

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica



Instituto de Patobiología, CNIA – INTA.
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas,

Rol de las toxinas binarias en las enfermedades intestinales causadas por clostridios enterotóxicos.

Doctorando: Med. Vet. Leandro M. Redondo.

Director: Dr. Mariano E. Fernández-Miyakawa.

Consejero: Dra. Ángela Famiglietti

2015

Resumen

Las enfermedades digestivas causadas por especies del género *Clostridium* poseen un importante impacto en la medicina tanto humana como veterinaria. Entre las especies patógenas más importantes de este género se encuentran *C. perfringens* y *C. difficile*. Ambos microorganismos pueden encontrarse presentes en el intestino de animales y seres humanos sanos y ante cambios en el ambiente intestinal, estas bacterias pueden proliferar y producir toxinas con efectos tóxicos a nivel intestinal y/o sistémico.

El trabajo de esta tesis se realizó en base a la hipótesis general de que las cepas productoras de toxinas binarias de las especies *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* representan un grupo de microorganismos patógenos intestinales altamente especializados capaces de afectar a bovinos de diferentes edades.

En la primer etapa de este trabajo se realizó el aislamiento y caracterización de las cepas de *C. perfringens* y *C. difficile* presentes en rodeos bovinos de nuestro país. En este trabajo no se obtuvieron aislamientos de *C. difficile* y se obtuvieron aislamientos de *C. perfringens* de animales sanos y enfermos de diferentes edades, en proporciones similares. Durante el desarrollo de esta tesis, ocurrió un brote de enteritis hemorrágica en vacas de cría en el cual se aisló *C. perfringens* tipo E, productor de toxina iota (toxina binaria), siendo el primer caso descrito a nivel mundial que sucede en animales adultos. Por otro lado, este también es el primer reporte de enfermedad asociada a este toxinotipo en nuestro país.

Las cepas de *C. perfringens* tipo E obtenidas fueron comparadas mediante MLST con cepas del mismo toxinotipo aisladas en América del Norte. Utilizando esta técnica fue posible determinar que los aislamientos tipo E analizados pertenecen a un mismo complejo clonal, independientemente de su origen geográfico. La presencia de este complejo clonal asociado a casos de enteritis hemorrágica en bovinos sugiere que este microorganismo se encuentra altamente adaptado y que la capacidad de producir enfermedad se debería a la acción combinada de factores de virulencia codificados en plásmidos y cromosoma. En base a este concepto se plantea que la virulencia de *C. perfringens* tipo E depende de la toxina iota junto con características complementarias propias de esta bacteria.

Utilizando ratones como especie modelo, fue posible reproducir el efecto letal sistémico de la toxina iota únicamente a dosis relativamente altas de la misma. Este modelo, también permitió determinar un efecto enterotóxico de la toxina iota. En el desafío por vía intestinal, mediante inoculación intragástrica se observó una inhibición de la motilidad gastrointestinal, cambios en la homeostasis de líquidos y lesiones intestinales similares a las observadas en casos naturales de la enfermedad.

Considerando la colonización intestinal por *C. perfringens* tipo E como el primer paso en la enfermedad producida por esta bacteria, y reconociendo que la enfermedad ocasionada por cepas del toxinotipo E pueda ser un evento accidental en el ciclo biológico de la bacteria, se realizaron estudios con el objetivo de definir un potencial rol biológico para la toxina iota, y su participación en la colonización del intestino de los mamíferos. Utilizando un modelo en células Caco-2 se observó que la toxina iota induce la formación de extensiones en la superficie de los enterocitos a las cuales se adhieren las células vegetativas de *C. perfringens* tipo E. De acuerdo a los resultados obtenidos comparando el efecto de la toxina iota sobre la adherencia de otras cepas de *C. perfringens*, es posible sugerir que estas extensiones son aprovechadas de manera diferencial por las bacterias pertenecientes al toxinotipo E.

Además se propone que la inhibición intraespecífica es otro mecanismo involucrado en la colonización intestinal y posiblemente en la dominancia clonal observada en casos naturales de infección por *C. perfringens* tipo E. En los sobrenadantes de estas cepas se detectó un péptido con acción antimicrobiana, el cual demostró poseer un amplio espectro de inhibición contra diversas cepas de *C. perfringens*. *In vitro* fue posible observar que en cultivos conteniendo una mezcla de bacterias tipo A y tipo E, finalmente predominaban las células tipo E. Los resultados obtenidos *in vivo* fueron similares pero debido a la complejidad del medio intestinal no fue posible determinar el efecto individual de la toxina iota o el péptido antimicrobiano sobre la colonización.

Estos resultados analizados en conjunto permiten, por primera vez, entender el desarrollo de la enfermedad asociada a *C. perfringens* tipo E en bovinos y proponer un modelo de infección de este toxinotipo, asociado a la producción de toxina iota y a la capacidad diferencial de adherencia al epitelio gastrointestinal, establecimiento y colonización por parte de la bacteria.

Abstract

Digestive diseases caused by species of the genus *Clostridium* have a major impact on both human and veterinary medicine. Among the most important pathogenic species of this genus are *C. perfringens* and *C. difficile*. Both microorganisms may be present in the intestines of healthy animals and humans and due to changes in the intestinal environment, these bacteria can proliferate and produce toxins with intestinal and/or systemic toxic effects.

The work of this thesis was performed based on the general hypothesis that the binary toxin -producing strains of the species *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* represent a group of highly specialized intestinal pathogens capable of affecting cattle of different ages.

In the first stage of this work, the isolation and characterization of strains of *C. perfringens* and *C. difficile* present in cattle herds in our country was performed. In this study no *C. difficile* isolates were obtained and *C. perfringens* isolates from healthy and sick animals of different ages were obtained in similar proportions. During the development of this thesis, an outbreak of hemorrhagic enteritis in breeding cattle from which *C. perfringens* type E, iota toxin (binary toxin) producer was isolated occurred, being the first worldwide case described in adult animals. On the other hand, this is also the first report of illness associated with this toxinotype in our country.

Obtained *C. perfringens* type E strains were compared by MLST with strains of the same toxinotype isolated in North America. Using this technique it was possible to determine that type E isolates analyzed belong to the same clonal complex, regardless of their geographic origin. The presence of this clonal complex associated with cases of hemorrhagic enteritis in cattle suggests that this microorganism is highly adapted and the ability to produce disease is due to the combined action of virulence factors encoded in plasmids and chromosome. Based on this concept, it is propound that the virulence of *C. perfringens* type E depends on the iota toxin along with complementary characteristics typical of this bacterium.

Using mice as a model species, it was possible to reproduce the systemic lethal effect of iota toxin only in relatively high toxin doses. This model also allowed to determine an enterotoxigenic effect of iota toxin. In the intestinal tract challenge by intragastric inoculation inhibition of gastrointestinal motility, changes in the homeostasis of fluids and intestinal lesions similar to those observed in natural cases of the disease were observed.

Considering the intestinal colonization by *C. perfringens* type E as the first step in disease caused by this bacterium and recognizing that the disease caused by

toxintype E strains can be an accidental event in the life cycle of the bacteria, studies were conducted in order to define a potential biological role for the iota toxin and its participation in the colonization of the intestine of mammals. Using a model in Caco-2 cells was observed that iota toxin induces the formation of extensions on the surface of enterocytes in which vegetative cells of *C. perfringens* type E attach. According to obtained results comparing the effect of iota toxin on adherence of other strains of *C. perfringens*, it is possible to suggest that these extensions are differentially exploited by E toxintype bacteria.

In addition, it is proposed that intraspecific inhibition is another mechanism involved in intestinal colonization and possibly clonal dominance observed in natural cases of infection by *C. perfringens* type E. In supernatants of these strains a peptide with antimicrobial activity was detected, which have demonstrated a wide spectrum of inhibition against various strains of *C. perfringens*. *In vitro* was observed that in cultures containing a mixture of type A and type E bacteria eventually predominates cell type E. The results obtained *in vivo* were similar but due to the complexity of the intestinal environment was not possible to determine the individual effect of the iota toxin or antimicrobial peptide on colonization.

These results analyzed together allow, for the first time, to understand the development of the disease associated with *C. perfringens* type E in cattle and propose a model of infection of this toxintype associated with iota toxin production and the differential ability to adhere to gastrointestinal epithelium, establishment and colonization of the bacteria.

Agradecimientos

Esta tesis es el producto del trabajo de varias personas las cuales en diferentes momentos en los últimos 5 años me han acompañado a través de este proceso de constante aprendizaje. Quiero agradecer al Instituto de Patobiología del CICVyA-INTA por darme el lugar donde hacerlo.

Quiero agradecer especialmente a mi director Dr. Mariano E. Fernández-Miyakawa, quien me abrió las puertas de su grupo de trabajo y me permitió trabajar con total libertad. Ha sido un privilegio formar parte de su equipo de trabajo, además de contar con su total apoyo, confianza y guía para desarrollar esta investigación. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios para llevar a cabo las investigaciones para ésta tesis. Muchas gracias Mariano por la guía y la paciencia en mi formación.

También quiero agradecer en particular a cada uno de los compañeros y amigos con quienes he tenido el privilegio de compartir el espacio del laboratorio todo este tiempo. Muchas gracias! Yanil, Bettina, Daniel, Mariano L., Johana, Luisina, Enzo, Juan, Pablo C., Gabriela, Natalia, Ana, Lory, Jesica y Nacho. No hubiese sido lo mismo sin el aporte constante de amistad, humor y buena onda.

Por otro lado quiero agradecer también al resto de mis compañeros del Instituto de Patobiología. Un grupo de una profunda calidad humana que siempre aporta a la hora de trabajar. Muchas gracias!

No me quiero olvidar del resto del personal del CICVyA-INTA, que siempre estuvo dispuesto a colaborar en todos los trabajos propuestos. Un saludo especial a la Dra. Marisa Faber y su grupo por su contribución a este trabajo y su constante apoyo.

Por último, en el apartado personal, a mis padres y hermanos, es difícil expresar en pocas palabras, los 30 y pico de años contando de amor y cariño que incondicionalmente me han dado, solo me quedan expresiones de infinito agradecimiento hacia ustedes. Muchas gracias! A Paula, a quien conocí cuando recién empezaba a dar mis primeros pasos en la tesis, y he tenido la suerte de haber transitado todo este camino a su lado, gracias por tu cariño, por tu amor y tu ternura!

A los amigos, que por miedo a de dejar a alguien injustamente de lado, generalizo el saludo y agradezco de corazón la compañía!

Tabla de contenidos

Resumen	I
Abstract	II
Agradecimientos	III
Tabla de contenidos	IV
Lista de Figuras	V
Lista de tablas	VI

Capítulo 1:

Introducción, Objetivos generales, específicos e hipótesis de trabajo	1
1.1. Introducción	2
1.2. Clostridios enterotoxicos	3
1.3. Características generales	7
1.3.1. <i>Clostridium perfringens</i>	7
1.3.2. <i>Clostridium difficile</i>	11
1.4. Enfermedades causadas por clostridios enterotoxicos	12
1.4.1. Enfermedades causadas <i>C. perfringens</i>	12
1.4.1.1. <i>Clostridium perfringens</i> tipo A	12
1.4.1.2. <i>Clostridium perfringens</i> tipo B	13
1.4.1.3. <i>Clostridium perfringens</i> tipo C	15
1.4.1.4. <i>Clostridium perfringens</i> tipo D	16
1.4.1.5. <i>Clostridium perfringens</i> tipo E	17
1.4.2. Enfermedades causadas <i>C. difficile</i>	18
1.4.2.1. Infección por <i>C. difficile</i> en humanos	18

1.4.2.2.	Infección por <i>C. difficile</i> en equinos	19
1.4.2.3.	Infección por <i>C. difficile</i> en porcinos	20
1.4.2.4.	Infección por <i>C. difficile</i> en bovinos	21
1.4.3.	Aislamiento e identificación	22
1.4.3.1.	<i>Clostridium perfringens</i>	22
1.4.3.2.	<i>Clostridium difficile</i>	25
1.5.	Toxinas binarias	28
1.5.1.	Descripción del locus <i>iA/iB</i>	29
1.5.2.	Estructura de las toxinas binarias	30
1.5.3.	Mecanismo de acción	32
1.6.	Objetivos generales, específicos e hipótesis de trabajo	35
1.6.1.	Objetivos generales	35
1.6.2.	Objetivos específicos	35
1.6.3.	Hipótesis de trabajo	36

Capítulo 2:

	Aislamiento y caracterización genotípica de cepas de <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Clostridium difficile</i> de origen bovino	37
2.1.	Introducción	38
2.2.	Materiales y métodos	42
2.2.1.	Muestras	42
2.2.2.	Aislamiento e identificación bacteriológica	43
2.2.3.	Detección de genes por PCR	47
2.2.4.	Ensayos de citotoxicidad en células	50
2.2.5.	Reporte de caso	50
2.2.6.	Análisis estadístico	51
2.2.7.	Tipificación de cepas de <i>C. perfringens</i> por MLST	52
2.2.7.1.	Cepas y condiciones de cultivo	52
2.2.7.2.	Amplificación de genes por PCR	52
2.2.7.3.	Tipificación multilocus y análisis de secuencias	54

2.2.7.4.	Definición de alelos, haplotipos y complejos clónales	54
2.3.	Resultados	55
2.3.1.	Cepas de <i>C. difficile</i> en animales de producción	55
2.3.2.	Cepas de <i>C. perfringens</i> en animales de producción	57
2.3.3.	Reporte de caso	60
2.3.3.1.	Antecedentes	60
2.3.3.2.	Hallazgos de necropsia e histopatología	60
2.3.3.3.	Bacteriología	63
2.3.3.4.	Toxinotipificación por PCR	63
2.3.4.	Caracterización de aislamientos de <i>C. perfringens</i> por MLST	64
2.3.5.	Diversidad en los loci caracterizados por MLST	66
2.4.	Discusión	68

Capítulo 3:

	Alteraciones morfológicas y fisiológicas inducidas por efecto de la toxina iota en el intestino	75
3.1.	Introducción	76
3.2.	Materiales y métodos	77
3.2.1.	Cepas y condiciones de cultivo	77
3.2.2.	Producción de toxina iota <i>in vitro</i>	78
3.2.3.	Purificación de toxina iota	78
3.2.4.	Animales	79
3.2.5.	Letalidad en ratones	79
3.2.6.	Prueba de asas intestinales ligadas	80
3.2.7.	Inmunohistoquímica	81
3.2.8.	Enteropooling o acumulación de líquido intraluminal	82
3.2.9.	Acumulación de líquido intraluminal en asas intestinales ligadas	83
3.2.10.	Medición del tránsito gastrointestinal	84
3.2.11.	Análisis estadístico	84
3.3.	Resultados	85
3.3.1.	Producción de toxina iota <i>in vitro</i>	85

3.3.2. Purificación de toxina iota	86
3.3.3. Letalidad	90
3.3.4. Efectos morfológicos de la toxina iota en el intestino	91
3.3.5. Pegado de la toxina iota a la mucosa del intestino delgado	96
3.3.6. Efecto de la toxina iota sobre el balance de líquidos en intestino delgado	97
3.3.7. Efecto de la toxina iota sobre el tránsito gastrointestinal	99
3.4. Discusión	100

Capítulo 4:

Rol de la toxina iota en las etapas iniciales de la colonización intestinal por <i>Clostridium perfringens</i>	106
4.1. Introducción	107
4.2. Materiales y métodos	109
4.2.1. Cepas y condiciones de cultivo	109
4.2.2. Curvas de crecimiento	110
4.2.3. Toxina iota	110
4.2.4. Cultivo de células Caco-2	111
4.2.5. Ensayos de adherencia <i>in vitro</i>	111
4.2.6. Efecto de la toxina iota sobre la adherencia de <i>C. perfringens in vitro</i>	112
4.2.7. Neutralización de los cambios inducidos por toxina iota en la adherencia de <i>C. perfringens</i>	113
4.2.8. Microscopia electrónica de barrido	113
4.2.9. Ensayos de adherencia <i>in vivo</i>	114
4.2.9.1. Ensayos en ratones	114
4.2.9.2. Ensayos en terneros	115
4.2.9.3. Comité institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación (CICUAE)	115
4.2.10. Inmunohistoquímica	116

4.2.11.	116
4.2.11 Análisis estadístico	116
4.3. Resultados	117
4.3.1. Patrón de crecimiento de <i>C. perfringens</i> tipo A y tipo E	117
4.3.2. Efecto de la toxina iota sobre la adherencia de <i>C. perfringens in vitro</i>	119
4.3.3. Adherencia de las células de <i>C. perfringens</i> a la mucosa intestinal	124
4.4. Discusión	128

Capítulo 5:

Factores de virulencia presentes en cepas de <i>Clostridium perfringens</i> productoras de toxina binaria	130
5.1. Introducción	131
5.2. Materiales y métodos	132
5.2.1. Cepas y condiciones de cultivo	132
5.2.2. Detección de actividad inhibitoria <i>in vitro</i>	134
5.2.3. Detección de fagos	134
5.2.4. Caracterización del factor antimicrobiano	135
5.2.5. Purificación del péptido antimicrobiano	136
5.2.6. Microscopia electrónica de transmisión	136
5.2.7. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)	137
5.2.8. Crecimiento de <i>C. perfringens</i> en monocultivo y cocultivo	138
5.2.9. Exclusión competitiva y desplazamiento de cepas <i>in vitro</i>	139
5.2.10. Exclusión competitiva <i>in vivo</i>	140
5.2.11. Comité institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación (CICUAE)	141
5.2.12. Análisis estadístico	141
5.3. Resultados	142
5.3.1. Cepas de <i>C. perfringens</i>	142
5.3.2. Detección de cepas productoras de bacteriocinas	142

5.3.3. Purificación y caracterización del péptido antimicrobiano producido por CpE 218	144
5.3.4. Análisis de microscopía electrónica de transmisión	146
5.3.5. Crecimiento de cepas tipo A y tipo E	149
5.3.6. Inhibición en cocultivo	149
5.3.7. Inhibición de la adherencia a células Caco-2	152
5.3.8. Inhibición de la colonización <i>in-vivo</i>	154
5.4. Discusión	155
Discusión general, conclusiones finales, direcciones futuras	159
Discusión general	160
Conclusiones finales	165
Direcciones futuras	166
Referencias	168

Índice de figuras

Capítulo 1:

Introducción, Objetivos generales, específicos e hipótesis de trabajo

Figura 1.1: Microfotografía de un extendido de un cultivo de <i>C. perfringens</i> con tinción de Gram	9
Figura 1.2: Microfotografía de un extendido de un cultivo de <i>C. perfringens</i> coloreado con tinta china	9
Figura 1.3: Crecimiento de <i>C. perfringens</i> en medio diferencial agar sangre	23
Figura 1.4: Crecimiento de <i>C. perfringens</i> en medio diferencial agar yema de huevo.	24
Figura 1.5: Prueba de leche tornasolada	25
Figura 1.6: Crecimiento de <i>C. difficile</i> en medio sólido	26
Figura 1.6 cont.: Crecimiento de <i>C. difficile</i> en medio sólido	27
Figura 1.7: Estructura tridimensional de los componentes A de las toxinas binarias	31
Figura 1.8: Modelo básico de intoxicación celular por toxina iota (modelo toxinas binarias)	34

Capítulo 2:

Aislamiento y caracterización genotípica de cepas de *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* de origen bovino.

