadas con alimentos podría deberse a la capacidad de transferencia del plásmido que contiene la secuencia codificante de la enterotoxina a diferentes cepas de *C. perfringens* presentes en el tracto intestinal (102).

La enterotoxina tiene actividad letal, citotóxica y enterotóxica. En el intestino delgado de diferentes mamíferos produce daño morfológico y fisiológico, lo cual originaría la diarrea observada en humanos y otras especies animales (25, 79). El mecanismo de acción de esta toxina se inicia con la unión a un receptor celular proteico —o a varios— (65), que podría incluir ciertas proteínas de la familia de las claudinas. Estas proteínas tienen un importante papel en la formación de la unión estrecha de las células epiteliales (33, 49, 50). Luego de esta unión, la enterotoxina se localiza en un complejo de proteínas (~90 kDa), el cual es necesario, pero no suficiente, para ejercer toxicidad (127). Este pequeño complejo proteico es el precursor de un par de complejos mayores, uno de ~155 kDa y otro de ~200 kDa que incluye a la ocludina, otra proteína de la unión estrecha, aparentemente removida desde esta ubicación (108).

Hay evidencia que indica que la formación del complejo de 155 kDa forma poros en la membrana celular, lo que llevaría a un aumento de la permeabilidad celular con la consecuente citotoxicidad (40, 54, 127). El mecanismo de muerte celular es dependiente de la concentración de toxina y de la concentración de ciertos iones extracelulares, como el calcio (17). La evidencia existente indica que la apoptosis sería el mecanismo predominante a bajas concentraciones y la necrosis a altas concentraciones (17). En ambos casos la enterotoxina produce daño histopatológico en el intestino *in vivo* (68), lo que lleva a la pérdida de electrolitos y fluidos que se observa en modelos experimentales (79, 105, 109). Sin embargo, no está claro si los cambios en la unión estrecha e incluso los procesos inflamatorios producidos por la toxina también podrían contribuir a estos cambios fisiológicos.

Estudios recientes han demostrado que el receptor para CPE se expresa en células neoplásicas, razón por la cual se investiga su posible uso en el tratamiento del cáncer (55, 69, 100, 101).

### La toxina alfa

La toxina alfa es el principal factor de virulencia de la gangrena gaseosa en humanos y animales (66) y de la enteritis necrótica de bovinos, equinos y pollos (3, 11,

58, 80, 129, 130). Todos los tipos de *C. perfringens* poseen los genes codificantes para esta toxina (*plc*); sin embargo, no todas las cepas la producen y existen grandes variaciones en las cantidades producidas (26). Esta toxina tiene actividad enzimática, tanto de fosfolipasa (fosfolipasa-C o FLC) como de esfingomielinasa (SMasa) y, además, es hemolítica y dermonecrotica (111).

El gen *plc* tiene ubicación cromosómica (116) y su expresión es estimulada por la disminución de la temperatura (64). El significado biológico de esto sería que en condiciones adversas, como las que imperan en el suelo o en el ambiente externo, la bacteria necesitaría producir más FLC, para degradar membranas y otros lípidos del ambiente y generar así fuentes de carbono y energía. Esto no sucedería a la temperatura corporal.

La estructura cristalizada de la toxina alfa de *C. perfringens* muestra que la proteína madura está organizada en dos dominios, el amino terminal, que contiene la actividad FLC, y el carboxi terminal de unión que es dependiente de calcio. Los productos de la hidrólisis son grupos polares unidos a fosfatos solubles en agua y una cola unida a un esqueleto de glicerol insoluble en agua. La estructura del fosfolípido (el grupo de la cabeza polar) y el grado de insaturación y largo de la cola tienen profunda influencia en la eficiencia con la cual éstos son hidrolizados por ciertas FLC (77). Dependiendo de la composición de los lípidos de la membrana celular, la toxina alfa puede ser hemolítica en presencia de calcio, como sucede en los eritrocitos humanos, de ratones y de ovejas. En cambio, esto no sucede en el caso de los eritrocitos de conejos o de caballos (77).

La hidrólisis de fosfolípidos de membrana resulta en la acumulación de diacilglicerol, compuesto que puede activar vías celulares que contribuyen al efecto citotóxico observado, como la vía del ácido araquidónico (77). Esta acumulación actúa como activador de la proteína-quinasa C, enzima que a su vez puede activar las fosfolipasas C y D de las células eucarióticas (31, 32, 119). Asimismo, la activación de esta vía llevaría a la producción de tromboxano A<sub>2</sub>, un potente mediador de la respuesta inflamatoria. Parecería que la toxina alfa imita la acción de la FLC intracelular en la membrana de células eucariotas (99).

*C. perfringens* tipo A produce enteritis necrótica en pollos (3, 58, 80). Durante mucho tiempo la evidencia acumulada hizo suponer firmemente que la toxina alfa producida por este tipo de *C. perfringens* era la responsable de los principales signos de la enfermedad (2, 34). Sin embargo, la búsqueda de vacunas eficaces muestra que otras toxinas o factores no descubiertos aún, además de la toxina alfa, serían necesarios para proveer protección contra la enfermedad (118). Un trabajo reciente en el cual a cepas de casos clínicos de *C. perfringens* se les suprimió el gen de la toxina alfa, parecería aportar evidencia concluyente de que la toxina alfa no es esencial en el desarrollo de la enteritis necrótica (52). Sin

embargo, un trabajo posterior (4) puso en duda el modelo animal utilizado en los experimentos de Keyburn *et al.* (52), argumentando que los animales en estudio podrían haber estado colonizados con cepas salvajes productoras de enteritis necrótica previo al ensayo.

