

Toxina épsilon de *Clostridium perfringens* y su rol en la enterotoxemia

Clostridium perfringens epsilon toxin and its role in enterotoxemia

 **Manfredi, Mauro Joaquín**

Centro de Microbiología Básica y Aplicada (CEMIBA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina

mjmanfredi@fcv.unlp.edu.ar

 **Larsen, Alejandra Edith**

Centro de Microbiología Básica y Aplicada (CEMIBA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina

 **Sguazza, Guillermo Hernan**

Centro de Microbiología Básica y Aplicada (CEMIBA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina

Analecta Veterinaria
vol. 45, e096, 2025
Universidad Nacional de La Plata, Argentina
ISSN: 0365-5148
ISSN-E: 1514-2590
Periodicidad: Frecuencia continua
analecta@fcv.unlp.edu.ar
Recepción: 21 marzomayo 2024
Revisado: 26 octubre 2024
Aprobación: 01 noviembre 2024
DOI: <https://doi.org/10.24215/15142590e096>

Resumen La toxina épsilon es una proteína reconocida por ser la tercera más potente dentro del género *Clostridium*, que forma parte de un grupo de bacterias anaerobias cosmopolitas productoras de toxinas. Epsilon pertenece al grupo de las toxinas formadoras de poros y es sintetizada en forma de protoxina relativamente inactiva, por los toxinotipos B y D de *Clostridium perfringens*. La protoxina se activa por clivaje proteolítico en intestino y es responsable de la enterotoxemia, una toxiiinfección de curso agudo o subagudo que se caracteriza por la rapidez con que mata a los animales afectados, principalmente pequeños rumiantes.

Este artículo describe las principales toxinas asociadas a *C. perfringens* y se centra en la estructura, mecanismo de acción y rol de la toxina épsilon en el desarrollo de enterotoxemias. También se discuten alternativas de diagnóstico, control y prevención inmunoproyfiláctica, junto con los candidatos vacunales experimentales descriptos hasta el presente.

Palabras clave: toxina épsilon, *Clostridium perfringens*, enterotoxemia, diagnóstico, prevención

Abstract: Epsilon toxin is the third most potent within the genus *Clostridium*, which is part of a cosmopolitan anaerobic toxin-producing bacteria. Epsilon belongs to the group of pore-forming toxins and is synthesized as a relatively inactive protoxin by toxinotypes B and D of *Clostridium perfringens*. The protoxin is activated by proteolytic cleavage in the intestine and is responsible for enterotoxemia, an acute or subacute toxin-mediated infection characterized by rapid death of affected animals, mainly small ruminants.

This article describes the main toxins associated with *C. perfringens* and focuses on the structure, mechanism of action and role of the epsilon toxin in the development of enterotoxemias. Diagnostic, control and immunoprophylactic prevention alternatives are also discussed, together with the experimental vaccine candidates described so far.

Keywords: *epsilon toxin*, *Clostridium perfringens*, enterotoxemia, diagnosis, prevention

Introducción

El género *Clostridium* se caracteriza por ser más productor de toxinas que cualquier otro género de bacteria y está compuesto por aproximadamente 150 especies, con una filogenia muy heterogénea. Algunas especies de *Clostridium* se destacan por producir las tres toxinas más potentes del planeta. La neurotoxina tetánica, producida por *Clostridium tetani* y la neurotoxina botulínica, sintetizada por *Clostridium botulinum*, son responsables de los efectos clínicos severos del tétanos y del botulismo, respectivamente (Hatheway, 1990). A estas se le suma la toxina épsilon (ETX), generada por *Clostridium perfringens*, considerada una de las más potentes debido a su capacidad de causar daños en el sistema nervioso y tejidos. En términos de toxicidad, la ETX se encuentra solo detrás de la toxina tetánica y la toxina botulínica. La dosis letal 50 (DL₅₀) por inyección intraperitoneal en ratones es de 1 ng/kg para la toxina tetánica, 1,2 ng/kg para la toxina botulínica, y de 70 ng/kg para la ETX (Gill, 1982), por lo que fue considerada *clase B* por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de EE. UU. (CDC, de *Centers for Disease Control and Prevention*) hasta 2012, por su potencial uso en bioterrorismo (CDC, 2000; Mantis, 2005).

C. perfringens (previamente denominado *Clostridium welchii*) es un bacilo grampositivo, anaerobio, que forma esporas resistentes al calor, capaz de producir hasta 30 potenciales toxinas, agrupadas entre toxinas mayores y toxinas menores, sobre la base de su virulencia. *C. perfringens* se encuentra en el tracto gastrointestinal de seres humanos y animales en concentraciones bajas (<10³ bacterias/g) y sin enfermedades asociadas (Niilo, 1980; Silva & Lobato, 2015). Se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente, pudiéndose aislar en muestras de suelo y agua, lo que presenta grandes dificultades a la hora de realizar su aislamiento (Lobato *et al.*, 2007; Uzal & Songer, 2008; Uzal *et al.*, 2010). Esta bacteria muestra una gran respuesta adaptativa al estrés oxidativo, ya que puede activarse tanto en condiciones aerobias como anaerobias. A pesar de ser considerado un organismo estrictamente anaerobio, se ha demostrado que en su estado vegetativo puede sobrevivir por algún tiempo en presencia de bajas concentraciones de oxígeno (Briolat & Reysset, 2002), mientras que sus esporas pueden sobrevivir por largos periodos en condiciones de aerobiosis.

A comienzos del siglo XX se lograron avances significativos en la comprensión de la etiopatogenia de *C. perfringens*, tanto en medicina humana como veterinaria, clasificando a esta bacteria en 5 toxinotipos (A, B, C, D y E) (McDonel, 1980). Posteriormente, gracias a los avances de la biología molecular, Rood *et al.*, (2018) describieron los toxinotipos F y G.

Hasta la fecha se han descripto seis exotoxinas principales, también denominadas “toxinas mayores”: alfa (α), beta (β), épsilon (ε) e iota (ι), enterotoxina (CPE - por su sigla en inglés: *C. perfringens* enterotoxin) y una toxina similar a la de la enteritis necrótica B (NetB) (Rood, 1998; Songer, 1996) (Tabla 1).

Toxinotipo	Toxinas mayores					
	α	β	ϵ	τ	CPE	NteB
A	+	-	-	-	-	-
B	+/-	+	-	-	+/-	-
C	+/-	+	-	-	+/-	-
D	+/-	-	+	-	+/-	-
E	+/-	+/-	-	+	+/-	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+

Tabla1. Toxinas mayores producidas por los toxinotipos de *Clostridium perfringens*

Estas toxinas desempeñan un papel crucial en la patogenia y los signos clínicos de las enfermedades asociadas a *C. perfringens* (Navarro *et al.*, 2018).

En seres humanos, *C. perfringens* está asociado a importantes enfermedades transmitidas por los alimentos y es la causa de la enterocolitis necrotizante en niños y la enteritis necrótica o “pigbel” en las tribus de Papúa Nueva Guinea, principalmente por la producción de CPE de *C. perfringens* tipo F (Labbe & Juneja, 2017; Leeming *et al.*, 1961; Shrestha *et al.*, 2018; Uzal *et al.*, 2014). También puede provocar gangrena gaseosa o mionecrosis clostridial por el toxinotipo A, trastornos gastrointestinales (disenterías, enteritis hemorrágicas, enteritis necróticas) causados por los toxinotipos A, B y C en diferentes especies animales y enterotoxemias, principalmente en rumiantes domésticos, causadas por los toxinotipos B y D. Estos últimos toxinotipos afectan gravemente al sistema nervioso, producen enteritis hemorrágicas e intoxicación generalizada, provocando la muerte del animal (Songer, 1996) (Tabla 2).

Las enterotoxemias son toxiinfecciones de gran relevancia en la salud de los animales, siendo sus diferentes tipos de exotoxinas las responsables de los signos clínicos. El desarrollo de la enfermedad se ve facilitado por enfermedades gastrointestinales, disfunción secretora y cambios abruptos en el entorno, por ejemplo, diferentes condiciones de humedad, falta de ventilación, suministro de alimentos en mal estado, cambios bruscos en la dieta y el consumo de alimentos con alta concentración de carbohidratos.

Toxinotipo	Enfermedades asociadas
A	Mioneclerosis, ETA, posibles enteritis necróticas en aves, enterocolitis necrótica en cerdos, gastroenteritis hemorrágica canina
B	Disentería y enteritis crónica (corderos), enteritis hemorrágica (terneros y potrillos), enterotoxemia hemorrágica (ovejas)
C	Enteritis necrótica (humanos, aves y cerdos), enterotoxemia aguda (ovejas)
D	Enterotoxemia (ovinos, caprinos y posiblemente bovinos)
E	Possible enterotoxemia (terneros y corderos), enteritis (conejos y caninos)
F	ETA, diarrea no asociada a intoxicación por alimentos
G	Enteritis necrótica (aves)

Tabla 2. Enfermedades asociadas a los toxinotipos de *Clostridium perfringens* en humanos y animales

La primera secuencia completa del genoma de *C. perfringens* la obtuvo Shimizu *et al.*, (2002) y a partir de entonces se han podido caracterizar más de 20 genes codificantes para procesos enzimáticos de crecimiento y secuencias VirR/VirS, que regulan la producción de toxinas extracelulares mediante un sistema de traducción de señales (Ba-Thein *et al.*, 1996).

Los genes responsables de la producción de las toxinas se hallan tanto a nivel cromosómico como extracromosómico (plásmidos), siendo estos últimos primordiales en las enfermedades intestinales causadas por *C. perfringens*. Una cepa puede portar hasta tres plásmidos diferentes de gran tamaño (45 a 140 kb). La mayoría de los plásmidos en cepas de *C. perfringens* pertenecen a la familia pCW3-like y pCP13-like y son conjugativos (Mehdizadeh Gohari *et al.*, 2021). A continuación, se presenta una descripción de las principales exotoxinas de *C. perfringens*, incluyendo sus estructuras, mecanismos de acción y las enfermedades asociadas a cada una.

Toxina alfa

La toxina α (CPA) es un polipéptido único de 43 kDa que se encuentra codificado en el cromosoma (gen *cpa*) de todos los toxinotipos de *C. perfringens*. Macfarlane & Knight (1941), demostraron que su estructura estaba relacionada a dos dominios estructurales. CPA posee actividad hemolítica, citotóxica, dermonecrótica y letal a nivel de la membrana provocando escisión en los fosfolípidos de membrana, endocitosis y muerte celular (Oda *et al.*, 2015). Esta toxina cumple un rol fundamental en la presentación de la mioneclerosis (gangrena gaseosa) en humanos y posiblemente en animales (Nagahama *et al.*, 2019; Stevens & Bryant, 2002) asociada a la perfringolisin O (Yamamura *et al.*, 2019). Si bien el papel de CPA en las enfermedades intestinales es controversial

(Goossens *et al.*, 2014), se han descripto infecciones con presentación de diarrea neonatal (Gale *et al.*, 2022), enteritis necrótica en pollos causada por el toxinotipo G (Daneshmand *et al.*, 2022) y una rara presentación de enterotoxemia de curso agudo en corderos denominada “enfermedad del cordero amarillo” (Uzal *et al.*, 2022).

