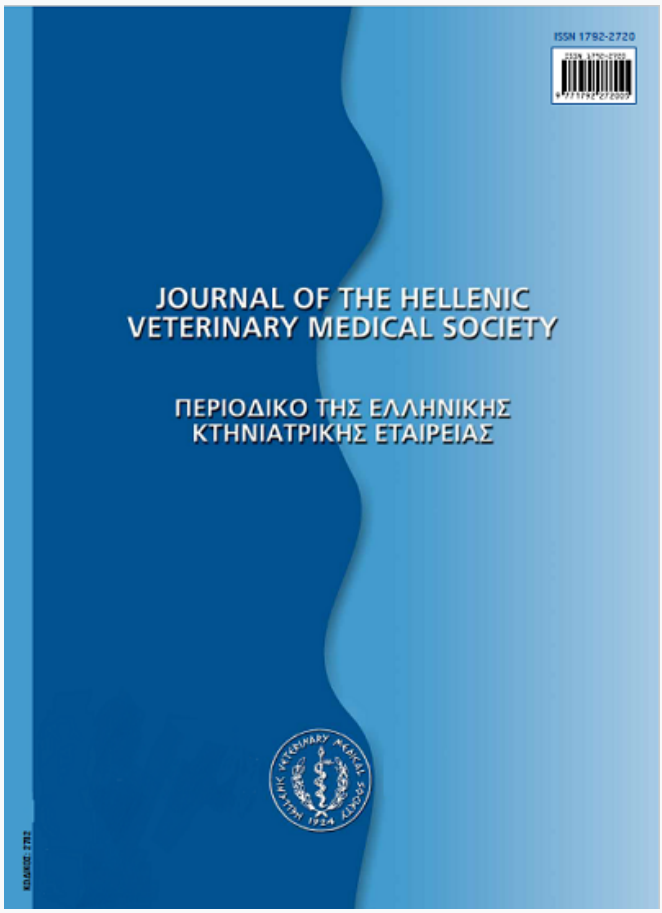
ePublishing

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 61, No 3 (2010)



Update on the toxins of Clostridium perfringens and their actions

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

doi: 10.12681/jhvms.14892

To cite this article:

TSIOURIS (Β.Σ. ΤΣΙΟΥΡΗΣ) V. S., GEORGOPOULOU (ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΥ) I., & PETRIDOU (Ε. ΠΕΤΡΙΔΟΥ) E. (2017). Update on the toxins of Clostridium perfringens and their actions. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *61*(3), 241–252. https://doi.org/10.12681/jhvms.14892

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 16/02/2026 08:51:42

JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY 2010, 61(3): 241-252
ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2010, 61(3): 241-252

Review article
Ανασκόπηση

Update on the toxins of *Clostridium perfringens* and their actions

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

[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 τις τοξίνες του *Clostridium perfringens* και τις δράσεις τους

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. *Clostridia* appeared as a distinct class, approximately 2.7 billion years ago, before the initial formation of oxygen. *Clostridium perfringens* is widely distributed throughout the environment due to its ability to form spores. Furthermore, it is a member of intestinal microbiota in animals and human. In 2002, the complete genome of *C. perfringens* strain 13 was published. Genomic analysis has revealed that *C. perfringens* lacks the genetic machinery to produce 13 essential amino acids and it obtains these in vivo via the action of its toxins. Toxins of *C. perfringens* can be divided into major, minor and enterotoxin. *C. perfringens* strains are classified into five toxinotypes (A, B, C, D and E), based on the production of four major toxins. Alpha toxin is the best and most studied major toxin of *C. perfringens* and it was the first bacterial toxin established to possess enzymatic activity. It has haemolytic, necrotic and cytolytic activity, it can lyse platelets and leukocytes and it can damage fibroblasts and muscle cell membranes. Expression of *cpa* gene, which is responsible for the production of alpha toxin by *C. perfringens*, is down-regulated in the normal healthy gut, but it is upregulated to initiate enteric disease in response to an environmental signal. *C. perfringens* appears to be regulated in a *quorum sensing* manner, using oligopeptides, AI-2 or both, to regulate expression of the *cpa* gene, and thus the synthesis of alpha toxin. Beta toxin is recognized as an important agent in necrotic enteritis of humans and it is the second most lethal *C. perfringens* toxin following epsilon toxin. Beta toxin is a membrane spanning protein that oligomerizes to form channels in susceptible cells or it primarily acts as a neurotoxin. Epsilon toxin is the most potent of the *C. perfringens* toxins and the third most potent neurotoxin from the *Clostridium* spp., following botulinum and tetanus toxins. Epsilon toxin of *C. perfringens* type D causes enterotoxaemia and pulpy kidneys disease of lambs. Iota toxin causes disruption of the actin cytoskeleton and cell barrier integrity and it is the less toxic of the major toxins of *C. perfringens*. Although *C. perfringens* enterotoxin is not classified as one of the major toxins of *C. perfringens*, it is the third most common cause of food poisoning in industrialized nations. It is not secreted by the cells of growing bacteria, but it is released only with the sporulation of *C. perfringens*. Not all strains of *C. perfringens* carry the *cpe* gene, which is responsible for the production of enterotoxin. Theta toxin is a pore-forming cytolysin that can lyse red blood

Correspondence: Tsiouris V. S.
Unit of Avian Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki
Staurou Voutyra 11, 546 27 Thessaloniki, Greece
Tel: 0030 2310 994555, Gsm: 0030 6974370342, 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.: 6974370342, Fax: 2310 994557, Email: biltsiou@vet.auth.gr

Submission date: 23.12.2009
Approval date: 30.03.2010

Ημερομηνία υποβολής: 23.12.2009
Ημερομηνία εγκρίσεως: 30.03.2010

cells. It is produced by all types of *C. perfringens*. Together with alpha-toxin, theta-toxin modulates the host inflammatory response. β_2 toxin is a pore forming toxin which is involved in necrotic enteritis of swine and horse, in haemorragic enteritis of bovine in diarrhea cases of dogs and along with enterotoxin in diarrhea cases of humans. Recently, -NetB, a novel toxin that is associated with broiler necrotic enteritis, has been described. The mechanism of its action seems to involve the formation of small hydrophilic pores. Other toxins of *C. perfringens* include λ-toxin, δ-toxin, μ-toxin, ν-toxin, κ-toxin, α-clostripain like protease and neuraminidase/sialidase. These toxins can act as enzymes, while many of them can act synergically or supplementally with major pore forming toxins. Potentially, *C. perfringens* might produce more toxins, which have not been identified. Finally, the actions of *C. perfringens* toxins, major or minor, in some diseases have not been figured out.

