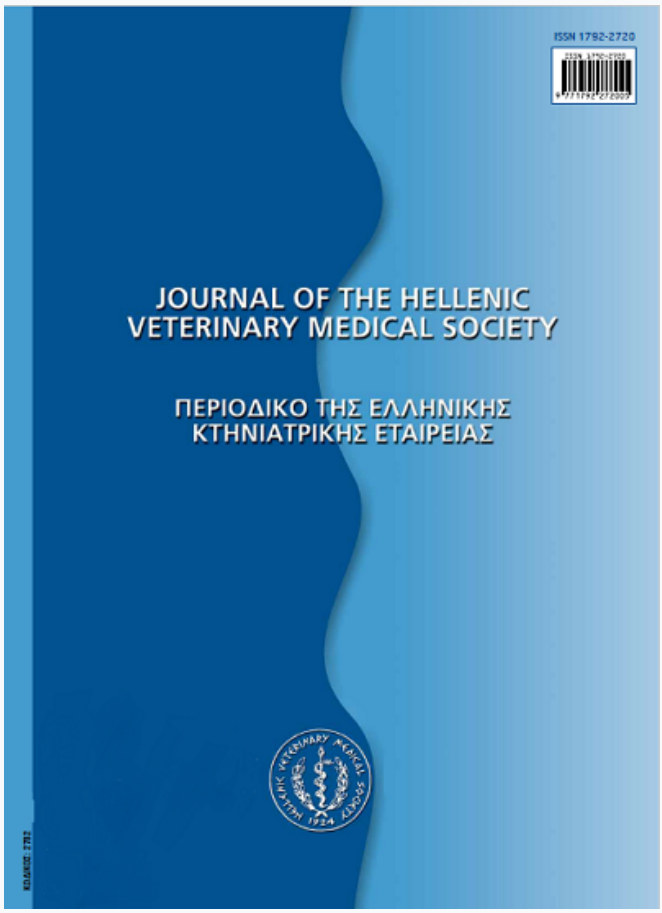
ePublishing

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 61, No 2 (2010)



Update on the emergence and pathogenesis of necrotic enteritis in broiler chickens

V. S. TSIOURIS (Β.Σ. ΤΣΙΟΥΡΗΣ), I. I. GEORGOPOULOU (Ι. ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΥ), E. I. PETRIDOU (Ε.Ι. ΠΕΤΡΙΔΟΥ)

doi: 10.12681/jhvms.14883

Copyright © 2018, TSIOURIS VS, GEORGOPOULOU II, PETRIDOU EI

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.

To cite this article:

TSIOURIS (Β.Σ. ΤΣΙΟΥΡΗΣ) V. S., GEORGOPOULOU (Ι. ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΥ) I. I., & PETRIDOU (Ε.Ι. ΠΕΤΡΙΔΟΥ) E. I. (2018). Update on the emergence and pathogenesis of necrotic enteritis in broiler chickens. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *61*(2), 144–153. https://doi.org/10.12681/jhvms.14883

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 22/01/2026 02:48:00

JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY 2010, 61(2): 144-153
ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2010, 61(2): 144-153

Review article
Ανασκόπηση

Update on the emergence and pathogenesis of necrotic enteritis in broiler chickens

Tsiouris V. S.[1], DVM, PhD, **Georgopoulou I. I.**[1], DVM, **Petridou E. I.**[2], DVM

[1] *Unit of Avian Medicine, Clinic of Farm Animals*
[2] *Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases*
Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Greece

Νεότερα δεδομένα για την ανάδυση και την παθογένεια της νεκρωτικής εντερίτιδας στα κρεοπαραγωγά ορνίθια

Β. Σ. Τσιούρης[1], DVM, PhD, **Ι. Ι. Γεωργοπούλου**[1], DVM, PhD, **Ε. Ι. Πετρίδου**[2], DVM, PhD

[1] *Μονάδα Παθολογίας Πτηνών, Κλινική Παραγωγικών Ζώων*
[2] *Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων*
Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ABSTRACT. Necrotic enteritis (NE) is a disease of broiler chickens, which is caused by *Clostridium perfringens* type A or C and is characterized by high mortality and severe intestinal lesions. NE is described as a disease of high economical importance which affects health and welfare of broilers and also may pose a threat to public health. Although NE was known as a disease since 1930, it did not cause serious problems to the poultry industry. The emergence of the disease occurred after 1986 in Scandinavia and 2000 in the European Union and was related with the ban of in-feed antimicrobial growth promoter. Furthermore, the ban of meat meal and bone meal from the feed of broiler chickens and their replacement by fishmeal increased further the occurrence of NE. NE breaks the Koch's postulate, which supports that "a disease-causing organism should not be present in healthy individuals", because *C. perfringens* may be detected in high populations in the gut of birds with no visible signs of NE. Moreover, challenge of birds with *C. perfringens* does not lead *per se* to the development of the disease. It is very well accepted that NE is a multi-factorial disease in which a number of co-factors are usually required for the proliferation and toxinogenesis of *C. perfringens* and manifestation of the disease. Toxin -a, since 2006, has been proposed to be the main virulence factor for NE in poultry. The origin of this assumption seems to lie to observation that crude supernatant from *C. perfringens* type A cultures induced necrotic lesions in broilers. Moreover, the development of NE lesions prevented partially by antibodies against *C. perfringens* toxin -a. The interpretation of these early studies is not clear, because they used crude supernatant and the assumption was made that the effects were caused by the dominant protein present (i.e. toxin -a). However, many other proteins are also present in the supernatant of *C. perfringens* cultures. The most convincing evidence, that toxin -a is not essential virulence factor for the pathogenesis of NE, comes from studies using a toxin -a negative mutant (*cpa* mutant) of a *C. perfringens* strain from NE outbreak, which was able to produce characteristic NE lesions. Recently, *netB*, a novel toxin that is associated with broiler NE, has been described. A *netB* mutant of *C. perfringens* was unable to cause necrotic lesions in the gut of experimentally infected broilers, but a complemented *netB* mutant was virulent, like the wild-type strain. However, *netB per se*, might not be an essential component of virulence factor

Correspondence: Tsiouris V. S.
Unit of Avian Medicine, School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki
Staurou Voutyra 11, 546 27, Thessaloniki, Greece
Tel.: 0030 2310 994555, Gsm: 0030 697 4370342, Fax: 0030 2310 994557, Email: biltsiou@vet.auth.gr

Αλληλογραφία: Β. Σ. Τσιούρης
Μονάδα Παθολογίας Πτηνών, Κλινική Παραγωγικών Ζώων, Κτηνιατρική Σχολή Α.Π.Θ.
Σταύρου Βουτυρά 11, 546 27 Θεσσαλονίκη
Τηλ.: 2310 994555, Κιν.: 697 4370342, Fax: 2310 994557, Email: biltsiou@vet.auth.gr

Submission date: 04.12.2009
Approval date: 25.02.2010

Ημερομηνία υποβολής: 04.12.2009
Ημερομηνία εγκρίσεως: 25.02.2010

for the pathogenesis of NE, because not all strains isolated from diseased birds carry the *netB* gene. The presence of the toxin -β_2, although it has been linked with increased incidence of bovine enterotoxaemia, intestinal disorders in human, horses and diarrhea in piglets, does not seem to be involved in the pathogenesis of NE in broiler. Most *C. perfringens* strains isolated from cases of NE do not carry the gene (*cpb*$_2$) which is responsible for the production of toxin -β_2. The efficacy of antitoxin -a toxoid vaccines, the high concentration of toxin-a at the supernatant of *C. perfringens* culture and feces of diseased birds, as well as the high titer of antibodies against toxin-a in birds with NE, indicate that toxin -a definitely play a role, major or minor, on the pathogenesis of NE in broilers.