Toxina beta

La toxina β (CPB) es considerada el principal factor de virulencia de *C. perfringens* tipo C (Sayeed *et al.*, 2008) y del tipo B. Fue aislada por primera vez por Sakurai & Duncan (1977), a partir de casos de enteritis necrótica. El gen responsable de la producción de CPB (gen *cpb*) se encuentra en un plásmido de gran tamaño. El gen *cpb* codifica para una protoxina sensible a la acción de tripsina y pepsina (Hunter *et al.*, 1993; Uzal *et al.*, 2009). Una vez activada dicha toxina provoca un aumento de la permeabilidad capilar y daño en vellosidades y microvellosidades del yeyuno que progresan hasta necrosis, muerte de las células epiteliales y descamación (Songer, 1996).

CPB (~ 35 KDa) demostró ser citotóxica en cultivos de células CHO y en el desarrollo de necrosis hemorrágica en cobayos (Jolivet-Reynaud *et al.*, 1986). En medicina veterinaria las presentaciones descriptas por CPB son producidas por los toxinotipos B y C de *C. perfringens*. Las cepas tipo B causan disentería hemorrágica en corderos y, posiblemente, en otras especies, mientras que las tipo C producen enteritis necrótica y/o enterotoxemias en casi todas las especies ganaderas (Uzal, 2004).

Durante la década de 1990, Gibert *et al.*, (1997) obtuvo una proteína significativamente más pequeña, de aproximadamente 28kDa. Dicha proteína fue descripta como toxina β_2 y presenta una homología mínima de identidad (15%) en relación con CPB. El gen *cpb2* puede encontrarse en todos los toxinotipos de *C. perfringens* (Abdolmohammadi *et al.*, 2021) y codifica para una toxina formadora de poros, posible causante de enfermedades entéricas como enteritis en lechones, diarrea en equinos, enterotoxemia en bovinos y otras especies animales relacionadas con *C. perfringens* (Uzal *et al.*, 2010). Sin embargo, la literatura actual ha sugerido un papel importante en la diarrea no transmitida por alimentos y enterocolitis no necrotizante en humanos (Mehdizadeh Gohari *et al.*, 2021).

Toxina iota

La toxina ι (ITX) fue descripta en un aislamiento de *C. perfringens* tipo E y está formada por dos componentes: enzimático (*Ia*) de ~45 kDa y unión (*Ib*) de aproximadamente 100 kDa. Ambos fueron codificados por dos genes extra cromosómicos (genes *iap* e *iab*) organizados en un operón (Sakurai *et al.*, 2009; Stiles & Wilkins, 1986). Dichos componentes se secretan como péptidos inactivados y no se encuentran unidos covalentemente entre sí (Gibert *et al.*, 2000). Una vez activados por acción de tripsina o quimiotripsinas, el componente *Ib* se une a un receptor de superficie en las células diana y luego se heptameriza para formar canales y permitir al componente *Ia* alterar el citoesqueleto celular, aumentando la permeabilidad vascular (Sakurai *et al.*, 2009; Takehara *et al.*, 2017). En los registros existentes, se asocia la acción de ITX a enterotoxemias en conejos y casos muy esporádicos de enteritis hemorrágicas en terneros (Uzal *et al.*, 2010).

Enterotoxina

La enterotoxina (CPE) se clasifica como una toxina formadora de poros que interactúa con receptores claudina en las células diana con alteración de la permeabilidad, degradación del citoesqueleto y lisis celular. Es la principal toxina asociada a las enfermedades gastrointestinales por intoxicaciones alimentarias y no alimentarias en humanos (Briggs *et al.*, 2011; Freedman *et al.*, 2016).

En todos los toxinotipos en los que CPE está presente (tipo F y E, y algunos hallados en C y D) el gen *cpe* se encuentra asociado a secuencias de inserción cromosómicas y plasmídicas que pueden ayudar a su movilización y propagación. En cepas del tipo F se han identificado tanto secuencias cromosómicas (Miyamoto *et al.*, 2011) del gen *cpe* como en plásmidos conjugativos asociados al gen *cpb2*, mientras que las cepas de tipo E suelen transportar el gen *cpe* en plásmidos generalmente asociados a genes productores de ITX (Li *et al.*, 2010). La producción de CPE ocurre cuando la bacteria esporula; luego de la lisis de su forma vegetativa se liberan altas concentraciones de la toxina en el lumen intestinal (Uzal *et al.*, 2010).

Toxina similar a la de la enteritis necrótica tipo B

La toxina similar a la de la enteritis necrótica tipo B (NetB) es miembro de la familia de toxinas formadoras de poros β -barril y es producida por *C. perfringens* tipo G. La NetB se describe como una proteína de cadena única de 33 kDa, que comparte identidad en su secuencia con otras toxinas formadoras de poros, tales como CPB, la toxina delta (δ) de *C. perfringens* y la hemolisina α de *Staphylococcus aureus* (Keyburn *et al.*, 2010; Savva *et al.*, 2013). Esta toxina se asocia a presentaciones de enteritis necrótica, principalmente en aves, causadas por toxinotipos A, C y G, generalmente en asociación con otras toxinas como CPA y CPB (Fathima *et al.*, 2022).

Toxina ϵ

La toxina ϵ (ETX) fue descripta por Bullen (1952) y es producida por los toxinotipos B y D. La proteína ETX se sintetiza durante la fase de crecimiento exponencial como protoxina, constituida por 296 aminoácidos, con un peso molecular de ~32,9 kDa y un péptido señal (32 aminoácidos en el extremo N-terminal) (Bhown & Habeeb, 1977; Hunter *et al.*, 1992). ETX se activa por clivaje proteolítico, principalmente por la acción de tripsina y α -quimotripsina propias del huésped, que escinden 13 residuos N-terminales y 29 residuos C-terminales, o por la acción de λ -proteasa de *C. perfringens*, que elimina 11 residuos N-terminales y 29 residuos C-terminales (Bokori-Brown *et al.*, 2011). Luego de su activación la proteína sufre una reducción de su tamaño (28,6 KDa), un cambio conformacional y una reducción del punto isoelectrónico (a un valor de 5,4 en la toxina activada vs. 8,2 en la protoxina). Esto genera una proteína más ácida, que favorece la interacción con los receptores (Minami *et al.*, 1997).

Los órganos más afectados por ETX son cerebro, riñón, pulmón y corazón, siendo en el cerebro donde ETX se une de manera específica y con alta afinidad (Alves *et al.*, 2014; Pawaiya *et al.*, 2020; Uzal *et al.*, 2016).

Genética y estructura de ETX

ETX se encuentra codificada por el gen *ext* dentro de un plásmido de gran tamaño (~48 - 110 kb) en el toxinotipo D (Sayeed *et al.*, 2007) y por un plásmido de 65 kb en el toxinotipo B (Miyamoto *et al.*, 2008; Sayeed *et al.*, 2010). Esta diferencia de tamaño de los plásmidos que codifican ETX, suele ser útil para la tipificación de las cepas de *Clostridium*. Sin embargo, diferentes estudios han demostrado una gran diversidad genética entre cepas que contienen un locus conjugativo (denominado *tcp*), el cual le otorga a cada toxinotipo la capacidad de adquirir, reorganizar o perder plásmidos (Hughes *et al.*, 2007).

ETX es una proteína heptamérica perteneciente a la familia de las beta toxinas formadoras de poros (β -PFT), similares a las aerolisinas ($\alpha\beta$ -PFT) (Cole *et al.*, 2004; Savva *et al.*, 2019). Esta estructura está presente en otras toxinas de *C. perfringens*, como CPA (Gordon *et al.*, 1999), CPB (Bruggisser *et al.*, 2022) y NetB (Savva *et al.*, 2013) y otras toxinas bacterianas como la aerolisina de *Aeromonas hydrophila* descrita por Janda *et al.*, (1996) o la toxina α de *C. septicum* descrita por primera vez por Ballard *et al.*, (1995).

Estructuralmente ETX tiene 3 dominios (Figura 1). El dominio I consiste en una hélice α seguida de un bucle y tres hélices α cortas, que interactúa con los anclajes de glicosilfosfatidilinositol de las proteínas, y una región similar con un grupo de residuos aromáticos de tirosina y fenilalanina (Y49, Y43, Y42, Y209 y F212), junto con un único triptófano implicado en la unión del receptor (*receptor-biding domains* o RBD) (Savva *et al.*, 2019).

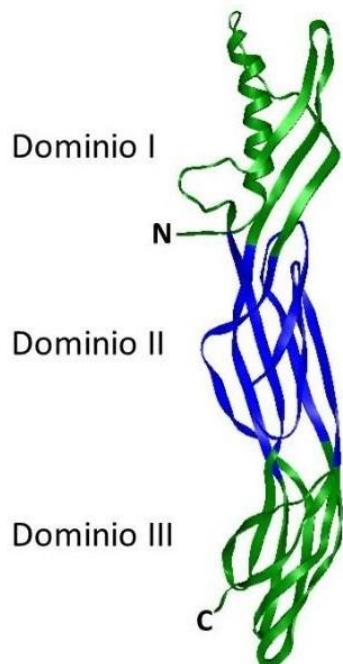


Figura 1. Modelo molecular de la toxina épsilon de *Clostridium perfringens*, en el que se describen sus tres dominios estructurales.

El dominio II consta de dos hojas plegadas β antiparalelas y un bucle a estructuralmente relacionado al dominio III de la aerolisina de *A. hydrophila*.

Este dominio actúa en la formación de poros o canales (*pore-forming moduleo PFM*) (Alves *et al.*, 2014; Bokori-Brown *et al.*, 2011).

El dominio III también es una hoja plegada β análogo a otros dominios de las aerolisininas que contiene un residuo de alanina (A168), que presenta un rol fundamental en la letalidad de la toxina, y un sitio de escisión de la toxina a partir de la protoxina (Y71) que favorece la activación de la proteína por tripsina (y otras enzimas proteolíticas) luego de la escisión del péptido entre los aminoácidos K14 y A15 (Figura 2) (Bhown & Habeeb, 1977).

Prototoxina

Lys –Glu –Ile -(Cys(Cm) –Asx5 –Pro –Val –Ser –Tyr–Glu10 –Met –Ser –Tyr –Lys –Ala15 –Ile –Tyr –Asx –Val20

Toxina

Ala – Ile – Tyr – Asx – Asx – Val – Leu – Asx - Pro – Leu – Ile – Glx - Tyr

Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la prototoxina y ubicación de los sitios de clivaje para su activación por acción de diferentes enzimas proteolíticas.