Keywords: *Clostridium perfringens*, toxins

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Τα κλωστρίδια εμφανίστηκαν ως ξεχωριστή κλάση πριν από το σχηματισμό του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα της γης, περίπου πριν από 2,7 δισεκατομμύρια χρόνια. Η ικανότητα του *C. perfringens* να σπορογονεί, το καθιστά ως το πιο διαδεδομένο παθογόνο βακτήριο στη φύση. Ανευρίσκεται σε κάθε πιθανή περιοχή πάνω στη γη, με εξαίρεση την έρημο της Σαχάρας. Επίσης, αποτελεί μέρος της φυσιολογικής εντερικής μικροβιακής χλωρίδας των θερμόαιμων ζώων και του ανθρώπου. Το 2002 ολοκληρώθηκε η διαδικασία ανάγνωσης της αλληλουχίας του γονιδιώματος του στελέχους 13 *C. perfringens*. Από το *C. perfringens*, σε αντίθεση με τα άλλα είδη του γένους, απουσιάζει μεγάλος αριθμός γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση 13 αμινοξέων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην μπορεί να αναπτυχθεί σε περιβάλλον όπου δεν υπάρχουν τα παραπάνω αμινοξέα. Ωστόσο, *in vivo*, με τη βοήθεια της δράσης των τοξινών του, προκαλεί λύση των κυττάρων και καταστροφή των ιστών, με στόχο την αξιοποίησή τους ως πηγή ενέργειας και αμινοξέων. Οι τοξίνες του *C. perfringens* ταξινομούνται σε κύριες (-α, -β, -ε και -ι), σε δευτερεύουσες και σε εντεροτοξίνη. Το *C. perfringens*, με βάση την παραγωγή των κύριων τοξινών του, ταξινομείται σε πέντε τοξινικούς τύπους: A, B, C, D και E. Η τοξίνη -α είναι η περισσότερο και καλύτερα μελετημένη από τις κύριες τοξίνες του *C. perfringens*. Επίσης, είναι η πρώτη βακτηριακή τοξίνη για την οποία αποδείχτηκε ότι εκδηλώνει ενζυματική δραστηριότητα. Εκδηλώνει αιμολυτική, νεκρωτική και κυτταρολυτική δράση, προκαλεί λύση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων και βλάβη στις κυτταρικές μεμβράνες των ινοβλαστών και των μυϊκών κυττάρων. Η έκφραση του γονιδίου *cpa* και, κατ' επέκταση, η σύνθεση της τοξίνης -α του *C. perfringens,* φαίνεται να ρυθμίζεται με το σύστημα *quorum sensing*, χρησιμοποιώντας ολιγοπεπτίδια, αυτεπαγωγείς ή και τα δύο. Το επίπεδο έκφρασης του *cpa* από το *C. perfringens* στο γαστρεντερικό σωλήνα των υγιών πτηνών είναι χαμηλό, ενώ στα πτηνά που εκδηλώνουν νεκρωτική εντερίτιδα αυξάνεται. Η τοξίνη -β είναι ο κύριος παράγοντας που εμπλέκεται στη νεκρωτική εντερίτιδα του ανθρώπου. Είναι η δεύτερη πιο θανατηφόρα τοξίνη του *C. perfringens* μετά την τοξίνη -ε. Ασκεί την παθογόνο της δράση σχηματίζοντας πόρους με ολιγομερισμό της κυτταρικής μεμβράνης ή εκδηλώνει δράση νευροτοξίνης. Η τοξίνη -ε είναι η πιο ισχυρή κλωστριδιακή νευροτοξίνη μετά την τοξίνη της αλλαντίασης και του τετάνου. Αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα της εντεροτοξιναιμίας και της νόσου του πολτώδους νεφρού στα πρόβατα. Η τοξίνη -ι είναι μέλος των κλωστριδιακών δυαδικών τοξινών που τροποποιούν τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Είναι η λιγότερο τοξική από τις κύριες τοξίνες του *C. perfringens*. Η εντεροτοξίνη αποτελεί την τρίτη σε σειρά συχνότητας αιτία τροφογενούς δηλητηρίασης στους ανθρώπους. Απελευθερώνεται από το *C. perfringens* κατά τη σπορογονία του και όχι κατά την ανάπτυξή του. Δεν φέρουν όλα τα στελέχη *C. perfringens* το γονίδιο (*cpe*), που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της εντεροτοξίνης. Η τοξίνη -θ είναι μια αιμολυσίνη. Παράγεται και από τους πέντε τοξινικούς τύπους *C. perfringens*. Προκαλεί πόρους στην κυτταρική μεμβράνη, ενώ μαζί με την τοξίνη -α, ρυθμίζει τη φλεγμονώδη αντίδραση στον ξενιστή. Η τοξίνη -β_2 ασκεί την παθογόνο της δράση μέσω της πρόκλησης πόρων στις κυτταρικές μεμβράνες. Έχει ενοχοποιηθεί για τη νεκρωτική εντερίτιδα του χοίρου, τη νεκρωτική εντερίτιδα του αλόγου, την αιμορραγική εντερίτιδα των βοοειδών, περιστατικά διάρροιας στο σκύλο και, μαζί με την εντεροτοξίνη, για περιστατικά διάρροιας στους ανθρώπους. Πρόσφατα, περιγράφηκε μια νέα τοξίνη που σχετίζεται με τη νεκρωτική εντερίτιδα των κρεοπαραγωγών ορνιθίων, η τοξίνη -NetB, η οποία εκδηλώνει την παθογόνο της δράση με την πρόκληση μικρών υδροφιλικών πόρων στην κυτταρική μεμβράνη. Άλλες τοξίνες είναι η τοξίνη -λ, η τοξίνη -δ, η τοξίνη -μ, η τοξίνη -ν, η τοξίνη -κ, η α-clostripain like πρωτεάση και η νευραμινιδάση/σιαλιδάση (Nam). Οι τοξίνες αυτές δρουν ως ένζυμα, ενώ πολλές δευτερεύουσες τοξίνες δρουν συνεργικά ή συμπληρωματικά με τις κύριες πορογόνες τοξίνες. Ενδεχομένως να παράγονται και άλλες τοξίνες από το *C. perfringens*, οι οποίες να μην έχουν ταυτοποιηθεί ακόμη. Τέλος, οι δράσεις των τοξινών, κύριων και δευτερευουσών, σε ορισμένα νοσήματα δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί.

Λέξεις ευρετηρίασης: *Clostridium perfringens*, τοξίνες

1. Εισαγωγή

Τα κλωστρίδια εμφανίστηκαν ως ξεχωριστή κλάση πριν από το σχηματισμό του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα της γης, περίπου πριν από 2,7 δισεκατομμύρια χρόνια. Τα περισσότερα είδη υπάρχουν σαπροφυτικά στη φύση, στα ζώα, σε σηπόμενα υλικά και είναι ακίνδυνα. Περισσότερα από 25 είδη είναι δυνητικά παθογόνα, ενώ 13 από αυτά χαρακτηρίζονται ως ιδιαίτερα παθογόνα. Τα τελευταία 13 είδη παράγουν 59 διαφορετικές τοξίνες, με σημαντικότερες την τοξίνη που προκαλεί τον τέτανο και την τοξίνη της αλλαντίασης, καθιστώντας το *Clostridium* spp. ως το πιο τοξινογόνο βακτηριακό γένος (Collins et al. 1994, Johansson 2006).

2.1. *Clostridium* spp.

Το γένος *Clostridium* αποτελείται από μεγάλα, ραβδιόμορφα, υποχρεωτικά αναερόβια, σπορογόνα, Gram- θετικά βακτήρια (Quinn et al. 1994, Cato et al. 1986) και περιλαμβάνει περισσότερα από 195 είδη (http://www.bacterio.cict.fr/c/clostridium.html). Τα περισσότερα είδη προκαλούν ζύμωση σε σάκχαρα ή σε αμινοξέα ή και στα δύο (Brock et al. 1994). Στα τελικά προϊόντα της ζύμωσης περιλαμβάνονται η ακετόνη, το βουτυρικό οξύ, η βουτανόλη και άλλες αλκοόλες, τα οποία προσδίδουν την οσμή ταγγισμένου βουτύρου στο υπόστρωμα ανάπτυξης (Biberstein 1990).

Τα κλωστρίδια, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που είναι παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα, εμφανίζουν μεγάλη διασπορά στη φύση. Αυτό οφείλεται στην ικανότητά τους να σπορογονούν, κάνοντάς τα ιδιαίτερα ανθεκτικά σε δυσμενείς συνθήκες περιβάλλοντος, όπως είναι οι ακραίες τιμές θερμοκρασίας και pH, η έλλειψη οξυγόνου κ.ά. (Johansson 2006).

Το γένος *Clostridium* κατατάσσεται στο βασίλειο *Bacteria*, στο φύλο *Firmicutes*, στην κλάση *Clostridia*, στην τάξη *Clostridiales* και στην οικογένεια *Clostridiaceae* (Johansson 2006).

2.2. *Clostridium perfringens*

Η απομόνωση του *C. perfringens* έγινε για πρώτη φορά από τον William H. Welch το 1890, από έναν ασθενή, ο οποίος πέθανε 8 ώρες νωρίτερα (Johansson 2006). Κατά τη μικροσκοπική εξέταση, περιέγραψε ένα βακτήριο που έμοιαζε με το βάκιλλο του άνθρακα, αλλά είχε στρογγυλεμένα άκρα και βρισκόταν πάντα σε ζεύγη ή μεμονωμένα και ποτέ σε αλυσίδες. Προς τιμή του επιστήμονα που το ανακάλυψε και λόγω των μορφολογικών του χαρακτηριστικών, ονομάστηκε αρχικά *Bacillus welchii*, στη συνέχεια μετονομάστηκε σε *Clostridium welchii* και αργότερα σε *Clostridium perfringens* (Johansson 2006).

Το *C. perfringens* είναι σχετικά μεγάλο (1,3-1,9 0,6-2,4μm), ανθεκτικό σε μικρές ποσότητες ατμοσφαιρικού οξυγόνου, ευθύγραμμο, ραβδιόμορφο Gram-θετικό βακτήριο (Hatheway 1990). Κινείται με τη βοήθεια λαχνών τύπου IV (Varga et al. 2006) ή είναι ακίνητο (Biberstein 1990). Στο αιματούχο υπόστρωμα σχηματίζει κυκλικές, λείες και στιλπνές αποικίες, οι οποίες περιβάλλονται από χαρακτηριστική διπλή ζώνη αιμόλυσης. Η εσωτερική ζώνη πλήρους αιμόλυσης οφείλεται στην τοξίνη -θ, ενώ η εξωτερική ζώνη ατελούς αιμόλυσης οφείλεται στην τοξίνη -α (Quinn et al. 1994).

Είναι μεσόφιλο βακτήριο και αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 12-50 °C, με ιδανικό εύρος ανάπτυξης μεταξύ 37-45 °C (Quinn et al. 1994, Johansson 2006). Η θερμοκρασία των 45 °C χρησιμοποιείται για την απομόνωση του βακτηρίου από μικτές καλλιέργειες, επειδή σε αυτήν τη θερμοκρασία αναπτύσσεται πολύ πιο γρήγορα (χρόνος γενεάς 8-10 λεπτών) από τα άλλα βακτήρια που συνυπάρχουν (Hatheway 1990). Οι σπόροι του είναι ιδιαίτερα ανθεκτικοί στην υψηλή θερμοκρασία. Η ανθεκτικότητα αυτή επηρεάζεται τόσο από γενετικούς παράγοντες, όσο και από περιβαλλοντικούς, όπως το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσεται (McClane 2007).