Keywords: emergence, pathogenesis, necrotic enteritis, broiler chickens

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Η νεκρωτική εντερίτιδα (ΝΕ) οφείλεται στο *Clostridium perfringens* τύπου Α ή C, το οποίο προσβάλλει τα κρεοπαραγωγά ορνίθια προκαλώντας υψηλή θνητότητα με χαρακτηριστικές και σοβαρές αλλοιώσεις. Αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αναδυόμενα νοσήματα που απασχολούν παγκοσμίως τον κλάδο της πτηνοτροφίας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, εκτός από τη σημαντική επίδραση στην οικονομικότητα της εκτροφής, την υγεία και την ευζωία των πτηνών, αποτελεί κίνδυνο και για τη δημόσια υγεία. Η ΝΕ ως νόσημα είναι γνωστό από το 1930, χωρίς ωστόσο να αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τη συστηματική πτηνοτροφία εκείνη την εποχή. Έξαρση στην εκδήλωση του νοσήματος παρατηρήθηκε τα τελευταία χρόνια και ιδιαίτερα μετά το 1986 στις Σκανδιναβικές χώρες και το 2000 στην υπόλοιπη Ευρώπη. Η ανάδυση της ΝΕ αποδίδεται στην απαγόρευση της προληπτικής χρήσης αντιβιοτικών αυξητικών παραγόντων (ΑΑΠ) στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Επιπρόσθετα, στην έξαρση των κλινικών εκδηλώσεων του νοσήματος συνέβαλε και η διακοπή της χρήσης των κρεαταλεύρων, οστεαλεύρων και πτηναλεύρων στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων και η αντικατάστασή τους από τα ιχθυάλευρα. Παρά το γεγονός ότι το *C. perfringens* είναι αποδεδειγμένα ο αιτιολογικός παράγοντας της ΝΕ, δεν υπακούει στο αξίωμα του Koch. Για την εκδήλωση του νοσήματος δεν αρκεί η μόλυνση με *C. perfringens*, αλλά απαιτείται η ταυτόχρονη δράση προδιαθεσικών παραγόντων, οι οποίοι θα διαμορφώσουν κατάλληλα τις συνθήκες στο γαστρεντερικό σωλήνα, έτσι ώστε να ευνοείται ο πολλαπλασιασμός και η τοξινογένεση από το *C. perfringens*. Μέχρι το 2006 ήταν γνωστό ότι η τοξίνη -α αποτελεί τον κύριο παθογόνο παράγοντα για την εκδήλωση των αλλοιώσεων της ΝΕ. Η υπόθεση αυτή βασίστηκε στο γεγονός ότι η μόλυνση με το ακατέργαστο υπερκείμενο υγρό ή της ακατέργαστης τοξίνης -α από την καλλιέργεια *C. perfringens* τύπου Α, ήταν σε θέση να προκαλέσει αλλοιώσεις ΝΕ στο έντερο των κρεοπαραγωγών ορνιθίων, καθώς επίσης ότι τα αντισώματα έναντι της τοξίνης -α του *C. perfringens* προστάτευαν μερικώς τα πτηνά από την εκδήλωση της ΝΕ. Ωστόσο, η ερμηνεία των παραπάνω αποτελεσμάτων παρουσιάζει κάποιες αδυναμίες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι σε όλες τις μελέτες χρησιμοποιήθηκε το ακατέργαστο υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας του *C. perfringens* και οι βιολογικές του δράσεις αποδόθηκαν στο κυρίαρχο συστατικό του, την τοξίνη -α, αγνοώντας παντελώς την ύπαρξη και τη δράση άλλων συστατικών που συνυπάρχουν. Το πιο σημαντικό δεδομένο, στο οποίο βασίζεται η άποψη ότι η τοξίνη -α δεν αποτελεί απαραίτητο παθογόνο παράγοντα για την παθογένεια της ΝΕ, είναι ότι στελέχη *C. perfringens*, από τα οποία αφαιρέθηκε το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της τοξίνης -α (*cpa*), διατήρησαν την ικανότητα να προκαλούν τις χαρακτηριστικές αλλοιώσεις της ΝΕ. Πρόσφατα, περιγράφηκε μια νέα τοξίνη που σχετίζεται με τη ΝΕ των κρεοπαραγωγών ορνιθίων, η τοξίνη *netB*. Στελέχη *C. perfringens*, από τα οποία αφαιρέθηκε με μεθόδους γενετικής μηχανικής το υπεύθυνο γονίδιο (*netB*) για την κωδικοποίηση της τοξίνης *netB*, δεν ήταν ικανά να προκαλέσουν αλλοιώσεις ΝΕ, σε αντίθεση με τα ίδια αρχικά στελέχη, τα οποία έφεραν το υπεύθυνο γονίδιο. Παρά τα ενθαρρυντικά και εντυπωσιακά αποτελέσματα των μελετών για τη νέα τοξίνη *netB*, δεν μπορεί από μόνη της να αιτιολογήσει πλήρως την παθογένεια της ΝΕ. Ορισμένα στελέχη *C. perfringens*, ικανά να προκαλέσουν ΝΕ, δεν φέρουν το γονίδιο *netB*. Η τοξίνη -β_2, παρά το γεγονός ότι έχει ενοχοποιηθεί για την πρόκληση εντερίτιδας στον άνθρωπο, τα ιπποειδή, τα βοοειδή και το χοίρο, δεν φαίνεται να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεια της ΝΕ στα κρεοπαραγωγά ορνίθια. Τα περισσότερα στελέχη *C. perfringens* που απομονώνονται από περιστατικά ΝΕ δεν φέρουν το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την παράγωγη της τοξίνης -β_2 (*cpb*$_2$). Η αποτελεσματικότητα των εμβολίων ανατοξίνης -α, η υψηλή συγκέντρωση της τοξίνης τόσο στο υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας *C. perfringens* όσο και στα κόπρανα των πτηνών με ΝΕ, καθώς επίσης και οι υψηλοί τίτλοι αντισωμάτων κατά της τοξίνης -α σε πτηνά με ΝΕ υποδηλώνουν ότι η τοξίνη -α σίγουρα διαδραματίζει κάποιο ρόλο, πρωταγωνιστικό ή μη, στην παθογένεια της ΝΕ.

Λέξεις ευρετηρίασης: ανάδυση, παθογένεια, νεκρωτική εντερίτιδα, κρεοπαραγωγά ορνίθια

1. Εισαγωγή

Η νεκρωτική εντερίτιδα (ΝΕ) οφείλεται στο *Clostridium perfringens* τύπου Α ή C, το οποίο προσβάλλει τα κρεοπαραγωγά ορνίθια προκαλώντας υψηλή θνητότητα με χαρακτηριστικές και σοβαρές αλλοιώσεις (Immerseel et al. 2004, Williams 2005).

Το νόσημα αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1930 από τον Bennetts στην Αυστραλία (Williams 2005). Ο Bennetts απομόνωσε το *Bacillus welchii (Clostridium welchii, Clostridium perfringens)* από αλλοιώσεις στον εντερικό βλεννογόνο όρνιθας Black Orpington και απέδωσε το θάνατό της σε αυτό. Η πειραματική αναπαραγωγή και η πλήρης περιγραφή του νοσήματος έγινε από τον Parish το 1961 στο Ηνωμένο Βασίλειο. Τα επόμενα χρόνια έως και το 1997 η σημασία που δόθηκε στο νόσημα παγκοσμίως ήταν περιορισμένη (Williams 2005).

Σήμερα αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αναδυόμενα νοσήματα που απασχολούν παγκοσμίως τον κλάδο της πτηνοτροφίας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι εκτός από τη σημαντική επίδραση στην οικονομικότητα της εκτροφής, την υγεία και την ευζωία των πτηνών, αποτελεί κίνδυνο και για τη δημόσια υγεία (Van der Sluis 2000, Immerseel et al. 2004). Συγκεκριμένα, η τροφογενής λοίμωξη με *C. perfringens* κατείχε την τρίτη σε σειρά συχνότητας λοίμωξη στις βιομηχανικές χώρες (Johnson 1989).

Το κόστος της ΝΕ ανά κρεοπαραγωγό ορνίθιο στις ΗΠΑ έχει υπολογιστεί σε $0,05, ενώ συνολικά το κόστος της ξεπερνά τα $2 δισεκατομμύρια δολάρια παγκοσμίως (Van der Sluis 2000). Οι δυσμενείς οικονομικές επιπτώσεις της ΝΕ στην εκτροφή οφείλονται κατά κύριο λόγο στη μείωση των αποδόσεων των πτηνών που παρατηρείται κατά την υποκλινική της μορφή και σε μικρότερο βαθμό στο υψηλό ποσοστό θνητότητας που παρατηρείται κατά την κλινική της μορφή (Lovland και Kaldhusdal 2001).