La acción de la toxina alfa en el intestino de especies animales (con la excepción de los pollos) es poco conocida, como también lo es su acción como factor de virulencia en casos de enterotoxemia (11, 77). Existe asociación entre la toxina alfa de *C. perfringens* tipo A y la abomasitis de los terneros (90). También se considera a *C. perfringens* tipo A el agente causal de la enteritis necrotizante bovina; sin embargo, el papel que la toxina alfa juega en esta enfermedad de los bovinos es controvertido (60). La toxina alfa inoculada en asas de intestino delgado de ratas *in vivo* causó influjo de neutrófilos en la mucosa, con incrementos en la actividad de la N-acetil-beta-glucosaminidasa intraluminal y en la permeabilidad, lo que indica daño de la mucosa (82) y contracción del intestino delgado (98). En explantes intestinales de conejo incubados *in vitro* con toxina alfa se observó daño en el epitelio (47). En cerdos, ovinos y bovinos inyectados por vía endovenosa se observó enteritis, escaso daño del epitelio intestinal, diarrea transitoria, hemólisis intravascular y daño capilar (78, 79). En ovinos, la toxina alfa causó daños morfológicos con alteración del transporte de agua en el intestino (25).

Estudios recientes asocian a la toxina alfa y a cepas de *C. perfringens* tipo A no enterotoxigénico con enfermedades humanas diferentes de la gangrena gaseosa (43, 45). Entre éstas se encuentran casos fatales de enteritis necrótica (45) y el síndrome de muerte súbita del lactante (47). El hecho de que sean escasos los reportes de enfermedades humanas asociadas a esta toxina puede deberse, al menos en parte, a la alta degradabilidad de la toxina en el intestino, lo cual dificulta su detección. A esto se suma el hecho de que hasta hace poco, el método más usado para la detección era la seroneutralización en ratón (66). Con esta técnica, un resultado falso negativo puede darse por insuficiente material o material no fresco. Dado que los antisueros específicos para esta prueba no siempre están a disposición en el mercado y que esta toxina posee baja letalidad en ratones, el diagnóstico resulta aún más dificultoso (66, 123). El empleo de los ELISA de captura para la detección de toxinas clostridiales no siempre resuelve el problema mencionado, ya que la alta sensibilidad de estas técnicas puede resultar en la obtención de falsos positivos (67, 123).

### La toxina beta

La toxina beta fue originalmente purificada y parcialmente caracterizada a fines de la década de 1970 (92, 93). Trabajos posteriores determinaron que la toxina formaba poros (selectivos para cationes monovalentes) en bicapas lipídicas y en membranas de células sensibles (104), lo que aporta evidencia de que la toxina podría

funcionar como una neurotoxina y producir constricción arterial (94, 95).

Uno de los principales factores de virulencia de *C. perfringens* tipos B y C es la toxina beta, que es muy sensible a la degradación por tripsina. Los animales recién nacidos o con deficiencias nutricionales son usualmente los más susceptibles de ser infectados por estos microorganismos (11). Según estudios recientes, la toxina beta es el principal factor que contribuye a la letalidad de *C. perfringens* tipo B y C (25, 30).

*C. perfringens* tipo B es responsable de algunas enfermedades de origen intestinal en rumiantes, principalmente ovejas, aunque también se han aislado cepas de este tipo de animales clínicamente sanos (122). En ovinos, la disentería del cordero y la enteritis hemorrágica ocurren en animales de menos de 3 semanas de vida, si bien también pueden observarse en animales de mayor edad. El resultado de la infección es una enterotoxemia acompañada de enteritis, hemorragia profusa y ulceración del intestino delgado (110). También existe una asociación del tipo B con casos de enteritis hemorrágica en cabras, vacas y potrillos (110).

No se dispone de mucha información acerca de la patogénesis de las infecciones causadas por el tipo B, y no se conocen los efectos individuales o sinérgicos de las toxinas alfa, beta, épsilon u otras toxinas menores sobre los signos clínicos observados.

*C. perfringens* tipo C causa enteritis necrótica en corderos, terneros, potrillos y cerdos neonatos, aunque han sido reportados casos en perros, pollos y llamas. Los cerdos recién nacidos son comúnmente más afectados que otros animales. En los animales infectados se observa diarrea y disentería, con materia fecal sanguinolenta, y muerte. Esta bacteria también produce enterocolitis necrótica en humanos, una enfermedad potencialmente letal (46, 57). Los primeros informes de esta enfermedad surgieron a fines de la Segunda Guerra Mundial durante un brote que afectó en Alemania a personas mal nutridas. El origen de la contaminación fue atribuido a carne de conejo enlatada. La enfermedad fue nombrada *darbrand* (intestinos en llamas). En la literatura más reciente, los casos más reconocidos y estudiados de enteritis necrótica provienen de Papúa-Nueva Guinea, donde la enfermedad es conocida como *pigbel*. La ingesta de carne de cerdo obtenida en condiciones de higiene deficientes y cocida insuficientemente, consumida junto con la batata, dio origen al alto número de casos registrados. Esta costumbre tribal de ocasiones festivas, aportaba suficiente cantidad de bacterias con la carne y esto, sumado a los inhibidores de la tripsina aportados por la batata, evitaban la degradación de la toxina beta en el intestino del huésped. La introducción de una vacuna basada en toxoide beta redujo significativamente la incidencia de la enfermedad en esa zona geográfica. Además de estos pocos reportes relacionados con brotes, se han descrito varios casos esporádicos de enteri-

tis necrótica que afectaron principalmente a personas con problemas pancreáticos o intestinales (89). Una dieta pobre en proteínas y problemas en la motilidad intestinal pueden favorecer el desarrollo de la enfermedad. El principal síntoma es dolor abdominal (46), también pueden aparecer vómitos y diarrea sanguinolenta. Los casos más complicados pueden desarrollar obstrucción intestinal por necrosis del intestino delgado. La muerte puede ocurrir también por toxemia, la que en algunos casos se produce muy rápidamente (46).

### La toxina épsilon

La toxina épsilon es la toxina clostridial más potente luego de las neurotoxinas tetánica y botulínica (85, 86). Es producida y secretada como una prototoxina con un peso molecular de 32,7 kDa, que al sufrir un clivaje proteolítico específico adquiere su máxima actividad biológica (96). Esta activación puede ser catalizada por proteasas como la tripsina, la quimotripsina y una zinc-metaloproteasa producida por *C. perfringens* (70) en el tracto gastrointestinal (85). El gen de esta toxina (*etx*) está codificado en un elemento extracromosómico, un plásmido de gran tamaño (51).