Figura 2.1: Características morfológicas compatibles con aislamientos de <i>C. difficile</i>	45
Figura 2.2: Características morfológicas compatibles con aislamientos de <i>C. perfringens</i>	46
Figura 2.3: Terneros criados con el sistema de "guachera"	55
Figura 2.4: Identificación de cepas de <i>C. difficile</i> y detección de genes de toxina por PCR	57

Figura 2.5: Resultados del cultivo bacteriológico de <i>C. perfringens</i> a partir de muestras de bovinos adultos	58
Figura 2.6: Resultados del cultivo bacteriológico de <i>C. perfringens</i> a partir de muestras de terneros	59
Figura 2.7: Resultados de la tipificación mediante PCR multiplex de los aislamientos de <i>C. perfringens</i>	59
Figura 2.8: Microfotografías de diferentes secciones de íleon de uno de los animales afectados. H/E	61
Figura 2.8 cont.: Microfotografías de diferentes secciones de íleon de uno de los animales afectados. H/E	62
Figura 2.9: Tipificación por PCR multiplex de los aislamientos de <i>C. perfringens</i>	64
Figura 2.10: Agrupamiento de los aislamientos de <i>C. perfringens</i> graficado mediante PHYLOViZ	66

Capítulo 3:

Alteraciones morfológicas y fisiológicas inducidas por efecto de la toxina iota en el intestino.

Figura 3.1: Prueba de asas intestinales ligadas	81
Figura 3.2: Inoculación por vía intragástrica en ratones	83
Figura 3.3: Correlación entre el crecimiento celular y la producción de toxina iota	86
Figura 3.4: SDS-PAGE que muestra los resultados de purificación de ambas subunidades de la toxina iota	87
Figura 3.5: Microscopia de fluorescencia para observar el efecto de ambas subunidades de toxina iota sobre monocapas de células Caco-2	88
Figura 3.5 cont.: Microscopia de fluorescencia para observar el efecto de la toxina iota sobre monocapas de células Caco-2	89
Figura 3.6: Letalidad inducida por acción de la inoculación endovenosa de toxina iota purificada (ITX)	90
Figura 3.7: Histología de las asas de íleon tratadas con toxina iota	92
Figura 3.7 cont.: Histología de las asas de íleon tratadas con toxina iota	93

Figura 3.7 cont.: Histología de las asas de íleon tratadas con toxina iota	94
Figura 3.8: Histología de las asas de colon tratadas con toxina iota	95
Figura 3.9: Inmunohistoquímica de los tejidos intestinales tratados con toxina iota	96
Figura 3.10: Efecto de la toxina iota de <i>C. perfringens</i> sobre la homeostasis de líquido en el intestino delgado del ratón medido mediante enteropooling	97
Figura 3.11: Efecto de la toxina iota (ITX) de <i>C. perfringens</i> sobre la homeostasis de líquido en el intestino delgado del ratón medido en asas intestinales ligadas	98

Capítulo 4:

Rol de la toxina iota en las etapas iniciales de la colonización intestinal por *Clostridium perfringens*.

Figura 4.1: El tratamiento con toxina binaria de <i>C. difficile</i> (CDT) aumenta la adherencia bacteriana a las células eucariotas	108
Figura 4.2: Curvas de crecimiento de las cepas de <i>C. perfringens</i> utilizadas	118
Figura 4.3: Efecto del tratamiento con toxina iota sobre el pegado de <i>C. perfringens</i> tipo E (CpE218) a células Caco-2	119
Figura 4.4: Efecto del tratamiento con toxina iota (ITX) sobre el pegado de diferentes cepas de <i>C. perfringens</i>	121
Figura 4.5: Los cambios en la adherencia de <i>C. perfringens</i> tipo A y tipo E, inducidos por acción de toxina iota son neutralizadas por IgY anti-ITX	122
Figura 4.6: Microscopía electrónica de barrido de la interacción de <i>C. perfringens</i> con células Caco-2	123
Figura 4.6 cont.: Microscopía electrónica de barrido de la interacción de <i>C. perfringens</i> con células Caco-2	124
Figura 4.7: Tinción de H/E de secciones de íleon de ratones desafiados con <i>C. perfringens</i>	125
Figura 4.7 cont.: Tinción de H/E de secciones de íleon de ratones desafiados con <i>C. perfringens</i>	126
Figura 4.8: Inmunohistoquímica de secciones de íleon de ratones desafiados con <i>C. perfringens</i>	127

Capítulo 5:

Factores de virulencia presentes en cepas de *Clostridium perfringens* productoras de toxina binaria

Figura 5.1: Esquema de las placas utilizadas para determinar la CIM de las cepas a utilizar en los ensayos de cocultivo	138
Figura 5.2: Resultado del ensayo de inhibición "spot on" en agar	143
Figura 5.3: SDS-PAGE que muestra los resultados de la purificación del péptido con actividad antibacteriana presente en el sobrenadante de cepas tipo E	146
Figura 5.4: Imágenes de secciones ultrafinas de una cepa de <i>C. perfringens</i> sensible a las bacteriocinas de CpE218	147
Figura 5.4 cont.: Imágenes de secciones ultrafinas de una cepa de <i>C. perfringens</i> sensible a las bacteriocinas de CpE218	148
Figura 5.5: Resultados obtenidos en los ensayos de cocultivo en medio líquido	150
Figura 5.5 cont.: Resultados obtenidos en los ensayos de cocultivo en medio líquido	151
Figura 5.6: Resultados de los ensayos de inhibición de adherencia entre cepas de <i>C. perfringens</i> tipo A y tipo E	153
Figura 5.7: Resultados de los ensayos de desplazamiento entre cepas de <i>C. perfringens</i> tipo A y tipo E	154

Índice de tablas

Capítulo 1:

Introducción, Objetivos generales, específicos e hipótesis de trabajo.

Tabla 1.1: Enfermedades intestinales causadas por especies de *Clostridium* diferentes de *C. perfringens* 5

Tabla 1.2: Enfermedades causadas por los diferentes toxinotipos de *C. perfringens* 6

Tabla 1.3: Toxinas binarias producidas por bacterias del genero *Clostridium* 29

Capítulo 2:

Aislamiento y caracterización genotípica de cepas de *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* de origen bovino

Tabla 2.1: Número de muestras procesadas según especie, categoría y estado sanitarios de los animales 43

Tabla 2.2: Secuencias de los primers y condiciones de PCR para la detección de los genes de toxinas de *C. perfringens* 48

Tabla 2.3: Secuencias de los primers y condiciones de PCR para la identificación y tipificación de *C. difficile* 49

Tabla 2.4: Secuencias de los primers y condiciones de PCR para la amplificación de los genes utilizados en el análisis de MLST 53

Tabla 2.5: Listado de cepas de *C. perfringens* utilizadas en el análisis de MLST 65

Tabla 2.6: Diversidad dentro de cada loci caracterizado por MLST 67

Tabla 2.7: Comparación en la diversidad de los loci caracterizados por MLST entre las cepas tipo A y tipo E 68

Capítulo 3:

Alteraciones morfológicas y fisiológicas inducidas por efecto de la toxina iota en el intestino.

Tabla 3.1: Efecto de la toxina iota (ITX) sobre el tránsito intestinal de los ratones, medido mediante el uso de una solución de partículas de carbón 99

Capítulo 5:

Factores de virulencia presentes en cepas de *Clostridium perfringens* productoras de toxina binaria

Tabla 5.1: Cepas utilizadas en los ensayos de inhibición intraespecífica 133

Tabla 5.2: Cepas con el mayor espectro de inhibición, se consideraron cepas que inhibieron a 5 o + de las cepas testeadas 144

Tabla 5.3: Efecto del tratamiento térmico y la hidrólisis con proteasas sobre el péptido antimicrobiano purificado de *C. perfringens* tipo E 145

Capítulo 1:

Introducción

**Objetivos generales, específicos e
hipótesis de trabajo**

1.1. Introducción:

Las enfermedades infecciosas que afectan al aparato digestivo poseen un gran impacto en la salud de los seres humanos y los animales. Este grupo de enfermedades son una gran preocupación en los sistemas de salud pública alrededor del mundo entero, ya que las enfermedades entéricas son una de las causas principales de mortalidad infantil en los países en desarrollo. En medicina veterinaria han sido clásicamente, y son aún, una de las principales preocupaciones debido a la importancia en la salud de los animales y a que son las responsables de una buena parte de las pérdidas económicas de las explotaciones agropecuarias.

En muchos de los establecimientos ganaderos de la República Argentina, las enfermedades digestivas producen importantes pérdidas económicas en forma directa por mortalidad y retraso en el crecimiento de los animales afectados, y en forma indirecta por los costos generados por la aplicación de tratamientos y medidas de control. El complejo diarreico neonatal del ternero es el grupo de enfermedades más frecuentemente diagnosticada y una de las principales causas de mortalidad en los sistemas productivos bovinos. Estas enfermedades digestivas son multifactoriales y entre las etiologías biológicas podemos encontrar un gran número de agentes que incluyen bacterias, virus y parásitos. En nuestro país se estima que la incidencia promedio de las diarreas neonatales en terneros es cercana al 20 %. Sin embargo, este valor es altamente variable entre diferentes estudios y entre establecimientos, hallándose dentro de un mismo relevamiento rodeos libres o con incidencias muy bajas y otros endémicos, donde el porcentaje de animales afectados puede superar el 70 %. Los porcentajes de mortalidad promedio reportados oscilan desde el 3,6 % en Francia y el 10 % en Estados Unidos. Sin embargo, estos índices pueden superar el 10 % en establecimientos individuales. De lo expuesto, se desprende que las diarreas neonatales representan una importante fuente de pérdidas económicas para los

productores, estimada en un costo promedio, considerando gastos de prevención, tratamiento, pérdida de peso de los animales afectados y mortalidad asociada, de US\$ 33,46 por ternero/año (Odeón 2001; Parreño, 2008).

Las bacterias del genero *Clostridium* muchas veces son sospechadas de ser las responsables de gran parte de las pérdidas ocasionadas por los cuadros entéricos que afectan a éstos sistemas productivos. Aunque algunas de las enfermedades entéricas clostridiales han sido ampliamente descritas y existen vacunas efectivas que las previenen, muchas otras son completamente desconocidas e ignoradas. Parte del desconocimiento se ha debido a fallas en el diagnóstico, en la interpretación de los resultados, en la falta de información básica sobre la patogénesis de ciertas especies de *Clostridium* y particularmente sobre ciertas toxinas que no han recibido suficiente consideración ni reconocimiento como factores de virulencia claves.

1.2. Clostridios enterotóxicos:

El tracto gastrointestinal de aves y mamíferos es el hábitat natural de muchas clases de bacterias. Las condiciones de anaerobiosis y disponibilidad de nutrientes presentes en este ambiente representan un nicho especialmente atractivo para numerosas especies del genero *Clostridium*. Las especies pertenecientes a este género bacteriano se caracterizan por ser bacilos Gram positivos de gran tamaño, formadores de endoesporas, anaerobios y son considerados parte de la microbiota normal del intestino en individuos sanos. Sin embargo, bajo determinadas condiciones, algunas de estas especies son capaces de producir toxinas con diferentes actividades sobre el tracto gastrointestinal, causando enfermedades enterotóxicas tanto en seres humanos

como en animales. Las enfermedades intestinales causadas por clostridios varían considerablemente en su presentación y en la gravedad de las mismas, pero en general son cuadros de presentación aguda y con signología severa. En su conjunto, estas infecciones representan una importante carga económica para la medicina humana y veterinaria, ocasionando pérdidas por miles de millones de dólares a nivel mundial.

Incluidas dentro del género *Clostridium*, existen dos especies a las que se considera de gran importancia tanto para la medicina humana como la veterinaria, *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile*. Ambas especies bacterianas son ampliamente reconocidas como patógenos intestinales de humanos y animales domésticos (McClane et. al, 2006; Songer, 1996). Las cepas de estas especies son capaces de producir diversos factores de virulencia, lo cual se ve reflejado en la variación observada en la presentación y gravedad de los cuadros digestivos ocasionados por estos microorganismos en diferentes especies animales, incluidos los seres humanos **(tablas 1.1, 1.2)**.

Tabla 1.1: Enfermedades intestinales causadas por especies de *Clostridium* diferentes de *C. perfringens*.

Especie	Factores de virulencia	Enfermedades
<i>C. difficile</i>	Toxina A (TCDA); toxina B (TCDB); toxina binaria (CDT)	Diarrea asociada a antimicrobianos y colitis pseudomembranosa en humanos; enteritis y enterocolitis hemorrágica en equinos; enteritis y tiflocolitis en porcinos, enteritis en rumiantes
<i>C. spiroforme</i>	Toxina binaria tipo iota (CST)	Tiflocolitis hemorrágica en conejos y equinos
<i>C. septicum</i>	Toxina alfa	Abomasitis en ovinos y bovinos

Tabla 1.2: Enfermedades causadas por los diferentes toxinotipos de *C. perfringens*.

Toxinotipo	Toxinas principales	Enfermedades
A	Toxina α (CPA)	Gangrena gaseosa en humanos y animales; enteritis necrótica en aves de corral; abomasitis hemorrágica y enteritis hemorrágica - necrótica en rumiantes; enterotoxemia en ovinos; enteritis en porcinos y equinos.
	Toxina α (CPA) y enterotoxina (CPE)	Intoxicación alimentaria y diarrea asociada a antimicrobianos en humanos; enteritis en caninos, porcinos y equinos
	Toxina α (CPA) y toxina β_2 (CPB2)	Enteritis en porcinos, equinos y bovinos
B	Toxina α (CPA), toxina β (CPB) y toxina ϵ (ETX)	Disentería y enteritis hemorrágica en ovinos y caprinos
C	Toxina α (CPA) y toxina β (CPB)	Enteritis necrótica en humanos (Pigbel o Darmbrand); Enteritis hemorrágica- necrótica en porcinos, equinos y rumiantes; enteritis necrótica en aves de corral
	Toxina α (CPA), toxina β (CPB) y toxina β_2 (CPB2)	Enteritis en porcinos y equinos
D	Toxina α (CPA) y toxina ϵ (ETX)	Enterotoxemia en ovinos (Riñón pulposo); enterocolitis en caprinos; enterotoxemia en bovinos
E	Toxina α (CPA) y toxina τ (ITX)	Enteritis hemorrágica en bovinos, ovinos y conejos
	Toxina α (CPA), toxina τ (ITX) y enterotoxina (CPE)	Intoxicación alimentaria en humanos

1.3. Características generales:

1.3.1. *Clostridium perfringens*:

Clostridium perfringens es uno de los patógenos con mayor distribución en la naturaleza, se lo encuentra en el medio ambiente y en el tracto intestinal de animales y de seres humanos sanos. En determinadas condiciones la microbiota intestinal es alterada permitiendo la proliferación de *C. perfringens* y la producción de enfermedad. Aunque esta bacteria no es capaz de invadir células sanas, produce un gran número de toxinas y enzimas que son las responsables de la producción de los signos y lesiones asociadas a las enfermedades producidas por este microorganismo (Morris y Fernández Miyakawa, 2009; Smedley et al., 2004). *Clostridium perfringens* se ha relacionado con enfermedades gastrointestinales en seres humanos desde mediados de la década de 1940, cuando McClung observó la capacidad de esta bacteria de causar intoxicación alimentaria (McClung, 1945). Esta asociación fue confirmada por los estudios de Hobbs durante la década de 1950 (McDonel, 1986). A finales de la década de 1940, *C. perfringens* también pudo ser asociado con brotes de "Darmbrand" (enteritis necrótica) en Alemania durante la posguerra (Kreft et al., 2000). En la década de 1980 se vinculó a *C. perfringens* con enfermedades humanas no transmitidas por los alimentos (Borriello, 1995; Borriello et al., 1984). La asociación de *C. perfringens* con enfermedades digestivas en medicina veterinaria ocurrió aun antes, donde los primeros informes surgen en la década de 1920 y principios de 1930 (Lebrun et al., 2010; Songer, 1996). A la fecha, a pesar de que se reconoce la importancia y el peso de las infecciones clostridiales en la medicina veterinaria, el real impacto de las enfermedades producidas por *C. perfringens* en animales domésticos no se comprende completamente.