2. Ανάδυση της ΝΕ

Η ΝΕ ως νόσημα είναι γνωστό από το 1930, χωρίς ωστόσο να αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τη συστηματική πτηνοτροφία εκείνη την εποχή. Ενδεικτικό είναι το γεγονός ότι δεν αναφερόταν σε κατάλογο με τα συχνότερα νοσήματα των ορνίθων στο Ηνωμένο Βασίλειο το 1964, ούτε και σε παγκόσμια έρευνα για τα συνήθη νοσήματα των πτηνών που διενεργήθηκε το 1979 (Williams 2005).

Έξαρση στην εκδήλωση του νοσήματος παρατηρήθηκε τα τελευταία χρόνια και ιδιαίτερα μετά το 1986 στις Σκανδιναβικές χώρες και το 2000 στην υπόλοιπη Ευρώπη. Η έξαρση της ΝΕ αποδίδεται στην απαγόρευση της προληπτικής χορήγησης αντιβιοτικών αυξητικών παραγόντων (ΑΑΠ) στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Kaldhusdal and Skjerve 1996, Williams 2005). Επιπρόσθετα, στην έξαρση των κλινικών εκδηλώσεων του νοσήματος συνέβαλε και η διακοπή της χρήσης των κρεαταλεύρων, οστεαλεύρων και πτηναλεύρων στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων και η αντικατάστασή τους από τα ιχθυάλευρα (Mateos et al. 2002).

2.1. Αντιμικροβιακοί αυξητικοί παράγοντες

Η απαγόρευση της χορήγησης των ΑΑΠ στα σιτηρέσια των κρεοπαραγωγών ορνιθίων είναι ένας σημαντικός παράγοντας, ο οποίος μετέβαλε αναπόφευκτα την εντερική μικροβιακή χλωρίδα (Knarreborg et al. 2002).

Η σημαντικότερη επίπτωση της απαγόρευσης των ΑΑΠ στη συστηματική πτηνοτροφία ήταν η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της ΝΕ, η οποία στην υποκλινική της μορφή προκαλεί μείωση των αποδόσεων, ενώ στην οξεία της μορφή χαρακτηρίζεται από υψηλή θνητότητα (Kaldhusdal et al. 2001, Hofacre et al. 2003).

Αυτό αποδεικνύεται και από την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της ΝΕ, αρχικά στις Σκανδιναβικές χώρες και αργότερα στις υπόλοιπες χώρες τις ΕΕ. Ενδεικτικά, στη Γαλλία η συχνότητα εμφάνισης της ΝΕ από το 4% το 1995 σχεδόν τριπλασιάστηκε και έφτασε το 12,4% το 1999 (Drouin 1999). Οι εκτροφείς κρεοπαραγωγών ορνιθίων στην Αμερική, οι οποίοι σταμάτησαν εθελοντικά τη χρήση ΑΑΠ, παρατήρησαν αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης των κλωστριδιακών λοιμώξεων, όπως της ΝΕ, της χολαγγειοηπατίτιδας, της γαγγραινώδους δερματίτιδας και της αλλαντίασης (Shane 2004).

Η απαγόρευση των ΑΑΠ είναι το αποτέλεσμα της αντίδρασης των καταναλωτικών οργανώσεων, των πολιτικών πιέσεων και των επιστημονικών ανησυχιών για την ανάπτυξη γονιδίων αντιβιοανθεκτικότητας σε βακτήρια των εκτρεφόμενων παραγωγικών ζώων, τα οποία μέσω της τροφικής αλυσίδας δυνητικά θα μπορούσαν να μεταδοθούν σε βακτήρια που προσβάλλουν τον άνθρωπο (Casewell et al. 2003).

Το 1993 υπήρξαν αναφορές για την απομόνωση εντεροκόκκων ανθεκτικών στα γλυκοπεπτίδια από τα παραγωγικά ζώα στην Αγγλία (Bates et al. 1993). Αυτό ήταν απροσδόκητο, επειδή στα παραγωγικά ζώα δεν χρησιμοποιούνται γλυκοπεπτίδια. Χρησιμο-

ποιείται, όμως, η avoparcin, η οποία ανήκει σε συγγενική ομάδα. Αυτό προκάλεσε τη διενέργεια επιδημιολογικών μελετών για πιθανή συσχέτιση, χωρίς ωστόσο ποτέ να αποδειχθεί. Παρ' όλα αυτά, η avoparcin απαγορεύτηκε στη Δανία το 1995 και στις υπόλοιπες χώρες της ΕΕ το 1997, λόγω του πιθανού κινδύνου μετάδοσης της ανθεκτικότητας. Στη συνέχεια, ακολούθησε η απαγόρευση της virginiamycin από τη Δανία το 1998 και η ΕΕ απαγόρευσε τους υπόλοιπους τέσσερις ΑΑΠ το 1999, στο πλαίσιο της «Προφυλακτικής Αρχής» (Casewall et al. 2003).

Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας, ο οποίος συνέβαλε στον περιορισμό της χρήσης των ΑΑΠ, κυρίως στις χώρες όπου δεν έχουν απαγορευτεί, όπως τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και την Αυστραλία, είναι η πίεση που ασκούν οι καταναλωτικές και μη κυβερνητικές φιλοζωικές οργανώσεις. Οι οργανώσεις αυτές διεκδικούν καλύτερες συνθήκες εκτροφής και ευζωίας και ελαχιστοποίηση της προληπτικής χρήσης φαρμάκων στα εκτρεφόμενα παραγωγικά ζώα. Αποτέλεσμα της πίεσης αυτής ήταν η ανακοίνωση των μεγαλύτερων εταιρειών κατανάλωσης κρέατος των ΗΠΑ, McDonald's και KFC, ότι θα χρησιμοποιούν κρέας και υποπροϊόντά του μόνο από εκτροφές που δεν χρησιμοποιούν ΑΑΠ (www.kfc.com/about/facts.htm., www.mcdonalds.com/corp/values/socialrespons.html.).

Ο μηχανισμός της δράσης των ΑΑΠ δεν έχει ακόμη πλήρως διαλευκανθεί, παρά τη μακρά ιστορία της χρήσης τους (Niewold 2007, Lu et al. 2008). Για την ερμηνεία της δράσης τους έχουν προταθεί τέσσερις κύριοι μηχανισμοί (Gaskins et al. 2002, Dibner and Richards 2005):

1) Η *αναστολή των υποκλινικών μολύνσεων*, με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ενέργειας, λόγω της καλύτερης αξιοποίησης της τροφής και της μη διέγερσης του ανοσοποιητικού συστήματος.

2) Η *μείωση των τοξικών προϊόντων* που παράγονται από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα, όπως η αμμωνία και οι μεταβολίτες χολικών αλάτων.

3) Ο *περιορισμός του ανταγωνισμού* της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας και του ξενιστή σε θρεπτικά συστατικά.

4) Η *ενίσχυση της πρόσληψης και της χρήσης* θρεπτικών συστατικών.

Τέλος, υπάρχει και μία πιο πρόσφατη θεωρία, σύμφωνα με την οποία οι ΑΑΠ δεν δρουν ως αντιβιοτικά, αλλά ως *αντιφλεγμονώδη*, αναστέλλοντας την παραγωγή και την έκκριση των καταβολικών μεσολαβητών από τα φλεγμονώδη εντερικά κύτταρα (Niewold 2007).

Η δράση των ΑΑΠ περιορίζεται στο γαστρεντερικό σωλήνα, επειδή ορισμένα από τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ως ΑΑΠ δεν απορροφώνται από τον εντερικό βλεννογόνο. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η χορήγηση αντιβιοτικών σε αξενικά ζώα δεν είχε αποτέλεσμα, ενώ αντίθετα η χορήγηση βακτηριακών μεταβολιτών προκάλεσε καθυστέρηση στην ανάπτυξη. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η δράση των ΑΑΠ έχει άμεση σχέση με την εντερική μικροβιακή χλωρίδα (Dibner and Richards 2005).