Ρευστοποιεί τη ζελατίνη και προκαλεί ζύμωση στη γλυκόζη, τη λακτόζη, τη μαλτόζη και τη σουκρόζη, αλλά όχι στη μαννιτόλη. Τα κύρια προϊόντα της ζύμωσης είναι το ακετοξικό και το βουτυρικό οξύ. Λόγω της ζύμωσης της λακτόζης, της παραγωγής αερίων και της πήξης, αλλά όχι της πέψης της καζεΐνης, παρατηρείται το φαινόμενο της stormy ζύμωσης του γάλακτος (Hatheway 1990, Wages and Opengart 2003). Τα περισσότερα στελέχη είναι ευαίσθητα στις πενικιλλίνες, αλλά ανθεκτικά στις αμινογλυκοσίδες (Krieg 1984).

Η μέγιστη ανάπτυξη του *C. perfringens* παρατηρείται σε pH 6-7. Ωστόσο, πολλά στελέχη είναι ικανά να αναπτύσσονται σε pH που κυμαίνεται από 5 έως 8,3. Η τιμή του δυναμικού οξειδοαναγωγής (E_h) που απαιτείται για την έναρξη της ανάπτυξης του *C. perfringens* εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως το pH, ενώ η χαμηλότερη τιμή ενεργού ύδατος (a_w) στην οποία αναπτύσσεται είναι 0,93. Η ανάπτυξη του *C. perfringens* αναστέλλεται σε περιβάλλον 6-8%

NaCl και 10.000 ppm $NaNO_3$ ή 400 ppm $NaNO_2$. Ωστόσο, με την ταυτόχρονη δράση και άλλων παραγόντων, όπως την υψηλή θερμοκρασία, το όξινο pH, τα αντιβιοτικά κ.ά., η ανάπτυξη του *C. perfringens* μπορεί να ανασταλεί και σε περιβάλλον με μικρότερες συγκεντρώσεις των παραπάνω αλάτων (McClane 2007).

Η ικανότητα του *C. perfringens* να σπορογονεί, το καθιστά ως το πιο διαδεδομένο παθογόνο βακτήριο στη φύση (Songer 1996). Ανευρίσκεται σε κάθε πιθανή περιοχή πάνω στη γη, με εξαίρεση την έρημο της Σαχάρας. Συγκεκριμένα, απομονώνεται από το έδαφος, τις υδατοσυλλογές και τους ιστούς που βρίσκονται σε κατάσταση αποσύνθεσης. Επίσης, αποτελεί μέρος της φυσιολογικής εντερικής μικροβιακής χλωρίδας των θερμόαιμων ζώων και του ανθρώπου (Rood and Cole 1991, Petit et al. 1999).

Το 2002 ολοκληρώθηκε η διαδικασία ανάγνωσης της αλληλουχίας του γονιδιώματος του στελέχους 13 *C. perfringens*. Το χρωμόσωμά του αποτελείται από 3.031.430 ζεύγη βάσεων, 2.660 περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, 10 rRNA γονίδια και η περιεκτικότητά του σε γουανίνη-κυτοσίνη (G+C) είναι 28% (Shimizu et al. 2002). Η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδιώματος του *C. perfringens* παρείχε τη δυνατότητα καλύτερης μελέτης των μηχανισμών που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του. Συγκεκριμένα, απαντάται μια σειρά γονιδίων, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη γλυκοσυλίωση και το μεταβολισμό του γλυκογόνου. Δεν υπάρχουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες να εμπλέκονται στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος, όπως είναι τυπικό για τα αναερόβια βακτήρια. Για το λόγο αυτό, τα κλωστρίδια προκαλούν ζύμωση στο πυρουβικό οξύ και παράγεται ακετυλο-συνένζυμο Α (acetyl-CoA), υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα. Η παραγωγή αυτών των αερίων συμβάλλει στη διατήρηση του αναερόβιου περιβάλλοντος, το οποίο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του *C. perfringens* (Shimizu et al. 2002).

Κύρια πηγή ενέργειας για το *C. perfringens* αποτελεί η αναερόβια γλυκοσυλίωση όπου το πυρουβικό οξύ μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ και ακετυλοσυνένζυμο Α και στη συνέχεια σε αιθανόλη, οξικό οξύ και βουτυρικό οξύ. Το *C. perfringens* χρησιμοποιεί πολλά σάκχαρα ως υπόστρωμα άνθρακα με τη βοήθεια διαφόρων ενζύμων και με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η ανάπτυξή του (Shimizu et al. 2002).

Το *C. perfringens*, σε αντίθεση με τα άλλα είδη του γένους, δεν διαθέτει μεγάλο αριθμό γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση 13 αμινοξέων (Petit et al. 1999, Cooper and Songer 2009). Συγκεκριμένα, απουσιάζουν τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της αργινίνης, της βαλίνης, της λευκίνης, της ισολευκίνης, των αρωματικών αμινοξέων, του γλουταμινικού οξέος, της ιστιδίνης, της λυσίνης, της μεθειονίνης, της σερίνης και της θρεονίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην μπορεί να αναπτυχθεί σε περιβάλλον όπου δεν υπάρχουν τα παραπάνω αμινοξέα. Ωστόσο, *in vivo*, με τη βοήθεια της δράσης των εξωτοξινών του, προκαλεί λύση των κυττάρων και καταστροφή των ιστών, με στόχο την αξιοποίησή τους ως πηγή ενέργειας και αμινοξέων (Cooper and Songer 2009).

2.3. Τοξίνες του *C. perfringens*

Τα παθογόνα στελέχη *C. perfringens* δεν έχουν τη δυνατότητα να εισβάλουν στα κύτταρα του ξενιστή, αλλά αναστέλλουν βασικές λειτουργίες στα κύτταρα-στόχος. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δράση των τοξινών του, οι οποίες προκαλούν κυτταρική βλάβη με τις ενζυματικές τους δραστηριότητες και τις λυτικές τους ιδιότητες (Frey and Vileie 2003). Πολλά είδη βακτηρίων έχουν την ικανότητα να παράγουν τοξίνες, αλλά κανένα τόσες πολλές όσες το *C. perfringens* (Hatheway 1990). Παράγει τουλάχιστον 17 τοξικές ή δυνητικά τοξικές εξωπρωτεΐνες, οι οποίες μπορεί να έχουν αθροιστική ή συνεργική δράση προκαλώντας διάφορες παθολογικές καταστάσεις στους ξενιστές (Songer 1996).

Οι τοξίνες του *C. perfringens* μπορούν να ταξινομηθούν σε κύριες, σε δευτερεύουσες και σε εντεροτοξίνη. Οι κύριες τοξίνες είναι η άλφα (-α), η βήτα (-β), η έψιλον (-ε) και η γιώτα (-ι), όλες δυνητικά θανατηφόρες, ανάλογα με τον ξενιστή. Η εντεροτοξίνη προκαλεί επιθηλιακή βλάβη. Όλες οι υπόλοιπες τοξίνες κατατάσσονται στην κατηγορία των δευτερευουσών τοξινών (Sakurai et al. 1997, Gatsos 2007). Ανάλογα με την παραγωγή των τεσσάρων κύριων τοξινών (-α, -β, -ε και -ι), τα είδη του *C. perfringens* ταξινομούνται σε πέντε τοξινικούς τύπους: A, B, C, D και E (Πίνακας 1). Ο τύπος Α είναι ο επικρατέστερος και ο πιο διαδεδομένος και παράγει μόνο την τοξίνη -α. Ο τύπος Β παράγει τις τοξίνες -α, -β και -ε, ο τύπος C τις τοξίνες -α και -β, ο τύπος D τις τοξίνες -α και -ε και ο τύπος E τις τοξίνες -α και -ι. Όλοι οι τύποι είναι ικανοί να παράγουν τοξίνη -α, σε μικρές ή μεγάλες ποσότητες (Brooks et al. 1957, Songer 1996).

Table 1. Classification of *C. perfringens* into toxinotypes and production of four major toxins.
Πίνακας 1. Ταξινόμηση του *C. perfringens* σε τοξινικούς τύπους και παραγωγή των κύριων τοξινών τους (Brown et al. 2007).

ΤΥΠΟΣ *C. perfringens*	ΤΟΞΙΝΕΣ Άλφα (-α)	Βήτα (-β)	Έψιλον (-ε)	Ιώτα (-ι)
A	++	–	–	–
B	+	++	+	–
C	+	++	–	–
D	+	–	++	–
E	+	–	–	++

++: σημαντική παραγωγή τοξίνης, +: μικρή παραγωγή τοξίνης, –: μη ανίχνευση τοξίνης

Το γονίδιο του *C. perfringens*, που κωδικοποιεί την τοξίνη -α, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα, ενώ τα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπόλοιπες τοξίνες μπορεί να εντοπίζονται στο χρωμόσωμα ή σε περιοχές εκτός αυτού (Gatsos 2007). Η εντόπιση των γονιδίων αυτών σε διάφορες περιοχές του χρωμοσώματος ή μεταθετών του στοιχείων (πλασμιδίων, τρανσποζονίων και πιθανώς φάγων) συμβάλλει στην ποικιλία των τοξινικών τύπων. Η απόκτηση ή/και η απώλεια πλασμιδίων, που πιθανόν να συμβεί κατά την καλλιέργεια των τύπων B, C, D και E, πιθανώς να οδηγήσει σε αλλαγή του τύπου (Petit et al. 1999). Η ταξινόμηση του *C. perfringens* σε τοξινικούς τύπους είναι χρήσιμη για κλινικούς σκοπούς, αλλά δεν απεικονίζει τη γενετική συγγένεια μεταξύ των τοξινών (Tsutsui et al. 1995). Ενδεχομένως να υπάρχουν και άλλες τοξίνες, οι οποίες δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί.