Las principales características de esta bacteria incluyen su morfología microscópica, siendo un bacilo Gram positivo, corto y con forma de caja (**Figura 1.1**), no móvil. Como otras especies del género *Clostridium*, este microorganismo es anaerobio, ya que no es capaz de crecer en placas incubadas en presencia de oxígeno atmosférico, sin embargo, *C. perfringens* no muere rápidamente cuando se expone al aire y crece después de sólo una moderada reducción del medio de cultivo, posiblemente porque esta bacteria produce cantidades relativamente altas de superóxido dismutasa, además la síntesis de esta enzima es inducida cuando las células vegetativas son expuestas a estrés oxidativo (Briolat y Reysset, 2002; Varga et al., 2008). Esta bacteria puede formar esporas, las cuales pueden observarse en extendidos de contenido intestinal, pero en condiciones de laboratorio con los medios utilizados rutinariamente es muy difícil inducir la esporulación (Philippe et al., 2006). Otra característica de esta especie es la presencia de una capsula de carbohidratos (**Figura 1.2**). Debido a que la mayor parte de los aislamientos de *C. perfringens* poseen esta estructura y su composición varía entre cepas, se desarrollaron sistemas de serotipificación capsular. Estos sistemas fueron empleados con éxito entre los años 1950 y 1980 para investigar brotes de intoxicación alimentaria ocasionados por *C. perfringens* en el Reino Unido (Stringer et al, 1980). Sin embargo, la serotipificación capsular demostró ser menos eficaz para la investigación de brotes similares en los Estados Unidos y Japón (donde muchos aislamientos no podían ser tipificados con los antisueros existentes), por lo que esta técnica se utiliza con menos frecuencia hoy en día.

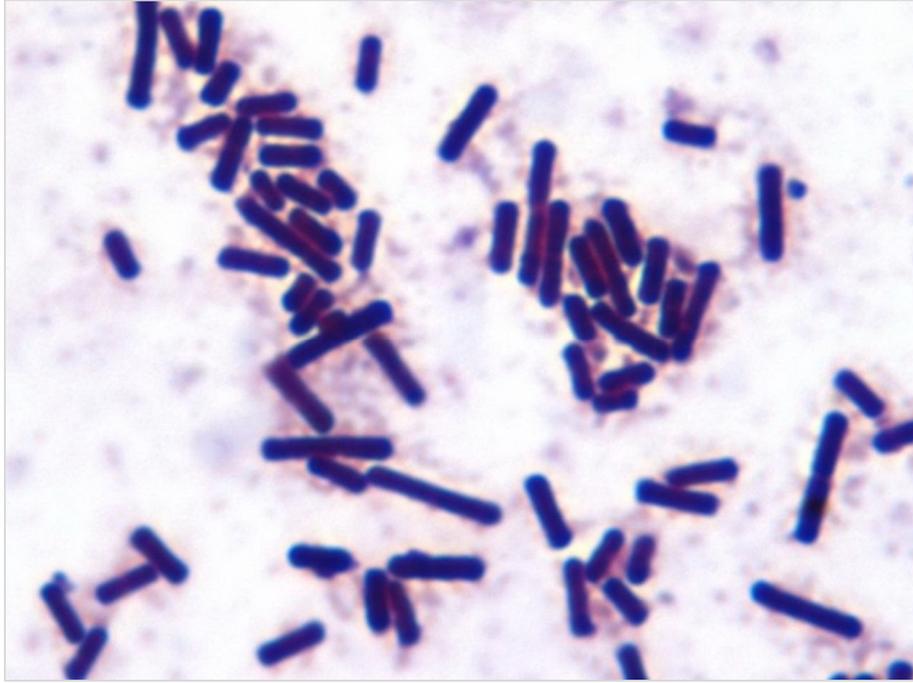


Figura 1.1: Microfotografía de un extendido de un cultivo de *C. perfringens* con tinción de Gram, es posible observar la forma de caja de las células (1000x).

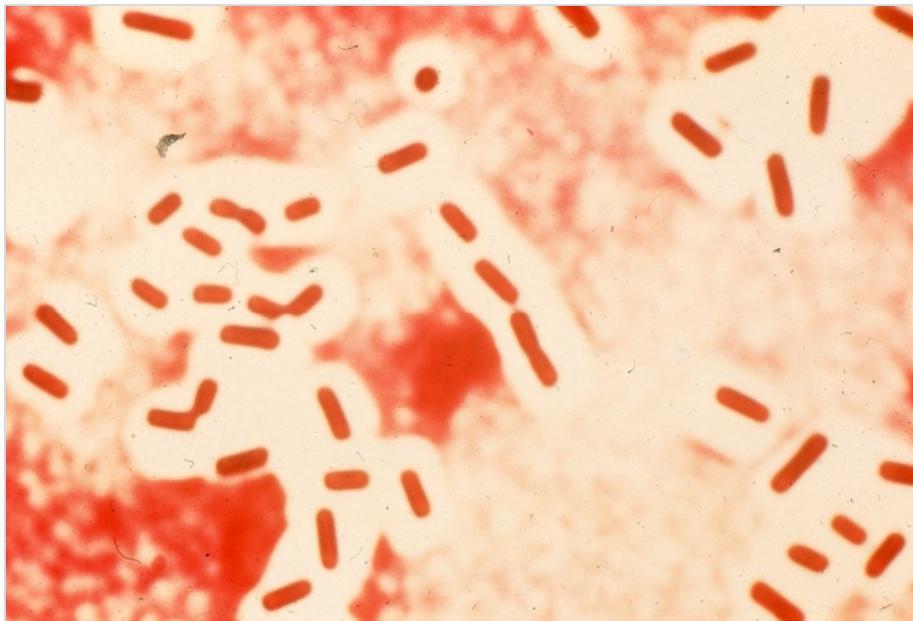


Figura 1.2: Microfotografía de un extendido de un cultivo de *C. perfringens* coloreado con tinta china, es posible observar la presencia de capsula (1000x). (www.microbeworld.org).

Este microorganismo es un prolífico productor de toxinas, posee un impresionante arsenal de al menos 30 toxinas (Morris y Fernández Miyakawa, 2009; Petit et al., 1999; Smedley et al., 2004). Sin embargo, los aislamientos individuales expresan solo ciertas combinaciones de estas toxinas, lo cual permitió el desarrollo de un esquema de toxinotipificación, ampliamente utilizado en la diferenciación entre aislamientos de *C. perfringens* (McClane et al., 2006; Songer, 1996). Este enfoque de tipificación por toxinas clasifica a los aislamientos en 5 toxinotipos (A-E) en base a la producción de cuatro toxinas, denominadas principales: alfa, beta, iota y épsilon (**Tabla 1.2**). Esta diversidad en la expresión de toxinas entre aislamientos sirve como explicación inicial de por qué *C. perfringens* es capaz de causar una amplia gama de enfermedades, desde enteritis leves hasta enterotoxemias fatales. Además de las cuatro toxinas principales, otras toxinas también contribuyen a la virulencia de *C. perfringens*. Las toxinas beta2 y enterotoxina (CPE), son consideradas importantes factores de virulencia involucrados en enfermedades entéricas de animales y seres humanos. En el caso de la toxina beta2, los reportes existentes muestran resultados contradictorios acerca de su rol en la patogenia de *C. perfringens* (Lebrun et al., 2010), actualmente se considerada como un factor que contribuye a la virulencia de *C. perfringens* (Manteca et al., 2002), aunque no puede ser considerada como un factor determinante (Nowell et al., 2012). Las cepas productoras de enterotoxina se encuentran asociadas a brotes de intoxicación alimentaria y diarrea asociada a antibióticos, y aunque sólo el 1-5 % de los aislamientos de *C. perfringens* son capaces de producir enterotoxina, este grupo de cepas son la 2º y 3º causa de intoxicación alimentaria en el Reino Unido y Estados Unidos, respectivamente (Li y McClane, 2006; McClane et al., 2006).

1.3.2. *Clostridium difficile*:

Clostridium difficile, como otras especies pertenecientes al género *Clostridium*, es un microorganismo formadoras de esporas, Gram positivo y anaerobio. Esta bacteria es un ejemplo de patógeno oportunista, ya que la mayor parte de los casos de enfermedad intestinal asociada a *C. difficile* se producen en pacientes que presentan una microbiota intestinal alterada. Tradicionalmente se propuso que la primera etapa de la enfermedad ocasionada por esta bacteria era las disbacteriosis intestinal luego del uso prolongado de antimicrobianos (Bartlett, 1992; Cervetto, 1996; Meyer-Kawohl y Bockemühl, 1986). Según este supuesto, cambios en la composición de la microbiota permiten que las esporas de *C. difficile* germinen en el intestino y las células vegetativas se establezcan, y de acuerdo a las características del huésped (edad, estado inmunológico) esto puede continuarse con la producción de toxinas, generando daño en los tejidos, lo que resulta en la aparición de la enfermedad. Existen reportes de enfermedad asociada a *C. difficile* en relación a casi todos los antimicrobianos, pero la ampicilina, amoxicilina, clindamicina, y cefalosporinas de 3º y 4º generación son los más comunes (Cervetto, 1996; Kuijper y van Dissel, 2008; Meyer-Kawohl y Bockemühl, 1986b). La infección resultante varía desde un estado de portador asintomático o enteritis leve, hasta colitis pseudomembranosa fulminante. Los términos generales utilizados para describir las enfermedades asociadas a *C. difficile*, incluyen diarrea asociada a antibióticos, colitis asociada a antibióticos y colitis pseudomembranosa. La diarrea asociada a antibióticos es la forma más leve de la enfermedad, y en algunos casos, es autolimitante. La colitis asociada a antibióticos y la colitis pseudomembranosa poseen un fuerte componente inflamatorio y pueden amenazar la vida si no es diagnosticada y tratada rápidamente.

Existen reportes del aislamiento de *C. difficile* a partir de un amplia variedad de especies animales. En muchos casos las especies de animales domésticos (equinos, porcinos, bovinos) son portadores asintomáticos. Sin embargo algunos animales,

pueden desarrollar una enfermedad intestinal muy parecida a la observada en seres humanos. Los hámsteres son especialmente sensibles a este organismo y sus toxinas, y luego del tratamiento con antimicrobianos desarrollan una enfermedad intestinal aguda, que se manifiesta principalmente como cecitis fatal. Por esta razón, esta especie ha sido usada como modelo animal de elección y el cual ha permitido realizar importantes aportes al entendimiento de la patogénesis y aspectos terapéuticos de la enfermedad (Borriello et al., 1987; Douce y Goulding, 2010; Keel y Songer, 2006). Los ratones tratados con antibióticos también pueden desarrollar la enfermedad, pero en ratones, la enfermedad se desarrolla más como una colitis crónica. Por esta razón, algunos investigadores creen que el modelo de ratón imita más estrechamente la enfermedad en los seres humanos y resulte de mayor utilidad al momento de establecer mecanismos patogénicos o alternativas terapéuticas (Chen et al., 2008).

1.4. Enfermedades causadas por clostridios enterotóxicos.

1.4.1. Enfermedades causadas *C. perfringens*:

1.4.1.1. *Clostridium perfringens* tipo A:

Las cepas del toxinotipo A son las más difundidas en la naturaleza, incluso se encuentran presentes como componente de la microbiota normal de animales y seres humanos (McClane et al., 2006; Songer, 1996). La amplia distribución de este toxinotipo genera controversia acerca de su importancia como agente patógeno. *Clostridium perfringens* tipo A se asocia a una gran variedad de enfermedades

digestivas en numerosas especies, las cuales se presentan en forma de cuadros de gravedad variable incluyendo enteritis leve hasta gastroenteritis hemorrágica fulminante (Songer, 1996). Algunas cepas de este toxinotipo producen gangrena gaseosa en seres humanos y animales (Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003), intoxicación alimentaria en humanos (Ma et al, 2012; Miyamoto et al., 2011), enteritis necrótica en aves de corral (Long, 1973) y una forma de enterotoxemia en corderos denominada "enfermedad del cordero amarillo" (Uzal y Songer, 2008). La intoxicación alimentaria en humanos causada por cepas tipo A productoras de enterotoxina es la segunda y tercer enfermedad transmitida por los alimentos en el Reino Unido y Estados Unidos, respectivamente (Li y McClane, 2006; McClane et al., 2006). Este grupo de cepas también se encuentra asociado a cuadros de diarrea esporádica o asociada a la terapia con antimicrobianos. En animales domésticos, la enfermedad de mayor impacto producida por este toxinotipo es la enteritis necrótica en aves de corral (Timbermont et al., 2011). Por definición las cepas de este toxinotipo únicamente producen la toxina alfa, esta toxina es una proteína de 42 kDa que posee actividad fosfolipasa C y esfingomielinasa (Titball et al., 1999). Esta toxina, en conjunto con la perfringolisina, ha demostrado poseer un rol central en la patogénesis de la gangrena gaseosa (Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003). Aunque, algunos estudios sugieren que podría ser un factor de virulencia importante en las enfermedades intestinales (Fernandez Miyakawa y Uzal, 2005; Valgaeren et al., 2013), hasta el momento no ha sido posible definir una asociación entre la producción de toxina alfa y el desarrollo de enteritis o enterotoxemia (Goossens et al., 2014), Además de la toxina alfa, subgrupos de cepas producen factores de virulencia complementarios, como la toxina NetB en cepas productoras de enteritis necrótica en aves (Keyburn et al., 2008), o la toxina beta 2 en rumiantes (Manteca et al., 2002).

1.4.1.2. *Clostridium perfringens* tipo B:

Las cepas pertenecientes al toxinotipo B son conocidas por el ser el agente etiológico de la disentería en corderos (J. Glenn Songer, 1996). Esta enfermedad es un diagnóstico poco frecuente alrededor del mundo, y la distribución geográfica de este

aislamiento se encuentra limitada a determinadas regiones geográficas. En nuestro país, se mantiene en niveles endémicos en la región patagónica, y aunque es poco frecuente, en esta región es posible aislarlo de animales sanos (Uzal et al, 2002). La fuente de infección primaria es el medio ambiente o la madre, y la colonización ocurre en los primeros días de vida del cordero. La presencia de grandes cantidades de alimento en el tracto digestivo inmaduro, por ejemplo en corderos hijos de madres con una gran producción láctea, permite un crecimiento anárquico de estas cepas acompañado de la producción de toxinas. Estas toxinas tienen un efecto local sobre la mucosa del intestino, pero pueden ser absorbidas y generar efectos sistémicos (Mariano E Fernandez Miyakawa, Fisher, et al., 2007). Síndromes similares se describen en cabras, terneros y potrillos (McClane et al., 2006; Songer, 1996). Los aislamientos del toxinotipo B producen, por definición las toxinas alfa, beta y épsilon. Aunque las 3 toxinas poseen efectos sinérgicos a nivel intestinal y sistémico (Fernandez Miyakawa et al., 2007; Fernandez Miyakawa et al., 2008) el rol individual de cada toxina no es comprendido completamente. La toxina beta es muy sensible a la digestión por tripsina, y por lo tanto en animales con bajos niveles de tripsina intestinal se favorece su acumulación en intestino. En contraste, la toxina épsilon requiere un paso previo de activación proteolítica, lo cual puede ocurrir por proteasas intestinales o bacterianas (Harkness et al., 2012), para ser completamente activa biológicamente. Estos requerimientos opuestos sugieren que en las enfermedades producidas por cepas del toxinotipo B, pueden predominar signos y lesiones asociados a la toxina beta (mayormente intestinales) o asociados a la toxina épsilon (mayormente nerviosos), de acuerdo a las condiciones presentes en el intestino (Mariano E Fernandez Miyakawa, Fisher, et al., 2007). La mayor parte del conocimiento actual de la patogénesis de las infecciones de *C. perfringens* tipo B, provienen de descripciones de casos naturales, principalmente en ovinos. La enfermedad se caracteriza por muerte súbita o desarrollo de signos nerviosos agudos. En algunos casos se puede observar signos digestivos que incluyen dolor abdominal y diarrea sanguinolenta, seguidos por recumbencia, coma y finalmente la muerte, para estos cuadros se estima una letalidad cercana al 100%. A la necropsia es posible encontrar hemorragias y úlceras en el intestino delgado. En seres humanos existen reportes que sugieren que la presencia de bacterias de este toxinotipo en el intestino, junto a la producción de toxina épsilon, se relaciona con el

desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple (Rumah et al., 2013).