Οι ΑΑΠ, παρ' όλο που μειώνουν τον πληθυσμό των λακτοβακίλλων (Knarreborg et al. 2002, Lu et al. 2008), οι οποίοι αποτελούν επωφελή βακτήρια για τον ξενιστή, προκαλούν αύξηση των αποδόσεων των ζώων. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι ταυτόχρονα μειώνουν και τον πληθυσμό του *C. perfringens*, το οποίο προκαλεί διάσπαση των χολικών αλάτων και κακή απορρόφηση των λιπών, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση στην ανάπτυξη (Knarreborg et al. 2002). Η ευεργετική επίδραση των ΑΑΠ, πιθανώς να οφείλεται και στην αλληλεπίδρασή τους με βακτήρια τα οποία δεν γνωρίζουμε ακόμη, δεδομένου ότι το 90% των βακτηρίων του γαστρεντερικού σωλήνα παρέμεναν άγνωστα (Apajalahti et al. 2004).

2.2. Σιτηρέσια υψηλής περιεκτικότητας πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης

Τα υψιπρωτεϊνικά σιτηρέσια και ιδιαίτερα εκείνα των οποίων οι πρωτεΐνες είναι κατά βάση ζωικής προέλευσης, προδιαθέτουν στην εκδήλωση της ΝΕ στα κρεοπαραγωγά ορνίθια (Drew et al. 2004, Wilkie et al. 2005).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα εικοσαετούς επιδημιολογικής μελέτης των Kaldhusdal και Skjerve (1996) στη Νορβηγία, υπάρχει θετική συσχέτιση της περιεκτικότητας του σιτηρεσίου σε ιχθυάλευρο και της συχνότητας εμφάνισης της ΝΕ. Ενδεικτικό της προδιάθεσης των ζωικών πρωτεϊνών και ιδιαίτερα του ιχθυαλεύρου, στην εκδήλωση της ΝΕ, είναι η προσθήκη τους στα σιτηρέσια των πτηνών στα περισσότερα πειραματικά μοντέλα αναπαραγωγής του νοσήματος (Al-Sheikhly and Truscott 1977a, 1977b, 1977c, Hofacre et al. 2003, Gholamiandekhordi et al. 2007).

Το *C. perfringens* δεν μπορεί να παράγει 13 από τα 20 απαραίτητα αμινοξέα, με αποτέλεσμα η ανάπτυξή του στο γαστρεντερικό σωλήνα των πτηνών να

εξαρτάται από τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών του σιτηρεσίου (Cooper and Songer 2009). Η αύξηση της περιεκτικότητας του σιτηρεσίου σε πρωτεΐνες ή σε συγκεκριμένα αμινοξέα πιθανώς να αποτελεί το έναυσμα για την υπέρμετρη ανάπτυξη του *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα των πτηνών, επειδή τόσο η ανάπτυξή του όσο και η παραγωγή της τοξίνης -α επηρεάζεται άμεσα από την παρουσία ορισμένων αμινοξέων (Titball et al. 1999).

Σε μελέτη σχετικά με την επίδραση της πηγής προέλευσης των πρωτεϊνών στον πληθυσμό του *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα, αποδείχθηκε ότι τα πτηνά που είχαν ως πηγή πρωτεϊνών το ιχθυάλευρο παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερο πληθυσμό *C. perfringens* στον ειλεό, συγκριτικά με τα πτηνά που είχαν ως πηγή πρωτεϊνών το σογιάλευρο (Drew et al. 2004). Επίσης, ο πληθυσμός του *C. perfringens* αυξανόταν με την αύξηση της περιεκτικότητας του ιχθυαλεύρου του σιτηρεσίου, ενώ αντίθετα δεν μεταβαλλόταν με την αύξηση της περιεκτικότητας του σογιάλευρου. Η ανάλυση και η συγκριτική μελέτη των σιτηρεσίων έδειξε ότι η περιεκτικότητα στα αμινοξέα γλυκίνη και μεθειονίνη ήταν υψηλότερη στο σιτηρέσιο με βάση το ιχθυάλευρο, συγκριτικά με το σογιάλευρο (Williams 2005).

Το αμινοξύ γλυκίνη προάγει την ανάπτυξη του *C. perfringens*, καθώς και την παραγωγή της τοξίνης -α (Wilkie et al. 2005), ενώ αντίθετα μειώνει τον πληθυσμό των επωφελών βακτηρίων, όπως των λακτοβακίλλων, με αποτέλεσμα την προδιάθεση των πτηνών στην εκδήλωση της ΝΕ (Dahiya et al. 2005). Οι πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης έχουν 2-4 φορές υψηλότερη περιεκτικότητα σε γλυκίνη, συγκριτικά με τις πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης, ευνοώντας έτσι την υπερανάπτυξη του *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα. Επίσης, στην προδιάθεση της εκδήλωσης της ΝΕ συμβάλλει και το αμινοξύ λυσίνη, ευνοώντας τον πολλαπλασιασμό του *C. perfringens* στον ειλεό και τα τυφλά (Dahiya et al. 2005).

Η υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών στο σιτηρέσιο, η μη ορθή αναλογία των αμινοξέων και η μειωμένη πεπτικότητά τους οδηγεί στην αυξημένη αποβολή τους με τα κόπρανα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της κατανάλωσης νερού, που οδηγεί στην ύγρανση της στρωμνής. Η αύξηση της υγρασίας της στρωμνής, σε συνδυασμό με την αύξηση της συγκέντρωσης αζώτου, προκαλεί αύξηση του πληθυσμού του *C. perfringens* της στρωμνής και επιδείνωση της κατάστασης (McDevitt et al. 2006).

Επιπρόσθετα, τα υψιπρωτεϊνικά σιτηρέσια ή αυτά με μη ορθή αναλογία αμινοξέων, ιδιαίτερα γλυκίνης και ισολευκίνης, έχουν ως συνέπεια την ατελή πέψη και την κακή απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών του σιτηρεσίου από τα πτηνά. Αυτό προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης των θρεπτικών συστατικών και των προϊόντων μεταβολισμού τους στο κατώτερο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, όπου χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα. Η διάσπαση των πρωτεϊνών σε αμμωνία και αμίνες ευνοεί τον πολλαπλασιασμό παθογόνων βακτηρίων, όπως το *C. perfringens*. Επιπλέον, η παρουσία αυτών των μεταβολικών προϊόντων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του pH στο κατώτερο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, περιορίζοντας την ανάπτυξη των βακτηρίων της φυσιολογικής εντερικής μικροβιακής χλωρίδας και ευνοώντας ακόμη περισσότερο την ανάπτυξη του *C. perfringens* (Juskiewicz et al. 2004, Lan et al. 2005).

Είναι πιθανό, η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της ΝΕ να μην οφείλεται *per se* στο ιχθυάλευρο, αλλά να συμβάλλει σε αυτό και η κακή ποιότητα των ιχθυαλεύρων, μέσω της παραγωγής βιογενών αμινών. Οι βιογενείς αμίνες αποτελούν προϊόντα μεταβολισμού των πρωτεϊνών, όταν χρησιμοποιείται κακής ποιότητας ή μη θερμικά επεξεργασμένο ιχθυάλευρο στο σιτηρέσιο των πτηνών (McDevitt et al. 2006).

3. Παθογένεια της ΝΕ

Παρά το γεγονός ότι το *C. perfringens* είναι αποδεδειγμένα ο αιτιολογικός παράγοντας της ΝΕ, δεν υπακούει στο αξίωμα του Koch, επειδή απομονώνεται από υγιή ορνίθια, καθώς επίσης η μόλυνση των ορνιθίων μόνο με *C. perfringens* δεν οδηγεί πάντα στην αναπαραγωγή της ΝΕ (Hofacre et al. 2003, Drew et al. 2004, Gholamiandekhordi et al. 2007). Για την εκδήλωση του νοσήματος απαιτείται η ταυτόχρονη δράση προδιαθεσικών παραγόντων, οι οποίοι θα διαμορφώσουν κατάλληλα τις συνθήκες στο γαστρεντερικό σωλήνα, έτσι ώστε να ευνοείται ο πολλαπλασιασμός και η τοξινογένεση από το *C. perfringens*. Οι παράγοντες που εμπλέκονται συχνότερα στην παθογένεια της ΝΕ στα κρεοπαραγωγά ορνίθια είναι: α) οι τραυματισμοί του γαστρεντερικού βλεννογόνου, β) η σύνθεση του σιτηρεσίου, γ) η ανοσοκαταστολή και δ) τα διαχειριστικά σφάλματα (Williams 2005, McDevitt et al. 2006).