La toxina épsilon es tóxica para células de la línea *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) y, en menor medida, para la línea G-402 de células de leiomioblastoma humano (84, 106). Diversos trabajos realizados con células MDCK muestran que la toxina épsilon induce hinchazón, formación de burbujas, fragmentación y lisis celular. Además, se demostró que en las células MDCK la toxina épsilon forma un complejo en la membrana citoplasmática, aunque su ingreso a la célula no es necesario para ejercer toxicidad (87, 88). En estas células, la acción citotóxica se correlaciona con la formación de un gran complejo de membrana que causa una rápida pérdida de potasio con entrada de sodio y cloruro, mientras que la concentración de calcio se incrementa; esto da como resultado una pérdida de la viabilidad celular (88). La toxina épsilon se une a microdominios de membrana resistentes a los detergentes (*lipid raft*) y se oligomeriza y forma un poro en membranas celulares tanto sinaptosomales como de células MDCK (73, 87). El poro formado en la membrana celular permitiría el pasaje de solutos hidrofílicos de hasta una masa molecular de 1 kDa. Este canal estaría constituido por una heptamerización de la toxina que, sugestivamente, coincide con otras toxinas citolíticas como la toxina alfa de *Staphylococcus aureus* (38), la aerolisina de *Aeromonas hydrophila* (14, 87) y la toxina citolítica ClyA de *Escherichia coli* (59, 125). La estructura cristalizada de la toxina muestra que forma un poro barril  $\beta$ , el cual exhibe alguna similitud estructural con la aerolisina, otra toxina formadora de poro (19).

Una baja concentración de toxina épsilon puede detener la división celular sin matar inmediatamente a las células, y causar un descenso en su número y un signifi-

cativo aumento de su volumen medio (10). La unión específica a este tipo de células se debe probablemente a la presencia de un receptor, el que sería necesario para la actividad biológica de la toxina (87). En forma reciente se demostró que la línea de células epiteliales de túbulo colector distal de riñón de ratón mpkCCDcl4 es también sensible a la acción de la toxina épsilon (18). Estas células conservan ciertas características del transporte iónico de las células epiteliales, por lo que han sido útiles para caracterizar los efectos de la toxina épsilon en la homeostasis celular. En estas células, la toxina épsilon se une principalmente a las membranas del lado apical de las células y oligomeriza sobre esta superficie, sin difundir hacia el interior de la célula. Sobre la superficie apical existen proteasas que activarían a la prototoxina épsilon.

Aunque se desconoce el receptor de esta toxina, se sabe que es una proteína de superficie anclada por glucosilfosfatidilinositol. La toxina épsilon produjo una caída de la resistencia transepitelial y del potencial eléctrico en estas células crecidas en monocapa. Esto estimuló temporariamente la absorción de sodio e indujo una corriente iónica entrante con el consecuente aumento de la concentración de calcio intracelular (24). Asimismo, la toxina ocasionó una rápida pérdida del ATP celular y activó a la proteína quinasa activada por AMP (que sensa el estado metabólico). La toxina también produjo permeabilización mitocondrial y translocación nuclear del factor inductor de apoptosis, un efector de muerte celular independiente de caspasas. Además, en las células mpkCCDcl4 la toxina épsilon indujo una necrosis caracterizada por la reducción en el tamaño del núcleo, pero sin fragmentación del ADN. Llamativamente, aunque la eliminación de los dominios ricos en colesterol de la membrana celular evitó la oligomerización de la toxina y redujo el influjo de sodio y calcio, no impidió la pérdida del ATP celular ni la muerte celular. Estos hallazgos indican que la toxina épsilon produce una rápida necrosis en estas células, y que la pérdida de ATP interviene en el proceso de muerte celular sin estar correlacionada con la permeabilización de la membrana celular y la difusión iónica causada por la toxina (24).

La principal actividad biológica de la toxina épsilon es la generación de edema (11). Esta toxina es letal y dermonecrotica, aunque no es hemolítica (66). Se ha descrito que eleva la presión sanguínea, incrementa la permeabilidad vascular e intestinal y causa daño renal y contracción del íleon en ratas (13, 35, 74, 76, 97). Es capaz de pasar la barrera hematoencefálica y acumularse en el cerebro (85). Una propiedad básica de la toxina épsilon es que incrementa la permeabilidad vascular por la alteración de las uniones estrechas entre las células endoteliales (1); esto produce daño y edema en diversos órganos, como pulmón, corazón, riñón y cerebro (11). En el cerebro, el daño neuronal y los desórdenes neurológicos están asociados con los edemas perivasculares

(por el aumento de la permeabilidad vascular) y con la posible interacción con las neuronas del hipocampo, que lleva a una excesiva liberación de glutamato (71, 72).

En ovejas y ratones se observó un aumento en la absorción de inmunoglobulinas anti-toxina diftérica cuando fueron coadministradas con la toxina épsilon, lo que llevó a suponer que esta toxina incrementaría la permeabilidad del intestino delgado y facilitaría su propia absorción y pasaje a la circulación general (6, 13). Se ha informado que la toxina épsilon altera la permeabilidad paracelular del epitelio del intestino delgado (6, 13). Esto podría explicar la mayor absorción intestinal de toxina épsilon y la acumulación de fluido en el intestino que se observó en animales de experimentación (24, 120, 121), así como en casos clínicos (28). Sin embargo, no existen estudios experimentales sobre la capacidad de absorción de la toxina en el intestino delgado y grueso de ovinos y caprinos, así como tampoco existe información comparativa sobre las diferencias de permeabilidad paracelular en el tracto intestinal. Tampoco se cuenta con estudios funcionales precisos acerca de la actividad de la toxina épsilon sobre epitelios intestinales, y considerando que en condiciones patológicas *C. perfringens* puede ser aislado de diferentes secciones del tracto intestinal (66), no se puede descartar que la toxina épsilon tenga actividad sobre este tejido.