1.4.1.3. *Clostridium perfringens* tipo C:

Clostridium perfringens tipo C produce enteritis y enterotoxemia en numerosas especies incluyendo seres humanos. El curso de la enfermedad, los signos y lesiones encontrados en casos naturales son muy similares en varias especies. El curso de esta enfermedad puede ser hiperagudo, agudo o crónico. La presentación hiperaguda se caracteriza por cuadros de muerte súbita; la presentación aguda se presenta como cuadros de intenso dolor abdominal que pueden ir acompañados o no de diarrea sanguinolenta (Songer y Uzal, 2005; Uzal y McClane, 2011). Los cuadros crónicos son menos comunes y en general afectan a animales adultos, se manifiestan con la presencia de diarrea abundante sin sangre y deshidratación. Las lesiones características se observan principalmente en intestino delgado, aunque algunas veces puede verse afectado el colon o el ciego. Las lesiones incluyen necrosis y enteritis hemorrágica difusa o localizada, también es posible observar enfisema en los tejidos y presencia de contenido sanguinolento (McClane et al., 2006; Songer, 1996). Al igual que otras enfermedades producidas por *C. perfringens*, la enfermedad por tipo C, se inicia luego de que un cambio en el ambiente intestinal permite el sobrecrecimiento acompañado de la producción de toxinas (Uzal y McClane, 2011). Aunque las cepas tipo C pueden encontrarse como componentes de la microbiota intestinal normal, es más probable que ingrese con el alimento y se comporte como una verdadera infección, sin embargo nuevos trabajos son necesarios para definir este punto. Por definición las cepas tipo C deben producir las toxinas alfa y beta. De acuerdo a los trabajos actuales la toxina beta es la factor de virulencia más importante de estos aislamientos (Sayeed et al., 2008). Esta toxina es una molécula de aproximadamente unos 35 kDa muy sensible a la inactivación por proteasas como la tripsina. Esta sensibilidad a la proteólisis, se relaciona con la aparición de cuadros en individuos en los cuales el contenido o actividad de tripsina intestinal se encuentre reducido. El primer sitio de acción de la toxina beta es el intestino, donde se producen graves

alteraciones en el epitelio, de forma directa por acción sobre los enterocitos o en forma indirecta, por alteraciones en el endotelio de los vasos intestinales lo cual genera trombosis e isquemia en el intestino (Popescu et al., 2011). Los cambios producidos sobre el intestino permiten que la toxina beta, junto con otras toxinas que puedan estar presentes en el intestino, alcancen la circulación general y produzcan efectos sistémicos letales. En seres humanos, los aislamientos del toxinotipo C también producen enteritis necrótica. Las presentaciones más conocidas de esta enfermedad son "Pigbel", endémica en el sudeste asiático, y "Darmbrand" ocurrida en Alemania a finales de la 2º guerra mundial. En la actualidad se presenta en forma aislada en pacientes con una secreción de tripsina disminuida secundaria a enfermedades pancreáticas, diabetes (Gui et al., 2002; Petrillo et al., 2000) o malnutrición.

1.4.1.4. *Clostridium perfringens* tipo D:

Clostridium perfringens tipo D produce enterotoxemia en ovinos, caprinos (Fernandez Miyakawa et al, 2003; Miyakawa y Uzal, 2003) y bovinos (Filho et al., 2009). Esta enfermedad es más común en ovinos, donde se la conoce con el nombre de "riñón pulposo". Este nombre deriva de una lesión característica en ovinos donde los riñones adquieren una consistencia friable. La enfermedad está asociada a cambios en la microbiota intestinal debido a cambios bruscos en la dieta especialmente luego del agregado de dietas ricas en carbohidratos, esta enfermedad se destaca por su curso corto y la gran tasa de letalidad. El pasaje de una gran cantidad de nutrientes desde el abomaso al intestino delgado permite un crecimiento descontrolado de estas cepas acompañado de la producción de toxina épsilon. En ovinos esta enfermedad es de curso agudo y se caracteriza por la presencia de lesiones simétricas en cerebro y edema de pulmón, con cambios muy leves o inexistentes en intestino (McClane et al., 2006; J. Glenn Songer, 1996). A diferencia de esto, en caprinos la enfermedad es de curso crónico se caracteriza por enterocolitis ulcerativa con pocos cambios a nivel sistémico (Fernandez Miyakawa et al, 2003; Miyakawa y Uzal, 2003). En bovinos aunque se ha reportado la ocurrencia de casos naturales, e incluso existen trabajos donde se realiza la reproducción de una enfermedad similar a la descrita en ovinos

(Filho et al., 2009), la relación entre este agente y la enfermedad no está completamente definida. Las cepas de *C. perfringens* tipo D se definen por la producción de las toxinas alfa y épsilon. Los signos y alteraciones sistémicas observadas en casos naturales de esta enfermedad pueden ser reproducidos mediante la administración endovenosa de toxina épsilon purificada. Esta toxina es la tercer toxina más potente (después de las toxinas botulínica y tetánica) y es considerada como un potencial agente de bioterrorismo. La toxina épsilon es secretada por la célula bacteriana como una prototoxina la cual requiere de una activación proteolítica, que puede ser por proteasas intestinales o bacterianas como se explicó en el caso de las enfermedades producidas por el toxinotipo B. Aunque los efectos sistémicos de esta toxina sean los de mayor impacto, la toxina épsilon posee efectos sobre el intestino, inhibe la motilidad (Losada-Eaton y Fernandez Miyakawa, 2010) e incrementa la permeabilidad intestinal (Goldstein et al., 2009), permitiendo la acumulación y absorción de esta toxina (Losada-Eaton et al., 2008). Una vez en la circulación general afecta al cerebro, pulmones y riñones.

1.4.1.5. *Clostridium perfringens* tipo E:

Desde la descripción del primer caso, hace más de 50 años (Bosworth, 1943), la enterotoxemia por *C. perfringens* tipo E ha sido considerada como una causa poco común de enteritis en terneros (Songer y Miskimmins, 2004), corderos (Songer 1998) y conejos (Baskerville et al., 1980). A pesar de ser considerado como un agente poco frecuente, trabajos recientes sugieren que la prevalencia de este toxinotipo podría ser mayor de la previamente considerada. En un trabajo realizado en Estados Unidos, informa que este toxinotipo se aisló en el 4% de las muestras destinadas a diagnóstico de enfermedades clostridiales, en este mismo trabajo reportan que hasta un 50% de los casos de enteritis hemorrágica fatal observados en terneros estarían producidos por este toxinotipo (Songer y Miskimmins, 2004). Un trabajo similar realizado en Brasil, informó de la detección de toxina iota en el 30% de las muestras de bovinos analizadas. En nuestro país solo existen reportes de aislamientos a partir de productos cárnicos (Stagnitta et al., 2002). La enterotoxemia por *C. perfringens* tipo E es de

presentación hiperaguda que se observa como casos de enteritis hemorrágica fatal o muerte súbita. Las lesiones observadas a la necropsia son focos de hemorragia, hiperemia y edema de la mucosa del intestino delgado y abomaso (Redondo et al., 2013; Songer y Miskimmins, 2004). Aunque los aislamientos de *C. perfringens* tipo E se definen por la producción de toxinas alfa e iota, actualmente existen pocos trabajos referidos a la patogenia de este toxinotipo. La toxina iota pertenece a la familia de las toxinas binarias, junto con otras toxinas producidas por otras especies de clostridios enterotóxicos. El mecanismo de acción de la toxina iota se discutirá en las siguientes secciones.

1.4.2. Enfermedades causadas por *C. difficile*:

1.4.2.1. Infección por *C. difficile* en seres humanos:

Desde fines de la década de 1970 *C. difficile* ha sido considerado como la principal causa infecciosa de diarrea asociada a antimicrobianos y colitis pseudomembranosa en adultos. En la actualidad es considerado como el principal agente de enfermedad nosocomial, superando a las cepas resistentes a meticilina de *Staphylococcus aureus* (Olfield IV et al., 2014). Los cuadros clínicos asociados a la infección por esta bacteria pueden presentarse como una infección asintomática, o como cuadros de enteritis de severidad variable que incluyen diarrea sin lesiones aparentes hasta cuadros de colitis pseudomembranosa fulminante. En algunas ocasiones pueden desarrollarse secuelas severas como íleo paratítico, megacolon tóxico, perforación intestinal o peritonitis, sin embargo estas presentaciones son poco comunes (Olfield IV et al., 2014; Keel y Songer, 2006). Los factores de riesgo tradicionales incluyen hospitalización, terapia antimicrobiana, inmunosupresión y edad superior a los 65 años entre otros. Sin embargo, en los últimos años se ha reportado un incremento en la incidencia de las enfermedades asociadas a este microorganismo y en la severidad de los cuadros, como así también la aparición de enfermedad en pacientes no incluidos en los grupos de

riesgos (Freeman et al., 2010). Estos cambios en la epidemiología se atribuyen a la aparición de cepas hipervirulentas de *C. difficile* (Stabler et al., 2009; Warny et al., 2005). Aunque estas cepas hipervirulentas incluyen numerosos ribotipos el de mayor impacto han sido las cepas del grupo BI/NAP1/027 aisladas en brotes en Europa y América del Norte (Navaneethan, 2010). Los datos actuales acerca de la incidencia y el impacto de la infección por *C. difficile* en Argentina y otros países de Latinoamérica son escasos y muchas veces contradictorios (Lopardo et al., 2014)

1.4.2.2. Infección por *C. difficile* en equinos:

Clostridium difficile es una causa importante de diarrea y enterocolitis fatal en los equinos, también produce diarrea acuosa y deshidratación severa en potros recién nacidos (Rodríguez-Palacios et al., 2007). Las alteraciones más comunes incluyen enterocolitis necrotizante hemorrágica severa, y en la histopatología es común observar abundantes bacilos Gram positivos adheridos a vellosidades intestinales necróticas. El curso clínico suele durar menos de 24 horas y se caracteriza por presencia de cólicos, debilidad y deshidratación severa. La enfermedad en los potrillos ha podido ser reproducida en forma experimental luego del desafío intragástrico con una suspensión de esporas (Arroyo et al., 2004). En los últimos años *C. difficile* se ha convertido en una de las causas de infecciones nosocomiales asociadas a la terapia antimicrobiana y diarrea en caballos adultos, sin embargo, la tasa de detección de bacteria o toxina es altamente variable tanto en individuos adultos como jóvenes (Arroyo et al., 2007). Algunos autores sugieren que esta bacteria puede estar asociada a casos de duodenitis yeyunitis proximal. Aunque en nuestro país se ha detectado la presencia de casos en los que los signos y lesiones observados coinciden con los reportados para esta enfermedad, al momento no se han realizado estudios que reporten el aislamiento de esta bacteria.

1.4.2.3. Infección por *C. difficile* en porcinos:

Existen numerosos reportes de casos de infección neonatal en porcinos (Songer y Uzal, 2005), los cuadros típicos de enfermedad asociada a esta bacteria se observan en lechones de 1 a 7 días de edad, que presentaban antecedentes de diarrea desde el nacimiento. En los casos característicos se observa edema en mesocolón, contenido del colon de consistencia pastosa a acuosa de color amarillento. En algunos casos es posible observar signos sistémicos como disnea que se pueden presentar en forma leve a severa. En la bibliografía consultada mencionan que el diagnóstico debe realizarse mediante la detección de la toxina (Keel y Songer, 2006), aunque los resultados con esta técnica pueden ser variables. De acuerdo a los trabajos consultados, se estima que en promedio, el 60% de las camadas y hasta un 30% de los cerdos individuales presentes en un establecimiento pueden verse afectados durante un brote, aunque la tasa de infección puede ser tan alta como 97 % (Keel y Songer, 2006). Los animales afectados presentan un peso al destete aproximadamente 0.5 a 1 kg por debajo del promedio. En estos casos el cultivo en medio selectivo de contenido de colon produce un abundante crecimiento de colonias compatibles con *C. difficile*. La infección por *C. difficile* puede afectar incluso animales adultos presentándose en forma similar a la enfermedad en humanos, incluso en sus formas más severas (Keel y Songer, 2006). Los resultados obtenidos mediante la caracterización genética de cepas de origen porcino (Pirs et al., 2008), revela la presencia de ribotipos asociados a enfermedad en humanos, incluidas las cepas denominadas hipervirulentas, la similitud entre estas cepas y la extensa diseminación de las mismas a través del ambiente, refuerza la idea de una posible transmisión interespecie de estas cepas. Reportes de nuestro país han demostrado la presencia de las toxinas de *C. difficile* en brotes de enteritis con presencia de edema de mesocolón (Cappuccio et al., 2009), aunque a la fecha no existen reportes de aislamientos en cerdos con enfermedad intestinal.

1.4.2.4. Infección por *C. difficile* en bovinos:

Actualmente existen numerosos reportes de asociaciones entre el aislamiento de *C. difficile* y la presencia de enteritis en terneros jóvenes, sin embargo al momento los resultados obtenidos son variables. En un estudio de casos-controles en terneros de establecimientos lecheros, *C. difficile* fue aislado de 7,6 % de los terneros con enfermedad digestiva y del 14,9 % de los animales sanos (Rodríguez-Palacios, et al., 2007). En este mismo trabajo se detectaron las toxinas A y B en el 39,6 % de los terneros con diarrea y en 20,9 % de los controles. Otros trabajos realizados en poblaciones similares reportan prevalencias que varían desde el 20% al 1% (Costa et al., 2012; Hammitt et al., 2008). En un ensayo de asas intestinales ligadas en terneros (Hammitt et al., 2008), se observó que los tejidos de animales tratados con toxinas A y/o B mostraron acumulación de líquidos, y durante el análisis histopatológico se observó la presencia de infiltrados inflamatorios en *lámina* propia del colon proximal, y criptas deformadas por la presencia de restos necróticos de células epiteliales y neutrófilos degenerados. También fue posible observar degeneración del epitelio y pérdida del mismo en algunas regiones del colon medio y distal. El infiltrado de neutrófilos ha sido observado en otras especies con enteritis por *C. difficile* (Keel y Songer, 2006). También se ha intentado reproducir experimentalmente la infección en ganado bovino sin embargo al momento no ha sido posible (Rodríguez-Palacios et al., 2007). Los resultados obtenidos mediante la caracterización genética de las cepas de origen bovino (Rodríguez-palacios et al., 2006), revela la presencia de ribotipos asociados a enfermedad en humanos, incluidas las cepas denominadas hipervirulentas, al igual que la situación planteada en porcinos, la similitud entre estas cepas y la extensa diseminación de la mismas a través del ambiente, sugiere una posible transmisión interespecie de estas cepas. Aunque recientemente se ha demostrado la presencia de esporas de *C. difficile* en carne bovina (Rodríguez-Palacios et al., 2007), y estas cepas están asociadas a enfermedad en humanos y animales, al momento no se ha reportado la transmisión interespecies (Songer, 2010). Actualmente no existen reportes de esta enfermedad en bovinos de nuestro país.

1.4.3. Aislamiento e identificación:

Al momento de realizar la identificación de *C. perfringens* o *C. difficile* es importante considerar la amplia distribución de estos microorganismos en la naturaleza, lo que puede dificultar la interpretación de los resultados obtenidos por bacteriología.

1.4.3.1. *Clostridium perfringens*:

Actualmente se encuentran disponibles diversos medios selectivos aptos para el aislamiento de *C. perfringens* a partir de diversos tipos de muestras. Uno de tales medios es el agar con sangre de ovino o bovino que contiene neomicina (Marshall, 1965), las colonias se pueden aislar fácilmente mediante extensión de una muestra sobre una placa, para luego incubar en condiciones de anaerobiosis durante ~ 18 horas. Las colonias de *C. perfringens* suelen alcanzar 1 - 3 mm después de incubarlas en condiciones de anaerobiosis durante una noche. Al momento de intentar el aislamiento a partir de una muestra clínica es importante incluir etapas de enriquecimiento en medio líquido como caldo cerebro-corazón (BHI) o caldo carne picada (CCP) (Redondo et al., 2013).

En agar sangre, la mayoría de las colonias de *C. perfringens* se ven rodeada por una doble zona de hemólisis distintiva, debido a la producción de toxinas hemolíticas (alfa y perfringolisina O) (**Figura 1.3**). Un medio alternativo de uso común para el aislamiento de *C. perfringens* es el agar yema de huevo. La precipitación opaca de color blanco alrededor de una colonia es sugerente de *C. perfringens*, que típicamente muestra la actividad lecitinasa de la toxina alfa (**Figura 1.4**). La identificación de las colonias se puede completar con otras pruebas bioquímicas. Los aislamientos de *C.*

perfringens fermentan lactosa, hidrolizan gelatina, reducen nitratos y sulfatos (**Figura 1.4**). Este microorganismo también es indol negativo, catalasa negativo, e inmóvil. Esta bacteria causa una "fermentación tormentosa" de la leche tornasolada (**Figura 1.5**). Las células de *C. perfringens* pueden permanecer viables cuando se almacena durante ~1 semana a 4°C en medio líquido o cuando se almacena congelado a -20°C durante ~2 semanas. Si un aislamiento esporulado se conserva en caldo de carne cocida, esas esporas pueden mantenerse viables durante años (en especial si se almacenan a -20°C). Otras opciones de conservación a largo plazo (varios meses a varios años) incluyen el almacenamiento de las células vegetativas en 50% de glicerol a -80°C, o el almacenamiento de los cultivos liofilizados (suspendidos en leche descremada) a 4 °C.