Η ΝΕ στα κρεοπαραγωγά ορνίθια εκδηλώνεται συνήθως στην ηλικία των 2 με 6 εβδομάδων και συνηθέστερα στις 3-4 εβδομάδες (Long 1973, Engstrom et

al. 2003, Lovland et al. 2004). Τις πρώτες 2 εβδομάδες, η περιεκτικότητα του γαστρεντερικού σωλήνα σε οξυγόνο είναι σχετικά υψηλή και δεν ευνοεί την υπέρμετρη ανάπτυξη αναερόβιων βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου και του *C. perfringens*. Μετά τις 2 εβδομάδες, το περιβάλλον γίνεται αναερόβιο, ευνοώντας την εκδήλωση της ΝΕ. Επίσης, μετά τη δεύτερη εβδομάδα, παρατηρείται κενό ανοσίας, το οποίο οφείλεται στο γεγονός ότι το ανοσοποιητικό σύστημα των πτηνών ωριμάζει στις 3-4 εβδομάδες (La Ragione et al. 2003), ενώ η διάρκεια της μητρικής ανοσίας υπολογίζεται συνήθως στις 2-3 εβδομάδες (Heier et al. 2001, Lovland et al. 2003).

Η σύνθεση του πληθυσμού του *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα καθορίζεται από το επίπεδο υγείας του πτηνού. Τα υγιή κρεοπαραγωγά ορνίθια μπορούν να φέρουν από δύο έως και πέντε διαφορετικούς κλώνους *C. perfringens* τύπου Α (Nauerby et al. 2003, Barbara et al. 2008). Αντίθετα, από ορνίθια με κλινική ή υποκλινική ΝΕ απομονώνεται συνήθως μόνο ένας κλώνος, ο οποίος τις περισσότερες φορές είναι διαφορετικός από τους κλώνους των υγιών πτηνών (Engstrom et al. 2003, Nauerby et al. 2003). Η κυριαρχία αυτή πιθανώς να είναι το αποτέλεσμα της παραγωγής και της έκκρισης βακτηριοσινών από τα βακτήρια, επειδή οι κλώνοι *C. perfringens* που απομονώνονται από περιστατικά ΝΕ αναστέλλουν *in vitro* την ανάπτυξη των κλώνων *C. perfringens* από υγιή πτηνά (Barbara et al. 2008). Μετά την ανάρρωση ή τη θεραπεία, τα πτηνά επανακτούν πάλι πολλούς και διαφορετικούς κλώνους, όπως και τα υγιή πτηνά (Nauerby et al. 2003, Barbara et al. 2008).

Χρειάζεται μεγάλη προσοχή στη διενέργεια των επιδημιολογικών μελετών και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους, διότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τις τοξίνες, με εξαίρεση το *cpa*, βρίσκονται σε μεταθετά στοιχεία και μπορεί να χαθούν κατά τις ανακαλλιέργειες. Επίσης, στο γαστρεντερικό σωλήνα υπάρχουν πολλά και διαφορετικά στελέχη *C. perfringens*, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο να ελεγχθούν όλα και να διακριθούν τα παθογόνα από τα μη παθογόνα (Immerseel et al. 2009).

3.1.1. Δεδομένα που ενισχύουν τον ρόλο της τοξίνης -α στην παθογένεια της ΝΕ

Μέχρι το 2006 ήταν γνωστό ότι η τοξίνη -α αποτελεί τον κύριο παθογόνο παράγοντα για την παθογένεια της ΝΕ (Keyburn et al. 2006). Η υπόθεση αυτή βασίστηκε στο γεγονός ότι η μόλυνση με το ακατέργαστο υπερκείμενο υγρό (Al-Sheikhly and Truscott 1977b) ή της ακατέργαστης τοξίνης -α (Al-Sheikhly and Truscott 1977c) από την καλλιέργεια *C. perfringens* τύπου Α, ήταν σε θέση να προκαλέσει αλλοιώσεις ΝΕ στο έντερο των κρεοπαραγωγών ορνιθίων (Al-Sheikly and Truscott 1977a).

Αργότερα, οι Fukata et al. (1988) απέδειξαν ότι σε αξενικά ορνίθια ειδικά αντισώματα κατά της τοξίνης -α εξουδετέρωσαν την επίδραση της θανατηφόρας πειραματικής μόλυνσης με το ακατέργαστο υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας *C. perfringens*. Το 2001 οι Heier et al. παρατήρησαν στην επιδημιολογική μελέτη που διεξήχθη σε σμήνη κρεοπαραγωγών ορνιθίων στη Νορβηγία ότι τα σμήνη με υψηλούς τίτλους μητρικής ανοσίας έναντι της τοξίνης -α παρουσίαζαν χαμηλότερα ποσοστά θνητότητας, συγκριτικά με τα σμήνη όπου ο τίτλος των αντισωμάτων ήταν χαμηλός. Επιπρόσθετα, ο εμβολιασμός των πατρογονικών σμηνών με εμβόλια που περιέχουν ανατοξίνες *C. perfringens* τύπου Α και C, διεγείρει την παραγωγή IgY αντισωμάτων έναντι της τοξίνης -α, τα οποία μέσω της μητρικής ανοσίας μεταφέρονται στους απογόνους και προστατεύουν μερικώς έναντι της ΝΕ (Lovland et al. 2004).

Ωστόσο, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων των παραπάνω μελετών παρουσιάζει κάποιες αδυναμίες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι σε όλες τις μελέτες χρησιμοποιήθηκε το ακατέργαστο υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας του *C. perfringens* και οι βιολογικές του δράσεις αποδόθηκαν στο κυρίαρχο συστατικό του, την τοξίνη -α, αγνοώντας παντελώς την ύπαρξη και τη δράση των άλλων συστατικών που συνυπάρχουν (Immerseel et al. 2009).

Νεότερα δεδομένα από πειραματικές μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο καθαρής ανατοξίνης -α και παρείχε προστασία έναντι της ΝΕ (Kulkarni et al. 2007), ενισχύουν την άποψη ότι η τοξίνη -α αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την εκδήλωση της ΝΕ. Επίσης, ο εμβολιασμός μυών με το καρβοξυλικό άκρο (C terminal domain) της τοξίνης -α διέγειρε το ανοσοποιητικό σύστημα και προκάλεσε την παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων, τα οποία ήταν προστατευτικά έναντι της μόλυνσης με *C. perfringens* (Hoang et al. 2008, Zekarias et al. 2008).

Η συγκέντρωση της τοξίνης -α στο εντερικό περιεχόμενο και τα κόπρανα πτηνών με ΝΕ είναι μεγαλύτερη, συγκριτικά με την συγκέντρωση της τοξίνης -α στα κόπρανα φυσιολογικών πτηνών (Lovland et al. 2003, Gholamiandekhordi et al. 2006).

3.1.2. Δεδομένα που υποβαθμίζουν τον ρόλο της τοξίνης -α στην παθογένεια της ΝΕ

Τα περισσότερα στελέχη *C. perfringens* που απομονώνονται από το γαστρεντερικό σωλήνα και τα κόπρανα των πτηνών ανήκουν στον τύπο Α, που σημαίνει ότι η μοναδική κύρια τοξίνη που παράγεται είναι η τοξίνη -α (Nauerby et al. 2003). Ωστόσο, δεν υπάρχει διαφορά στην ικανότητα και την ποσότητα παραγωγής τοξίνης -α μεταξύ στελεχών που απομονώθηκαν από υγιή πτηνά και από πτηνά με ΝΕ (Gholamiandekhordi et al. 2006).