2.3.1. Τοξίνη -α

Η τοξίνη -α είναι η περισσότερο και καλύτερα μελετημένη από τις κύριες τοξίνες του *C. perfringens*. Επίσης, είναι η πρώτη βακτηριακή τοξίνη για την οποία αποδείχτηκε ότι εκδηλώνει ενζυματική δραστηριότητα. Ανήκει σε μια ευρύτερη οικογένεια πρωτεϊνών, γνωστές ως μεταλλοπρωτέασες. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής είναι ένζυμα, τα οποία απαιτούν ψευδάργυρο για να εκδηλώσουν τη βιολογική τους δράση (Gatsos 2007).

Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της τοξίνης -α (*plc* ή *cpa*) εντοπίζεται σε μια πολύ σταθερή περιοχή του χρωμοσώματος του *C. perfringens*, κοντά στην περιοχή αναδιπλασιασμού. Αυτό εξηγεί το γιατί όλοι οι τοξινικοί τύποι φέρουν το γονίδιο αυτό και είναι ικανοί να παράγουν τοξίνη -α (Rood and Cole 1991, Titball et al. 1999, McDevitt et al. 2006).

Η ανίχνευση της τοξίνης -α παρεμποδιζόταν, εξαιτίας της διάσπασής της στο υπερκείμενο υγρής καλλιέργειας κατά τη διαδικασία καθαρισμού από τις άλλες τοξίνες του βακτηρίου. Οι δυσκολίες αυτές ξεπεράστηκαν το 1989, όταν το υπεύθυνο γονίδιο *cpa* κλωνοποιήθηκε και στη συνέχεια εκφράστηκε σε στέλεχος *Escherichia coli* (Leslie et al. 1989, Titball et al. 1989).

Η τοξίνη -α είναι μια φωσφολιπάση C σφιγγομυελινάση, η οποία υδρολύει τα φωσφολιπίδια, προκαλώντας αποδιοργάνωση των μεμβρανών. Εκδηλώνει αιμολυτική, νεκρωτική και κυτταρολυτική δράση, προκαλεί λύση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων και βλάβη στις κυτταρικές μεμβράνες των ινοβλαστών και των μυϊκών κυττάρων (Titball et al. 1993, Ninomiya et al. 1994). Αποτελείται από 370 αμινοξέα και η τρισδιάστατη δομή της περιέχει 2 περιοχές που συνδέονται μεταξύ τους μέσω μιας μικρής, ευέλικτης περιοχής σύνδεσης. Το αμινοτελικό άκρο (N-terminal domain) είναι επιφορτισμένο με την ενζυματική δραστηριότητα της τοξίνης και χρειάζεται ψευδάργυρο για την ενεργοποίησή του, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο (C-terminal domain) είναι απαραίτητο για τη σύνδεση με τους υποδοχείς των κυτταρικών μεμβρανών με τη μεσολάβηση του ασβεστίου (Naylor et al. 1999, Titball et al. 1999).

Η τοξίνη -α υδρολύει τη φωσφατιδυλχολίνη και τη σφιγγομυελίνη, δυο συστατικά των μεμβρανών των ευκαρυωτικών κυττάρων. Η δράση της επηρεάζεται από την περιεκτικότητα των μεμβρανών σε χοληστερόλη, τον κορεσμό των φωσφολιπιδίων και τη ρευστότητα της μεμβράνης, με γενικό κανόνα ότι όσο χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία τήξης της μεμβράνης, τόσο πιο ευαίσθητη είναι στη δράση της τοξίνης -α

(Nagahama et al. 1998, Gatsos 2007).

Σε υψηλές συγκεντρώσεις η τοξίνη -α προκαλεί εκτεταμένη υδρόλυση των φωσφολιπιδίων, κυτταρική βλάβη και τελικά τη λύση του κυττάρου (Titball et al. 1999). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις προκαλεί περιορισμένη υδρόλυση της φωσφατιδυλχολίνης και της σφιγγομυελίνης, με αποτέλεσμα την παραγωγή δευτερογενών αγγελιοφόρων μορίων, της διαγλυκερόλης (DAG) και της κεραμίδης (ceramide). Τα μόρια αυτά με τη σειρά τους ενεργοποιούν αλυσιδωτές αντιδράσεις μεταγωγέων σήματος, με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη παραγωγή διαφορετικών ενδοκυτταρικών μεσολαβητών (Titball et al. 1999).

Η διαγλυκερόλη μπορεί να ανακυκλωθεί σε τριαγλυκερόλη ή σε νέα φωσφολιπίδια. Επίσης, μπορεί να ενεργοποιήσει την πρωτεϊνική κινάση C και με αυτόν τον τρόπο να προκαλέσει την απελευθέρωση ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δικτυωτό των ευκαρυωτικών κυττάρων, οδηγώντας σε κυτοπλασματική συγκέντρωση ασβεστίου (Flores-Diaz et al. 2004). Αυτό εξηγεί την καρδιοτοξικότητά της και τη δυσμενή της δράση στα μυϊκά κύτταρα (Titball et al. 1999).

Η τοξίνη -α, εκτός από την απευθείας βλάβη των κυτταρικών μεμβρανών μέσω της υδρόλυσης των φωσφολιπιδίων, μπορεί να προκαλέσει απορρύθμιση της τοπικής και συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης, με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία, την καταπληξία και τελικά το θάνατο του ξενιστή (Bryant and Stevens 1996, Titball 1997). Επιπρόσθετα, μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης C μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίηση του καταρράκτη των αντιδράσεων του αραχιδονικού οξέος και την παραγωγή θρομβοξανίων, λευκοτριενίων και προσταγλαδινών. Τα μόρια αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση τοπικά φλεγμονής, ισχαιμίας, θρόμβωσης και αγγειοσύσπασης, με συνέπεια την υποξία των προσβεβλημένων ιστών, όπως συμβαίνει στη γάγγραινα των ανθρώπων, ευνοώντας την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του C. perfringens (Stevens and Bryant 1997, Titball et al. 1999, Flores-Diaz et al. 2004).

Η τοξίνη -α διεγείρει ακόμη την παραγωγή προστακυκλίνης και του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) στα ενδοθηλιακά κύτταρα, οδηγώντας σε αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας και σε προσκόλληση των ουδετερόφιλων κυττάρων στο ενδοθήλιο. Επιπρόσθετα, η τοξίνη -α μπορεί να διεγείρει την έκφραση των παραγόντων προσκόλλησης μορίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα ουδετερόφιλα. Η απορρύθμιση των ICAM-1 (intercellular adhesion molecular-1) και ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1) στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, σε συνδυασμό με την αυξημένη παραγωγή IL-8, η οποία δρα χημειοτακτικά για τα ουδετερόφιλα, έχει ως αποτέλεσμα την έμφραξη των αιμοφόρων αγγείων, παρεμποδίζοντας τη μετανάστευση των ουδετερόφιλων κυττάρων (Bryant and Stevens 1996, Bunting et al. 1997, Titball et al. 1999). Επίσης, η τοξίνη -α θα μπορούσε να οδηγήσει και σε συγκόλληση των αιμοπεταλίων, με συνέπεια την αγγειακή απόφραξη (Bryant et al. 2000).

Η τοξίνη -α, όπως φαίνεται και από τα παραπάνω, μπορεί να εκδηλώσει μεγάλη ποικιλία βιολογικών δράσεων. Ωστόσο, η ερμηνεία πρέπει να γίνεται με προσοχή, επειδή σε πολλές μελέτες οι βιολογικές δράσεις εκδηλώνονται σε μεγάλη ποικιλία κυτταρικών σειρών και σε *in vivo* μοντέλα διαφορετικών ειδών ζώων. Επίσης, η περιεκτικότητα της κυτταρικής μεμβράνης των ευκαρυωτικών κυττάρων σε φωσφολιπίδια εμφανίζει μεγάλη ποικιλία μεταξύ των ζωικών ειδών (Flores-Diaz et al. 2004). Στην πραγματικότητα, πολλές από τις παραπάνω βιολογικές δράσεις μπορούν να δώσουν εύλογες απαντήσεις για τα συμπτώματα και τις αλλοιώσεις της γάγγραινας του ανθρώπου, αλλά δεν είναι βέβαιο ποιες από αυτές θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην πρόκληση της νεκρωτικής εντερίτιδας (NE) στα κρεοπαραγωγά ορνίθια (Gatsos 2007).