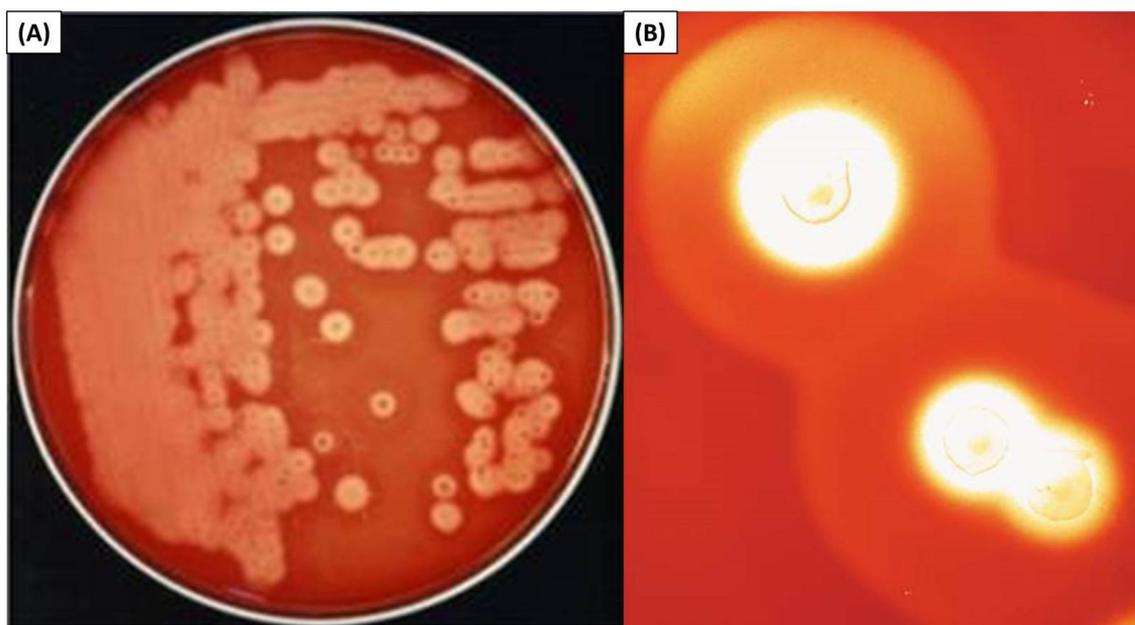


Figura 1.3: Crecimiento de *C. perfringens* en medio diferencial agar sangre. (A) Crecimiento en placa de agar sangre luego de 18 horas de incubación en anaerobiosis. (B) Detalle de las colonias, es posible observar un doble halo de hemolisis. (www.britannica.com).

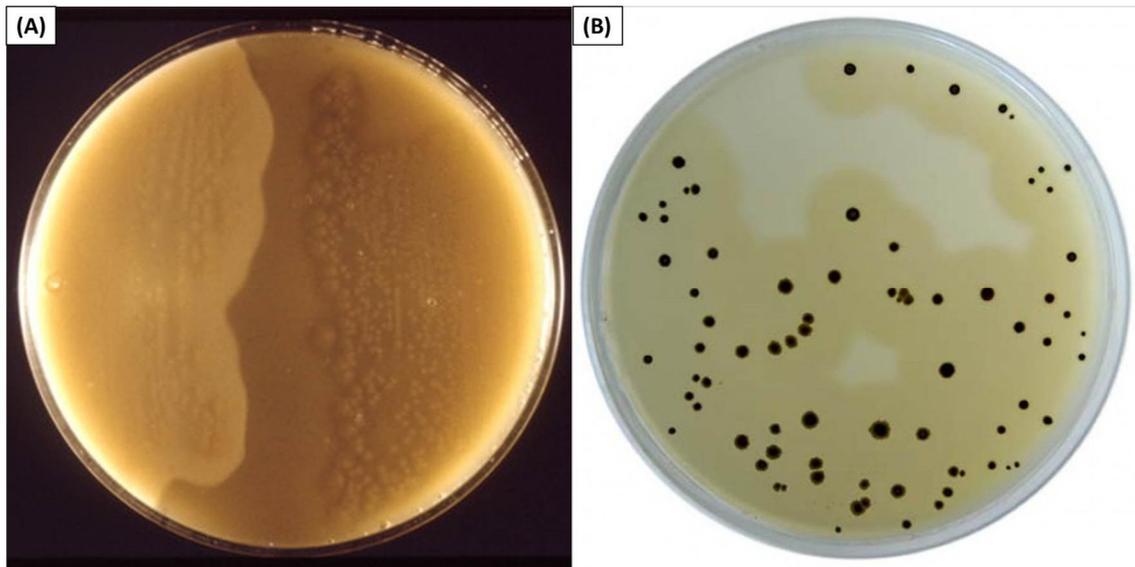


Figura 1.4: Crecimiento de *C. perfringens* en medio diferencial agar yema de huevo. (A) Crecimiento en placa de agar yema de huevo luego de 18 horas de incubación en anaerobiosis. Der. Es posible observar el precipitado blanco opaco producido por la acción lecitinasa de la toxina alfa; Izq. El agregado de antitoxina alfa de *C. perfringens* contribuye a la identificación de especie (<http://phil.cdc.gov>). (B) El medio agar yema de huevo puede ser suplementado con sales sulfato y hierro que sirvan como indicador de producción de sulfito, las colonias se observan negras rodeadas por un halo de precipitado blanco opaco (www.eolabs.com).

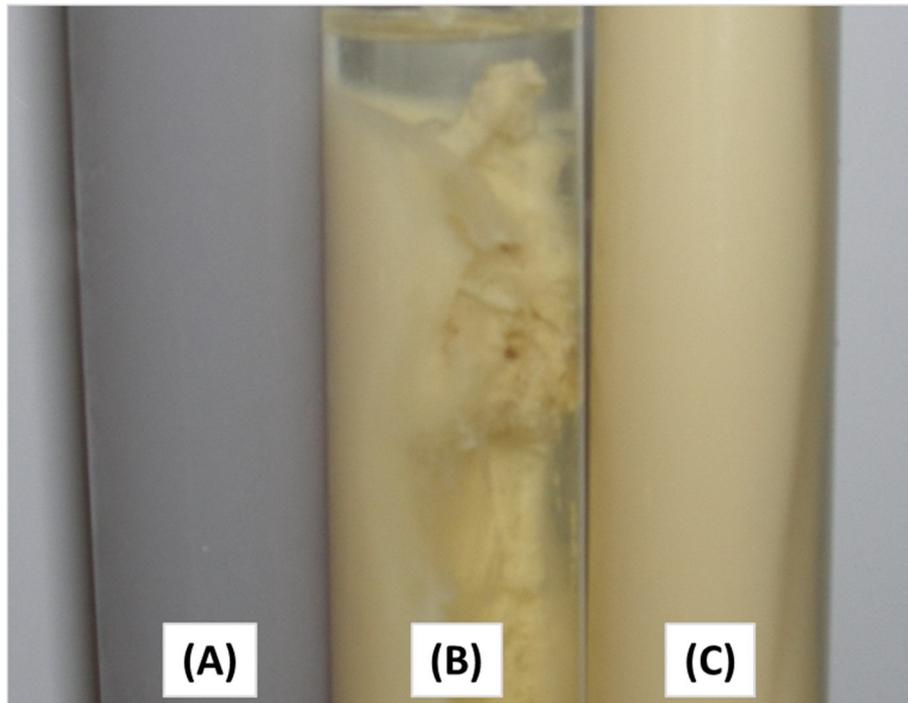


Figura 1.5: Prueba de leche tornasolada. (A) Control negativo; (B) Crecimiento de *C. perfringens*, es posible observar el cambio de color por la fermentación de la lactosa, la formación del coagulo de caseína y la explosión del coagulo por la abundante formación de gas; (C) Crecimiento de una enterobacteria fermentadora de lactosa.

1.4.3.2. *Clostridium difficile*:

Para el crecimiento de *Clostridium difficile* se requieren condiciones anaerobias más estrictas en comparación con *C. perfringens*. El medio selectivo y diferencial más utilizado para el aislamiento de *C. difficile* a partir de muestras de materia fecal es el agar fructosa, suplementado con cicloserina y cefoxitina (CCFA), desarrollado originalmente por George et al. (1979). La formulación original consistía en agar base de yema de huevo con fructosa suplementado con cicloserina (500 mg/l) y cefoxitina

(16 mg/l). Este medio es altamente selectivo, aunque permite el crecimiento de algunos anaerobios Gram negativos, *Lactobacillus spp* y otros clostridios. La inclusión de sangre de caballo mejora la recuperación del organismo (Marler et al., 1992). Otras modificaciones que según se informa mejoran la recuperación del organismo a partir de muestras fecales y de fuentes ambientales incluyen el agregado de 0,1 % de taurocolato de sodio, utilizar una menor concentración de cicloserina y/o cefoxitina, la adición de clorhidrato de cisteína como un suplemento de crecimiento, o la utilización de suplementos de norfloxacina (12 mg/l) y moxalactam (32 mg/l) (Aspinall y Hutchinson, 1992; Levett, 1985). En medio sólido, las colonias de *C. difficile* tienen aspecto rugoso de forma plana que crecen varios milímetros de diámetro. El crecimiento en determinados medios permite que las colonias se vean verde fluorescente bajo la luz ultravioleta de onda larga (**Figura 1.6**). Para la recuperación de *C. difficile* a partir de animales sanos puede ser necesario el uso de caldos selectivos, el caldo de cicloserina, cefoxitina, fructosa se puede preparar de manera similar al medio solido CCFA con buenos resultados (Costa et al., 2012).



Figura 1.6: Crecimiento de *C. difficile* en medio solido luego de 48 horas de incubación en anaerobiosis. (A) Crecimiento de *C. difficile* en medio agar sangre luego de 48 horas de incubación en anaerobiosis. (<http://blogs.ifr.ac.uk>).

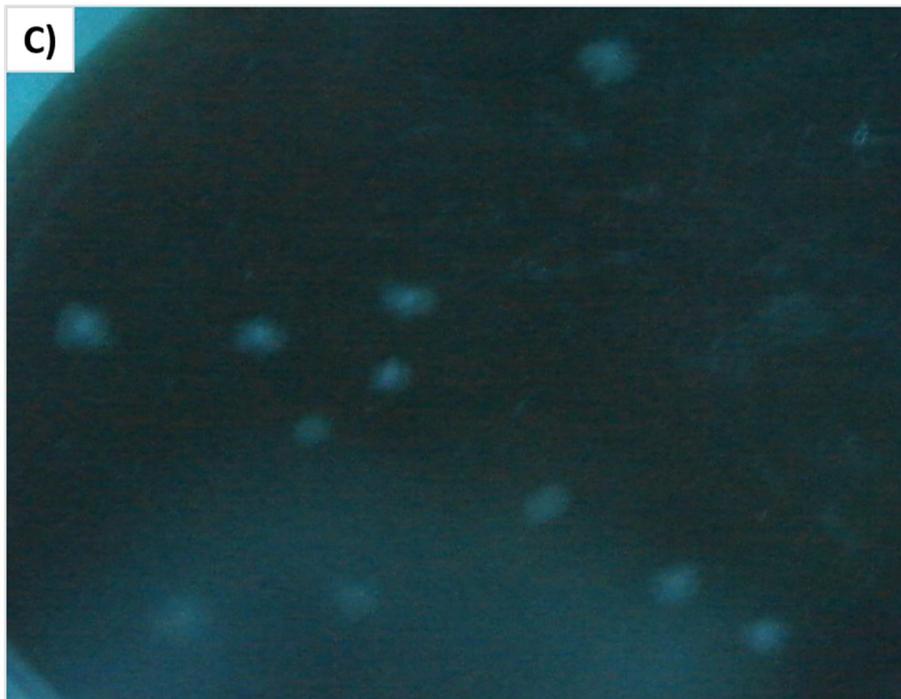
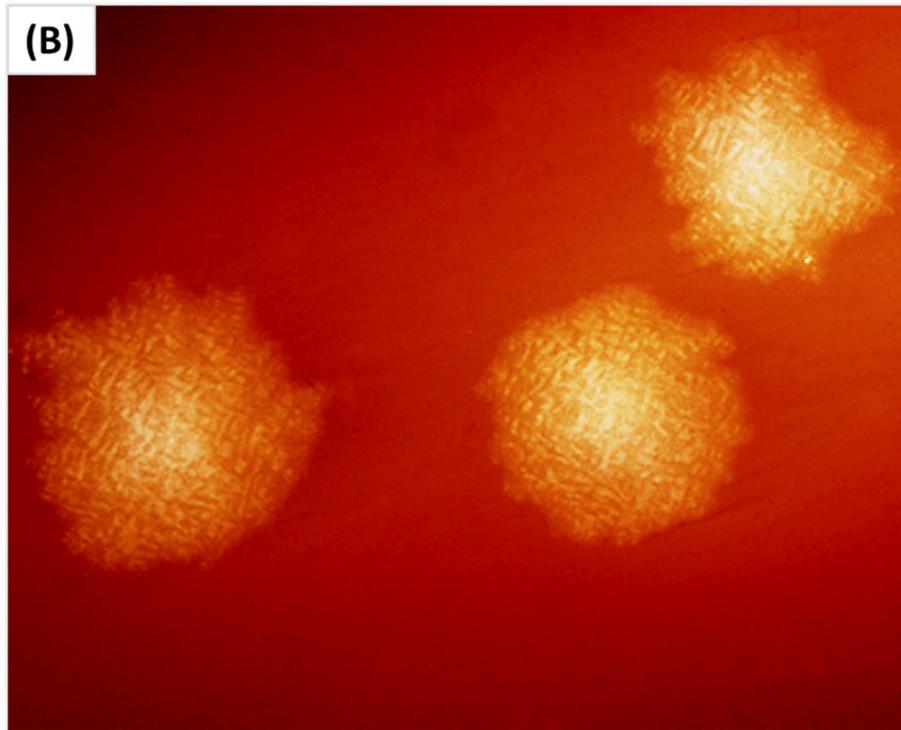


Figura 1.6 cont.: Crecimiento de *C. difficile* en medio solido luego de 48 horas de incubación en anaerobiosis. (B) Crecimiento de *C. difficile* en medio CCFA (agar cicloserina, cefoxitina y fructosa), las colonias se ven naranjas por la fermentación de fructosa (<http://phil.cdc.gov/phil>). (C) Crecimiento en agar sangre de oveja, luego de 48 horas de crecimientos en anaerobiosis es posible observar colonias fluorescentes.

Clostridium difficile produce esporas subterminales que no deforman la célula. La capacidad de este organismo para formar esporas, contribuye al mantenimiento de este agente en el medio y constituye un gran problema en las instalaciones médicas donde se han reportado brotes de esta enfermedad. Los laboratorios que realizan el diagnóstico de este agente mediante cultivo bacteriológico a menudo utilizan un paso previo de shock térmico o etanólico para la selección de esporas para evitar que el crecimiento de *C. difficile* sea cubierto por la presencia de otros microorganismos de crecimiento más rápido (Jones, 1989). Las cepas de *C. difficile* pueden ser conservadas mediante los mismos métodos antes descritos para las cepas de *C. perfringens*.

1.5. Toxinas binarias:

Las especies patógenas del género *Clostridium* han desarrollado numerosas estrategias para sobrevivir dentro y fuera de la especie huésped, como evidencia la gran variedad de toxinas producidas por estos microorganismos, y con diversos mecanismos de acción (Carter et al., 2011; Smedley et al., 2004). Las toxinas incluidas dentro de la familia de las toxinas binarias se caracterizan por utilizar un mecanismo sinérgico al momento de intoxicar a las células eucariotas. Las toxinas binarias poseen dos características generales: (1) ambos componentes proteicos son sintetizados y secretados como 2 proteínas separadas, no se unen como un complejo "A-B" preformado presente en solución, como puede ser el caso de las grandes toxinas glucosilantes (toxinas A y B de *C. difficile*); (2) producen una modificación enzimática de la actina globular lo que favorece la despolimerización de los filamentos de actina.

1.5.1. Descripción del locus *iA/iB*:

Las toxinas binarias de *Clostridium* se encuentran codificadas por dos genes separados que pueden estar ubicados en el cromosoma, como en el caso de CDT de *C. difficile* (Metcalf y Weese, 2011), o en plásmidos, como en el caso de *C. perfringens* tipo E (Billington et al., 1998; Li et al., 2007). Las características de éstas y otras toxinas binarias del género *Clostridium* se resumen en la **tabla 1.3**.

Tabla 1.3: Toxinas binarias producidas por bacterias del género *Clostridium*.