### La toxina iota

La toxina iota de *C. perfringens* tipo E es un miembro de la familia de las toxinas binarias, como la toxina iota de *C. spiroforme*, la toxina CDT de *C. difficile*, la toxina C2 de *C. botulinum* y la toxina ántrax de *B. anthracis* (16). Estas toxinas binarias están formadas por un péptido de unión (Ib) de unos 81 kDa y un péptido enzimático (ADP-ribosiltransferasa) de 45 kDa (Ia). El primero es necesario para la internalización del segundo (62). La toxina iota requiere de la remoción proteolítica de un fragmento propeptídico, el cual permite que la unidad Ib se inserte en la membrana e interactúe con la porción Ia (39). Al insertarse en la membrana celular, el segmento Ib forma un poro heptamérico que permite la salida de los iones K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>, además de la entrada de la porción Ia a la célula. Una vez dentro de la célula, la ribosilactina G actúa y termina por despolimerizar los filamentos de actina, con la consiguiente destrucción del citoesqueleto celular (39). La activación de la toxina iota ocurre, generalmente, por efecto de las proteasas presentes en el tracto intestinal (110).

La toxina iota es dermonecrótica, citotóxica, enterotóxica e induce daño histopatológico intestinal (16). Sin embargo, durante mucho tiempo se dudó de su efecto patógeno (110, 128); éste se confirmó hace alrededor de treinta años (8, 16, 84). En 1978, Patton *et al.* (84)

informaron un brote de enterotoxemia en una colonia de conejos. Los animales afectados presentaban enteritis necrótica y hemorrágica aguda. Se aisló la toxina iota del contenido intestinal de los conejos afectados; esta toxina produjo lesiones agudas en el ciego de conejos sanos inoculados, salvo en aquellos a los que se los protegió con un antisero específico contra la toxina (84). Aunque existen informes de enterotoxemia asociada a esta bacteria en otras especies (112), sólo se la ha podido reproducir en conejos.

Estudios recientes han dado a las toxinas binarias, y en especial a la toxina iota, mayor importancia, dado que podrían utilizarse como transportadoras e internalizadoras de drogas en células procariontas (5).

### Dos nuevas toxinas

A mediados de 1980, de una cepa de tipo C se purificó y caracterizó una proteína tóxica letal (enterotóxica y necrotizante) de 28 kDa, identificada inicialmente como toxina beta. En 1997, Gibert *et al.* (36) aislaron una toxina de 28 kDa del contenido intestinal de un cerdo con enteritis necrotizante. Esta toxina era citotóxica para células CHO y, además, provocaba enteritis hemorrágica al ser inoculada en asas ligadas de cobayo (36). El gen de esta proteína de 28 kDa fue secuenciado, y se pudo establecer que su producto no era la toxina beta, sino una proteína diferente, a la que se llamó beta-2 (36).

El gen de la toxina beta-2 puede ser encontrado en todos los tipos de *C. perfringens* y se halla codificado en un plásmido en la mayoría de las cepas que lo contienen.

Esta toxina ha sido asociada con diversas enfermedades intestinales en animales (36, 37, 42, 60), pero también se ha aislado de pacientes humanos con enfermedades gastrointestinales (29, 30, 60). Aunque en los últimos años ha aumentado considerablemente la cantidad de publicaciones sobre la toxina beta-2 y su asociación con enfermedades entéricas, la mayoría de los trabajos sólo informan la presencia de bacterias con el gen codificante de la toxina, de modo que la asociación entre la enfermedad y la toxina aparece como una cuestión netamente especulativa (27, 113).

En febrero de 2008, Keyburn *et al.* (53) comunicaron la existencia de una nueva toxina clostridial responsable de la enteritis necrotizante en pollos: la NetB. El gen de dicha toxina fue caracterizado a partir de cepas de *C. perfringens* tipo A, aisladas del contenido intestinal de aves con esta enfermedad. La NetB sería una toxina de tipo formadora de poro. Estos autores reprodujeron la infección en aves libres de patógenos, a las que se les inoculó la toxina recombinante purificada o cepas que portaban el gen de la toxina o que carecían de éste. Sólo las aves que recibieron la toxina purificada o la cepa con la toxina desarrollaron enteritis necrotizante (53).

## CONCLUSIONES

*C. perfringens* es un microorganismo que reviste suma importancia en medicina humana y veterinaria ya que, pese a ser parte de la microbiota intestinal, es potencialmente patógeno y letal, tanto para animales como para el hombre. Tanto es así que el uso de algunas de sus toxinas como potenciales armas bioterroristas ha generado cierta preocupación en algunos países. Sin embargo y a modo de contracara, otras de sus toxinas podrían ser usadas en el tratamiento de enfermedades, como transportadoras e internalizadoras de drogas en células procariontas (toxina iota) o en ciertas terapias antitumorales (enterotoxina).

En el ámbito de la medicina veterinaria, *C. perfringens* genera importantes pérdidas en la producción ganadera. En el caso de la producción avícola, por ejemplo, el reciente descubrimiento de una toxina (NetB), presente en cepas de *C. perfringens* tipo A aisladas de aves con enteritis necrótica, abre una nueva línea de investigación, relevante tanto para el conocimiento de la patogenia de estos microorganismos como para el desarrollo de nuevas vacunas. Esta toxina, o tal vez otras también, podrían estar involucradas en la enteritis necrótica por *C. perfringens* tipo A observada en otras especies animales.

Dado el renovado interés que existe en el estudio de *C. perfringens* y sus toxinas, es posible que en los próximos años tengamos un perfil más completo de la biología de esta bacteria como comensal y como patógeno. Esta información permitirá dilucidar su papel en enfermedades entéricas en las que su participación aún es incierta.