Mecanismo de acción molecular y celular de ETX

Las proteínas formadoras de poros se clasifican en α -PFT o β -PFT sobre la base de sus características de oligomerización. Como se mencionó anteriormente, ETX pertenece a la familia de las β -PFT, las cuales poseen un mecanismo de acción que consiste en un paso fundamental de unión de los protómeros de la toxina a un receptor en la superficie de la membrana de la célula blanco, un aumento de la concentración de la toxina en la célula y un proceso de oligomerización. Una vez unida a la célula, ETX presenta un efecto principalmente citotóxico (muerte celular), generando múltiples alteraciones morfológicas (Figura 3).

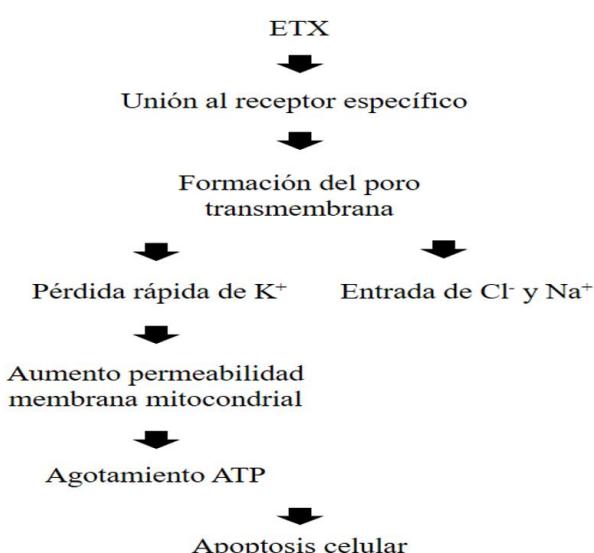


Figura 3. Alteraciones moleculares y celulares producidas por la toxina ϵ (ETX) de *Clostridium perfringens* en órganos diana.

Takagishi *et al.*, (2016) ha reportado actividad de esfingomielinasas en la formación del heptámero durante la unión de ETX al receptor celular, como un paso previo de oligomerización que genera una estructura intermedia denominada preporo. A continuación, ETX sufre cambios en la conformación que favorece la inserción en la membrana, formando un poro ya activo (Petit *et al.*, 1997) donde las hebras β de cada monómero contribuyen a la formación de un β -bucle con puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales que le confieren rigidez y estabilidad al poro (Parker & Feil, 2005).

ETX se une a receptores específicos de la célula y, aunque no se ha demostrado la identidad de los mismos, hasta la fecha se han descripto los siguientes posibles receptores de la toxina: O-glicoproteína del receptor celular 1 del virus de hepatitis A (HAVCR1) mediante sitios de unión formador por los residuos de Y29, Y30, Y36 e Y196 que interactúan con dicho receptor, contribuyendo como receptor o co-receptor (Ivie & McClane, 2012); la proteína de mielina; proteína MAL (*myelin and lymphocyte protein*); la caveolina-1 (CAV1) (Dorca-Arévalo *et al.*, 2022) y la caveolina-2 (CAV2) (Fennessey *et al.*, 2012). también se han documentado mutantes de ETX generados mediante la delección experimental de un fragmento entre los residuos V108 y F135 que mantenían la capacidad de unión e incluso la oligomerización a receptores en células renales (Dorca-Arévalo *et al.*, 2022).

Según Rumah *et al.*, (2015), la proteína MAL es el mejor candidato, ya que sería necesaria tanto para la unión y oligomerización como para la citotoxicidad de ETX. La acción de ETX sobre células que expresan proteína MAL podría explicar el efecto de desmielinización que sufren los oligodendrocitos al inhibirse canales de entrada de potasio (Bossu *et al.*, 2020) y ha sido asociada recientemente al desarrollo de esclerosis múltiple en humanos, aunque no se ha demostrado directamente implicada en la acción luego de ensayos en ratones y ovejas (Titball *et al.*, 2023). Este hallazgo proporciona una posible explicación de la meningitis y las lesiones de corteza cerebral observadas en pacientes con esclerosis múltiple. A nivel molecular, la formación de poros altera la membrana e induce una rápida pérdida de iones de K^+ y entrada de iones Cl^- y Na^+ , seguida de un aumento de Ca^{2+} intracelular. Este aumento intracelular acrecienta la permeabilidad de la membrana mitocondrial, provocando así el agotamiento de ATP y la apertura de la transición de permeabilidad de membrana (Theoret & McClane, 2016). Las células también pierden importantes coenzimas necesarias para la producción de energía, como NAD^+ , $NADH$ y acetil CoA, lo que contribuye a la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP), que facilita la translocación del factor inductor de la apoptosis (AIF), un factor de muerte celular independiente de las caspasas (Chassin *et al.*, 2007). También se ha reportado la acción de diferentes esfingomielinasas durante el proceso de daño e internalización celular que escinden estructuras de la membrana a compuestos de ceramida, facilitando el proceso de apoptosis (Takagishi *et al.*, 2016). El proceso de oligomerización provoca vacuolización celular originada por endosomas tardíos. Por su parte, Sakaguchi *et al.*, (2023) documentó similitudes en componentes de toxinas binarias como ITX de *C. perfringens* y la toxina C2 de *C. botulinum*.

A nivel celular, la ausencia de cambios histológicos y ultraestructurales en el epitelio del intestino delgado y grueso sugiere un aumento del paso a través de la vía paracelular, ya que las únicas lesiones observadas son edema paravascular y células apoptóticas en la lámina propia intestinal (Goldstein *et al.*, 2009).

También genera degeneración, exfoliación celular y procesos de necrosis con formación de núcleos picnóticos. Dada la gran especificidad por el sistema nervioso, ETX genera daño neuronal con interrupción de la transmisión de señales y necrosis.

Principales órganos afectados por ETX

Una vez atravesada la barrera intestinal, debido a la distribución sistémica y a la presencia de células endoteliales vasculares en todos los órganos, ETX daña potencialmente cualquier tejido vascularizado. Posee sitio de acción y capacidad de daño en múltiples órganos, como riñón, cerebro (donde se acumula masivamente) y, en menor medida, en pulmón y corazón, dependiendo de la especie animal. De esta manera, las manifestaciones de la enfermedad dependerán de la acumulación de ETX en los distintos órganos.

En riñón, ETX se dirige a glomérulos, capilares y túbulos colectores, aunque no se consideran lesiones renales graves. Ensayos en ratones han documentado que ETX se une a las células epiteliales del túbulos distal y también a la superficie luminal de los túbulos proximales. Esto produciría una gran filtración de toxinas a través de los glomérulos (Tamai *et al.*, 2003), dilatación del espacio de Bowman, hemorragias intersticiales entre los túbulos y degeneración del epitelio tubular con dilatación del lumen, degeneración celular con picnosis y exfoliación celular. Sin embargo, recientes ensayos en ovejas concluyeron que no se observan lesiones renales macroscópicas e histopatológicas específicas luego de ser desafiadas con inóculos de ETX por vía intraduodenal (Giannitti *et al.*, 2023).

Dada la reducida actividad de ETX en cultivos celulares, unos de los pocos sistemas *in vitro* que se han reportado como sensibles a ETX son las células de riñón canino Madin Darby (MDCK) (Lindsay, 1996), las células del conducto colector cortical del riñón de ratón (mpkCCD) y, en menor medida, células de leiomioblastoma humano (G-402). En la línea celular MDCK, ETX se une a la superficie de la célula, preferentemente en el sitio apical y reconoce un receptor de membrana específico, que conduce a la formación de grandes complejos (Payne *et al.*, 1994), vacuolización celular y condensación nuclear 30 minutos después de la exposición a 100 LD₅₀/ml de ETX y 60 minutos de exposición a 12,5 LD₅₀/ml de la misma toxina. Pasadas las 3 horas de exposición, todas las células presentaron muerte celular con todas las concentraciones de toxina épsilon analizadas, con pérdida completa de la resistencia transepitelial (Uzal *et al.*, 1999). Se ha descripto el desafío en cultivo de células endoteliales de ovino, caprino y bovino, con el objetivo de comparar su susceptibilidad a esta toxina; no obstante, en ninguno de los casos se observaron alteraciones morfológicas, incluso después de desafiar con dosis altas como 1200 LD₅₀/ml de ETX (Uzal *et al.*, 1999). Estos datos indicaron que la muerte celular directa por la formación de poros en la membrana apical precedió a cualquier posible efecto directo sobre el complejo de unión. Por lo tanto, es probable que las amplias áreas de la membrana basal expuestas durante el tratamiento con toxina épsilon de los microvasos del mesenterio sean el resultado de la ruptura de las células endoteliales, más que del desensamblaje de las uniones intercelulares (Adamson *et al.*, 2005; Petit *et al.*, 2003).

Las lesiones causadas en cerebro, principalmente en sistema nervioso central, pueden considerarse patognomónicas para cualquier presentación de

enterotoxemia (Finnie & Uzal, 2022). Estas lesiones son el resultado de la acción neurotóxica de la toxina y pueden generar signos neurológicos severos e incluso la muerte del animal. ETX interacciona de forma específica y se adhiere a la microvasculatura cerebral provocando daño en células endoteliales y alterando la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE), produciendo edema perivascular e intramural, con la consiguiente degeneración y necrosis del parénquima mediante la destrucción de las células en lugar del desmontaje de las uniones intercelulares (García et al., 2013). El edema generalizado aumenta la presión intracranial y también origina lesiones hipóxicas en otros órganos (Uzal et al., 2016) y ha sido relacionado a la acción de ETX sobre ciertos canales de acuaporinas (AQP), especialmente la AQP-4, importantes proteínas de los canales de agua de membrana que regulan la extravasación de líquido (Finnie et al., 2008). Al atravesar y alterar la BHE, estimula la liberación de glutamato inducido por el aumento de Ca^{+2} intracelular (Lonchamp et al., 2010; Wioland et al., 2015), por lo que se sugiere que los daños en el tejido nervioso son consecuencia indirecta del edema vasogénico (Finnie, 2004). Esto puede ser la razón de la producción de los signos neurológicos que se observan en animales. En su forma de protoxina, ETX es capaz de inducir una disminución de la expresión de antígenos de la BHE, siendo estos marcadores específicos de la barrera del sistema nervioso (Zhu et al., 2001). Esto se refleja en un deterioro de la permeabilidad de la BHE con una rápida acumulación de toxina en el cerebro. Dada la similitud de la BHE con la barrera hemato-retiniana (BHR), Finnie, (2004) ha demostrado que ETX se acumula en la retina, generando un aumento de la permeabilidad vascular retiniana con edema vasogénico difuso.

El daño microvascular puede afectar posteriormente la función de la retina, causando ceguera en ovejas y cabras. Esto también fue demostrado por Mander & Finnie (2018) en ensayos con ratones expuestos a ETX.