Toxina	Componentes	Ubicación del gen	Proteínas (kDa)	Referencias
<i>C. perfringens</i>				
Toxina iota	ITXa	Plásmido (140 kb)	45	Perelle et al., 1995
	ITXb		94 (prototoxina) 81 (activa)	
Enterotoxina binaria (BEC)	BECa	Plásmido (54,5 kb)	47	Yonogi et al., 2014
	BECb		80	
<i>C. spiroforme</i>				
CST	Sa	Cromosoma	44	Popoff et al., 1989
	Sb		92 (prototoxina) 76 (activa)	
<i>C. difficile</i>				
DT	CDTa	Cromosoma	48	Rupnik et al., 2003
	CDTb		99 (prototoxina) 75 (activa)	
<i>C. botulinum</i>				
C2	C2I	Cromosoma o plásmido (107 kb)	49	Ohishi et al., 1980
	C2II		81 (prototoxina) 60 (activa)	

Modificado de Stiles et al., 2014.

En el caso particular de la toxina iota de *C. perfringens* tipo E, los genes que corresponden a las subunidades de unión (*iB*) y a la subunidad ADP ribosilasa (*iA*) fueron secuenciados con anterioridad (Perelle et al., 1995). En este trabajo se analizó una secuencia de 5.7 Kb en la cual se hallaron 2 marcos de lectura abiertos (ORF) orientados en el mismo sentido. El primero corresponde a la secuencia del gen *iA* correspondiente a la fracción "A" de la toxina iota (ITXa), este gen posee una secuencia de 1164 pb. Seis pb corriente abajo del codón de inicio se presenta una secuencia homologa a la secuencia de Shine-Dalgarno para la unión de ribosomas, en las posiciones -160 y -131 se encuentran dos secuencias homologas a las secuencias -10 y -35 que funcionan como promotores. El segundo codón de inicio, correspondiente al gen *iB* que codifica la fracción "B" de la toxina iota (ITXb), se encuentra separado de la secuencia descrita antes por una región no codificante de 243 pb, en esta región se encuentra una región de unión a ribosomas similar a la mencionada anteriormente, pero no se encuentran secuencias promotoras, lo que sugiere que ambas secuencias (*iA* + *iB*) forman un operón y se expresan en conjunto. La secuencia del gen *iB* posee 2627 pb. En el caso de *C. difficile*, los genes *cdtA* – *cdtB* correspondientes a las subunidades de "A" y "B" la toxina CDT, equivalentes a los genes *iA* – *iB* respectivamente, se encuentran alineados de manera similar sobre el cromosoma (Metcalf y Weese, 2011).

1.5.2. Estructura de las toxinas binarias:

La secuencia de aminoácidos de la fracción ITXa contiene 387 residuos, de los cuales 41 presentes en el extremo N-terminal corresponden a un péptido señal el cual se elimina proteolíticamente al momento de ser secretado (Perelle et al., 1995). Esta secuencia se corresponde con una proteína de aproximadamente 45 kDa y de 42 kDa, antes y después de la proteólisis respectivamente. Esta secuencia posee una secuencia similar a los componentes CDTa y CSTa de aproximadamente el 93 y 80%

respectivamente. Los componentes "A" de las 3 toxinas poseen 2 dominios (**Figura 1.7**). En el extremo N-terminal se encuentra el sitio de unión al componente B y en el extremo C-terminal se encuentra el sitio activo ADP-ribosilante (Simpson et al., 1987). El sitio activo de este componente posee regiones conservadas similares a las encontradas en otras ADP-ribosiltransferasas (Stiles et al., 2014), en este sitio se encuentran los sitios de unión para NAD y G-actina (Nagahama et al., 2000; Schering et al., 1988).

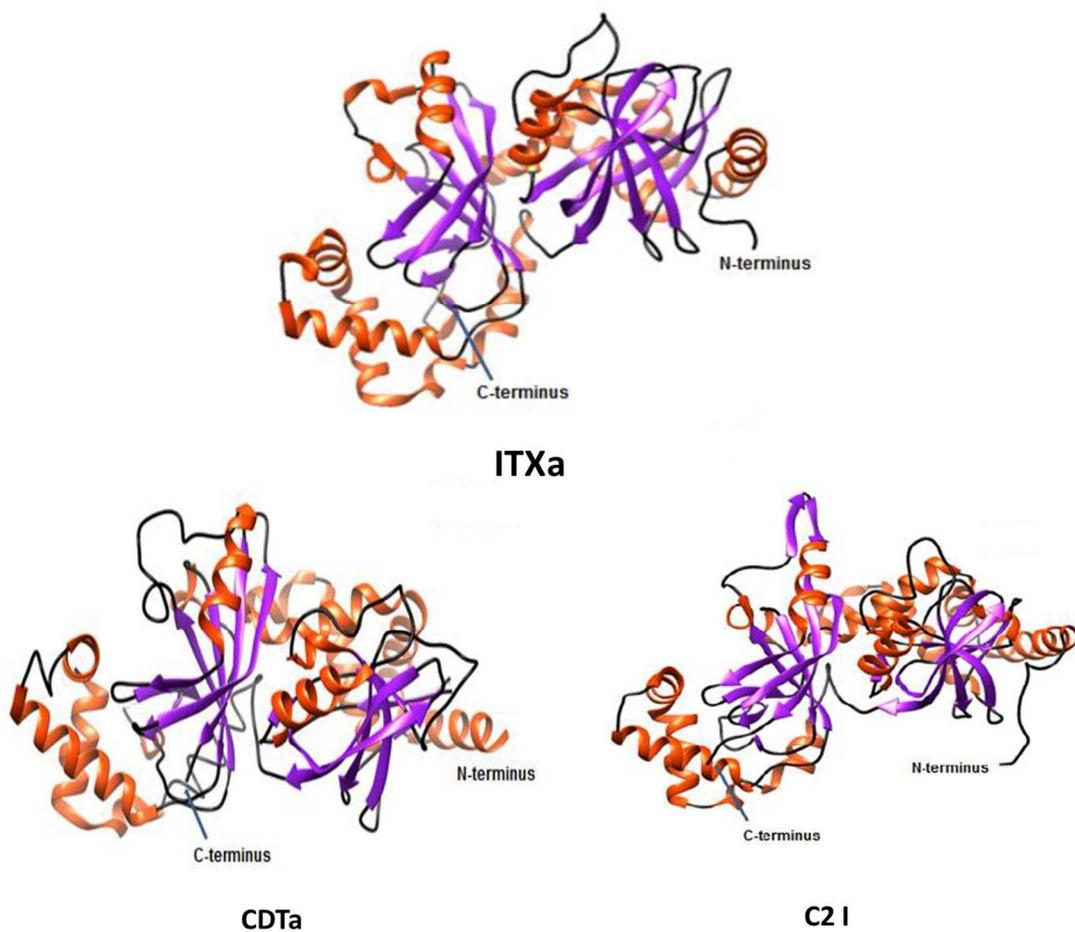


Figura 1.7: Estructura tridimensional de los componentes A de las toxinas binarias ITX de *C. perfringens* (PDB Id: 1GIQ), CDT de *C. difficile* (PDB Id: 2WN8) y C2I de *C. botulinum* (PDB Id: 2J3Z). Naranja: alfa hélices; violeta: Laminas beta. <http://www.rcsb.org/pdb>. (Stiles et al., 2014).

La secuencia de aminoácidos de ITXb contiene 875 residuos, de los cuales 39 presentes en el extremo N-terminal corresponde a un péptido señal el cual se elimina al momento de ser secretado (Perelle et al., 1995). Esta fracción es secretada en la forma de un propéptido el cual debe ser activado proteolíticamente antes de tener actividad biológica, esta activación puede ser mediada por la tripsina presente en el intestino de los mamíferos (Gibert et al., 2000), aunque la mayoría de los aislamientos tipo E de *C. perfringens* analizados hasta el momento poseen una toxina adicional con actividad metaloproteasa, denominada toxina lambda, que cataliza la activación de ambas fracciones de la toxina iota (Li et al., 2007). Aunque se conoce relativamente poco de la estructura de la fracción "B" de las toxinas iota, CDT y CST, se piensa que las mismas poseen una estructura similar a la descrita para la fracción C2II de *C. botulinum*. Esta fracción posee 4 dominios (Barth et al., 2004), el dominio I responsable de la activación proteolítica; el dominio II responsable de la unión a la membrana plasmática de la célula y formación de poro; el dominio III responsable de la polimerización; y el dominio IV responsable de la unión al receptor, este último es similar entre todas las toxinas de este grupo (Papatheodorou et al., 2011, 2012).

1.5.3. Mecanismo de acción:

El modelo más aceptado para el mecanismo de acción de las toxinas binarias es el propuesto por Gerding et al. (2014). El primer paso para la intoxicación celular por la toxina iota es la unión de la subunidad B (ITXb), para esto monómeros de ITXb se unen formando complejos (Stiles et al., 2002). Estos heptameros reconocen al receptor LSR (lipolysis-stimulated lipoprotein receptor) presente en la membrana celular (Papatheodorou et al., 2011, 2012), y luego son agrupados en rafts lipídicos (Nagahama et al., 2004). Este complejo se forma rápidamente en contacto con células eucariotas y sirve como sitio de unión para la subunidad A (ITXa). Este complejo es internalizado mediante endocitosis dentro del compartimento endosomal. La

acidificación de los endosomas induce un cambio en la conformación del polímero de ITXb, el cual se inserta en la membrana y permite la translocación de ITXa a través de la membrana del endosoma. Actualmente no se determinó si ITXb ingresa al citosol o si es posible que se recicle transportándose de regreso a la membrana celular. ITXa atraviesa la membrana utilizando chaperonas como hsp90 u otras proteínas de la célula huésped que contribuyen al correcto plegado de esta subunidad. Una vez en el citosol, ITXa cataliza la ribosilación de la actina en la arginina-177, lo cual provoca la despolimerización de los filamentos de actina. Esto bloquea el transporte de vesículas en la célula intoxicada, permitiendo a las bacterias escapar de la fagocitosis y desviar las vesículas secretorias. Finalmente, estas modificaciones sobre la célula pueden inducir la muerte mediante la activación de señales necróticas (Nagahama et al., 2011) o apoptóticas (Hilger et al., 2009). Aunque no se conoce el rol biológico de la toxina iota en el ciclo de vida de bacterias productoras de esta toxina, estudios realizados con la toxina CDT de *C. difficile* sugieren que las toxinas binarias incrementan la adherencias de los clostridios a las células eucariotas. Los cambios en la actina inducen la formación de extensiones sobre la superficie celular. Estas extensiones poseen un eje de microtúbulos y generan un incremento en la adherencia bacteriana (Schwan et al., 2009). El modelo de intoxicación por toxinas binarias descrito se resume en la **figura 1.8**.

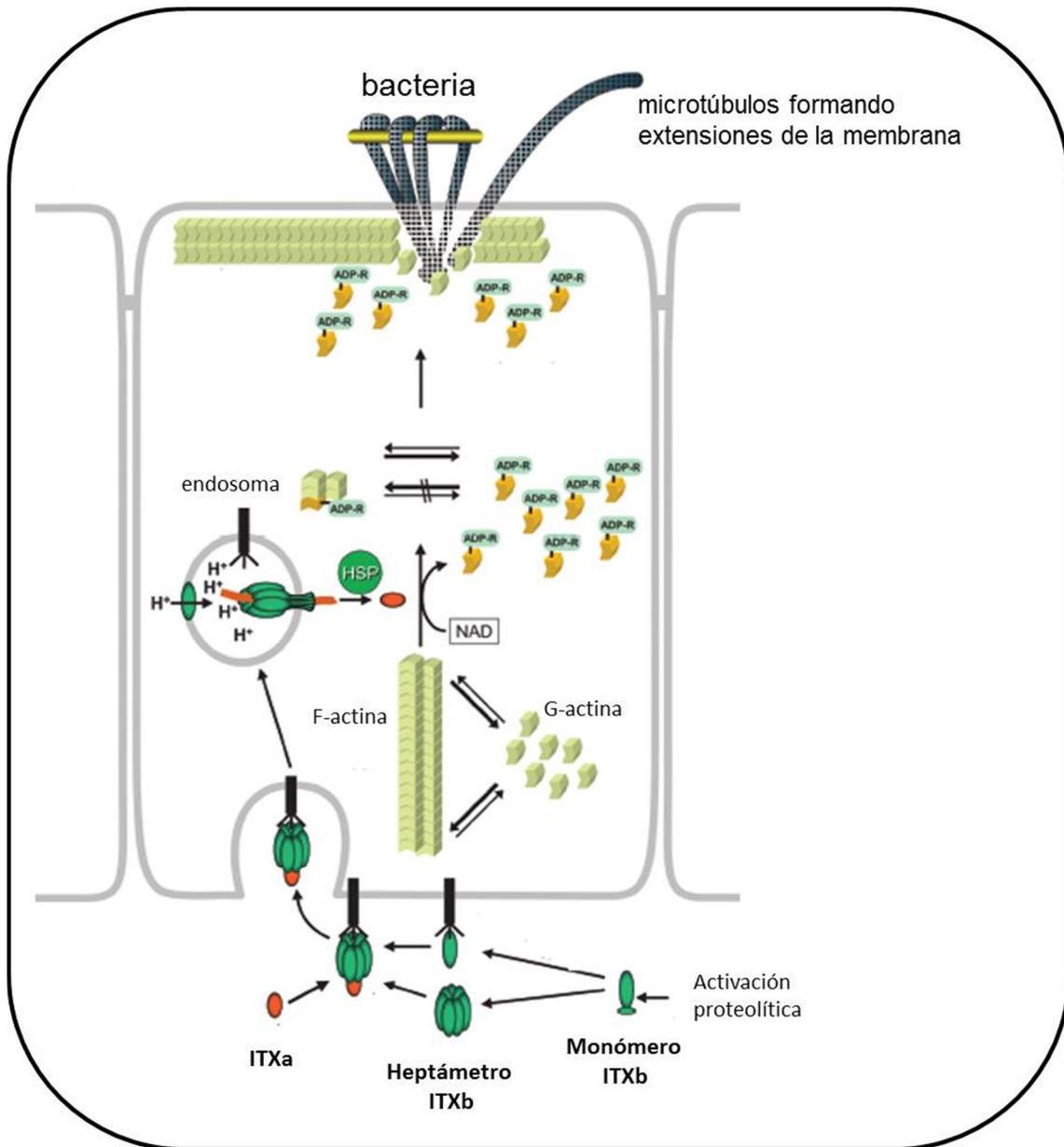


Figura 1.8: Modelo básico de intoxicación celular por toxina iota (modelo toxinas binarias). En este esquema se muestran los pasos necesarios para el pegado, ingreso y mecanismo de acción de las toxinas binarias. (Gerding et al., 2014).

1.6. Objetivos generales, específicos e hipótesis de trabajo:

1.6.1. Objetivo general:

Determinar el rol de *C. perfringens* y *C. difficile* en los casos de enteritis y diarrea en bovinos. Estudiar los mecanismos involucrados en las alteraciones producidas por las toxinas iota de *C. perfringens* y CDT de *C. difficile* en el intestino bovino.

1.6.2. Objetivos específicos:

Los objetivos específicos de este trabajo se plantearon en orden de acuerdo a la secuencia operativa requerida para el logro del objetivo general del trabajo, consisten en:

- 1.6.2.1. Aislar y caracterizar de manera fenotípica y genética cepas de *C. difficile* y *C. perfringens* de bovinos sanos y de aquellos que presenten enfermedad intestinal en casos clínicos en la República Argentina.
- 1.6.2.2. Desarrollar una base datos de MLST que permita definir entre las cepas obtenidas.
- 1.6.2.3. Desarrollar modelos de infección *in vitro* e *in vivo* que permita explicar los estadios iniciales de la infección intestinal producida por clostridios productores de toxinas iota y CDT.

- 1.6.2.4. Caracterizar y describir los mecanismos de patogenicidad iniciales de la infección intestinal producida por clostridios productores de toxinas iota y CDT.
- 1.6.2.5. Identificar mecanismos accesorios de competencia intraespecifica e interespecifica de cepas de *C. difficile* y *C. perfringens*.

1.6.3. Hipótesis de trabajo:

A partir de los objetivos planteados se postula que las cepas de clostridios productores de toxinas binarias representan un grupo de cepas patógenas de importancia para el ganado bovino, las cuales se hallan altamente especializadas para la invasión y colonización del intestino bovino. También se propone que la patogenicidad de las mencionadas cepas depende de la producción de toxina binaria junto a una combinación de factores de virulencias complementarios (bacteriocinas y adhesinas) presentes en este grupo de cepas.