**Agradecimientos:** Agradecemos la generosa ayuda de Yanil R. Parma. M.E. Fernández-Miyakawa es investigador del CONICET.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adamson RH, Ly JC, Fernández-Miyakawa M, Ochi S, Sakurai J, Uzal F, et al. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin increases permeability of single perfused microvessels of rat mesentery. *Infect Immun* 2005; 73: 4879-87.
- Al-Sheikhly F, Truscott RB. The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of crude toxins of *Clostridium perfringens* into the duodenum. *Avian Dis* 1977; 21: 241-55.
- Baba E, Fuller AL, Gilbert JM, Thayer SG, McDougald LR. Effects of *Eimeria brunetti* infection and dietary zinc on experimental induction of necrotic enteritis in broiled chickens. *Avian Dis* 1992; 36: 59-62.
- Barbara AJ, Trinh HT, Glock RD, Songer JG. Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. *Vet Microbiol* 2008; 126: 377-82.
- Barth H, Stiles BG. Binary actin-ADP-ribosylating toxins and their use as molecular Trojan horses for drug delivery into eukaryotic cells. *Curr Med Chem* 2008; 15: 459-69.
- Batty I, Bullen JJ. The effect of *Clostridium welchii* type D culture filtrates on the permeability of the mouse intestine. *J Pathol Bacteriol* 1956; 71: 311-23.
- Billington SJ, Wieckowski EU, Sarker MR, Bueschel D, Songer JG, McClane BA. *Clostridium perfringens* type E animal enteritis isolates with highly conserved, silent enterotoxin gene sequences. *Infect Immun* 1998; 66: 4531-6.
- Borriello SP, Carman RJ. Association of iota-like toxin and *Clostridium spiroforme* with both spontaneous and antibiotic-associated diarrhea and colitis in rabbits. *J Clin Microbiol* 1983; 17: 414-8.
- Borriello SP, Larson HE, Welch AR, Barclay F, Stringer MF, Bartholomew BA. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: a possible cause of antibiotic-associated diarrhoea. *Lancet* 1984; 8372: 305-7.
- Borrmann E, Günther H, Köhler H. Effect of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on MDCK cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 31: 85-92.
- Brown CC, Baker DC, Barker IK. The alimentary system. In: MG Maxie, editor. *Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals*. Vol. 2, 5<sup>o</sup> ed.; Elsevier, 2007, p. 771.
- Brynstad S, Synstad B, Granum PE. The *Clostridium perfringens* enterotoxin gene is on a transposable element in type A human food poisoning strains. *Microbiology* 1997; 143: 2109-15.
- Bullen JJ, Batty I. Experimental enterotoxaemia of sheep: the effect of the permeability of the intestine and the stimulation of antitoxin production in immune animals. *J Pathol Bacteriol* 1957; 73: 511-8.
- Cabiaux V, Buckley JT, Wattiez R, Ruyschaert JM, Parker MW, van der Goot FG. Conformational changes in aerolysin during the transition from the water-soluble protoxin to the membrane channel. *Biochemistry* 1997; 36: 15224-32.
- Canard B, Cole ST. Genome organization of the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6676-80.
- Carman RJ, Perelle S, Popoff MR. Binary toxins from *Clostridium spiroforme* and *Clostridium perfringens*. In: Rood JI, McClane BA, Songer JG, Titball RW, editors. *The clostridia: molecular biology and pathogenesis*. London, UK, Academic Press, 1997, p. 359-67.
- Chakrabarti G, Zhou X, McClane BA. Death pathways activated in CaCo-2 cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect Immun* 2003; 71: 4260-70.
- Chassin C, Bens M, de Barry J, Courjaret R, Bossu JL, Cluzeaud F, et al. Pore-forming epsilon toxin causes membrane permeabilization and rapid ATP depletion-mediated cell death in renal collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293: 927-37.
- Cole AR, Gibert M, Popoff M, Moss DS, Titball RW, Basak AK. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 797-8.
- Collie RE, McClane BA. Evidence that the enterotoxin gene can be episomal in *Clostridium perfringens* isolates associated with non-food-borne human gastrointestinal diseases. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 30-6.
- Collins JE, Bergeland ME, Bouley D, Ducommun AL, Francis DH, Yeske P. Diarrhea associated with *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in neonatal pigs. *J Vet Diagn Invest* 1989; 1: 351-3.
- Cornillot E, Saint-Joanis B, Daube G, Katayama S, Granum PE, Canard B, et al. The enterotoxin gene (*cpe*) of *Clostridium perfringens* can be chromosomal or plasmid-borne. *Mol Microbiol* 1995; 15: 639-47.
- Czeczulin JR, Hanna PC, McClane BA. Cloning, nucleotide sequencing, and expression of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1993; 61: 3429-39.
- Fernández Miyakawa ME, Ibarra CA, Uzal FA. In vitro effects of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin on water and ion transport in ovine and caprine intestine. *Anaerobe* 2003; 9: 145-9.