En ensayos experimentales en corderos y cabras inoculados por vía intraduodenal con sobrenadante de cultivo de *C. perfringens* tipo D que contenía ETX, se observaron signos nerviosos minutos después de la inoculación (Uzal 2004). De manera similar, en ratones, se observaron efectos letales 2 horas después de la administración oral de ETX (Fernandez-Miyakawa et al., 2007).

En ratas, a bajas dosis, ETX induce daño neuronal, reducción celular, vacuolización y picnosis. Estos cambios no fueron acompañados por un edema perivascular, pero al ser inhibido por inhibidores de glutamato se demostró que ETX interfiere directamente con neuronas glutamatérgicas (Miyamoto et al., 1998) y áreas del hipocampo de ratones.

Por otro lado, en ensayos experimentales en ovejas, Giannitti et al., (2021) ha descripto varias lesiones cardiopulmonares, utilizando diferentes modelos de ETX. Los cambios microscópicos acontecidos a nivel cardíaco 24 horas post inoculación incluyeron degeneración de los cardiomiositos (con pérdida de la disposición transversal de las estrías e hipercromasia nuclear), o necrosis aguda (coagulación o fragmentación sarcoplasmática con picnosis) edema, hemorragia, infiltrado inflamatorio y fibrosis. A nivel pulmonar, el grado de edema pleural e intersticial era mayor que el edema alveolar. Dichos cambios están asociados a la capacidad de las diferentes cepas de *C. perfringens* de producir ETX.

Enterotoxemias asociadas a ETX

La enfermedad se caracteriza por los altos niveles de producción y liberación de toxinas luego del crecimiento excesivo de bacterias (por lo general de 10^8 a 10^9

bacterias/g) en cualquier segmento del intestino delgado (Popoff, 2011) o del intestino grueso (Losada-Eaton *et al.*, 2008). La presentación de la enterotoxemia varía dependiendo de la especie animal, la edad del individuo, el estado sanitario y, fundamentalmente, de la cantidad de bacterias presentes, ya que si grandes concentraciones de ETX entran en circulación se desarrollará una forma peraguda o aguda con fuertes convulsiones que conducen a un coma o muerte súbita sin signos premonitorios. En cambio, si la dosis de ETX es menor y los animales son parcialmente inmunes, desarrollará una intoxicación subaguda o crónica con signos más prolongados.

Una vez que ETX llega a una elevada concentración en la luz intestinal, induce el aumento de la permeabilidad de la mucosa y favorece la entrada de toxinas y bacterias en la circulación sanguínea. Esta proliferación bacteriana junto con un peristaltismo reducido aumenta la concentración local de bacterias y el potencial patogénico de ETX en el organismo.

Por su parte, la ingesta excesiva de carbohidratos también puede predisponer a un peristaltismo reducido, así como la acumulación de almidón no digerido, el que sirve de sustrato favoreciendo la rápida proliferación de *C. perfringens*. De esta forma, los microambientes apropiados conducen a una rápida multiplicación del toxinotipo D y a la producción de ETX.

ETX es una de las causas principales de muerte súbita en animales destetados de hasta 10 meses de edad en explotación intensiva, alimentados con raciones ricas de grano. La enfermedad a menudo se asocia con trastornos en la flora intestinal, como resultado de cambios repentinos de la dieta o de la alimentación continua de altos niveles de carbohidratos fermentables en alimentos (Pawaiya *et al.*, 2020; Songer, 1996; Uzal, 2013), entre otros factores, en los que también pueden destacarse un mal estado nutricional, infestación parasitaria (tenias del género *Moniezia*) (Thomas *et al.*, 1956), toxemia de la preñez, y sobredosis de un antihelmíntico de amplio espectro (netobimina) (Uzal *et al.*, 1994; Uzal & Songer, 2008; Uzal, 2013).

Enterotoxemia ovina

Se describe una forma clínica peraguda, sin signos premonitorios, caracterizada principalmente por muerte súbita. En la forma aguda, que se desarrolla en menos de 12 horas, predominan los signos neurológicos de tipo excitatorios que incluyen varios episodios de opistótonos, nistagmo, bruxismo, ataxia y decúbito lateral con pedaleo (Finnie, 2004; Uzal & Kelly, 1998). En las ovejas, se desarrolla una forma crónica también conocida como “encefalomalacia simétrica focal” (FSE por sus siglas en inglés), que puede ir acompañada de diarrea, además de signos neurológicos. El hallazgo de edema perivascular y vascular rico en proteínas plasmáticas en el cerebro es típico de la enfermedad producida por *C. perfringens* tipo D (Finnie *et al.*, 2020; García *et al.*, 2013; Uzal, 2004). Este edema luego progresó y lleva a la necrosis del parénquima perivascular, distribuyéndose principalmente por la sustancia blanca y es seguida de hemorragias en vasos sanguíneos cerebrales (microangiopatías). También se observa degeneración en terminales de axones y dendritas, vainas de mielina, y daño en ciertos núcleos neuronales del tronco del encéfalo, cuerpo estriado, tálamo y pedúnculos cerebelosos, con lesiones ocasionales presentes en la sustancia negra, sustancia blanca de las circunvoluciones frontales, pedúnculos cerebrales y otras regiones de la corteza cerebral (Finnie *et al.*, 1999; Uzal *et al.*, 2016).

En borregos puede presentarse una forma crónica de la enfermedad, que se caracteriza por depresión, renuencia a amamantar y la consecuente pérdida de la condición corporal. Los signos neurológicos producidos por las lesiones cerebrales causadas por ETX, incluyen opistótonos, ceguera y falta de coordinación. Sin embargo, es posible que al menos algunos de estos signos también estén asociados con CPB (Uzal *et al.*, 2016).

Enterotoxemia caprina

A diferencia de las ovejas, rara vez se observan lesiones macroscópicas en cabras. Se desarrolla una presentación crónica con enterocolitis fibrinonecrótica y hemorragia en ausencia de lesiones cerebrales (McClane *et al.*, 2006; Uzal, 2004). Sin embargo, Ortega *et al.*, (2019) ha documentado el hallazgo de lesiones microscópicas y daño microvascular con edema intramural en cabras con enterotoxemia. El desarrollo de la colitis puede extenderse hasta el intestino delgado con contenido de moco y fibrina. También pueden observarse lesiones cardiopulmonares, como hidropericardio y edema pulmonar en las formas agudas y subagudas, siendo frecuentes en animales jóvenes no vacunados (Uzal & Songer, 2008).

Uzal & Kelly (1998) realizaron experimentos inoculando, por vía intraduodenal, sobrenadante de cultivos de *C. perfringens* tipo D productor de ETX y observaron que los signos más consistentes eran diarrea maloliente con presencia de fibrina y restos de mucosa intestinal. También se describieron estrés respiratorio y signos neurológicos, tales como opistótonos, convulsiones y pedaleos en decúbito lateral. En las necropsias se observaron pulmones rojizos y edematosos y espuma en tráquea y bronquios. En animales que habían desarrollado colitis había congestión y hemorragias en la mucosa intestinal con grados variables de edema en la serosa y mesenterio adyacente. Una posible explicación de estas diferencias es que ETX es absorbida con menor rapidez por el intestino caprino, en relación con el del ovino (Sumithra *et al.*, 2013).

Enterotoxemia bovina

En el ganado bovino hay pocos reportes sobre casos naturales de enterotoxemia, y la información sobre los hallazgos clínicos y anatomo-patológicos de la enfermedad en esta especie es escasa y con frecuencia contradictoria (Barker *et al.*, 1993; Niilo *et al.*, 1963). Uzal, en el año 2013 describió una condición llamada enterotoxemia del ganado, al parecer producida por *C. perfringens* tipo D, con lesiones neuronales similares a las presentadas en ovejas de modo experimental (Uzal, 2013; Uzal *et al.*, 2002); sin embargo, la confirmación de la etiología de esta condición sigue sin establecerse (Kiu & Hall, 2018).

Diagnóstico de enterotoxemia

El diagnóstico de la mayoría de las enfermedades clostridiales siempre plantea dificultades, ya que la enfermedad progresiona rápidamente y culmina con la muerte del animal en cuestión de horas. Esto puede limitar el tiempo disponible para realizar pruebas diagnósticas. En casos crónicos los signos clínicos son sumamente variables. El aspecto más importante para destacar es que el agente por sí mismo no produce la enfermedad ni la muerte del animal, sino que la producción de sus diferentes toxinas serán las responsables de los signos clínicos

y de los cambios anatomico-pathológicos y bioquímicos observables y detectables. Una aproximación diagnóstica se da sobre la base de datos en historias y signos clínicos, factores predisponentes y hallazgos de necropsia. Si bien los antecedentes pueden orientar un diagnóstico de enterotoxemia, sin el apoyo del laboratorio y la detección de ETX por métodos serológicos no se puede realizar la confirmación de este (Uzal, 2004).

Dentro de los hallazgos anatomico-pathológicos de la enterotoxemia ovina y caprina se describen edema pulmonar, exceso de fluido en el pericardio, con la presencia o no de fibrina y ascitis con altas concentraciones de proteínas. También se pueden utilizar otras pruebas auxiliares diagnósticas que se basan en hallar bacilos grampositivos con extremos redondeados en frotis de mucosa intestinal que respaldan la presencia de *C. perfringens*, pero no la enfermedad por el tipo D (Uzal, 2004). Una de las pruebas más útiles es la medición de glucosa en orina, cuya presencia en cualquier cantidad suele interpretarse como un fuerte indicio de enterotoxemia, tanto en ovejas como en cabras. En más del 50% de infecciones experimentales se han encontrado altos niveles de glucosuria (Uzal, 2004). La hernia del vermis cerebeloso en la necropsia también es muy sugestiva de enterotoxemia tipo D (Finnie et al., 2020; Uzal et al., 2014, 2016). La FSE, cuando está presente, es confirmatoria, al igual que la evidencia histológica de daño microvascular (microangiopatía) en regiones cerebrales selectivamente vulnerables, con depósito perivascular de edema rico en proteínas (Finnie et al., 2020; Uzal, 2013; Uzal et al., 2014, 2016). En las cabras, se aplican criterios de diagnóstico similares, a los animales afectados de forma aguda y subaguda, aunque el edema perivascular en el cerebro, la hernia del vermis cerebeloso y la FSE se encuentran con menos frecuencia que en las ovejas. En casos subagudos y crónicos, hay colitis necrosante y, con menos frecuencia, enteritis. En corderos suelen hallarse signos de hemoconcentración, acidosis e hiperglucemia y daño endotelial vascular severo a nivel cerebral; aun así, son lesiones que no suelen ser específicas y raramente son de utilidad para la formulación de un diagnóstico.

El aislamiento microbiológico de *C. perfringens*, tanto del tipo B como D productores de ETX del contenido del intestino delgado o grueso, apoya el diagnóstico, pero tampoco es confirmatorio (Pawaiya et al., 2020), ya que este microorganismo se puede encontrar en bajas concentraciones aun en animales clínicamente sanos y en el medio ambiente.