Capítulo 2:

**Aislamiento y caracterización
genotípica de cepas de
Clostridium perfringens y
Clostridium difficile
de origen bovino.**

2.1. Introducción:

Clostridium difficile es ampliamente reconocido como un agente productor de diarreas intrahospitalarias y se asocia a la terapia antimicrobiana en seres humanos, especialmente con antimicrobianos de amplio espectro (Bartlett et al., 1978). En los últimos años se ha observado un aumento en la incidencia de esta enfermedad y en la severidad de los cuadros, como así también se han reportado casos en pacientes no incluidos dentro de los grupos de riesgo. Estos cambios en la epidemiología se atribuyen, principalmente a la aparición de cepas denominadas hipervirulentas (McDonald et al., 2005; Stabler et al., 2009; Warny et al., 2005). Asimismo, este microorganismo puede afectar a animales domésticos de diversas especies. En equinos se lo ha asociado a casos de enteritis en potrillos y en animales adultos (Diab et al., 2013). En porcinos, es considerado un agente productor de diarrea infecciosa neonatal, presentándose en forma de brotes que generalmente afectan a lechones de 1 a 7 días de edad, los animales afectados presentan antecedentes de diarrea desde el nacimiento (Songer y Uzal, 2005). En esta especie se han detectado ribotipos patógenos para el ser humano, incluidas las cepas denominadas hipervirulentas (Pirs et al., 2008; Rodríguez-Palacios et al., 2007). En el caso de los bovinos, algunos trabajos sugieren que la infección por *C. difficile* puede producir enteritis y diarrea en terneros, aunque los trabajos existentes muestran resultados contradictorios (Costa et al., 2012; Hammitt et al., 2008; Rodríguez-palacios et al., 2006). En animales de producción de la Argentina existe un único reporte de enfermedad asociada a *C. difficile* en el que se describen 2 brotes de colitis en establecimientos productores de cerdos (Cappuccio et al., 2009). En dicho reporte el diagnóstico de colitis asociada a *C. difficile* se basa en el hallazgo de lesiones macroscópicas y microscópicas compatibles, junto con la detección de toxinas A y B, sin embargo en ninguno de los brotes descritos fue posible obtener aislamientos compatibles con *C. difficile*. Actualmente no existen informes de casos ni de prevalencia de *C. difficile* en animales de producción en nuestro país.

Clostridium perfringens es un microorganismo ampliamente distribuido en el ambiente, al que incluso es posible encontrarlo como habitante normal del tracto gastrointestinal de los animales domésticos y el ser humano (McClane et al., 2006; Songer, 1996). La virulencia de este microorganismo está directamente relacionada con la producción de diferentes toxinas. La producción diferencial de cuatro toxinas letales (alfa, beta, iota y épsilon) se utiliza para clasificar los aislamientos de *C. perfringens* en 5 toxinotipos (A, B, C, D y E) y cada uno de estos toxinotipos de *C. perfringens* se asocia con determinadas enfermedades humanas o animales (McClane et al., 2006; Songer, 1996). La diversidad de toxinas producidas por los aislamientos individuales se ve reflejada en la amplia gama de enfermedades enterotóxicas e histotóxicas asociadas a esta bacteria. Actualmente la información relacionada a casos de enfermedad asociada a *C. perfringens* es escasa, y en numerosas ocasiones se presenta de forma incompleta e incluso confusa. En la práctica de la medicina humana y animal, muchos diagnósticos de enfermedades asociadas a *C. perfringens* en realidad agrupan diversas enfermedades ocasionadas por diferentes agentes etiológicos. Debido a esta situación muchos de los datos existentes referidos a la prevalencia de esta bacteria incluyen síndromes pobremente definidos, en los que pocas veces se recurre a la identificación bacteriológica.

La identificación bacteriana aporta información valiosa al momento de identificar al agente causal de una enfermedad digestiva. Sin embargo en el caso de las enfermedades producidas por microorganismos del género *Clostridium*, y debido a la extensa distribución en la naturaleza de estas especies, es importante complementar el aislamiento bacteriológico con pruebas de tipificación que permitan identificar toxinas o factores de virulencia accesorios. El análisis molecular de patógenos tales como *C. difficile* y *C. perfringens* facilita la detección de genes correspondientes a toxinas u otros factores de virulencia, lo que permite identificar toxinotipos considerados poco comunes o variantes virulentas de cepas consideradas no patógenas. La detección de cepas productoras de factores de virulencia adicionales, tales como la toxina binaria en el caso de *C. difficile* (Rupnik et al., 2003) sirve de ejemplo de la utilidad de este tipo de análisis. Identificar estas cepas también permite

evaluar la distribución de las mencionadas cepas, estableciendo posibles asociaciones entre un tipo de microorganismo en particular y la ocurrencia de cuadros de mayor severidad o en grupos considerados de bajo riesgo (Barbut, 2005).

Existen numerosos métodos para tipificar los aislamientos de *C. difficile* y *C. perfringens*. Dentro de estos, los de mayor difusión son la ribotipificación para *C. difficile* y la toxinotipificación para *C. perfringens*. El primer método se basa en la detección de polimorfismos en las regiones intergénicas de los genes 16S y 23S (O'Neill et al, 1996), y el segundo en la detección de los genes que codifican 4 toxinas denominadas principales (alfa, beta, iota y épsilon) (McClane et al., 2006; Meer y Songer, 1997). Aunque estos métodos se encuentran ampliamente difundidos ambos presentan limitaciones. En el sistema de ribotipificación de *C. difficile* las secuencias intergénicas de los genes antes mencionados se amplifican por PCR, y posteriormente se define un patrón de bandas mediante electroforesis. Aunque esta técnica posee un gran poder discriminatorio es necesario contar con una amplia biblioteca de patrones estándar, a la vez que es muy difícil obtener patrones fácilmente comparables entre grupos de trabajo. El sistema de toxinotipificación de *C. perfringens* permite agrupar aislamientos de acuerdo a la presencia de toxinas relacionadas con enfermedades específicas en seres humanos y animales. Sin embargo, para llevar a cabo estudios epidemiológicos, es necesario diferenciar las cepas por debajo del nivel de toxinotipo. Con este objetivo se han desarrollado diversos métodos destinados a definir relaciones entre aislamientos de *C. difficile* y *C. perfringens*, entre los cuales se incluyen la electroforesis de campo pulsátil (PFGE) (Engström, 2003; Fawley et al., 2002; Nauerby, 2003), ribotipificación (O'Neill et al., 1996; Schalch et al., 2003) y repeticiones en tándem de número variable (VNTR) (Sawires y Songer, 2005). En el caso particular de *C. perfringens* la utilización de estos métodos permitió definir diversos subtipos, pero con la excepción de los resultados obtenidos en el estudio de cepas productoras de enteritis necrótica en aves (Nauerby, 2003), estos métodos no han podido ser utilizados para establecer relaciones claras entre los subtipos obtenidos, o definir patotipos vinculados a enfermedades específicas. El método de tipificación mediante análisis de secuencias múltiples (MLST) es considerado actualmente la prueba de

referencia para la tipificación de aislamientos bacterianos (Urwin y Maiden, 2003). A diferencia de otros métodos que utilizan patrones de electroforesis, este se basa en el análisis de secuencias lo cual permite generar patrones fácilmente comparables entre diferentes laboratorios, que a su vez pueden ser organizados en bases de datos globales fácilmente accesibles como en el caso de *C. difficile* (Lemee et al., 2004).

El objetivo inicial de esta sección fue determinar la prevalencia de *C. difficile* y *C. perfringens* en bovinos de la región pampeana de la Argentina caracterizando mediante técnicas bioquímicas y moleculares los aislamientos obtenidos, y definir posibles asociaciones entre genotipos específicos y la presencia de enfermedad digestiva en bovinos. Se incluye la descripción y la marcha diagnóstica de un brote de enteritis hemorrágica en bovinos adultos. Finalmente, se describe el desarrollo y la utilización de una base de datos de MLST para tipificar aislamientos de *C. perfringens*. Mediante esta técnica se compararon las cepas de *C. perfringens* obtenidas a partir de un brote de enteritis hemorrágica descrito, contra otro conjunto de cepas aisladas en los Estados Unidos de casos similares.

2.2. Materiales y métodos:

2.2.1. Muestras:

Durante el desarrollo de este trabajo se tomaron muestras de materia fecal de 251 bovinos. En la **tabla 1.1** se muestra el número de muestras procesadas según especie, categoría y estado sanitarios de los animales. El número de individuos incluidos en la muestra se determinó considerando una prevalencia de individuos portadores aproximada al 25%, utilizando como referencia el trabajo de Hammitt et al. (2008) el cual menciona el uso de un protocolo de aislamiento para *C. difficile* similar al utilizado en este trabajo. Se tomaron muestras de materia fecal de aproximadamente 5 gramos, las cuales fueron conservadas a 4°C hasta ser procesadas en el laboratorio, lo que en todos los casos se realizó dentro de las 24 horas desde el momento en que se tomó la muestra (Jones, 1989). Estas muestras se utilizaron para la detección mediante cultivo bacteriológico de *C. difficile* y *C. perfringens*. Como complemento al análisis de materia fecal de bovinos, se incluyeron muestras de 10 equinos adultos con enfermedad digestiva compatible con enteritis por *C. difficile* (mayores a 2 años) y 40 porcinos (lechones 21 días). Estas muestras fueron conservadas de la manera antes mencionada.

Tabla 2.1: Número de muestras procesadas según especie, categoría y estado sanitarios de los animales.

Especie/categoría	Presencia de signos de enfermedad Digestiva	Ausencia de signos de enfermedad digestiva
Bovino		
Adultos (mayor a 6 meses)	73	77
Terneros cría	20	21
Terneros guachera	31	29
Porcino *		
lechones 21 días	21	19
Equino *		
Adultos (mayor a 2 años)	10	-

*Las muestras de equinos y porcinos se procesaron para la detección de *C. difficile* únicamente.

2.2.2. Aislamiento e identificación bacteriológica:

Las muestras obtenidas fueron procesadas utilizando un protocolo optimizado para obtener la mayor tasa de recuperación posible a partir de muestras de animales sanos. En este protocolo el aislamiento se realizó en 2 etapas, la primera a partir de la siembra directa en medio selectivo sólido, y la segunda a partir de un paso previo de enriquecimiento en medio líquido. En el caso de *C. difficile*, las muestras fueron homogeneizadas en etanol al 96%, en una proporción 1:1, e incubadas a temperatura

ambiente durante 30 minutos (shock etanólico) para luego ser inoculadas en placas de agar cicloserina, cefoxitina y fructosa (CCFA) e incubarse hasta 5 días a 37°C en atmosfera anaerobia (H₂ 10%: CO₂ 10%: N₂ 80%). En forma paralela, se realizó un enriquecimiento en caldo cerebro corazón (BHI) suplementado con cefoxitina-cicloserina (8 mg/L y 250 mg/L respectivamente) y se incubo por 5 días a 37°C en atmosfera anaerobia, para luego ser sembradas en placas de CCFA previo shock etanólico, e incubadas hasta 5 días a 37°C en condiciones de anaerobiosis (Costa et al., 2012). Las colonias se seleccionaran de acuerdo a su morfología (**Figura 2.1a**), ausencia de hemolisis, ausencia de crecimiento en cultivo aerobio y morfología microscópica (**Figura 2.1b**). Para el aislamiento de *C. perfringens*, las muestras fueron sembradas en placas de agar sangre suplementadas con neomicina (100 mg/L) e incubadas a 37°C durante 18 horas en atmosfera anaerobia (Marshall, 1965). El enriquecimiento para esta bacteria se realizó en caldo carne picada y se incubo durante 18 horas a 37°C para luego ser sembradas en placas de agar sangre con neomicina, e incubadas nuevamente durante 18 horas a 37°C en condiciones de anaerobiosis (Redondo et al, 2013). Las colonias se seleccionaran de acuerdo a su morfología, presencia de doble halo de hemolisis (**Figura 2.2a**), ausencia de crecimiento en cultivo aerobio y morfología microscópica (**Figura 2.2b**). Los aislamientos obtenidos fueron conservados a -80°C en glicerol al 50% para su posterior tipificación mediante pruebas moleculares.

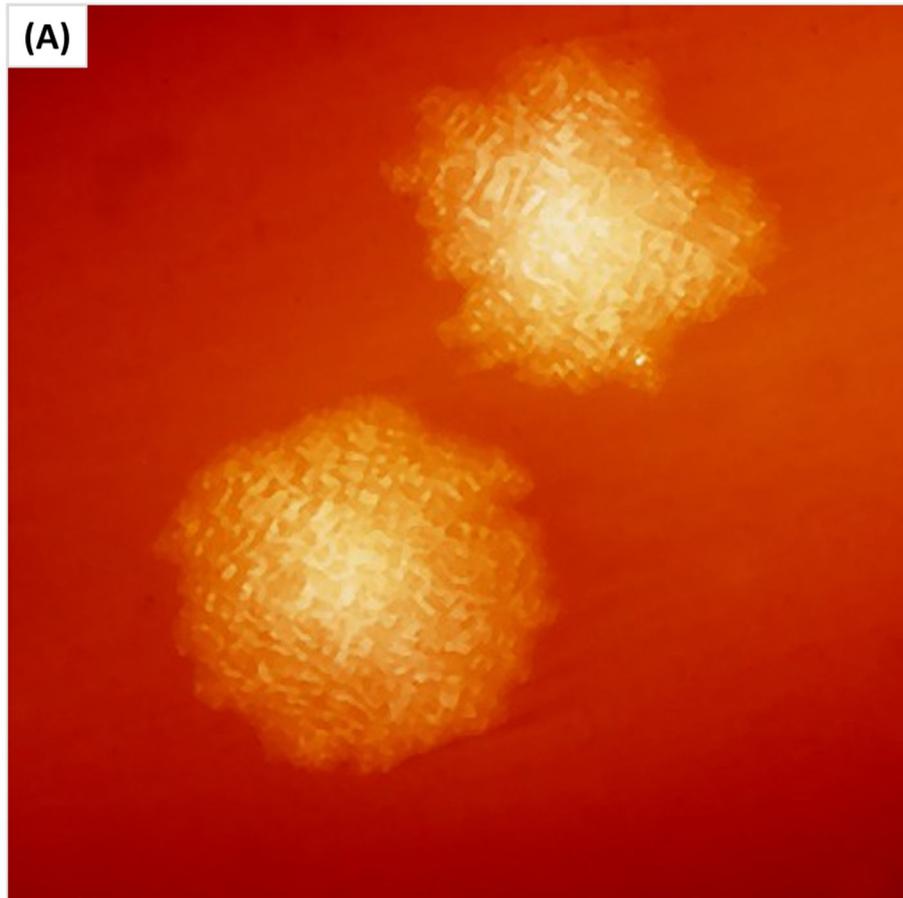


Figura 2.1: Características morfológicas compatibles con aislamientos de *C. difficile*. (A) Crecimiento de *C. difficile* en el medio CCFA luego de incubar 48 horas en anaerobiosis. (B) Microfotografía de *C. difficile* con tinción de Gram.

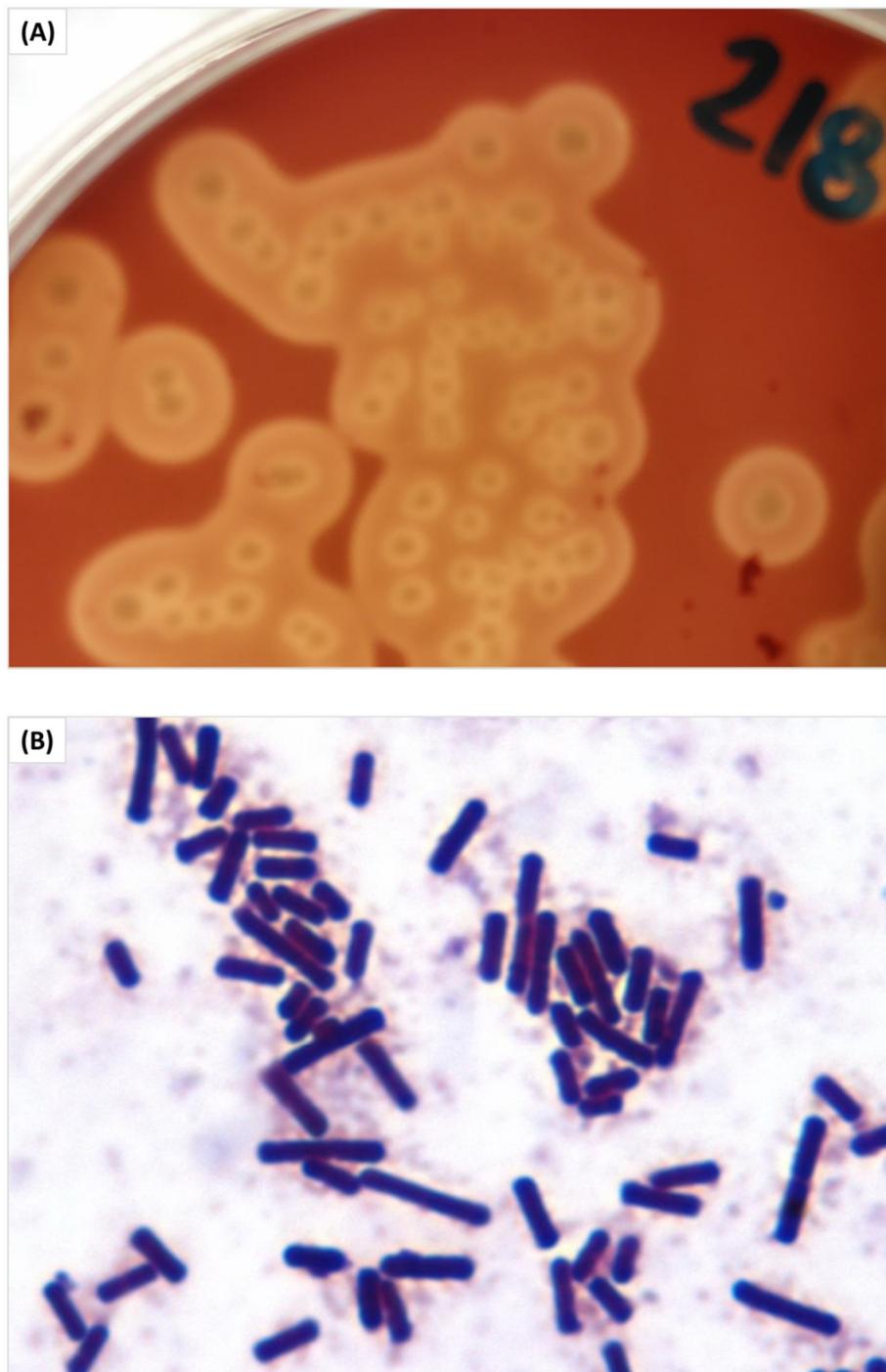


Figura 2.2: Características morfológicas compatibles con aislamientos de *C. perfringens*. (A) Crecimiento de *C. perfringens* en el medio agar sangre suplementado con neomicina luego de incubar 18 horas en anaerobiosis. (B) Microfotografía de *C. perfringens* con tinción de Gram.