2.3.1.1. Η ρύθμιση του γονίδιου έκφρασης της τοξίνης -α

Ένα από τα σημαντικότερα στάδια για την πυροδότηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην εκδήλωση της NE είναι η έκφραση του γονιδίου cpa που κωδικοποιεί την τοξίνη -α. Η τοξίνη -α εκκρίνεται από τα βακτήρια που συνδέονται με τα επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντερικού βλεννογόνου, τα οποία προηγουμένως έχουν υποστεί βλάβη από τη δράση των προδιαθεσικών παραγόντων (McDevitt et al. 2006).

Η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις τοξίνες του *C. perfringens* ελέγχεται από ρυθμιστικό σύστημα δύο συστατικών, το VirR/VirS σύστημα. Όπως και σε άλλα ρυθμιστικά συστήματα δύο συστατικών, το φοσφωρυλιωμένο συστατικό ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχος, συμπεριλαμβανομένου και του cpa (Rood and Cole 1991). Το επίπεδο της έκφρασης του *cpa* από το *C. perfringens* στο

γαστρεντερικό σωλήνα των υγιών πτηνών είναι χαμηλό, ενώ στα πτηνά που εκδηλώνουν ΝΕ αυξάνεται. Σύμφωνα με τους Novak and Fratamico (2004), η παραγωγή τοξινών ρυθμίζεται με βάση το *quorum sensing* (QS). Βακτήρια των οποίων ο έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων γίνεται με βάση το QS είναι το *Pseudomonas aeruginosa*, το *Bacillus subtilis*, το *C. perfringens* και πολλά είδη του γένους *Vibrio* (McDevitt et al. 2006).

Πολλά είδη βακτηρίων ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων τους σε επίπεδο πληθυσμού με την παραγωγή, την έκκριση, την ανίχνευση και την αντίδραση με μόρια σηματοδότησης, τα οποία ονομάζονται αυτεπαγωγείς (ΑΕ) και συγκεντρώνονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Κάθε είδος βακτηρίου παράγει και ανταποκρίνεται μοναδικά στους ΑΕ. Έχει ανακαλυφθεί ένας μοναδικός αυτεπαγωγέας (ΑΕ-2), ο οποίος φαίνεται να αποτελεί καθολικό σήμα και χρησιμεύει για την επικοινωνία μεταξύ βακτηρίων του ίδιου, αλλά και διαφορετικού είδους (Lu et al. 2005). Σε όλα τα είδη βακτηρίων που ελέχθησαν, η σύνθεση του ΑΕ-2 φαίνεται να ελέγχεται από το γονίδιο luxS. Ο ΑΕ-2 εκκρίνεται από το κύτταρο και συνδέεται με τη *luxP*, μια περιπλασματική πρωτεΐνη σύνδεσης, η οποία οδηγεί τελικά σε μεταβολές της έκφρασης του γονιδίου cpa, (Xavier and Bassler 2003).

2.3.1.2. Ο έλεγχος της σύνθεσης της τοξίνης -α

Η έκφραση του γονιδίου *cpa* και κατ' επέκταση η σύνθεση της τοξίνης -α του *C. perfringens* φαίνεται να ρυθμίζεται με το σύστημα QS, χρησιμοποιώντας ολιγοπεπτίδια, αυτεπαγωγείς ή και τα δύο. Η τοξίνη -α παράγεται προς το τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης του *C. perfringens* και επηρεάζει σημαντικά τη λοιμογόνο του δύναμη. Η παραγωγή της τοξίνης -α συμπίπτει με το χρονικό σημείο όπου η παραγωγή ΑΕ-2 από το βακτήριο βρίσκεται στο μέγιστο. Μελέτες με μεταλλαγμένα στελέχη έχουν δείξει ότι, κατά τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης, η παραγωγή τοξίνης -α είναι μειωμένη, ενώ κατά τη στατική φάση, η παραγωγή τοξίνης είναι στα ίδια επίπεδα τόσο στο μεταλλαγμένο, όσο και στο φυσικό στέλεχος. Ο ρόλος του *luxS* γονιδίου είναι ο έλεγχος του χρόνου παραγωγής της τοξίνης -α από το *C. perfringens* (Phillips-Jones 2000).

Διάφορα χαρακτηριστικά των μηχανισμών βιοσύνθεσης του ΑΕ-2 υποδηλώνουν την ύπαρξη στενής σχέσης μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών και της βακτηριακής ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, ο ΑΕ-2 εκκρίνεται από τα κύτταρα με αποτέλεσμα η συγκέντρωσή του να αποτελεί ένδειξη του βακτηριακού πληθυσμού. Επίσης, υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ του βακτηριακού μεταβολισμού και της παραγωγής ΑΕ-2. Τα επίπεδα ΑΕ-2 μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένδειξη τόσο για το στάδιο ανάπτυξης όσο και για τη δυνατότητα ανάπτυξης ενός βακτηριακού πληθυσμού. Όσο αφορά το *C. perfringens*, ο ΑΕ-2 ελέγχει την έκφραση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των τοξινών -α, -θ και -κ (McDevitt et al. 2006).

Σχετικά με την πυροδότηση της ΝΕ στα πτηνά γεννώνται ερωτηματικά από το γεγονός ότι ο ΑΕ-2 είναι καθολικός και μπορεί να δράσει σε όλα τα είδη βακτηρίων, ενώ τα ολιγοπεπτίδια είναι ειδικά του είδους. Αν η σύνθεση των ολιγοπεπτιδίων και των αυτεπαγωγέων αποτελεί αντίδραση του πληθυσμού του *C. perfringens*, η σύνθεση του ΑΕ-2 θα μπορούσε να αποτελεί αντίδραση διαφορετικών ειδών βακτηρίων. Η εκδήλωση της ΝΕ είναι πιθανώς αποτέλεσμα της επικοινωνίας μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών και της αλληλεπίδρασής τους με το γαστρεντερικό σωλήνα. Εάν αποδειχθεί κάτι τέτοιο, η ΝΕ θα αποτελούσε παράδειγμα νοσήματος του πεπτικού συστήματος, το οποίο πυροδοτείται μέσω βακτηριακής αλληλεπίδρασης (McDevitt et al. 2006).

2.3.2. Τοξίνη -β

Η τοξίνη -β είναι ο κύριος παράγοντας που εμπλέκεται στη ΝΕ του ανθρώπου (Sakurai and Duncan 1978). Είναι ευαίσθητη στη θερμότητα και τη δράση της πρωτεάσης και της θρυψίνης. Αποτελείται από 347 αμινοξέα, ενώ το μοριακό της βάρος είναι 34 kDaltons. Η γενετική της ανάλυση αποκάλυψε ότι εμφανίζει ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων με την τοξίνη -α, την τοξίνη -γ και τη λευκοσιδίνη του *Staphylococcus aureus*. Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίησή της είναι το cpb, το οποίο εντοπίζεται σε πλασμίδιο (Sakurai et al. 1984).

Είναι η δεύτερη πιο θανατηφόρα τοξίνη του *C. perfringens*, μετά την τοξίνη -ε. Η διαδικασία σύνδεσής της με τους υποδοχείς είναι μη αντιστρέψιμη, με αποτέλεσμα η χορήγηση αντιορού μετά τη σύνδεση να μην μπορεί να εξουδετερώσει την τοξίνη (Sakurai et al. 1981). Ασκεί την παθογόνο της δράση σχηματίζοντας πόρους με ολιγομερισμό της κυτταρικής μεμβράνης. Οι πόροι αυτοί προκαλούν μεταβολή της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την εκροή ιόντων καλίου και την εισροή ιόντων

νατρίου, ασβεστίου και χλωρίου, οδηγώντας στη διόγκωση και τελικά στη λύση του κυττάρου (Shatursky et al. 2000, Nagahama et al. 2003). Στον άνθρωπο, τα ενδοθηλιακά κύτταρα φαίνεται να αποτελούν τα κύτταρα-στόχος, χωρίς ωστόσο να εκδηλώνει αιμολυτική δράση (Steinthorsdottir et al. 2000).

Τέλος, σύμφωνα με τους Shatursky et al. (2000), η τοξίνη -β εκδηλώνει δράση κυρίως νευροτοξίνης δρώντας στις προγαγγλιακές ίνες ή σε στοιχεία του αυτόνομου νευρικού συστήματος και λιγότερο δράση κυτταρολυσίνης. Η μεταβολή της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης και η διευκόλυνση της ροής των μονοσθενών ιόντων προκαλούν ταχύτατη και μη αναστρέψιμη εκπόλωση του κυττάρου, με αποτέλεσμα τη βλάβη του νευρώνα (Shatursky et al. 2000).

2.3.3. Τοξίνη -β_2

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. Το μοριακό της βάρος ανέρχεται στα 28 kD. Είναι κυτταροτοξική για ορισμένες κυτταρικές σειρές επιθηλιακής προέλευσης και ασκεί την παθογόνο της δράση μέσω της πρόκλησης πόρων στις κυτταρικές μεμβράνες (Gibert et al. 1997).

Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της τοξίνης είναι το *cpb*$_2$ και εντοπίζεται σε πλασμίδιο (Hirsh and Biberstein 2004). Η παρουσία του *cpb*$_2$ σχετίζεται με τη ΝΕ του χοίρου (Jost et al. 2005), τη ΝΕ του αλόγου (Herholz et al. 1999), την αιμορραγική εντερίτιδα των βοοειδών (Lebrun et al. 2007), με περιστατικά διάρροιας σε σκύλους (Hirsh and Biberstein 2004) και μαζί με την εντεροτοξίνη με περιστατικά διάρροιας στους ανθρώπους (Fisher et al. 2005).

2.3.4. Τοξίνη -ε

Η τοξίνη -ε είναι η πιο ισχυρή κλωστριδιακή νευροτοξίνη μετά την τοξίνη της αλλαντίασης και την τοξίνη του τετάνου (Mantis 2005). Το γονίδιο (*etx*) που κωδικοποιεί την τοξίνη -ε εντοπίζεται σε πλασμίδιο (Hirsh and Biberstein 2004). Η ταχύτητα με την οποία εκδηλώνει την τοξικότητά της στον ξενιστή αποδίδεται κατά ένα μέρος στην ικανότητα να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Worthington and Mulders 1975). Είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της θανατηφόρας εντεροτοξιναιμίας και της νόσου του πολτώδους νεφρού στα πρόβατα και ενίοτε σε αίγες και μοσχάρια (Songer 1996, Petit et al. 1999, Hirsh and Biberstein 2004, Johansson 2006).

Παράγεται στο γαστρεντερικό σωλήνα ως αδρανής προτοξίνη και ενεργοποιείται από τις πεπτικές πρωτεάσες (θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, κ.ά.) (Miyata et al. 2002). Προκαλεί αύξηση της αρτηριακής πίεσης και της αρτηριακής διαπερατότητας, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η διέλευσή της από το γαστρεντερικό βλεννογόνο, να εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και να μεταφέρεται σε διάφορα όργανα του σώματος, όπως στον εγκέφαλο, την καρδιά, τους πνεύμονες και τους νεφρούς, προκαλώντας βλάβες στο ενδοθήλιο των αγγείων, απώλεια υγρών, οίδημα και αιμορραγίες (Tamai et al. 2003).

Σε υψηλές συγκεντρώσεις της τοξίνης -ε παρατηρείται οίδημα του εγκεφάλου και αύξηση της ενδοκρανιακής πίεσης, εξαιτίας της βλάβης των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων του εγκεφάλου. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, παρατηρείται εστιακή συμμετρική εγκεφαλομαλάκυνση. Επιπλέον, η τοξίνη -ε διεγείρει την απελευθέρωση κατεχολαμινών, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης και την πρόκληση υπεργλυκαιμίας και γλυκοζουρίας (Hirsh and Biberstein 2004).

Για την εκδήλωση της βιολογικής δράσης της τοξίνης -ε απαιτείται η σύνδεσή της με ειδικούς κυτταρικούς υποδοχείς, τους σιαλογλυκοπρωτεϊνικούς υποδοχείς. Μετά τη σύνδεσή της με τους κυτταρικούς υποδοχείς, προκαλεί μη επιλεκτικά πόρους με ολιγομερισμό της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την απώλεια της επιθηλιακής ανθεκτικότητας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συγκέντρωση υγρού και την πρόκληση οιδήματος στον προσβεβλημένο ιστό (Petit et al. 2001, Miyata et al. 2002).

2.3.5. Τοξίνη -ι

Η τοξίνη -ι είναι μέλος των κλωστριδιακών δυαδικών τοξινών που τροποποιούν τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Είναι η λιγότερο τοξική από τις κύριες τοξίνες του *C. perfringens*. Αποτελείται από δυο ανεξάρτητες πρωτεΐνες, το ενζυματικό συστατικό (Ia) και το συνδετικό συστατικό (Ib). Για την εκδήλωση της κυτταροτοξικής της δράσης είναι απαραίτητα και τα δύο συστατικά. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις παραπάνω πρωτεΐνες, *lap* και *lbp*, βρίσκονται στην ίδια αλληλουχία, εκφράζονται από τον ίδιο υποκινητή, αλλά χωρίζονται από 40 μη κωδικοποιήσιμα νουκλεοτίδια. Το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών είναι 45-47,5 kD και 71,5-80 kD,

αντίστοιχα. Εξαιτίας του διαφορετικού μεγέθους το Ia χαρακτηρίζεται ως ελαφριά αλυσίδα, ενώ το Ib ως βαριά αλυσίδα (Perelle et al. 1993).

Τα δυο συστατικά εκκρίνονται ως προτοξίνες και για την ενεργοποίησή τους απαιτείται η δράση της τοξίνης -λ ή της χυμοθρυψίνης (Gibert et al. 2000). Το Ib συνδέεται με τον υποδοχέα επιφάνειας και συνεπώς μεσολαβεί στην εσωτερίκευση του ενζυματικού συστατικού. Το Ia καταλύει την ADP-ριβοσυλίωση των μονομερών ακτίνης, με αποτέλεσμα τον αποπολυμερισμό της ακτίνης και την αναστολή των κυτταρικών λειτουργιών που βασίζονταν στον κυτταροσκελετό της ακτίνης, οδηγώντας στο θάνατο. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η τοξίνη -ι θα μπορούσε να αποτελέσει χρήσιμο βιολογικό εργαλείο για τη μεταφορά πρωτεϊνών μέσα στα κύτταρα (Rood and Cole 1991, Songer 1996, Petit et al. 1999, Gibert et al. 2000, Johansson 2006).

2.3.6. Εντεροτοξίνη

Η εντεροτοξίνη (CPE) αποτελεί την τρίτη σε σειρά συχνότητας αιτία τροφογενούς δηλητηρίασης στους ανθρώπους, παρ' όλο που δεν κατατάσσεται στις κύριες τοξίνες του *C. perfringens* (McClane 2007). Απελευθερώνεται από το *C. perfringens* κατά τη σπορογονία του και όχι κατά την ανάπτυξη του (Johnson 1989).

Το γονίδιο *cpe* είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της εντεροτοξίνης και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα ή σε περιοχές εκτός αυτού. Ο αριθμός των στελεχών *C. perfringens* που φέρουν το γονίδιο *cpe* είναι περιορισμένος. Συγκεκριμένα, λιγότερο από το 5% των στελεχών *C. perfringens* που έχουν απομονωθεί παγκοσμίως φέρουν το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της εντεροτοξίνης (McClane 2007). Τα θετικά *cpe* στελέχη *C. perfringens* τύπου Α ταξινομούνται σε διαφορετικούς γενοτύπους (*χρωμοσωμικό IS1470-cpe, πλασμιδιο-φερόμενο IS1470-like-cpe* και *plasmid-borne IS1511-cpe*), ανάλογα με την αλληλουχία εισαγωγής (insertion sequence) των στοιχείων που προσκολλώνται στο cpe γονίδιο (Songer 1996, McClane 2001).

Οι γενότυποι που ενοχοποιούνται συχνότερα για την πρόκληση τροφογενούς λοίμωξης είναι οι χρωμοσωμικοί, παρ' όλο που και οι τρεις γνωστοί γενότυποι έχουν τη δυνατότητα (McClane 2007, Lahti et al. 2008). Αντίθετα, οι πλασμιδιο-φερόμενοι γενότυποι σχετίζονται κυρίως με μη τροφογενείς λοιμώξεις, όπως τη γαστρεντερίτιδα μετά τη χρήση αντιβιοτικών και τη γαστρεντερίτιδα των ταξιδιωτών (Collie and McClane 1998).

Η εντεροτοξίνη ακολουθεί ένα πολυσταδιακό μηχανισμό αλληλεπίδρασης με τα κύτταρα του ξενιστή. Αρχικά συνδέεται με τους υποδοχείς των επιθηλιακών κυττάρων του γαστρεντερικού βλεννογόνου και ιδιαίτερα με τους υποδοχείς των κυττάρων της κορυφής των λαχνών (McClane 2007). Οι υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια κλαυδίνης (claudin), των πρωτεϊνών ισχυρής σύνδεσης (Fujita et al. 2000). Μετά τη σύνδεση ακολουθεί η δημιουργία μικρών συμπλόκων, στα οποία η εντεροτοξίνη ολιγομερίζεται σε εξαμερές σύμπλοκο, το *C. perfringens* εντεροτοξίνη εξαμερές-1 (CH-1). Το CH-1 περιέχει κλαυδίνη και συγκεντρώνεται στην επιφάνεια της μεμβράνης (Robertson et al. 2007). Ακολούθως, το CH-1 παράγει κατιόν-επιλεκτικούς πόρους μετά την σύνδεσή του στην κυτταρική μεμβράνη, επιτρέποντας την εισροή ιόντων ασβεστίου στο κύτταρο (McClane, 2004). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της καλμοντουλίνης (calmodulin) και της καλπεΐνης (calpein), τον αποπολυμερισμό της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτόπλασμα, με συνέπεια τον κυτταρικό θάνατο (Smedley et al. 2004).