C. perfringens es una bacteria fermentativa, por lo tanto, crece rápidamente en medios que contienen carbohidratos; bajo estas condiciones produce abundantes cantidades de H₂ y CO₂ que promueven el mantenimiento de un ambiente anaeróbico, siendo el menos estricto en su condición anaeróbica (Rood & Cole, 1991). La temperatura de crecimiento óptima es de 37°C y crece en medios enriquecidos, siendo importante mantener la tensión de CO₂ (Labbe & Juneja, 2017). El pH óptimo para el crecimiento de *C. perfringens* se sitúa entre 6,0 y 7,2, pudiendo crecer en un amplio rango de pH, que varía entre 5,0 y 9,0. Sus esporas son resistentes al calor, la desecación y la radiación. *C. perfringens* fermenta diferentes azúcares como glucosa, lactosa y fructosa, produciendo ácido acético y ácido butírico con o sin butanol. La producción de la toxina ETX se lleva a cabo luego de aproximadamente 6 a 8 horas de cultivo.

Existen análisis de laboratorio para detectar la presencia de ETX mediante pruebas serológicas y de neutralización, que también son utilizadas como comparativas para validar o comparar la eficacia diagnóstica de otras pruebas serológicas y también para probar la potencia de las vacunas clostridiales durante su elaboración (Uzal, 2013). Los desarrollos de técnicas como ELISA han

obtenido resultados satisfactorios para la detección de anticuerpos contra la toxina a partir de muestras de suero y la presencia del antígeno en el contenido intestinal, con una sensibilidad del 97,4 % y una especificidad del 94,6% (Pawaiya *et al.*, 2020). En un estudio comparativo entre PC-ELISA (*polyclonal capture* - ELISA), MC-ELISA (*monoclonal capture*-ELISA), contrainmunoelectroforesis y seroneutralización en ratones, se mostró la mayor sensibilidad (90%) a PC-ELISA, donde se detectó tan solo 0,075 MLD₅₀/ml de toxina épsilon en el contenido intestinal (68% correspondían a contenido duodenal, 78% a contenido ileal y 40% a contenido colónico) (Uzal *et al.*, 2003). También se detectó mediante la técnica de PC-ELISA en el líquido pericárdico (4,5-7%) y en el humor acuoso (4,5%) (Stiles *et al.*, 2013; Uzal, 2013). Para la detección del gen *etx* mediante técnicas de biología molecular se desarrollaron técnicas de PCR y RT-PCR a partir de muestras de contenido intestinal (Hunter *et al.*, 1992; Uzal *et al.*, 1997). Sin embargo, el análisis directo de estas muestras mediante PCR puede verse obstaculizado debido a la presencia de inhibidores en la misma. También se han empleado muestras de intestino fijadas en formol y embebidas en parafina (Moustafa *et al.*, 2022).

Otra dificultad para el diagnóstico mediante técnicas moleculares es la posible degradación o contaminación de las muestras, ya que la presencia de ADN de *C. perfringens* proveniente del ambiente puede llevar a resultados falsos positivos.

Tratamiento contra ETX y enterotoxemia

En general, el curso clínico de la enfermedad en animales es demasiado rápido para un tratamiento eficaz. El tratamiento debe centrarse en los siguientes objetivos: evitar la proliferación bacteriana, prevenir la absorción de toxinas en el intestino y neutralizar las toxinas ya absorbidas mediante la administración de sueros hiperinmunes antitoxina ETX. Estos sueros han sido utilizados experimentalmente para tratar ovejas y cabras con enterotoxemia (Phukan *et al.*, 2000; Stiles *et al.*, 2013). Por otro lado, también se recomienda el tratamiento paliativo para contrarrestar la deshidratación y la acidosis especialmente en casos agudos y peragudos, así como el manejo nutricional (Pawaiya *et al.*, 2020; Uzal *et al.*, 2016).

En un estudio reciente, se evaluó el perfil de resistencia *in vitro* de *C. perfringens* tipo D y se encontró que la bacteria es sensible a penicilina, ciprofloxacina y ceftriaxona, mientras que se demostró resistencia abacitracina, ampicilina y eritromicina (Hussain *et al.*, 2018).

Por otro lado, se ensayaron terapias combinadas con el uso de sueros hiperinmunes administrados por vía parenteral junto con penicilina procaínica y oxitetraciclina, los cuales mostraron un 83,3% y 50% de efectividad, respectivamente (Phukan *et al.*, 2000). Sin embargo, actualmente no existe un tratamiento específico para esta enfermedad en el ganado en condiciones de campo, por lo que la prevención mediante la vacunación es el único método para evitar pérdidas económicamente significativas de animales.

Prevención y control

El plan de prevención y control se basa en el logro de una inmunidad de rodeo y las correctas medidas de manejo. La prevención se lleva a cabo a través de la inmunoprofilaxis en categorías bovinas, ovinas y caprinas. Las vacunas actualmente disponibles para prevenir enterotoxemias e infecciones con ETX se

clasifican como anavacunas. Están compuestas por diferentes inmunógenos obtenidos a partir de bacterias dentro del género *Clostridium* (toxoides como CPB y ETX de *C. perfringens* tipo C y D, respectivamente, junto con toxoides de *C. sordelli* y anacultivo de *C. chauvoei* y *C. septicum*), utilizando hidróxido de aluminio como adyuvante (Larsen *et al.*, 2018). Aunque estas vacunas a toxoides son efectivas para prevenir la enterotoxemia y otras enfermedades en los animales, contienen una excesiva cantidad de proteínas no específicas que podrían interferir con una buena respuesta inmune (Uzal & Kelly 1998) o generar una respuesta variable. Estas preparaciones tienen varias desventajas, tales como el riesgo biológico de manipular tanto al microorganismo como a la toxina que produce, particularmente en el momento del filtrado. Dadas sus características microbiológicas todos los clostridios requieren condiciones de anaerobiosis que *per se* limitan su crecimiento; además, la producción de la toxina depende del pH, dado que una reducción de este puede modificar la estabilidad antigénica, lo que dificulta su producción.

El régimen de inmunización típico implica una primovacunación con dos dosis de vacuna, con un intervalo de 2 a 6 semanas, seguido de un refuerzo anual en ovejas y un refuerzo cada 3-4 meses en cabras. En cabras, se considera que un título de 0,25 UI/ml es protectivo (Uzal & Kelly 1998). Sin embargo, por razones aún desconocidas, los títulos de anticuerpos del toxoide ETX después de la inmunización en estos animales son más bajos y de menor duración (0,1 UI/ml); por lo que se requieren refuerzos cada 3-4 meses después de la vacunación inicial (Blackwell *et al.*, 1983).

Para proporcionar inmunidad calostral a los corderos y cabritos, se recomienda administrar el refuerzo anual en las hembras preñadas de 2 a 4 semanas preparto (Uzal *et al.*, 2016). En la actualidad, las vacunas suelen administrarse con un adyuvante de hidróxido de aluminio, ya que los intentos de mejorar la eficacia mediante una formulación liposomal no han tenido éxito, según lo descripto por Uzal *et al.*, (1999).

Se han realizado intentos de producción de vacunas recombinantes mediante el uso de la ingeniería genética; por ejemplo, se ha empleado *Escherichia coli* para producir mayores cantidades del inmunógeno (Goswami *et al.*, 1996; Hunter *et al.*, 1992; Oyston *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2010). Debido a que la ETX consta de tres dominios y las estructuras de estos dominios dependen de dos cadenas que atraviesan toda la molécula (Cole *et al.*, 2004), la expresión de los dominios individuales de la ETX para su posterior ensayo como vacunas no es sencilla. En consecuencia, se ha centrado la atención en la evaluación de mutantes sitio-dirigidos como candidatos a vacunas. Se ha demostrado que los mutantes con una mutación (Y196E, F199E, H106P y Y71A), dos mutaciones (Y30A/Y196A) o tres mutaciones (Y30A/Y196A/A168F) pierden la toxicidad nula en células MDCK o en ratones, y proporcionan una buena alternativa para inmunidad protectora contra la ETX (Du *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2013).

Actualmente se considera que los mutantes con el cambio H106P (localizado en el dominio II de ETX) ha demostrado carecer de actividad tóxica hacia las células MDCK (Oyston *et al.*, 1998). La proteína mutada H106P tampoco era tóxica cuando se administraba por vía intravenosa a los ratones. Sin embargo, la razón de la falta de la toxicidad de la proteína H106P se desconoce (Li *et al.*, 2013). También se han sintetizado proteínas químéricas bivalentes que comprenden 3 mutaciones de ETX (Y30A/H106P/Y196A) conformadas junto con fragmentos recombinantes de la toxina alfa (CSA) de *C. septicum* (Du *et al.*, 2023).

A pesar de las medidas de vacunación y control, el intento de erradicar la

enfermedad presentaría muchas dificultades, dada su amplia distribución en la naturaleza.

Conclusiones

ETX es una potente toxina formadora de poros producida por *C. perfringens* y desempeña un papel crítico en las enterotoxemias que afectan al ganado. La toxina representa un desafío significativo para la salud animal, la producción ganadera y la seguridad alimentaria. También ha atraído la atención de investigadores de todo el mundo por su potencial uso como arma biológica, y de allí su inclusión en la lista de posibles agentes bioterrorísticos de los que considera el CDC.

Se sintetiza en forma de protoxina y se activa en el intestino, siendo una de las principales causas de enfermedades como la enterotoxemia en ovinos, caprinos y en menor medida bovinos, con consecuencias devastadoras en el ganado. Además, su potencial impacto en la salud pública subraya la importancia de comprender y controlar esta toxina en la producción y manipulación de alimentos de origen animal.

La investigación continua sobre la biología de ETX y el desarrollo de estrategias de prevención y tratamiento son fundamentales para mitigar su impacto en la industria ganadera. Las vacunas comúnmente usadas en las últimas décadas están basadas en filtrados de cultivos de *C. perfringens* y su uso va dirigido principalmente a pequeños rumiantes. Sin embargo, la producción industrial de ETX es cara, lenta y peligrosa y presenta mayor riesgo de producir accidentes vacunales y su eficacia inmunitaria es escasa, lo que hace imperativo mantener un alto nivel de anticuerpos con sucesivas dosis de refuerzos, como así también el desarrollo de nuevos candidatos vacunales de mayor eficacia. Las medidas de control y profilaxis de las enterotoxemias pueden incluir la vacunación regular de los animales, el manejo adecuado de la alimentación y el agua, la reducción del estrés ambiental y la implementación de buenas prácticas de higiene y manejo. Estas medidas son esenciales para mantener la salud y el bienestar de los animales, así como para proteger y garantizar la seguridad alimentaria y la salud pública.