25. Fernández Miyakawa ME, Uzal FA. Morphologic and physiologic changes induced by *Clostridium perfringens* type A alpha toxin in the intestine of sheep. *Am J Vet Res* 2005; 66: 251-5.
26. Fernández-Miyakawa ME, Marcellino R, Uzal FA. *Clostridium perfringens* type A toxin production in 3 commonly used culture media. *J Vet Diagn Invest.* 2007; 19: 184-6.
27. Ferrarezi MC, Cardoso TC, Dutra IS. Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from calves with neonatal diarrhea. *Anaerobe* 2008; 14: 328-31.
28. Finnie JW. Neurological disorders produced by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *Anaerobe* 2004; 10: 145-50.
29. Fisher DJ, Miyamoto K, Harrison B, Akimoto S, Sarker MR, McClane BA. Association of beta2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. *Mol Microbiol* 2005; 56: 747-62.
30. Fisher DJ, Fernández-Miyakawa ME, Sayeed S, Poon R, Adams V, Rood JI, *et al.* Dissecting the contributions of *Clostridium perfringens* type C toxins to lethality in the mouse intravenous injection model. *Infect Immun* 2006; 74: 5200-10.
31. Fujii Y, Nomura S, Oshita Y, Sakurai J. Excitatory effect of *Clostridium perfringens* alpha toxin on the rat isolated aorta. *Br J Pharmacol* 1986; 88: 531-9.
32. Fujii Y, Sakurai J. Contraction of the rat isolated aorta caused by *Clostridium perfringens* alpha toxin (phospholipase C): evidence for the involvement of arachidonic acid metabolism. *Br J Pharmacol* 1989; 97: 119-24.
33. Fujita K, Katahira J, Horiguchi Y, Sonoda N, Furuse M, Tsukita S. *Clostridium perfringens* enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS Lett* 2000; 476: 258-61.
34. Fukata T, Hadate Y, Baba E, Arakawa A. Influence of bacteria on *Clostridium perfringens* infections in young chickens. *Avian Dis* 1991; 35: 224-7.
35. Gardner DE. Pathology of *Clostridium welchii* type D enterotoxaemia. II. Structural and ultrastructural alterations in the tissues of lambs and mice. *J Comp Pathol* 1973; 83: 509-24.
36. Gibert, M.; Jolivet-Renaud, C.; Popoff, M.R. Beta-2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene* 1997; 203: 65-73.
37. Gkiourtzidis K, Frey J, Bourtzi-Hatzopoulou E, Iliadis N, Sarris K. PCR detection and prevalence of alpha-, beta-, beta 2-, epsilon-, iota- and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery. *Vet Microbiol* 2001; 82: 39-43.
38. Gouaux E. Alpha-hemolysin from *Staphylococcus aureus*: an archetype of beta-barrel, channel-forming toxins. *J Struct Biol* 1998; 121: 110-22.
39. Hale ML, Marvaud JC, Popoff MR, Stiles BG. Detergent-resistant membrane microdomains facilitate Ib oligomer formation and biological activity of *Clostridium perfringens* Iota-toxin. *Infect Immun* 2004, 72, 4: 2186-93.
40. Hardy SP, Denmead M, Parekh N, Granum PE. Cationic currents induced by *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in human intestinal CaCO-2 cells. *J Med Microbiol* 1999; 48: 235-43.
41. Hauschild AH, Hilsheimer R. Purification and characteristics of the enterotoxin of *Clostridium perfringens* type A. *Can J Microbiol* 1971; 17: 1425-33.
42. Herholz C, Miserez R, Nicolet J, Frey J, Popoff M, Gibert M, *et al.* Prevalence of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 358-61.
43. Holdsworth RJ, Parratt D. The potential role of *Clostridium perfringens* alpha toxin in the pathogenesis of acute pancreatitis. *J Clin Pathol* 1996; 49: 500-3.
44. Hughes ML, Poon R, Adams V, Sayeed S, Saputo J, Uzal FA, *et al.* Epsilon-toxin plasmids of *Clostridium perfringens* type D are conjugative. *J Bacteriol* 2007; 189: 7531-8.
45. Iwanaka T, Kawashima H, Kishimoto H, Kakinuma M, Arai K, Sakurai J, *et al.* Enteritis necroticans caused by *Clostridium perfringens* type A. *J Pediatr* 2004; 144: 410-4.
46. Johnson S, Gerding DN. Enterotoxemic infections. In: Rood JI, McClane BA, Songer JG, editors. *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis*. London, UK, Academic Press, 1997, p. 117-40.
47. Kamaras J, Murrell WG. Intestinal epithelial damage in SIDS babies and its similarity to that caused by bacterial toxins in the rabbit. *Pathology* 2001; 33: 197-203
48. Kanoe M, Inoue S, Abe T, Anzai T, Kamada M, Imagawa H, *et al.* Isolation of *Clostridium perfringens* from foals. *Microbios* 1990; 64: 153-8.
49. Katahira J, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J Cell Biol* 1997a. 24; 136: 1239-47.
50. Katahira J, Sugiyama H, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N. *Clostridium perfringens* enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors *in vivo*. *J Biol Chem* 1997b; 272: 26652-8.
51. Katayama S, Dupuy B, Daube G, China B, Cole ST. Genome mapping of *Clostridium perfringens* strains with I-Ceul shows many virulence genes to be plasmid-borne. *Mol Gen Genet* 1996; 251: 720-6.
52. Keyburn AL, Sheedy SA, Ford ME, Williamson MM, Awad MM, Rood JI, *et al.* Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect Immun* 2006; 74: 6496-500.
53. Keyburn AL, Boyce JD, Vaz P, Bannam TL, Ford ME, Parker D, *et al.* NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog* 2008; 4: e26, 1-11.
54. Kokai-Kun JF, McClane BA. Evidence that a region(s) of the *Clostridium perfringens* enterotoxin molecule remains exposed on the external surface of the mammalian plasma membrane when the toxin is sequestered in small or large complexes. *Infect Immun* 1996; 64: 1020-5.
55. Kominsky SL, Tyler B, Sosnowski J, Brady K, Doucet M, Nell D, *et al.* *Clostridium perfringens* enterotoxin as a novel-targeted therapeutic for brain metastasis. *Cancer Res* 2007; 67: 7977-82.
56. Kruth SA, Prescott JF, Welch MK, Brodsky MH. Nosocomial diarrhea associated with enterotoxigenic *Clostridium perfringens* infection in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 195: 331-4.
57. Lawrence G, Walker PD. Pathogenesis of enteritis necroticans in Papua New Guinea. *Lancet* 1976; 1: 125-6.
58. Long JR, Truscott RB. Necrotic enteritis in broiler chickens. III. Reproduction of the disease. *Can J Comp Med* 1976; 40: 53-9.
59. Ludwig A, Bauer S, Benz R, Bergmann B, Goebel W. Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 1999; 31: 557-67.
60. Manteca C, Daube G, Jauniaux T, Linden A, Pirson V, Detilleux J, *et al.* A role for the *Clostridium perfringens* beta2 toxin in bovine enterotoxaemia? *Vet Microbiol* 2002; 86: 191-202.
61. Mantis NJ. Vaccines against the category B toxins: Staphylococcal enterotoxin B, epsilon toxin and ricin. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 1424-39.
62. Marvaud JC, Stiles BG, Chenal A, Gillet D, Gibert M, Smith LA, *et al.* *Clostridium perfringens* Iota toxin. Mapping of the Ia domain involved in docking with Ib and cellular internalization. *J Biol Chem* 2002; 277: 43659-66.