Επίσης, η εισροή ιόντων ασβεστίου προκαλεί μορφολογική βλάβη στα κύτταρα, η οποία διαρρηγνύει τις ισχυρές συνδέσεις μεταξύ των παρακείμενων επιθηλιακών κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ελεύθερη είσοδο της εντεροτοξίνης στη βασεοπλευρική επιφάνεια του κυττάρου, όπου μπορούν να παραχθούν επιπλέον CH-1. Σε αυτό το σημείο, σχηματίζεται ένα επιπλέον CPE σύμπλοκο, το *C. perfringens* εντεροτοξίνη εξαμερές-2 (CH-2), το οποίο περιέχει οκκλουδίνη (occludine) (McClane 2007).

Οι παραπάνω αλλαγές προκαλούν την ταχεία απώλεια υγρών και ηλεκτρολυτών από τη γαστρεντερική οδό, με αποτέλεσμα την εκδήλωση διάρροιας και την αφυδάτωση του ξενιστή (Gatsos 2007).

Η επιδημιολογική διερεύνηση περιστατικών τροφογενούς λοίμωξης έχει αποδείξει ότι ένας μικρός αριθμός στελεχών *C. perfringens*, ικανών να παράγουν εντεροτοξίνη, συνυπάρχει με μεγάλο αριθμό μη εντεροτοξινογόνων στελεχών στα ορνίθια και τους μόσχους (Miwa et al. 1997, Miwa et al. 1998, McClane 2007). Γι' αυτόν το λόγο, η καλλιέργεια εντερικού περιεχομένου ή κοπράνων και η επιλογή αποικιών για περαιτέρω χαρακτηρισμό πιθανώς να οδηγήσει

σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Για τον αποτελεσματικό προσδιορισμό του επιπολασμού των στελεχών *C. perfringens*, θετικών ως προς την παραγωγή εντεροτοξίνης, είναι απαραίτητη η διενέργεια περισσότερων επιδημιολογικών μελετών με ακόμη πιο ευαίσθητες τεχνικές (Immerseel et al. 2004).

2.3.7. Τοξίνη -θ

Η τοξίνη -θ είναι μια αιμολυσίνη, γνωστή επίσης και ως θ-αιμολυσίνη, περφρινγγολυσίνη Ο (theta-hemolysin, perfringolysin O) ή θειολ-ενεργοποιημένη κυτολυσίνη (thiol-activated cytolysin). Παράγεται και από τους πέντε τοξινικούς τύπους *C. perfringens*. Η δράση της εξαρτάται από την περιεκτικότητα της κυτταρικής μεμβράνης σε χοληστερόλη (Rood and Cole 1991).

Προκαλεί πόρους στην κυτταρική μεμβράνη, με αποτέλεσμα την πλήρη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Petit et al. 1999, Awad et al. 2001). Μαζί με την τοξίνη -α, ρυθμίζει τη φλεγμονώδη αντίδραση στον ξενιστή, προκαλώντας τη συγκέντρωση των λευκοκυττάρων στα αιμοφόρα αγγεία και παρεμποδίζοντας τη φυσιολογική μετανάστευση των ουδετερόφιλων στο σημείο της μόλυνσης. Οι βλάβες που προκαλούνται από την τοξίνη -θ και την τοξίνη -α προκαλούν οίδημα και ισχαιμία, με αποτέλεσμα την υποξία των ιστών, γεγονός που ευνοεί την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του *C. perfringens* (Petit et al. 1999, Awad et al. 2001).

2.3.8. Τοξίνη -NetB

Πρόσφατα, περιγράφηκε μια νέα τοξίνη που σχετίζεται με τη NE 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 NE (Keyburn et al. 2008).

Η τοξίνη -NetB είναι κυτταροτοξική για τα κύτταρα ορνίθιου ηπατώματος in vitro και εκδηλώνει την παθογόνο της δράση με την πρόκληση μικρών υδροφιλικών πόρων στην κυτταρική μεμβράνη διαμέτρου 1,6-1,8 nm. Το μοριακό της βάρος κυμαίνεται από 33,2 έως 34,8 kD και παρουσιάζει ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων με την τοξίνη -δ κατά 40%, με την τοξίνη -β κατά 38% και με την τοξίνη -α του *Staphylococcus aureus* κατά 31% (Manich et al. 2008).

2.3.9. Δευτερεύουσες τοξίνες και παθογόνοι παράγοντες

Το *C. perfringens*, εκτός από τις κύριες τοξίνες και την εντεροτοξίνη, παράγει την τοξίνη -λ ή καζεϊνάση, την τοξίνη -δ με δράση αιμολυσίνης, την τοξίνη -μ (mu) με δράση υαλουρονιδάσης, την τοξίνη -ν (nu) με δράση νουκλεάσης, την τοξίνη -κ με δράση κολλαγενάσης, τη νευραμινιδάση/σιαλιδάση (Nam) και την α-clostripain like πρωτεάση (Rood and Cole 1991, Hirsh and Biberstein 2004, Gatsos 2007).

Οι τοξίνες αυτές δρουν ως ένζυμα, τα οποία εμπλέκονται στην αποδόμηση εξωκυτταρικού υλικού και πρωτεϊνών, παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη του *C. perfringens*. Επίσης, πολλές δευτερεύουσες τοξίνες δρουν συνεργικά ή συμπληρωματικά με τις κύριες πορογόνες τοξίνες (Minami et al. 1997, Gilbert et al. 2000). Ενδεχομένως να παράγονται και άλλες τοξίνες από το *C. perfringens*, οι οποίες να μην έχουν ταυτοποιηθεί ακόμη. Τέλος, η δράση των τοξινών, κύριων και δευτερευουσών, σε ορισμένα νοσήματα δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί (Immerseel et al. 2009).

REFERENCES - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Awad MM, Ellemor DM, Boyd RL, Emmins JJ, Rood JI (2001) Synergistic effects of alpha-toxin and perfringolysin O in Clostridium perfringens-mediated gas gangrene. Infection and Immunity, 69:7904-7910.

Biberstein E (1990) The Clostridia. Review of Veterinary Microbiology. Blackwell Scientific Publications, Inc, London, UK, pp 295-310.

Brock T, Madigan M, Martinko J, Parker J (1994) Biology of microorganisms. 7th Edition, Prentice-Hall Inc, New Jersey, USA.

Brooks M, Sterne M, Warrack G (1957) A reassessment of the criteria used for type differentiation of Clostridium perfringens. Journal of Pathology and Bacteriology, 74:185-195.

Brown CC, Baker DC and Barker IK (2007) Infectious and parasitic diseases of the alimentary tract. In: Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals. 5th Edition. Elsevier Health Sciences. pp 135-279.

Bryant AE, Chen RY, Nagata Y, Wang Y, Lee CH, Finegold S, Guth PH, Stevens DL (2000) Clostridial gas gangrene. II. Phospholipase C-induced activation of platelet gpIIbIIIa mediates vascular occlusion and myonecrosis in Clostridium perfringens gas gangrene. Journal of Infection Diseases, 182:808-815.

Bryant AE, Stevens DL (1996) Phospholipase C and perfringolysin O from Clostridium perfringens up-regulate endothelial cell-leukocyte adherence molecule 1 and intercellular leukocyte adherence molecule 1 expression and induce interleukin-8 synthesis in cultured human umbilical vein endothelial cells. Infection and Immunity, 64:358-62.

Bunting M, Lorant DE, Bryant AE, Zimmerman GA, McIntyre TM, Stevens DL, Prescott SM (1997) Alpha toxin from Clostridium perfringens induces proinflammatory changes in endothelial cells. Journal of Clinical Investigation, 100:565-574.

Cato E, George W, Finegold S (1986) Genus Clostridium. In: Bergey s Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore, USA, pp 1179-1182.

Collie RE, McClane BA (1998) Evidence that the enterotoxin gene can be episomal in Clostridium perfringens isolates associated with non-food-borne human gastrointestinal diseases. Journal of Clinical Microbiology, 36:30-36.

Collins M, Lawson P, Willems A, Cordoba J, Fernandez-Garayzabal J, Garcia P, Cai J, Hippe H, Farrow J (1994) The phylogeny of the genus Clostridium: proposal of five new genera and eleven new species combinations. International Journal of Systematic Bacteriology, 44:812-826.

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

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. Molecular Microbiology, 56:747-762.

Flores-D az M, Thelestam M, Clark G, Titball R, Alape-Gir n A (2004) Effects of Clostridium perfringens phospholipase C in mammalian cells. Anaerobe, 10:115-123.

Frey J, Vileie M (2003) Molecular genetics of Clostridium perfringens toxins. In: European Concerted Action QLK2-CT2001-01267. Protein toxins of the genus Clostridium and vaccination. Liege, Belgium, pp 45-51.

Fujita K, Katahira J, Horiguchi Y, Sonoda N, Furuse M and Tsukita S (2000) Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. FEBS Letters, 476. pp 258-261.

Gatsos X (2007) The development of live vectored vaccines targeting the alpha-toxin of Clostridium perfringens for the prevention of necrotic enteritis in poultry. PhD thesis. Biotechnology and Environmental Biology School of Applied Science, RMIT University, Melbourne, Victoria, Australia.

Gibert M, Jolivet-Reynaud C, Popoff MR, Jolivet-Renaud C (1997) Beta2 toxin, a novel toxin produced by Clostridium perfringens. Gene, 203:65-73.