Declaración de autoría

Manfredi MJ: Redacción - borrador original

Manfredi MJ, Sguazza GH, Larsen AE: Escritura/Revisión y edición

Declaración de conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, incluyendo entre estos últimos las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

Financiación

Este trabajo fue realizado en el marco del Proyecto I+D 11/V302: Procesos biotecnológicos aplicados a las ciencias veterinarias, llevado a cabo en la FCV, UNLP.

Referencias

- Abdolmohammadi Khiav L, Zahmatkesh A. 2021. Vaccination against pathogenic clostridia in animals: a review. *Tropical Animal Health and Production.* 53(2):284. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02728-w>
- Adamson RH, Fernandez-Miyakawa M, Ochi S, Sakurai J, Uzal F, Curry FE. 2005. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin increases permeability of single perfused microvessels of rat mesentery. *Infection and Immunity.* 73(8):4879-87. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4879-4887.2005>
- Alves GG, Machado de Ávila RA, Chávez-Olórtegui CD, Lobato FCF. 2014. *Clostridium perfringens* epsilon toxin: the third most potent bacterial toxin known. *Anaerobe.* 30:102-7. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.08.016>
- Ballard J, Crabtree J, Roe BA, Tweten RK. 1995. The primary structure of *Clostridium septicum* alpha-toxin exhibits similarity with that of *Aeromonas hydrophila* aerolysin. *Infection and Immunity.* 63:340-4. <https://doi.org/10.1128/iai.63.1.340-344.1995>
- Barker IK, Van Dreumel AA, Palmer N. The Alimentary System. En: Jubb KF, Kennedy PC and Palmer N. 1993. Pathology of Domestic Animals, Vol. 2.4th Edition. San Diego, Academic Press Inc., pp. 13-18.
- Ba-Thein W, Lyritis M, Ohtani K, Nisbet IT, Hayashi H, Rood JI, Shimizu T. 1996. The virR/virS locus regulates the transcription of genes encoding extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. *Journal of Bacteriology.* 178(9):2514-20. <https://doi.org/10.1128/jb.178.9.2514-2520.1996>
- Bhown AS & Habeeb AF. 1977. Structural studies on ϵ -prototoxin of *Clostridium perfringens* type D. Localization of the site of tryptic scission necessary for activation to ϵ -toxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 78(3):889-96. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(77\)90506-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(77)90506-X)
- Blackwell TE, Butler DG, Bell JA. 1983. Enterotoxemia in the goat: the humoral response and local tissue reaction following vaccination with two different bacterin-toxoids. *Canadian Journal of Comparative Medicine.* 47(2):127-32.
- Bokori-Brown M, Savva CG, Fernandes da Costa SP, Naylor CE, Basak AK, Titball RW. 2011. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *The FEBS Journal.* 278(23):4589-601. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08140.x>
- Bossu, JL, Wioland L, Doussau F, Isope P, Popoff MR, Poulain B. 2020. Epsilon toxin from *Clostridium perfringens* causes inhibition of potassium inward rectifier (Kir) channels in oligodendrocytes. *Toxins.* 12(1):36. <https://doi.org/10.3390/toxins12010036>
- Briggs DC, Naylor CE, Smedley JG, Lukyanova N, Robertson S, Moss DS, McClane, BA, Basak AK. 2011. Structure of the food-poisoning *Clostridium perfringens* enterotoxin reveals similarity to the aerolysin-like pore-forming toxins. *Journal of Molecular Biology.* 413(1):138-49. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.066>
- Briolat V & Reysset G. 2002. Identification of the *Clostridium perfringens* genes involved in the adaptive response to oxidative stress. *Journal of Bacteriology.* 184(9):2333-43. <https://doi.org/10.1128/JB.184.9.2333-2343.2002>
- Bruggeisser J, Iacovache I, Musson SC, Degiacomi MT, Posthaus H, Zuber B. 2022. Cryo-EM structure of the octameric pore of *Clostridium perfringens* β -toxin. *EMBO Reports.* 23(12):e54856. <https://doi.org/10.15252/embr.202254856>
- Bullen JJ. 1952. Enterotoxaemia of sheep: *Clostridium welchii* type D in the alimentary tract of normal animals. *The Journal of Pathology and Bacteriology.* 64(1):201-6. <https://doi.org/10.1002/path.1700640120>
- Bullen JJ. Role of toxins in host parasite relationships. En: Ajl S, Kadis S, Montie T. 1970. *Microbial Toxins.* New York/London, Academic Press, pp. 233-276.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2000. Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. Recommendations of the CDC Strategic Planning Workgroup. *MMWR;49(RR04):1-14.* [En línea] Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr4904a1.htm> [Consultado 11/12/2024]
- Chassin C, Bens M, de Barry J, Courjaret R, Bossu JL, Cluzeaud F, Ben Mkaddem S, Gibert M, Poulain B, Popoff MR, Vandewalle A. 2007. Pore-forming epsilon toxin causes membrane permeabilization and rapid ATP depletion-mediated cell death in renal collecting duct cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* 293(3):F927-F937. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00199.2007>
- Cole AR, Gibert M, Popoff M, Moss DS, Titball RW, Basak, AK. 2004. *Clostridium perfringens* ϵ -

- toxin shows structural similarity to the pore-forming toxin aerolysin. *Nature Structural & Molecular Biology.* 11(8):797-8. <https://doi.org/10.1038/nsmb804>
- Daneshmand A, Kermanshahi H, Mohammed J, Sekhavati MH, Javadmanes A, Ahmadian M, Alizadeh M, Razmyar J, Kulkarni RR. 2022. Intestinal changes and immune responses during *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broiler chickens. *Poultry Science.* 101(3):101652. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101652>
- Dorca-Arévalo J, Gómez de Aranda I, Blasi J. 2022. New mutants of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* with an altered receptor-binding site and cell-type specificity. *Toxins.* 14(4):288. <https://doi.org/10.3390/toxins14040288>
- Du J, Wang T, Xu L, Wang C, Liu Y, Pan C, Chen X, Zhu Z, Luo Y, Yin C. 2023. *Clostridium perfringens* epsilon prototoxin mutant rpETXY30A/Y71A/H106P/Y196A as a vaccine candidate against enterotoxemia. *Vaccine.* 41(32):4762-70. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.06.044>
- Fathima S, Hakeem WG, Shanmugasundaram R, Selvaraj RK. 2022. Necrotic enteritis in broiler chickens: are view on the pathogen, pathogenesis, and prevention. *Microorganisms.* 10(10):1958. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101958>
- Fennessey CM, Sheng J, Rubin DH, McClain MS. 2012. Oligomerization of *Clostridium perfringens* epsilon toxin is dependent upon caveolins 1 and 2. *PLoS One.* 7(10):e46866. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046866>
- Fernandez-Miyakawa ME, Fisher DJ, Poon R, Sayeed S, Adams V, Rood JI, McClane BA, Uzal FA. 2007. Both epsilon-toxin and beta-toxin are important for the lethal properties of *Clostridium perfringens* type B isolates in the mouse intravenous injection model. *Infection and Immunity.* 75(3):1443-52. <https://doi.org/10.1128/IAI.01672-06>
- Finnie JW, Blumbergs PC, Manavis J. 1999. Neuronal damage produced in rat brains by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *Journal of Comparative Pathology.* 120(4):415-20. <https://doi.org/10.1053/jcpa.1998.0289>
- Finnie JW. 2004. Neurological disorders produced by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *Anaerobe.* 10(2):145-50. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2003.08.003>
- Finnie, JW, Manavis J, Blumbergs P. 2008. Aquaporin-4 in acute cerebral edema produced by *Clostridium Perfringens* type D epsilon toxin. *Veterinary Pathology.* 45(3):307-9. <https://doi.org/10.1354/vp.45-3-307>.
- Finnie JW, Navarro MA, Uzal FA. 2020. Pathogenesis and diagnostic features of brain and ophthalmic damage produced by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 32(2):282-6. <https://doi.org/10.1177/1040638719900190>
- Finnie JW & Uzal FA. 2022. Pathology and pathogenesis of brain lesions produced by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *International Journal of Molecular Sciences.* 23(16), 9050. <https://doi.org/10.3390/ijms23169050>
- Freedman JC, Shrestha A, McClane BA. 2016. *Clostridium perfringens* enterotoxin: action, genetics, and translational applications. *Toxins.* 8(3):73. <https://doi.org/10.3390/toxins8030073>
- Gale C, Velazquez E, Sperling D. 2022. The role of *Clostridium perfringens* in neonatal diarrhoea and the importance of effective control. *Livestock.* 27(3):120-6. <https://doi.org/10.12968/live.2022.27.3.120>
- García JP, Adams V, Beingesser J, Hughes ML, Poon R, Lyras D, Hill, A, McClane BA, Rood JI, Uzal FA. 2013. Epsilon toxin is essential for the virulence of *Clostridium perfringens* type D infection in sheep, goats, and mice. *Infection and Immunity.* 81(7):2405-14. <https://doi.org/10.1128/IAI.00238-13>
- Giannitti F, García JP, Rood JI, Adams V, Armendano JI, Beingesser J, Uzal FA. 2021. Cardiopulmonary lesions in sheep produced by experimental acute *Clostridium Perfringens* type D enterotoxemia. *Veterinary Pathology.* 58(1):103-13. <https://doi.org/10.1177/0300985820965554>
- Giannitti F, García JP, Adams V, Armendano JI, Beingesser J, Rood JI, Uzal FA. 2023. Experimental acute *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in sheep is not characterized by specific renal lesions. *Veterinary Pathology.* 60(4):412-19. <https://doi.org/10.1177/03009858231171669>
- Gibert M, Jolivet-Reynaud C, Popoff MR. 1997. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene.* 203(1):65-73. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(97\)00493-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(97)00493-9)
- Gibert M, Petit L, Raffestin S, Okabe A, Popoff MR. 2000. *Clostridium perfringens* iota-toxin requires activation of both binding and enzymatic components for cytopathic activity.