63. Matsuda T, Okada Y, Inagi E, Tanabe Y, Shimizu Y, Nagashima K, *et al.* Enteritis necroticans 'pigbel' in a Japanese diabetic adult. *Path Int* 2007; 57: 622-6.
64. Matsushita C, Matsushita O, Katayama S, Minami J, Takai K, Okabe A. An upstream activating sequence containing curved DNA involved in activation of the *Clostridium perfringens* plc promoter. *Microbiology* 1996; 142: 2561-6.
65. McClane BA, McDonel JL. Protective effects of osmotic stabilizers on morphological and permeability alterations induced in Vero cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Biochim Biophys Acta* 1981; 641: 401-9.
66. McClane BA, Uzal FA, Miyakawa MF, Lyerly D, Wilkins T. The Enterotoxic Clostridia. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes*, Vol. 4. New York, Springer-Verlag, 2006, p. 698-752.
67. McCourt MT, Finlay DA, Laird C, Smyth JA, Bell C, Ball HJ. Sandwich ELISA detection of *Clostridium perfringens* cells and alpha-toxin from field cases of necrotic enteritis of poultry. *Vet Microbiol* 2005; 106: 259-64.
68. McDonel JL, Duncan CL. Histopathological effect of *Clostridium perfringens* enterotoxin in the rabbit ileum. *Infect Immun* 1975; 12: 1214-8.
69. Michl P, Gress TM. Bacteria and bacterial toxins as therapeutic agents for solid tumors. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 689-702.
70. Minami J, Katayama S, Matsushita O, Matsushita C, Okabe A. Lambda-toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides. *Microbiol Immunol* 1997; 41: 527-35.
71. Miyamoto O, Minami J, Toyoshima T, Nakamura T, Masada T, Nagao S, *et al.* Neurotoxicity of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin for the rat hippocampus via the glutamatergic system. *Infect Immun* 1998; 66: 2501-8.
72. Miyamoto O, Sumitani K, Nakamura T, Yamagami S, Miyata S, Itano T, *et al.* *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes excessive release of glutamate in the mouse hippocampus. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 189: 109-13.
73. Miyata S, Matsushita O, Minami J, Katayama S, Shimamoto S, Okabe A. Cleavage of a C-terminal peptide is essential for heptamerization of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the synaptosomal membrane. *J Biol Chem* 2001; 276: 13778-83.
74. Morgan KT, Kelly BG, Buxton D. Vascular leakage produced in the brains of mice by *Clostridium welchii* type D toxin. *J Comp Pathol* 1975; 85: 461-6.
75. Nabuurs MJ, Haagsma J, Van de Molen EJ, Van der Heijden PJ. Diarrhea in one to three week-old piglets associated with *Clostridium perfringens* type A. *Ann Rech Vet* 1983; 14: 408-11.
76. Nagahama M, Iida H, Sakurai J. Effect of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on rat isolated aorta. *Microbiol Immunol* 1993; 37: 447-50.
77. Nagahama M, Nakayama T, Michiue K, Sakurai J. Site-specific mutagenesis of *Clostridium perfringens* alpha-toxin: replacement of Asp-56, Asp-130, or Glu-152 causes loss of enzymatic and hemolytic activities. *Infect Immun* 1997; 65: 3489-92.
78. Niilo L. Mechanism of Action of the enteropathogenic factor of *Clostridium perfringens* type A. *Infect Immun* 1971; 3: 100-6.
79. Niilo L. Fluid secretory response of bovine Thiry jejunal fistula to enterotoxin of *Clostridium perfringens*. *Infect Immun* 1973; 7: 1-4.
80. Niilo L. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolated from intestinal contents of cattle, sheep and chickens. *Can J Comp Med* 1978; 42: 357-63.
81. Niilo L. *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. *Can Vet J* 1980; 21: 141-8.
82. Otamiri T. Phospholipase C-mediated intestinal mucosal damage is ameliorated by quinacrine. *Food Chem Toxicol* 1989; 27: 399-402.
83. Parsons JA, Bannam TL, Devenish RJ, Rood JI. TcpA, an FtsK/SpoIIIE homolog, is essential for transfer of the conjugative plasmid pCW3 in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* 2007; 189: 7782-90.
84. Patton NM, Holmes HT, Riggs RJ, Cheeke PR. Enterotoxemia in rabbits. *Lab Anim Sci* 1978; 28: 536-40.
85. Payne DW, Williamson ED, Havard H, Modi N, Brown J. Evaluation of a new cytotoxicity assay for *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 116: 161-7.
86. Payne D, Williamson ED, Titball RW. The *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. *Rev Med Microbiol* 1997; 8: 28-30.
87. Petit L, Gibert M, Gillet D, Laurent-Winter C, Boquet P, Popoff MR. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin acts on MDCK cells by forming a large membrane complex. *J Bacteriol* 1997; 179: 6480-7.
88. Petit L, Maier E, Gibert M, Popoff MR, Benz R. *Clostridium perfringens* epsilon toxin induces a rapid change of cell membrane permeability to ions and forms channels in artificial lipid bilayers. *J Biol Chem* 2001; 276: 15736-40.
89. Petrillo TM, Beck-Sagué CM, Songer JG, Abramowsky C, Fortenberry JD, Meacham L, *et al.* Enteritis necroticans (pigbel) in a diabetic child. *N Engl J Med* 2000; 342: 1250-3.
90. Roeder BL, Chengappa MM, Nagaraja TG, Avery TB, Kennedy GA. Experimental induction of abdominal tympany, abomasitis, and abomasal ulceration by intraruminal inoculation of *Clostridium perfringens* type A in neonatal calves. *Am J Vet Res* 1988; 49: 201-7.
91. Rood JI, Cole ST. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol Rev* 1991; 55: 621-48.
92. Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM, Hughes JM. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 225-30. Sakurai J, Duncan CL. Purification of beta-toxin from *Clostridium perfringens* type C. *Infect Immun* 1977; 18: 741-5.
93. Sakurai J, Duncan CL. Some properties of beta-toxin produced by *Clostridium perfringens* type C. *Infect Immun* 1978; 21: 678-80.
94. Sakurai J, Fujii Y, Matsuura M, Endo K. Pharmacological effect of beta toxin of *Clostridium perfringens* type C on rats. *Microbiol Immunol* 1981; 25: 423-32.
95. Sakurai J, Fujii Y, Dezaki K, Endo K. Effect of *Clostridium perfringens* beta toxin on blood pressure of rats. *Microbiol Immunol* 1984; 28: 23-31.
96. Sakurai J, Nagahama M. Amino groups in *Clostridium perfringens* epsilon prototoxin and epsilon toxin. *Microb Pathog* 1986; 1: 417-23.
97. Sakurai J, Nagahama M, Takahashi T. Contraction induced by *Clostridium perfringens* epsilon toxin in the isolated rat ileum. *FEMS Microbiol Lett* 1989; 49: 269-72.
98. Sakurai J, Fujii Y, Shirotani M. Contraction induced by *Clostridium perfringens* alpha toxin in the isolated rat ileum. *Toxicon* 1990; 28: 411-8.
99. Sakurai J, Nagahama M, Oda M. *Clostridium perfringens* alpha-toxin: characterization and mode of action. *J Biochem* 2004; 136: 569-74.
100. Santin AD, Cané S, Bellone S, Palmieri M, Siegel ER, Thomas M, *et al.* Treatment of chemotherapy-resistant human ovarian cancer xenografts in C.B-17/SCID mice by intraperitoneal administration of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Cancer Res* 2005; 65: 4334-42.
101. Santin AD, Bellone S, Marizzoni M, Palmieri M, Siegel ER, McKenney JK, *et al.* Overexpression of claudin-3 and claudin-4 receptors in uterine serous papillary carcinoma: novel targets for a type-specific therapy using *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE). *Cancer* 2007; 109: 1312-22.