Επίσης, η πειραματική αναπαραγωγή της ΝΕ μπορεί να γίνει μόνο από στελέχη που απομονώθηκαν από περιστατικά ΝΕ, ενώ αντίθετα στελέχη από υγιή πτηνά δεν μπορούν να αναπαράγουν το νόσημα, παρ' όλο που είναι ικανά να παράγουν τοξίνη -α (Timbermont et al. 2008). Λοιμογόνα στελέχη, τα οποία παρουσιάζουν αυθόρμητες μεταλλάξεις στο γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της τοξίνης -α (*cpa*), έχουν μειωμένη ικανότητα αναπαραγωγής της ΝΕ. Ωστόσο, τα στελέχη αυτά πιθανόν να παρουσιάζουν μεταλλάξεις και σε άλλα γονίδια πλην του *cpa*, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να αποδοθεί εξολοκλήρου η μείωση της λοιμογόνου δύναμης στην περιορισμένη παραγωγή τοξίνης -α (Thompson et al. 2006).

Το πιο σημαντικό δεδομένο στο οποίο βασίζεται η άποψη ότι η τοξίνη -α δεν αποτελεί απαραίτητο παθογόνο παράγοντα για την εκδήλωση της ΝΕ, είναι ότι στελέχη *C. perfringens*, από τα οποία αφαιρέθηκε το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της τοξίνης -α (*cpa*), διατήρησαν την ικανότητα να προκαλούν τις χαρακτηριστικές αλλοιώσεις της ΝΕ. Επίσης, τόσο το αρχικό στέλεχος όσο και το μεταλλαγμένο στέλεχος (mutant *cpa*) ήταν ικανά να αναπαράγουν το νόσημα σε πειραματικές συνθήκες (Keyburn et al. 2006).

Ένα ακόμη στοιχείο, το οποίο υποβαθμίζει σημαντικά το ρόλο της τοξίνης -α στην παθογένεια της ΝΕ, είναι η ιστοπαθολογική εικόνα των αλλοιώσεων. Κύριο χαρακτηριστικό της ιστοπαθολογικής εικόνας της ΝΕ είναι η φλεγμονή των προσβεβλημένων ιστών που συνοδεύεται από έντονη διήθηση λευκοκυττάρων (Long et al. 1974, Gholamiandekhordi et al. 2007). Αντίθετα, σε παθολογικές καταστάσεις που αποδεδειγμένα οφείλονται στην τοξίνη -α, όπως η κακοήθης γάγγραινα, δεν παρατηρείται φλεγμονή και μετανάστευση λευκοκυττάρων (Immerseel et al. 2009).

Επιπλέον, μεταλλαγμένα στελέχη *C. perfringens*, τα οποία δεν παράγουν τοξίνη -α, προκαλούν έντονη φλεγμονώδη αντίδραση και δεν μπορούν να προκαλέσουν κακοήθη γάγγραινα στους μυς. Τέλος, η ιστολογική εικόνα των τραυματισμένων ιστών στα αρχικά στάδια ανάπτυξης της ΝΕ, δεν συμβαδίζει με τις δραστηριότητες της τοξίνης -α ως φωσφολιπάση C και σφιγγομυελινάση (Olkowski et al. 2008, Immerseel et al. 2009).

3.2.1. Δεδομένα που ενισχύουν τον ρόλο της τοξίνης *netB* στην παθογένεια της ΝΕ

Πρόσφατα, περιγράφηκε μια νέα τοξίνη, που σχετίζεται με τη ΝΕ των κρεοπαραγωγών ορνιθίων, η τοξίνη *netB*. Η τοξίνη ανακαλύφθηκε κατά την προσπάθεια ανεύρεσης πρωτεϊνών από το υπερκείμενο υγρό καλλιέργειας *C. perfringens*, οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανοσολογική διέγερση και την προστασία έναντι της ΝΕ (Keyburn et al. 2008). Στελέχη *C. perfringens*, από τα οποία αφαιρέθηκε με μεθόδους γενετικής μηχανικής το υπεύθυνο γονίδιο (*netB*) για την κωδικοποίηση της τοξίνης *netB*, δεν ήταν ικανά να προκαλέσουν αλλοιώσεις ΝΕ, σε αντίθεση με τα ίδια αρχικά στελέχη τα οποία έφεραν το υπεύθυνο γονίδιο (Keyburn et al. 2008).

Η γενετική ανάλυση των στελεχών *C. perfringens*, που απομονώθηκαν από εκτροφές κρεοπαραγωγών ορνιθίων του Βελγίου και της Δανίας, έδειξε ότι οχτώ στα έντεκα στελέχη *C. perfringens* που απομονώθηκαν από πτηνά με ΝΕ έφεραν το γονίδιο *netB*, ενώ αντίθετα από τα στελέχη που απομονώθηκαν από υγιή πτηνά μόνο ένα στα τριάντα δύο έφερε το γονίδιο. Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί κατά πόσο τα στελέχη που δεν φέρουν το γονίδιο εμφανίζουν διαφορετική αλληλουχία συγκριτικά με αυτά που το φέρουν (Immerseel et al. 2009).

Ο ρόλος της τοξίνης *netB* στην παθογένεια της ΝΕ ενισχύεται από το γεγονός ότι τα στελέχη *C. perfringens*, που απομονώθηκαν μετά από πειραματική αναπαραγωγή της ΝΕ, έφεραν το γονίδιο *netB*, ενώ αντίθετα στελέχη που απομονώθηκαν από υγιή πτηνά δεν έφεραν το γονίδιο και δεν παρήγαγαν την τοξίνη (Keyburn et al. 2008). Επίσης, όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν από περιστατικά ΝΕ έφεραν το γονίδιο *netB* (Chalmers et al. 2008).

3.2.2. Δεδομένα που υποβαθμίζουν τον ρόλο της τοξίνης *netB* στην παθογένεια της ΝΕ

Παρά τα ενθαρρυντικά και εντυπωσιακά αποτελέσματα των μελετών για τη νέα τοξίνη *netB*, δεν μπορεί από μόνη της να αιτιολογήσει πλήρως την παθο-

γένεια της ΝΕ. Ορισμένα στελέχη *C. perfringens*, ικανά να προκαλέσουν ΝΕ, δεν φέρουν το γονίδιο *netB* (Keyburn et al. 2008).

Επιπρόσθετα, ένα από τα στελέχη από τα οποία αφαιρέθηκε το γονίδιο *netB*, προκάλεσε αλλοιώσεις ΝΕ στο γαστρεντερικό σωλήνα των κρεοπαραγωγών ορνιθίων. Ωστόσο, επειδή το στέλεχος που απομονώθηκε δεν ήταν ανθεκτικό στη χλωραμφαινικόλη, όπως το αρχικό που ενοφθαλμίστηκε, πιθανώς οι αλλοιώσεις να οφείλονται σε στελέχη *C. perfringens* της φυσιολογικής χλωρίδας (Keyburn et al. 2008).

Σε επιδημιολογική μελέτη στις ΗΠΑ, από περιστατικά ΝΕ απομονώθηκαν στελέχη *C. perfringens* τα οποία δεν φέρουν το γονίδιο *netB*. Επίσης, στην ίδια μελέτη απομονώθηκαν στελέχη *C. perfringens* που φέρουν το γονίδιο *netB* από υγιή ορνίθια και από απόστημα ήπατος αγελάδας (Martin and Smyth 2008).

3.3. Δεδομένα που υποβαθμίζουν τον ρόλο της τοξίνης -β2 στην παθογένεια της ΝΕ

Η ανακάλυψη της τοξίνης -β_2 πιθανώς να επηρεάσει το μέλλον της ταξινόμησης των τοξινικών τύπων του *C. perfringens*. Απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε από τους Gilbert et al. (1997) και δεν εμφανίζει ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων με καμία άλλη γνωστή τοξίνη.