- Infection and Immunity. 68(7):3848-53. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.3848-3853.2000>
- Gill DM. 1982. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. Microbiological Reviews. 46(1):86-94. <https://doi.org/10.1128/mr.46.1.86-94.1982>
- Goldstein J, Morris WE, Loidl CF, Tironi-Farinatti C, McClane BA, Uzal FA, Fernandez Miyakawa ME. 2009. *Clostridium perfringens* epsilon toxin increases the small intestinal permeability in mice and rats. PLoS One. 4(9):e7065. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007065>
- Goossens E, Verherstraeten S, Timbermont L, Valgaeren BR, Pardon B, Haesebrouck F, Ducatelle R, Deprez PR, Van Immerseel F. 2014. *Clostridium perfringens* strains from bovine enterotoxemia cases are not superior in *in vitro* production of alpha toxin, perfringolysin O and proteolytic enzymes. BMC Veterinary Research. 10(1):32. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-32>
- Gordon VM, Nelson KL, Buckley JT, Stevens VL, Tweten RK, Elwood PC, Leppla SH. 1999. *Clostridium septicum* alpha toxin uses glycosylphosphatidylinositol-anchored protein receptors. The Journal of Biological Chemistry. 274(38):27274-80. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.38.27274>
- Goswami PP, Rupa P, Prihar NS, Garg LC. 1996. Molecular cloning of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin gene and its high-level expression in *E. coli*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 226(3):735-40. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1422>
- Hatheway CL. 1990. Toxigenic clostridia. Clinical Microbiology Reviews. 3(1):66-98. <https://doi.org/10.1128/CMR.3.1.66>
- Hughes ML, Poon R, Adams V, Sayeed S, Saputo J, Uzal FA, McClane BA, Rood JI. 2007. Epsilon-toxin plasmids of *Clostridium perfringens* type D are conjugative. Journal of Bacteriology. 189(21):7531-8. <https://doi.org/10.1128/JB.00767-07>
- Hunter SE, Clarke IN, Kelly DC, Titball RW. 1992. Cloning and nucleotide sequencing of the *Clostridium perfringens* epsilon-toxin gene and its expression in *Escherichia coli*. Infection and Immunity. 60(1):102-10. <https://doi.org/10.1128/IAI.60.1.102-110.1992>
- Hunter SE, Brown JE, Oyston PC, Sakurai J, Titball RW. 1993. Molecular genetic analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. Infection and Immunity. 61(9):3958-65. <https://doi.org/10.1128/iai.61.9.3958-3965.1993>
- Hussain K, Ijaz M, Farooqi SH, Rizvi SNB, Ali A, Ghaffar A, Aqib AI, and Iqbal MK. 2018. Molecular characterization of *Clostridium perfringens* toxino-types and type D multidrug resistance profile in diarrheic sheep. Pakistan Veterinary Journal. 38(3):271-5. <https://doi.org/10.29261/pakvetj/2018.037>
- Ivie SE, McClain MS. 2012. Identification of amino acids important for binding of *Clostridium perfringens* epsilon toxin to host cells and to HAVCR1. Biochemistry. 51(38):7588-95. <https://doi.org/10.1021/bi300690a>
- Janda JM, Abbott SL, Khashe S, Kellogg GH, Shimada T. 1996. Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. Journal of Clinical Microbiology. 34(8):1930-3. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.8.1930-1933.1996>
- Jolivet-Reynaud C, Popoff MR, Vinit MA, Ravisse P, Moreau H, Alouf JE. 1986. Enteropathogenicity of *Clostridium perfringens* beta toxin and other clostridial toxins. Zentralblatt für Bakteriologie. 15:145-51.
- Keyburn AL, Bannam TL, Moore RJ, Rood JI. 2010. NetB, a pore-forming toxin from necrotic enteritis strains of *Clostridium perfringens*. Toxins. 2(7):1913-27. <https://doi.org/10.3390/toxins2071913>
- Kiu R & Hall LJ. 2018. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. Emerging Microbes & Infections. 7(1):1-15. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0144-8>
- Labbe RG & Juneja VK. Capítulo 10: *Clostridium perfringens*. En: Dodd CER, Aldsworth T, Stein RA, Cliver DO, Riemann HP. 2017. *Foodborne Diseases*. 3er Edición. Academic Press, pp. 235-42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00010-3>
- Larsen AE, Miceli G, Mórtola EC. 2018. *Vacunas en rumiantes domésticos* [ebook]. Series: Libros de Cátedra. [En Línea]. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/78435> [Consultado 28-01-2025]. <https://doi.org/10.35537/10915/78435>
- Leeming RL, Pryce JD, Meynell MJ. 1961. *Clostridium welchii* and food-poisoning. British Medical Journal. 1(5224):1-501. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5224.501-a>

- Li J, Miyamoto K, Sayeed S, McClane BA. 2010. Organization of the *cpe* locus in CPE-positive *Clostridium perfringens* type C and D isolates. *PloS One.* 5(6):e10932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010932>
- Li Q, Xin W, Gao S, Kang L, Wang J. 2013. A low-toxic site-directed mutant of *Clostridium perfringens* ϵ -toxin as a potential candidate vaccine against enterotoxemia. *Human Vaccines & Immunotherapeutics.* 9(11):2386-92. <https://doi.org/10.4161/hv.25649>
- Lindsay CD. 1996. Assessment of aspects of the toxicity of *Clostridium perfringens* E-toxin using the MDCK cell line. *Human & Experimental Toxicology.* 15(11):904-8. <https://doi.org/10.1177/096032719601501107>
- Lobato FCF, Salvarani FM, de Assis, RA. 2007. Clostridioses dos pequeños ruminantes. Clostridiosis of small ruminants. *Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias.* 102(561-562):23-34.
- Lonchamp E, Dupont JL, Wioland L, Courjaret R, Mbebi-Liegeois C, Jover E, Doussau F, Popoff MR, Bossu JL, De Barry J, Poulain B. 2010. *Clostridium perfringens* epsilon toxin targets granule cells in the mouse cerebellum and stimulates glutamate release. *PloS One.* 5(9):e13046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013046>
- Losada-Eaton DM, Uzal FA, Fernández Miyakawa ME. 2008. *Clostridium perfringens* epsilon toxin is absorbed from different intestinal segments of mice. *Toxicon.* 51(7): 1207-13. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.02.008>
- Macfarlane MG, Knight BC. 1941. The biochemistry of bacterial toxins: The lecithinase activity of *C. welchii* toxins. *The Biochemical Journal.* 35(8-9):884-902. <https://doi.org/10.1042/bj0350884>
- Mander KA, Finnie JW. 2018. Loss of endothelial barrier antigen immunoreactivity in rat retinal microvessels is correlated with *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin-induced damage to the blood-retinal barrier. *Journal of Comparative Pathology.* 158:51-5. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.11.003>
- McClane BA, Uzal FA, Fernandez Miyakawa ME, Lyerly D, Wilkins T. The Enterotoxic Clostridia. En: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. 2006. The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3er edición. New York, NY, Springer, pp. 698-752. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_22
- McDonel JL. 1980. *Clostridium perfringens* toxins (type A, B, C, D, E). *Pharmacology & Therapeutics.* 10(3):617-55. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(80\)90031-5](https://doi.org/10.1016/0163-7258(80)90031-5)
- Mantis NJ. 2005. Vaccines against the category B toxins: Staphylococcal enterotoxin B, epsilon toxin and ricin. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 57(9):1424-39. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.01.017>
- Mehdizadeh Gohari I, Navarro MA, Li J, Shrestha A, Uzal FA, McClane BC. 2021. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence.* 12(1):723-53. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1886777>
- Minami J, Katayama S, Matsushita O, Matsushita C, Okabe A. 1997. Lambda-toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides. *Microbiology and Immunology.* 41(7):527-35. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1997.tb01888.x>
- Miyamoto O, Minami J, Toyoshima T, Nakamura T, Masada T, Nagao S, Negi T, Itano T, Okabe A. 1998. Neurotoxicity of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin for the rat hippocampus via the glutamatergic system. *Infection and Immunity.* 66(6):2501-08. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.6.2501-2508.1998>
- Miyamoto K, Li J, Sayeed S, Akimoto S, McClane BA. 2008. Sequencing and diversity analyses reveal extensive similarities between some epsilon-toxin-encoding plasmids and the pCPF5603 *Clostridium perfringens* enterotoxin plasmid. *Journal of Bacteriology.* 190(21):7178-88. <https://doi.org/10.1128/JB.00939-08>
- Miyamoto K, Yumine N, Mimura K, Nagahama M, Li J, McClane BA, Akimoto S. 2011. Identification of novel *Clostridium perfringens* type E strains that carry an iota toxin plasmid with a functional enterotoxin gene. *PLoS One.* 6(5):e20376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020376>
- Moustafa S, Zakaria I, Moustafa A, AboSakaya R, Selim, A. 2022. Molecular epidemiology and genetic characterization of *Clostridium perfringens* infections in lambs. *Microbial Pathogenesis.* 173(Pt A):105822. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105822>
- Nagahama M, Takehara M, Rood JI. 2019. Histotoxic clostridial infections. *Microbiology Spectrum* 7(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0024-2018>

- Navarro MA, McClane BA, Uzal FA. 2018. Mechanisms of action and cell death associated with *Clostridium perfringens* toxins. *Toxins.* 10(5):212. <https://doi.org/10.3390/toxins10050212>
- Niilo L, Moffatt RE, Avery R. 1963. Bovine "enterotoxemia". II. Experimental reproduction of the disease. *The Canadian Veterinary Journal = La revue veterinaire canadienne.* 4(11):288-98.
- Niilo L. 1980. *Clostridium perfringens* in animal disease: are view of current knowledge. *The Canadian Veterinary Journal.* 21(5):141-8.
- Oda M, Terao Y, Sakurai J, Nagahama M. 2015. Membrane-binding mechanism of *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Toxins.* 7(12):5268-75. <https://doi.org/10.3390/toxins7124880>
- Ortega J, Verdes JM, Morrell EL, Finnie JW, Manavis J, Uzal FA. 2019. Intramural vascular edema in the brain of goats with *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia. *Veterinary Pathology.* 56(3):452-9. <https://doi.org/10.1177/0300985818817071>
- Oyston PCF, Payne DW, Havard HL, Williamson ED, Titball RW. 1998. Production of a non-toxic site-directed mutant of *Clostridium perfringens* e-toxin which induces protective immunity in mice. *Microbiology.* 144(Pt 2):333-41. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-2-333>
- Parker MW, Feil SC. 2005. Pore-forming protein toxins: From structure to function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* 88(1):91-142. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2004.01.009>
- Pawaiya RS, Gururaj K, Gangwar NK, Singh DD, Kumar R, Kumar A. 2020. The challenges of diagnosis and control of enterotoxaemia caused by *Clostridium perfringens*; in small ruminants. *Advances in Microbiology.* 10(5):238-73. <https://doi.org/10.4236/aim.2020.105019>
- Payne DW, Williamson ED, Havard H, Modi N, Brown J. 1994. Evaluation of a new cytotoxicity assay for *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *FEMS Microbiology Letters.* 116(2):161-7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06695.x>
- Petit L, Gibert M, Gillet D, Laurent-Winter C, Boquet P, Popoff MR. 1997. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin acts on MDCK cells by forming a large membrane complex. *Journal of Bacteriology.* 179(20):6480-7. <https://doi.org/10.1128/JB.179.20.6480-6487.1997>
- Petit L, Gibert M, Gourch A, Bens, M, Vandewalle, A, Popoff, MR. 2003. *Clostridium perfringens* epsilon toxin rapidly decreases membrane barrier permeability of polarized MDCK cells. *Cellular Microbiology.* 5(3):155-64. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00262.x>
- Phukan A, Kalita D, Das B. 2000. Experimental production of enterotoxaemia in goats and its treatment. *Indian Veterinary Journal.* 77:1051-3.
- Popoff MR. 2011. Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin: *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *The FEBS Journal.* 278(23):4602-15. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08145.x>
- Rood JI & Cole ST. 1991. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiological Reviews.* 55(4):621-48.
- Rood JI. 1998. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annual Review of Microbiology.* 52:333-60. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.333>
- Rood JI, Adams V, Lacey J, Lyras D, McClane BA, Melville SB, Moore RJ, Popoff MR, Sarker MR, Songer JG, Uzal FA, Van Immerseel F. 2018. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe.* 53:5-10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.011>
- Rumah KR, Ma Y, Linden JR, Oo ML, Anrather J, Schaeren-Wiemers N, Alonso MA, Fischetti VA, McClain MS, Vartanian T. 2015. The myelin and lymphocyte protein MAL is required for binding and activity of *Clostridium perfringense*-toxin. *PLoS Pathogens.* 11(5):e1004896. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004896>
- Sakaguchi Y, Kobayashi K, Takehara M, Nagahama M. 2023. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin requires acid sphingomyelinase for cellular entry. *Anaerobe.* 82:102753. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2023.102753>
- Sakurai J & Duncan CL. 1977. Purification of beta-toxin from *Clostridium perfringens* type C. *Infection and Immunity.* 18(3):741-5. <https://doi.org/10.1128/iai.18.3.741-745.1977>
- Sakurai J, Nagahama M, Oda M, Tsuge H, Kobayashi K. 2009. *Clostridium perfringens* iota-toxin: structure and function. *Toxins.* 1(2):208-28. <https://doi.org/10.3390/toxins1020208>