102. Sarker MR, Carman RJ, McClane BA. Inactivation of the gene (cpe) encoding *Clostridium perfringens* enterotoxin eliminates the ability of two cpe-positive *C. perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. *Mol Microbiol* 1999; 33: 946-58. Erratum in: *Mol Microbiol* 2000; 35: 249.
103. Satija KC, Narayan KG. Passive bacteriocin typing of strains of *Clostridium perfringens* type A causing food poisoning for epidemiologic studies. *J Infect Dis* 1980; 142: 899-902.
104. Shatursky O, Bayles R, Rogers M, Jost BH, Songer JG, Tweten RK. *Clostridium perfringens* beta-toxin forms potential-dependent, cation-selective channels in lipid bilayers. *Infect Immun* 2000; 68: 5546-51.
105. Sherman S, Klein E, McClane BA. *Clostridium perfringens* type A enterotoxin induces tissue damage and fluid accumulation in rabbit ileum. *J Diarrhoeal Dis Res* 1994; 12: 200-7.
106. Shortt SJ, Titball RW, Lindsay CD. An assessment of the in vitro toxicology of *Clostridium perfringens* type D epsilon-toxin in human and animal cells. *Hum Exp Toxicol* 2000; 19: 108-16.
107. Sinclair R, Boone SA, Greenberg D, Keim P, Gerba CP. Persistence of category A select agents in the environment. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 555-63.
108. Singh U, Mitic LL, Wieckowski EU, Anderson JM, McClane BA. Comparative biochemical and immunocytochemical studies reveal differences in the effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin on polarized CaCo-2 cells versus Vero cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 33402-12.
109. Smedley JG III, Fisher DG, Sayeed S, Chakrabarti G, McClane BA. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2004; 152: 183-204.
110. Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 2116-34.
111. Songer JG. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol* 1997; 5: 156-61.
112. Songer JG, Miskimmins DW. *Clostridium perfringens* type E enteritis in calves: two cases and a brief review of the literature. *Anaerobe*. 2004; 10: 239-42.
113. Songer JG, Miskimmins DW. Clostridial abomasitis in calves: Case report and review of the literature. *Anaerobe* 2005; 11: 290-4.
114. Stackebrandt E, Sproer C, Rainey FA, Burghardt J, Päuker O, Hippe H. Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47: 1134-9.
115. Stark RL, Duncan CL. Purification and biochemical properties of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infect Immun* 1972; 6: 662-73.
116. Stevens DL, Tweten RK, Awad MM, Rood JI, Bryant AE. Clostridial gas gangrene: evidence that alpha and theta toxins differentially modulate the immune response and induce acute tissue necrosis. *J Infect Dis* 1997; 176: 189-95.
117. Stringer MF. *Clostridium perfringens* type A food poisoning. In: Borriello SP, editor. *Clostridia in gastrointestinal disease*. Boca Raton, Florida, CRC Press Inc., 1985, p. 117-43.
118. Thompson DR, Parreira VR, Kulkarni RR, Prescott JF. Live attenuated vaccine-based control of necrotic enteritis of broiler chickens. *Vet Microbiol* 2006; 113: 25-34.
119. Titball RW. Bacterial phospholipases C. *Microbiol Rev* 1993; 57: 347-66.
120. Tironi-Farinati C, Morris WE, Loidl F, Goldstein J, Dunleavy M, Uzal F, et al. La toxina epsilon de *Clostridium perfringens* incrementa la permeabilidad del intestino delgado de roedores. LII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, 2007, Mar del Plata, Argentina.
121. Uzal FA, Kelly WR. Enterotoxaemia in goats. *Veter Res Commun* 1996; 20:481-92.
122. Uzal FA, Marcellino RM. *Clostridium perfringens* in clinically healthy sheep of Patagonia, Argentina. The 6th Biennial Congress of the Anaerobe Society of the Americas, 2002, Park City, USA.
123. Uzal FA, Songer JG. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20: 253-65.
124. Vance HN. *Clostridium perfringens* as a pathogen of cattle: A literature review. *Can J Comp Med Vet Sci* 1967; 31: 248-50.
125. Wallace AJ, Stillman TJ, Atkins A, Jamieson SJ, Bullough PA, Green J, et al. *E. coli* hemolysin E (*HlyE*, *ClyA*, *SheA*): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell* 2000; 100: 265-76.
126. Wen Q, McClane BA. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 2685-91.
127. Wieckowski EU, Wnek AP, McClane BA. Evidence that an approximately 50-kDa mammalian plasma membrane protein with receptor-like properties mediates the amphiphilicity of specifically bound *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J Biol Chem* 1994; 269: 10838-48.
128. Wierup M. Equine intestinal clostridiosis. An acute disease in horses associated with high intestinal counts of *Clostridium perfringens* type A. *Acta Vet Scand Suppl* 1977; 62: 1-182.
129. Wierup M, DiPietro JA. Bacteriologic examination of equine fecal flora as a diagnostic tool for equine intestinal clostridiosis. *Am J Vet Res* 1981; 42: 2167-9.
130. Wojdat E, Kwiatek K, Zdrojewski H, Krupa L. Gas gangrene diagnosis. *Przegl Epidemiol* 2005; 59: 859-63.
131. Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 908-34.