Η τοξίνη -β_2, παρά το γεγονός ότι έχει ενοχοποιηθεί για την πρόκληση εντερίτιδας στον άνθρωπο (Fisher et al. 2005), στα ιπποειδή (Herholz et al. 1999), στα βοοειδή (Lebrun et al. 2007) και στο χοίρο (Jost et al. 2005), δεν φαίνεται να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεια της ΝΕ στα κρεοπαραγωγά ορνίθια (Crespo et al. 2007, Chalmers et al. 2008). Τα περισσότερα στελέχη *C. perfringens* που απομονώνονται από περιστατικά ΝΕ δεν φέρουν το γονίδιο, που είναι υπεύθυνο για την παράγωγη της τοξίνης -β_2 (cpb_2) (Chalmers et al. 2008, Jost et al. 2005). Επίσης, στελέχη *C. perfringens*, θετικά ως προς το cpb_2, απομονώνονται τόσο από υγιή πτηνά όσο και από πτηνά με ΝΕ (Crespo et al. 2007).

3.4. Νέες τοξίνες του C. perfringens που πιθανόν εμπλέκονται στην παθογένεια της ΝΕ

Με τη βοήθεια σύγχρονων μοριακών τεχνικών (φασματοφωτομετρία μάζας), μετά από μόλυνση με *C. perfringens*, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν έξι ανοσογενείς πρωτεΐνες: η τοξίνη -α, η 3 φωσφορική γλυκεραλδεΰδη, η αφυδρογονάση, η αναγωγάση της πυρουβικο-φερρεδοξίνης (ΑΠΦ), η αλδολάση της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης (ΑΔΦΦ) και η υποθετική πρωτεΐνη (ΥΠ) (Kulkarni et al. 2008).

Οι πρωτεΐνες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοποίηση των κρεοπαραγωγών ορνιθίων έναντι της ΝΕ. Και οι έξι πρωτεΐνες παρείχαν προστασία έναντι μόλυνσης με *C. perfringens*, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή εμπλοκή τους στην παθογένεια της ΝΕ. Η ανοσολογική αντίδραση έναντι κάθε μιας από τις έξι πρωτεΐνες παρείχε σημαντική προστασία έναντι ήπιας μόλυνσης με *C. perfringens*, ενώ η ανοσολογική αντίδραση της ΑΠΦ και της ΥΠ έναντι της τοξίνης -α προσέφερε προστασία ακόμα και μετά από σοβαρή μόλυνση (Kulkarni et al. 2008).

4. Συμπερασματικά για την παθογένεια της ΝΕ

Η αποτελεσματικότητα των εμβολίων ανατοξίνης -α (Lovland et al. 2004, Kulkarni et al. 2007), η υψηλή συγκέντρωση της τοξίνης τόσο στο υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας *C. perfringens* (Al-Sheikhly και Truscott 1977c) όσο και στα κόπρανα των πτηνών με ΝΕ (Gholamiandekhordi et al. 2006), καθώς επίσης και οι υψηλοί τίτλοι αντισωμάτων κατά της τοξίνης -α σε πτηνά με ΝΕ (Heier et al. 2001) υποδηλώνουν ότι η τοξίνη -α σίγουρα διαδραματίζει κάποιο ρόλο, πρωταγωνιστικό ή μη, στην παθογένεια της ΝΕ (Kulkarni et al. 2007, Cooper et al. 2009).

Για την ερμηνεία της παθογένειας της ΝΕ έχουν ανακαλυφθεί και προταθεί νέες τοξίνες (Keyburn et al. 2008, Kulkarni et al. 2008), χωρίς ωστόσο καμία από αυτές να μπορεί *per se* να την αιτιολογήσει πλήρως (Cooper and Songer 2009). Είναι πιθανό στην πολύπλοκη παθογένεια της ΝΕ να εμπλέκονται και άλλοι παθογόνοι παράγοντες, όπως υδρολυτικά ένζυμα ή ακόμη και τοξίνες, οι οποίες δεν έχουν ακόμη αναγνωριστεί (Immerseel et al. 2009). Για παράδειγμα, υπάρχει η αντίληψη ότι στα αρχικά στάδια της ΝΕ τα πρωτεολυτικά ένζυμα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, προκαλώντας ρήξη του υλικού της βασικής μεμβράνης και της πλευρικής περιοχής των εντεροκυττάρων. Στην πραγματικότητα, κατά την εξέλιξη της ΝΕ το εξωκυτταρικό υλικό είναι αποδιοργανωμένο ή μπορεί ακόμη και να απουσιάζει (Olkowski et al. 2008).

Τα νεοτέρα δεδομένα κάνουν επιτακτική την ανάγκη για επαναξιολόγηση του ρόλου της τοξίνης -α και των μελετών που βασίστηκαν σε αυτήν στην παθογένεια της ΝΕ και ταυτόχρονα ανοίγουν το δρόμο για την αναζήτηση και άλλων παραγόντων που εμπλέκονται στην παθογένεια της ΝΕ. ■

REFERENCES - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Al-Sheikhly F, Truscott R (1977a) The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of broth cultures of Clostridium perfringens into the duodenum. Avian Diseases, 21:230-240.

Al-Sheikhly F, Truscott R (1977b) The interaction of Clostridium perfringens and its toxins in the production of necrotic enteritis of chickens. Avian Diseases, 21:256-263.

Al-Sheikhly F, Truscott R (1977c) The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of crude toxins of Clostridium perfringens into the duodenum. Avian Diseases, 21:241-255.

Apajalahti J, Kettunen A, Graham H (2004) Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. World's Poultry Science Journal, 60:223-232.

Barbara A, Trinh H, Glock R, Songer J (2008) Necrotic enteritis-producing strains of Clostridium perfringens displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. Veterinary Microbiology, 126:377-382.

Bates J, Jordens J, Selkon J (1993) Evidence for an animal origin of vancomycin resistant enterococci. Lancet, 342:490-491.

Casewell M, Friis C, Granell E, Mcmullin P, Phillips I (2003) The European ban on growth-promoting antibiotics and its consequences for human and animal health. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 52:159-161.

Chalmers G, Bruce H, Hunter D, Parreira V, Kulkarni R, Jiang Y, Prescott J, Boerlin P (2008) Multilocus sequence typing analysis of Clostridium perfringens isolates from necrotic enteritis outbreaks in broiler chicken populations. Journal of Clinical Microbiology, 46:3957-3964.

Cooper K, Songer G (2009) Necrotic enteritis in chickens: A paradigm of enteric infection by Clostridium perfringens type A. Anaerobe, 15:55-60.

Cooper K, Trinh H, Songer G (2009) Immunization with recombinant alpha toxin partially protects broiler chicks against experimental challenge with Clostridium perfringens. Veterinary Microbiology, 133:92-97.

Crespo R, Fisher D, Shivaprasad H, Fernández-Miyakawa M, Uzal F (2007) Toxinotypes of Clostridium perfringens isolated from sick and healthy avian species. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 19:329-333.

Dahiya J, Hoehler D, Wilkie D, Van Kessel A, Drew M (2005) Dietary glycine concentration affects intestinal Clostridium perfringens and lactobacilli populations in broiler chickens. Poultry Science, 84:1875-1885.

Dibner J, Richards J (2005) Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. Poultry Science. 84:634-643.

Drew M, Syed N, Goldade B, Laarveld B, Van Kessel A (2004) Effects of dietary protein source and level on intestinal populations of Clostridium perfringens in broiler chickens. Poultry Science, 83:414-420.

Drouin P (1999) Filieres Avicoles, 78-79.

Engstrom B, Fermer C, Lindberg A, Saarinen E, Baverud V, Gunnarsson A (2003) Molecular typing of isolates of Clostridium perfringens from healthy and diseased poultry. Veterinary Microbiology, 94:225-235.

Fisher D, Miyamoto K, Harrison B, Akimoto S, Sarker M, McClane B (2005). Association of beta2 toxin production with Clostridium perfringens type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. Mol Microbiol, 56:747-762.

Fukata T, Hadate Y, Baba E, Uemura T, Arakawa A (1988) Influence of Clostridium perfringens and its toxin in germ-free chickens. Research in Veterinary Science, 44:68-70.

Gaskins H, Collier C, Anderson D (2002) Antibiotics as growth promotants:Mode of action. Animal Biotechnology, 13:29-42.