- Savva CG, Fernandes da Costa SP, Bokori-Brown M, Naylor CE, Cole AR, Moss DS, Titball RW, Basak AK. 2013. Molecular architecture and functional analysis of NetB, a pore-forming toxin from *Clostridium perfringens*. *The Journal of Biological Chemistry*. 288(5):3512-22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.430223>
- Savva CG, Clark AR, Naylor CE, Popoff MR, Moss DS, Basak AK, Titball RW, Bokori-Brown M. 2019. The pore structure of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *Nature Communications*. 10(1):2641. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10645-8>
- Sayeed S, Li J, McClane BA. 2007. Virulence plasmid diversity in *Clostridium perfringens* type D isolates. *Infection and Immunity*. 75(5):2391-8. <https://doi.org/10.1128/IAI.02014-06>
- Sayeed S, Uzal FA, Fisher DJ, Saputo J, Vidal JE, Chen Y, Gupta P, Rood, JI, McClane BA. 2008. Beta toxin is essential for the intestinal virulence of *Clostridium perfringens* type C disease isolate CN3685 in a rabbit ileal loop model. *Molecular Microbiology*. 67(1):15-30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06007.x>
- Sayeed S, Li J, McClane BA. 2010. Characterization of virulence plasmid diversity among *Clostridium perfringens* Type B isolates. *Infection and Immunity*. 78(1):495-504. <https://doi.org/10.1128/IAI.00838-09>
- Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, Ohshima K, Yamashita A, Shiba T, Ogasawara N, Hattori M, Kuhara 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(2):996-1001. <https://doi.org/10.1073/pnas.022493799>
- Shrestha A, Uzal FA, McClane BA, Fischetti A, Novick R, Ferretti J, Portnoy D, Rood J. 2018. Enterotoxic clostridia: *Clostridium perfringens* enteric diseases. *Microbiology Spectrum*. 6(5): 10.1128/microbiolspec.GPP3-0003-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0003-2017>
- Silva ROS & Lobato FCF. 2015. *Clostridium perfringens*: a review of enteric diseases in dogs, cats and wild animals. *Anaerobe*. 33:14-17. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.01.006>
- Songer JG. 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews*. 9(2):216-34. <https://doi.org/10.1128/CMR.9.2.216>
- Souza AM, Reis JKP, Assis RA, Horta CC, Siqueira FF, Facchin S, Alvarenga ER, Castro CS, Salvarani FM, Silva ROS, Pires PS, Contigli C, Lobato FCF, Kalapothakis E. 2010. Molecular cloning and expression of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* type D and tests of animal immunization. *Genetics and Molecular Research*. 9(1):266-76. <https://doi.org/10.4238/vol9-1gmr711>
- Stevens DL & Bryant AE. 2002. The role of clostridial toxins in the pathogenesis of gas gangrene. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 35(Suppl 1), S93-S100. <https://doi.org/10.1086/341928>
- Stiles BG & Wilkins TD. 1986. Purification and characterization of *Clostridium perfringens* iota toxin: dependence on two nonlinked proteins for biological activity. *Infection and Immunity*. 54(3):683-8.
- Stiles BG, Barth G, Barth H, Popoff MR. 2013. *Clostridium perfringens* epsilon toxin: a malevolent molecule for animals and man? *Toxins*. 5(11):2138-60. <https://doi.org/10.3390/toxins5112138>
- Sumithra TG, Chaturvedi VK, Siju SJ, Susan C, Rawat M, Rai AK, Sunita SC. 2013. Enterotoxaemia in goats: a review of current knowledge. *Small Ruminant Research*. 114(1):1-9. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.05.013>
- Takagishi T, Oda M, Takehara M, Kobayashi K, Nagahama M. 2016. Oligomer formation of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin is induced by activation of neutral sphingomyelinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1858(11):2681-8. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.07.009>
- Takehara M, Takagishi T, Seike S, Oda M, Sakaguchi Y, Hisatsune J, Ochi S, Kobayashi K, Nagahama M. 2017. Cellular entry of *Clostridium perfringens* iota-toxin and *Clostridium botulinum* C2 toxin. *Toxins*. 9(8):247. <https://doi.org/10.3390/toxins9080247>
- 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(9):5371-5. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.5371-5375.2003>
- Theoret JR & McClane BA. Chapter 5: Toxins of *Clostridium perfringens*. 2016. En: Clostridial diseases of animals. 2016. Uzal FA, Songer JG, Prescott JF, Popoff MR. Wiley-Blackwell, Ames, IA, pp. 45-60. <https://doi.org/10.1002/9781118728291.ch5>
- Thomas PL, Downey NE, Dreadon RS. 1956. Mortality in lambs due to enterotoxaemia associated

- with heavy infestations of *Moniezia expansa*. New Zealand Veterinary Journal. 4(4):161-5. <https://doi.org/10.1080/00480169.1956.33240>
- Titball RW, Lewis N, Nicholas R. 2023. Is *Clostridium Perfringens* epsilon toxin associated with multiple sclerosis? Multiple Sclerosis Journal. 29(9):1057-63. <https://doi.org/10.1177/13524585231186899>.
- Uzal FA, Pasini MI, Olaechea F, Robles CA, Elizondo A. 1994. An outbreak of enterotoxaemia caused by *Clostridium perfringens* type D in goats in Patagonia. The Veterinary Record. 135(12):279-80. <https://doi.org/10.1136/vr.135.12.279>
- Uzal FA, Plumb JJ, Blackall LL, Kelly WR. 1997. PCR detection of *Clostridium perfringens* producing different toxins in faeces of goats. Letters in Applied Microbiology. 25(5):339-44. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.19919977.00247.x>
- Uzal FA & Kelly WR. 1998. Experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in goats. Veterinary Pathology. 35(2):132-40. <https://doi.org/10.1177/030098589803500207>
- Uzal FA, Rolfe BE, Smith NJ, Thomas AC, Kelly WR. 1999. Resistance of ovine, caprine and bovine endothelial cells to *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin *in vitro*. Veterinary Research Communication. 23(5):275-84. <https://doi.org/10.1023/a:1006362819202>
- Uzal FA, Kelly WR, Morris WE, Assis RA. 2002. Effects of intravenous injection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in calves. The Journal of Comparative Pathology. 126:71-5. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0514>
- Uzal FA, Kelly WR, Thomas R, Hornitzky M, Galea F. 2003. Comparison of four techniques for the detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in intestinal contents and other body fluids of sheep and goats. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 15(2): 94-8. <https://doi.org/10.1177/104063870301500202>
- Uzal FA. 2004. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. Anaerobe. 10(2):135-43. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2003.08.005>
- Uzal FA & Songer JG. 2008. Diagnosis of *Clostridium Perfringens* intestinal infections in sheep and goats. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 20(3):253-65. <https://doi.org/10.1177/104063870802000301>
- Uzal FA, Saputo J, Sayeed S, Vidal JE, Fisher DJ, Poon R, Adams V, Fernandez-Miyakawa ME, Rood JI, McClane BA. 2009. Development and application of new mouse models to study the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C enterotoxemias. Infection and Immunity. 77(12):5291-9. <https://doi.org/10.1128/iai.00825-09>
- Uzal FA, Vidal JE, McClane BA, Gurjar AA. 2010. *Clostridium perfringens* toxins involved in mammalian veterinary diseases. The Open Toxicology Journal. 2:24-42. <https://doi.org/10.1002/978118728291>
- Uzal FA. 2013. Enfermedades clostrídiales de los rumiantes, con especial énfasis en bovinos. Parte 1: Enteroroxemias, abomasitis y enteritis. XLI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, pp 65.
- Uzal FA, Freedman JC, Shrestha A, Theoret JR, Garcia J, Awad MM, Adams V, Moore RJ, Rood JI, McClane BA. 2014. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. Future Microbiology. 9(3):361-77. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.168>
- Uzal FA, Songer JG, Prescott JF, Popoff MR. 2016. Clostridial diseases of animals. Iowa, USA, John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/978118728291>
- Uzal FA, Giannitti F, Asin J. 2022. Yellow lamb disease - *Clostridium perfringens* type A enterotoxemia of sheep: a Review. Animals. 12(12):1590. <https://doi.org/10.3390/ani12121590>
- Wioland L, Dupont JL, Doussau F, Gaillard S, Heid, F, Isopé P, Pauillac S, Popoff MR, Bossu JL, Poulaïn B. 2015. Epsilon toxin from *Clostridium perfringens* acts on oligodendrocytes without forming pores and causes demyelination. Cellular Microbiology. 17(3):369-88. <https://doi.org/10.1111/cmi.12373>
- Yamamura K, Ashida H, Okano T, Kinoshita-Daitoku R, Suzuki S, Ohtani K, Hamagaki M, Ikeda T, Suzuki T. 2019. Inflammasome activation induced by perfringolysin O of *Clostridium perfringens* and its involvement in the progression of gas gangrene. Frontiers in Microbiology. 10:2406. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02406>
- Zhu C, Ghabriel MN, Blumbergs PC, Reilly PL, Manavis J, Youssef J, Hatami S, & Finnie JW. 2001. *Clostridium perfringens* prototoxin-induced alteration of endothelial barrier antigen (EBA) immunoreactivity at the blood-brain barrier (BBB). Experimental neurology. 169(1):72–82. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7652>