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, 68:3848-3853.

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.

Hatheway C (1990) Toxigenic clostridia. Clinical Microbiology Revision. 3:66-98.

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.

Hirsh DC and Biberstein EL (2004) Clostridium. In: Veterinary Microbiology. 2nd Edition. Blackwell Publishing. pp 198-214.

Immerseel F, De Buck J, Pasmans F, Huyghebaert G, Haesebrouck F and 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.

Johansson A (2006) Clostridium perfringens: the causal agent of necrotic enteritis in poultry. PhD thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

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 cpb2 genes, encoding beta2-toxin in Clostridium perfringens isolates of nonporcine origin. Infection and Immunity, 73:652-656.

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.

Krieg N (1984) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

Lahti P, Heikinheimo A, Johansson T, Korkeala H (2008) Clostridium perfringens type A strains carrying a plasmid-borne enterotoxin gene (genotype IS1151-cpe or IS1470-like-cpe) as a common cause of food poisoning. J Clin Microbiol, 46:371-373.

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.

Leslie D, Fairweather N, Pickard D, Dougan G, Kehoe M (1989) Phospholipase C and haemolytic activities of Clostridium perfringens alpha-toxin cloned in Escherichia coli: sequence and homology with a Bacillus cereus phospholipase. C Mol Microbiol, 3:383-92.

Lu LG, Hume ME, Pillai SD (2005) Autoinducer 2-like activity in poultry-associated enteric bacteria in response to subtherapeutic antibiotic exposure. Avian Diseases, 49:74-80.

Manich M, Knapp O, Gibert M, Maier E, Jolivet-Reynaud C, Geny B, Benz R, Popoff M (2008) Clostridium perfringens delta toxin is sequence related to beta toxin, NetB, and Staphylococcus pore-forming toxins, but shows functional differences. PLoS One, 3:e3764.

Mantis NJ (2005) Vaccines against the category B toxins: Staphylococcal enterotoxin B, epsilon toxin and ricin. Adv Drug Deliv Rev, 57:1424-1439.

McClane BA (2007) Clostridium perfringens. In: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 3rd Edition. ASM Press, Washington, USA, pp 423-444.

McClane BA (2001) The complex interactions between Clostridium perfringens enterotoxin and epithelial tight junctions. Toxicon, 39:1781-1791.

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.

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. Microbiol Immunol, 41:527-535.

Miwa N, Nishina T, Kubo S and Honda H (1997) Most probable numbers of enterotoxigenic Clostridium perfringens in intestinal contents of domestic livestock detected by nested PCR. Journal of Veterinary Medical Science, 59: 557-560.

Miwa N, Nishina T, Kubo S, Atsumi M and Honda H (1998) Amount of enterotoxigenic Clostridium perfringens in meat detected by nested PCR. International Journal of Food Microbiolog, 42: 195-200.

Miyata S, Minami J, Tamai E, Matsushita O, Shimamoto S, Okabe A (2002) Clostridium perfringens epsilon-toxin forms a heptameric pore within the detergent-insoluble microdomains of Madin-Darby canine kidney cells and rat synaptosomes. J Biol Chem, 277:39463-39468.

Nagahama M, Hayashi S, Morimitsu S, Sakurai J (2003) Biological activities and pore formation of Clostridium perfringens beta toxin in HL 60 cells. J Biol Chem, 278:36934-36941.

Nagahama M, Michiue K, Mukai M, Ochi S, Sakurai J (1998). Mechanism of membrane damage by Clostridium perfringens alpha-toxin. Microbiol Immunol, 42:533-8.

Naylor CE, Jepson M, Crane DT, Titball RW, Miller J, Basak AK, Bolgiano B (1999) Characterisation of the calcium-binding C-terminal domain of Clostridium perfringens alpha-toxin. J Mol Biol, 294:757-770.

Ninomiya M, Matsushita O, Minami J, Sakamoto H, Nakano M, Okabe A (1994) Role of alpha-toxin in Clostridium perfringens infection determined by using recombinants of C. perfringens and Bacillus subtilis. Infection and Immunity, 62:5032-5039.

Novak JS, Fratamico PM (2004) Evaluation of ascorbic acid as a quorum-sensing analogue to control growth, sporulation, and enterotoxin production in Clostridium perfringens. Journal of Food Science, 69:FMS72-FMS78.

Perelle S, Gibert M, Boquet P, Popoff MR (1993) Characterization of Clostridium perfringens iota-toxin genes and expression in Escherichia coli. Infection and Immunity, 61:5147-5156.

Petit L, Gibert M, Popoff M (1999) Clostridium perfringens: Toxinotype and genotype. Trends in Microbiology, 7:104-110.

Petit L, Maier E, Gibert M, Popoff M, Benz R (2001) Clostridium perfringens epsilon toxin induces a rapid change of cell membrane permeability to ions and forms channels in artificial lipid bilayers. J Biol Chem, 276:15736-15740.

Phillips-Jones MK (2000) Use of a lux reporter system for monitoring rapid changes in alpha –toxin gene expression in Clostridium perfringens during growth. FEMS Microbiology-Letter, 188:29-33.

Quinn P, Carter M, Markey B, Carter G (1994) Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing. London, UK.

Robertson SL, Smedley JG 3rd, Singh U, Chakrabarti G, Van Itallie CM, Anderson JM and McClane BA (2007) Compositional and stoichiometric analysis of Clostridium perfringens enterotoxin complexes in Caco-2 cells and claudin 4 fibroblast transfectants. Cellular Microbiology, 9: 2734-2755.

Rood J, Cole S (1991) Molecular genetics and pathogenesis of Clostridium perfringens. Microbiological Reviews, 55:621-648.

Sakurai J, Fujii Y, Dezaki K, Endo K (1984) Effect of Clostridium perfringens beta toxin on blood pressure of rats. Microbiol Immunol, 28:23-31.

Sakurai J, Fujii Y, Matsuura M, Endo K (1981) Pharmacological effect of beta toxin of Clostridium perfringens type C on rats. Microbiol Immunol, 25:423-432.

Sakurai J, Nagahama M, Ochi S (1997) Major toxins of Clostridium perfringens. Toxin Reviews, 16:195-214.

Sakurai, J, Duncan CL (1978) Some properties of beta-toxin produced by Clostridium perfringens type C. Infection and Immunity, 21:678-680.

Shatursky O, Bayles R, Rogers M, Jost BH, Songer JG, Tweten RK (2000) Clostridium perfringens beta-toxin forms potential-dependent, cation-selective channels in lipid bilayers. Infection and Immunity, 68:5546-5551.

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. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99:996-1001.

Smedley JG 3rd, Fisher DJ, Sayeed S, Chakrabarti G and McClane BA (2004) The enteric toxins of Clostridium perfringens. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, 152:183-204.

Songer J (1996) Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clinical Microbiology Reviews, 9:216-234.

Steinthorsdottir V, Halldorsson H, Andresson OS (2000) Clostridium perfringens beta-toxin forms multimeric transmembrane pores in human endothelial cells. Microb Pathog, 28:45-50.

Stevens DL, Bryant AE (1997) Pathogenesis of Clostridium perfringens infection: mechanisms and mediators of shock. Clin Infect Dis, 2 (Suppl):S160-164.

Tamai E, Ishida T, Miyata S, Matsushita O, Suda H, Kobayashi S, Sonobe H, Okabe A (2003) Accumulation of Clostridium perfringens epsilon toxin in the mouse kidney and its possible biological significance. Infection and Immunity, 71: 5371-5375.

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

Titball RW (1997) Clostridial phospholipases. In: The Clostridia: Molecular biology and pathogenesis. Academic Press, San Diego, pp 223-242.

Titball RW, Fearn AM, Williamson ED (1993) Biochemical and immunological properties of the C-terminal domain of the alpha-toxin of Clostridium perfringens. FEMS Microbiol Lett, 110:45-50.

Titball RW, Hunter SE, Martin KL, Morris BC, Shuttleworth AD, Rubidge T, Anderson DW, Kelly DC (1989) Molecular cloning and nucleotide sequence of the alpha-toxin (phospholipase C) of Clostridium perfringens. Infection and Immunity, 57:367-376.

Tsutsui K, Minami J, Matsushita O, Katayama S, Taniguchi Y, Nakamura S, Nishioka M, Okabe A (1995) Phylogenetic analysis of phospholipase C genes from Clostridium perfringens types A to E and Clostridium novyi. Journal of Bacteriology, 177:7164-7170.

Varga J, Nguyen V, O'Brien D, Rodgers K, Walker R, Melville S (2006) Type IV pili-dependent gliding motility in the Gram-positive pathogen Clostridium perfringens and other Clostridia. Molecular Microbiology, 62:680-694.

Wages D, Opengart K (2003) Necrotic enteritis. In: Diseases of Poultry. 11th ed, Iowa State Press. Blackwell Publishing Company. Iowa, USA, pp 781-785.

Worthington RW, Mulders MS (1975) Effect of Clostridium perfringens epsilon toxin on the blood brain barrier of mice. Onderstepoort J Vet Res, 42:25-27.

Xavier KB, Bassler BL (2003) LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. Current Opinion in Microbiology, 6:191-197.