Gholamiandekhordi A, Ducatelle R, Heyndrickx M, Haesebrouck F, Van Immerseel F (2006) Molecular and phenotypical characterization of Clostridium perfringens isolates from poultry flocks with different disease status. Veterinary Microbiology, 113:143-152.

Gholamiandekhordi A, Timbermont L, Lanckriet A, Van Den Broeck W, Pedersen K, Dewulf J, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F (2007) Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. Avian Pathology, 36:375-382.

Gilbert R, Jiménez J, Chen S, Andrew P, Saibil H (2000) Structural basis of pore formation by cholesterol-binding toxins. International Journal of Medicine Microbiology, 290:389-394.

Heier B, Lovland A, Soleim K, Kaldhusdal M, Jarp J (2001) A field study of naturally occurring specific antibodies against Clostridium perfringens α toxin in Norwegian broiler flocks. Avian Diseases, 45:724-732.

Herholz C, Miserez R, Nicolet J, Frey J, Popoff M, Gibert M, Gerber H, Straub R (1999) Prevalence of beta2-toxigenic Clostridium perfringens in horses with intestinal disorders. Journal of Clinical Microbiology, 37:358-61.

Hoang T, Hong H, Clark G, Titball R, Cutting S (2008) Recombinant Bacillus subtilis expressing the Clostridium perfringens alpha toxoid is a candidate orally delivered vaccine against necrotic enteritis. Infection and Immunity, 76:5257-5265.

Hofacre C, Beacorn C, Collett S, Mathis G (2003) Using competitive exclusion, mannan-oligosaccharide and other intestinal products to control necrotic enteritis. Journal of Applied Poultry Research, 12:60-64.

Immerseel F, De Buck J, Pasmans F, Huyghebaert G, Haesebrouck F, Ducatelle R (2004) Clostridium perfringens in poultry: An emerging threat for animal and public health. Avian Pathology, 33:537-549.

Immerseel F, Rood J, Moore R, Titball R (2009) Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. Trends in Microbiology, 17:32-36.

Johnson C (1989) Clostridium perfringens food poisoning. In: Anaerobic infections in humans. Academic Press. London, UK, pp 629-638.

Jost B, Billington HSJ, Trinh HT, Bueschel DM, Songer JG (2005). Atypical cpb^2 genes, encoding beta2-toxin in Clostridium perfringens isolates of non-porcine origin. Infect. Immun, 73:652-6.

Juskiewicz J, Zdunczyck Z, Jankowski J (2004) Selected parameters of gastrointestinal tract metabolism of turkeys fed diets with flavomycin and different inulin content. World's Poultry Science Journal, 60:177-185.

Kaldhusdal M, Skjerve E (1996) Association between cereal contents in the diet and incidence of necrotic enteritis in broiler chickens in Norway. Preventive Veterinary Medicine, 28:1-16.

Kaldhusdal M, Schneitz C, Hofshagen M, Skjerve E (2001) Reduced incidence of Clostridium perfringens-associated lesions and improved performance in broiler chickens treated with normal intestinal bacteria from adult fowl. Avian Diseases, 45:149-156.

Keyburn A, Boyce J, Vaz P, Bannam T, Ford M, Parker D, Rubbo A, Rood J, Moore R (2008) NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by Clostridium perfringens. PLoS Pathogen, 4:e26.

Keyburn A, Sheedy S, Ford M, Williamson M, Awad M, Rood J, Moore R (2006) Alpha-toxin of Clostridium perfringens is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. Infection and Immunity, 74:6496-6500.

Knarreborg A, Simon M, Engberg R, Jensen B, Tannock G (2002) Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. Applied and Environmental Microbiology, 68:5918-5924.

Kulkarni R, Parreira V, Sharif S, Prescott J (2007) Immunization of broiler chickens against Clostridium perfringens-induced necrotic enteritis. Clinical and Vaccine Immunollogy, 14:1070-1077.

Kulkarni R, Parreira V, Sharif S, Prescott J (2008) Oral immunization of broiler chickens against necrotic enteritis with an attenuated Salmonella vaccine vector expressing Clostridium perfringens antigens. Vaccine, 26:4194-4203.

La Ragione R, Woodward M (2003) Competitive exclusion by Bacillus subtilis spores of Salmonella enterica serotype enteritidis and Clostridium perfringens in young chickens. Veterinary Microbiology, 94:245-256.

Lan Y, Verstegen M, Tamminga S, Williams B (2005) The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. World's Poultry Science Journal, 61:95-104.

Lebrun M, Filée P, Mousset B, Desmecht D, Galleni M, Mainil JG and Linden A (2007) The expression of Clostridium perfringens consensus b2 toxin is associated with bovine enterotoxaemia syndrome. Veterinary Microbiology, 120:151-157.

Long J (1973) Necrotic enteritis in broiler chickens. I. A review of the literature and the prevalence of the disease in Ontario. Canadian Journal of Comparative Medicine, 37:302-308.

Long J, Pettit J, Barnum D (1974) Necrotic enteritis in broiler chickens. II. Pathology and proposed pathogenesis. Canadian Journal of Comparative Medicine, 38:467-474.

Lovland A, Kaldhusdal M (2001) Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of Clostridium perfringens-associated hepatitis. Avian Pathology, 30:73-81.

Lovland A, Kaldhusdal M, Reitan L (2003) Diagnosing Clostridium perfringens associated necrotic enteritis in broiler flocks by an immunoglobulin G antialpha- toxin enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Pathology, 32:527-534.

Lovland A, Kaldhusdal M, Redhead K, Skjerve E, Lillehaug A (2004) Maternal vaccination against subclinical necrotic enteritis in broilers. Avian Pathology, 33:83-92.

Lu J, Hofacre C, Smith F, Lee M (2008) Effects of feed additives on the development on the ileal bacterial community of the broiler chicken. Animal, 2:669-676.

Martin T, Smyth J (2009) Prevalence of netB among some clinical isolates of Clostridium perfringens from animals in the United States. Vet Microbiol, 136:202-205.

Mateos G, Lazaro R, Gracia M (2002) The feasibility of using nutritional modifications to replace drugs in poultry feeds. Journal of Applied Poultry Research, 11:437-452.

McDevitt R, Brooker J, Acamovic T, Sparks N (2006) Necrotic enteritis: a continuing challenge for the poultry industry. World's Poultry Science Journal, 62:221-247.

Nauerby B, Pedersen K, Madsen M (2003) Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among Clostridium perfringens isolates from chickens. Veterinary Microbiology,. 94:257-266.

Niewold T (2007) The non-antibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. Poultry Science, 86:605-609.

Olkowski A, Wojnarowicz C, Chirino-Trejo M, Laarveld B, Sawicki G (2008) Sub-clinical necrotic enteritis in broiler chickens:novel etiological consideration based on ultra-structural and molecular changes in the intestinal tissue. Research in Veterinary Science, 85:543-553.

Shane S (2004) Update on the poultry disease situation in the USA. Poultry International, 43:10-15.

Thompson D, Parreira V, Kulkarni R, Prescott J (2006) Live attenuated vaccine-based control of necrotic enteritis of broiler chickens. Veterinary Microbiology, 113:25-34.

Timbermont L, Lanckriet A, Gholamiandehkordi A, Pasmans F, Martel A, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F (2008) Origin of Clostridium perfringens isolates determines the ability to induce necrotic enteritis in broilers. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. In press.

Titball R, Naylor C, Basak A (1999) The Clostridium perfringens -α toxin. Anaerobe, 5:51-64.

Van der Sluis W (2000) Clostridial enteritis is an often underestimated problem. World Poultry, 16:42-43.

Wilkie D, Van Kessel A, White L, Laarveld B, Drew M (2005) Dietary amino acids affect intestinal Clostridium perfringens populations in broiler chickens. Canadian Journal of Animal Science, 85:185-193.

Williams R (2005) Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: Rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. Avian Pathology, 34:159-180.

Zekarias B, Mo H, Curtiss R (2008) Recombinant attenuated Salmonella enterica serovar typhimurium expressing the carboxy-terminal domain of alpha toxin from Clostridium perfringens induces protective responses against necrotic enteritis in chickens. Clinical Vaccine Immunology, 15:805-16.