2.2.3. Detección de genes por PCR:

Los aislamientos obtenidos de *C. perfringens* y *C. difficile* se tipificaron mediante la detección por PCR de los genes de las principales toxinas de estos microorganismos. Las colonias compatibles fueron tomadas desde un cultivo sólido y resuspendidas en 200 µl de agua, luego se hirvieron durante 20 minutos. Los restos celulares fueron removidos mediante centrifugación a 13.000 g durante 5 minutos y el sobrenadante fue usado como templado. Para *C. perfringens* se utilizó una PCR multiplex (Meer y Songer, 1997), la cual permite detectar la secuencia de 6 genes de toxinas de esta bacteria (*cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*, *cpb2* y *cpe*). Esta técnica permitió confirmar la identidad de las colonias aisladas, como así también clasificarlas en toxinotipos. La secuencia de los primers y las condiciones de PCR utilizadas para los aislamientos compatibles con *C. perfringens* se muestran en la **tabla 2.2**.

Tabla 2.2: Secuencias de los primers y condiciones de PCR para la detección de los genes de toxinas de *C. perfringens*.

Gen	Secuencias de primers (5'→3')	Tamaño (pb)	Condiciones de PCR
<i>cpa</i>	Forward GCTAATGTTACTGCCGTTGA	324	94°C 10 min (1 ciclo); 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min (35 ciclos); 72°C 10 min (1 ciclo)
	Reverse CCTCTGATACATCGTGTAAG		
<i>cpb</i>	Forward GCGAATATGCTGAATCATCTA	196	
	Reverse GCAGGAACATTAGTATATCTTC		
<i>etx</i>	Forward GCGGTGATATCCATCTATTC	655	
	Reverse CCACTTACTTGTCTACTAAC		
<i>iA</i>	Forward ACTACTCTCAGACAAGACAG	446	
	Reverse CTTTCCTTCTATTACTATACG		
<i>cpe</i>	Forward GGAGATGGTTGGATATTAGG	233	
	Reverse GGACCAGCAGTTGTAGATA		
<i>cpb2</i>	Forward AGATTTTAAATATGATCCTAACC	567	
	Reverse CAATACCCTTCACCAAATACTC		

En el caso de *C. difficile*, se utilizó la detección del gen *gluD* (Paltansing et al., 2007), mediante la cual fue posible confirmar la identidad de los aislamientos con morfología compatible. Además se realizó la detección de los genes de las toxinas A (*tcdA*) y B (*tcdB*) (Hammit et al., 2008). En forma complementaria, los aislamientos de *C. difficile* se ribotipificaron mediante amplificación de las secuencias intergénicas del 16S y 23S (Bidet y Petit, 1999; O'Neill et al, 1996). La secuencia de los primers y las condiciones de PCR utilizadas para los aislamientos compatibles con *C. difficile* se muestran en la **tabla 2.3**. En ambos casos, los productos de la amplificación por PCR se identificaron mediante electroforesis, utilizando un gel de agarosa al 2 % y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio y exposición a la luz ultravioleta.

Tabla 2.3: Secuencias de los primers y condiciones de PCR para la identificación y tipificación de *C. difficile*.

Gen	Secuencias de primers (5'→3')	Tamaño (pb)	Condiciones de PCR
<i>gluD</i>	Forward GTCTTGGATGGTTGATGAGTAC Reverse TTCCTAATTTAGCAGCAGCTTC	159	94°C 10 min (1 ciclo); 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min (35 ciclos); 72°C 10 min (1 ciclo)
<i>tcdA</i>	Forward GCATGATAAGGCAACTTCAGTGG Reverse GAGTAAGTTCCTCCTGCTCCATCAA	700	94°C 5 min (1 ciclo); 94°C 30 seg, 59°C 30 seg, 72°C 30 seg (35 ciclos); 72°C 5 min (1 ciclo)
<i>tcdB</i>	Forward GGTGGAGCTTCAATTGGAGAG Reverse GTGTAACCTACTTTCATAACACCAG	200	96°C 5 min (1 ciclo); 96°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 2 min (35 ciclos); 72°C 5 min (1 ciclo)
16S-23S	Forward CTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG Reverse GCGCCCTTTGTAGCTTGACC	(*)	96°C 5 min (1 ciclo); 96°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 2 min (35 ciclos); 72°C 5 min (1 ciclo)

(*)La amplificación de los segmentos 16S-23S da un patrón de bandas de tamaño variable según la cepa.

2.2.4. Ensayos de citotoxicidad en células:

Con el fin de evaluar la capacidad de producir toxinas A y B de los aislamientos de *C. difficile* se realizaron pruebas de citotoxicidad en monocapas de células. La producción de toxina A se detectó mediante la evaluación del efecto citopático en monocapas de células de ovario de hámster chino (CHO). Estas células fueron cultivadas en medio E-MEM suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10%, aminoácidos no esenciales al 1%, glutamina al 1% y penicilina - estreptomina (100 UI/ml and 100 mg/L, respectivamente), las células fueron crecidas en placas de 96 pocillos en atmosfera humidificada con CO₂ al 5% a 37°C hasta alcanzar confluencia. Sobrenadantes filtrados estériles de un cultivo de *C. difficile* de 48 horas fueron diluidos en forma seriada en las placas con las células. Las placas se incubaron en atmosfera humidificada con CO₂ al 5% a 37°C, y se determinó el efecto citopático típico (abalonamiento y falta de adherencia) a partir de las 24 horas. La prueba se consideró positiva cuando más del 50 % de las células mostró efecto citopático. La producción de toxina B por *C. difficile* se detectó con la misma metodología, con la diferencia que se utilizaron monocapas de células Vero. Ambas líneas celulares fueron provistas por la Sección de Cultivos Celulares del Instituto de Virología del CICVyA, INTA.

2.2.5. Reporte de caso:

Como parte del diagnóstico y seguimiento de casos de enfermedad digestiva (enteritis y diarreas) potencialmente asociados a bacterias del género *Clostridium*, que se realiza como servicio en el Instituto de Patobiología CICVyA-INTA, se destacó un caso clínico particular en vacas de cría, el cual se describe en la sección **2.3. Resultados**. Se tomaron muestras de 3 de los animales afectados, debido a que en el caso de estos animales fue posible realizar la necropsia dentro de las primeras 12 horas *post*

mortem. Se registraron las lesiones macroscópicas, y se tomaron muestras de rumen, abomaso, intestino delgado y grueso, hígado, bazo, riñones, pulmones, corazón, y cerebro para su examen histológico. Los tejidos se fijaron en solución de formalina bufferada al 10 %, luego de 48 horas de fijación se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 4 μ m, para ser teñidas con hematoxilina y eosina (H/E) y Gram. Para el análisis bacteriológico, las muestras de abomaso, intestino delgado y grueso, hígado, riñón, bazo, pulmón, cerebro y ganglios linfáticos se recogieron asépticamente y se cultivaron aeróbicamente en placas de agar sangre al 5 % y en placas de agar McConkey a 37°C durante 48 horas. Para el enriquecimiento, las muestras se incubaron a 37°C durante 48 horas en caldo BHI y tetracionato, para luego ser sembradas en medios de cultivo selectivos de la manera antes mencionada. La detección de patógenos del género *Clostridium* se realizó a partir de muestras de abomaso, intestino delgado y grueso, utilizando placas de agar sangre al 5% con y sin neomicina las cuales fueron incubadas en atmosfera anaerobia a 37°C. En todos los casos, las colonias compatibles con *C. perfringens* se identificaron mediante pruebas bioquímicas y moleculares según se describió anteriormente.

2.2.6. Análisis estadístico:

Para probar la hipótesis de que la frecuencia de aislamiento de *C. perfringens* o *C. difficile* está vinculada a la ocurrencia de enfermedad digestiva en bovinos, los resultados obtenidos mediante bacteriología se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado. Para la prueba de hipótesis, se asumieron como significativos valores de $P < 0,05$ (intervalo de confianza del 95%).

2.2.7. Tipificación de cepas de *C. perfringens* por MLST:

2.2.7.1. Cepas y condiciones de cultivo:

Para realizar este estudio se seleccionaron las cepas de *C. perfringens* tipo E aisladas de acuerdo a lo descrito anteriormente. Al momento de ser utilizadas fueron sembradas en placas de agar sangre con neomicina (100 mg/L) y cultivadas en condiciones de anaerobiosis durante 18 horas a 37°C. La identidad de las colonias fue confirmada mediante pruebas bioquímicas y PCR multiplex (Redondo et al., 2013). A partir de estas cepas se prepararon los templados según lo descrito anteriormente. Junto con la secuencias de cepas aisladas en el país, se incluyeron las secuencias de cepas aisladas obtenidas por el servicio de diagnóstico de la Unidad de Enfermedades clostridiales entéricas, Universidad de Arizona (B. H. Jost, comunicación personal). Con el fin de comparar las secuencias obtenidas en nuestro laboratorio con las obtenidas por los investigadores de la Universidad de Arizona, se incluyeron como control 2 copias de la cepa de *C. perfringens* tipo E de referencia NCIB 10748.

2.2.7.2. Amplificación de genes por PCR:

Para la tipificación mediante MLST, se amplificaron por PCR fragmentos de 7 genes "housekeeping" (*ddlA*, *dut*, *glpK*, *gmK*, *recA*, *sod* y *tpi*) y de 1 gen de virulencia (*plc*). La secuencia de los oligonucleótidos y las condiciones de PCR de resumen en la **tabla 2.4**. El producto de la amplificación de la PCR de los 8 genes fue enviado para purificación y secuenciación a la unidad de genómica del Instituto de Biotecnología de CICVyA-INTA (DNA Analyzer ABI3130XL, Applied Biosystems).

Tabla 2.4: Secuencias de los primers y condiciones de PCR para la amplificación de los genes utilizados en el análisis de MLST. (Jost, Trinh, & Songer, 2006; Redondo et al., 2013).

Gen	Secuencias primers (5'→3')	Tamaño (pb)	Condiciones de PCR
<i>plc</i>	forward ATATGAATGGCAAAGAGGAAAC reverse AGTTTTCCATCCTTTGTTTTG	544	94°C 10 min (1 ciclo); 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min (35 ciclos); 72°C 5 min (1 ciclo)
<i>ddlA</i>	forward ATAATGGGGGATCATCAGTTGC reverse TTATTCCTGCTGCACTTTTAGG	429	
<i>dut</i>	forward TTAAGTATTTTGATAACGCAAC reverse CTGTAGTACCAAATCCACCACG	441	
<i>glpK</i>	forward TGGGTTGAGCATGATCCAATGG reverse CACCTTTTGCTCCAAGGTTTGC	547	
<i>gmk</i>	forward TAAGGGAActATTTGTAAAGCC reverse TACTGCATCTTCTACATTATCG	475	
<i>recA</i>	forward GCTATAGATGTTTTAGTTGTGG reverse CTCCATATGAGAACCAAGCTCC	475	
<i>sod</i>	forward GATGCTTTAGAGCCATCAATAG reverse AATAATAAGCATGTTCCCAAAC	475	
<i>tpi</i>	forward AAATGTGAAGTTGTTGTTTGCC reverse CATTAGCTTGGTCTGAAGTAGC	451	

2.2.7.3. Tipificación multilocus y análisis de secuencias:

Se desarrolló una base de datos de MLST de acuerdo al esquema descrito por Jost (2006). En esta etapa se contó con la colaboración de la Dra. Marisa Farber y el Dr. Juan Díaz Carrasco, del Instituto de Biotecnología del CICVyA-INTA. Con el fin de evitar pasos manualmente intensivos como el procesamiento de los datos crudos de secuenciación y su posterior análisis, se desarrolló una "pipeline" automática utilizando programas libres (Phred y CAP3) y se construyeron scripts que permiten comparar rápidamente las secuencias, identificar los alelos de cada gen, y definir el haplotipo correspondiente a cada cepa. Tanto las secuencias obtenidas en este trabajo como los datos descritos por Jost et al. se depositaron en una base de datos para *C. perfringens*, la cual puede ser explorada para buscar y descargar las secuencias de todos los genes y alelos analizados, junto con los números de haplotipos de las cepas almacenadas, disponibles en los sitios web <http://bioinformatica.inta.gov.ar/galaxy/> (pipeline) y <http://bioinformatica.inta.gov.ar/mlst/> (base de datos). Se puede acceder a ambos sitios previa autorización del administrador (ibiotecno.bioinfo@inta.gov.ar). Para determinar la variabilidad entre grupos de cepas se construyeron dendrogramas utilizando el método de agrupamiento de pares no ponderado con la media aritmética (UPGMA) y el cálculo de los coeficientes de dN/dS se realizaron con START (Jolley et al., 2001).

2.2.7.4. Definición de alelos, haplotipos y complejos clonales:

Los diferentes alelos de cada gen fueron enumerados en forma arbitraria de acuerdo al análisis de las secuencias correspondientes. Los haplotipos fueron definidos en la base de combinaciones únicas de alelos y numerados en forma arbitraria. Las relaciones entre las cepas de *C. perfringens* analizadas por MLST se definieron utilizando el programa PHYLOViZ (Francisco et al., 2012). Este programa se utilizó para analizar las posibles relaciones evolutivas entre las cepas en base a sus haplotipos. Este software utiliza el algoritmo goeBURST, que es un refinamiento del algoritmo eBURST propuesto por Feil et al. (2004), que permite definir complejos clonales y también generar un árbol de expansión mínima (MST) que incluye a todos los aislamientos analizados.

2.3. Resultados:

2.3.1. Cepas de *C. difficile* en animales de producción:

Durante el desarrollo del presente trabajo se realizó la detección bacteriológica de *C. difficile* en muestras de materia fecal de 100 terneros de entre 1 y 6 semanas de vida de diferentes establecimientos de la provincia de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba. Estos animales pertenecían a sistemas de cría y de "guachera" (**Figura 2.3**). Debido a la importancia que podrían tener los bovinos como portadores de cepas de *C. difficile* potencialmente patógenas se decidió incorporar muestras de animales de mayor edad, para lo cual se realizaron visitas periódicas a frigoríficos de la zona para tomar muestras de contenido intestinal durante la faena, de esta categoría se analizaron muestras de 50 animales de aproximadamente 3 años.



Figura 2.3: Terneros criados con el sistema de "guachera".

Del total de las muestras analizadas (N=150) se obtuvieron 16 aislamientos compatibles con *C. difficile* de acuerdo a las características morfológicas y los resultados obtenidos en la identificación mediante pruebas bioquímicas; 15 de terneros de guachera y 1 de un ternero de cría. Debido al reducido número de aislamientos obtenidos, se incluyeron muestras de animales que al momento del muestreo presentaron signos compatibles con enfermedad por *C. difficile*. Por este motivo se incluyeron 10 muestras de equinos de más de 2 años, y 40 muestras de lechones de 21 días de edad. A partir de muestras de lechones con diarrea se obtuvieron 3 aislamientos compatibles con *C. difficile*. La identidad de estas colonias se verificó mediante amplificación por PCR de los genes *gluD*, *tcdA* y *tcdB* (**Figura 2.4**). Los resultados fueron negativos para todos los aislamientos obtenidos, a excepción de uno de origen porcino, para el cual se determinó el genotipo *gluD+*, *tcdA-*, *tcdB-* correspondiente a una cepa de *C. difficile* no patógena. En todos los casos se utilizaron como control cepas de origen humano con los genotipos *gluD+*, *tcdA-*, *tcdB+* (control 1) y *gluD+*, *tcdA+*, *tcdB+* (control 2). Como complemento a la caracterización fenotípica mediante métodos bacteriológicos, se realizó una prueba de citotoxicidad en monocapa de células CHO (ovario de hámster chino) y Vero, con este método se comprobó que las cepas con genotipo *tcdA-*, *tcdB-*, no tenían efecto citopático o si lo tenían era inespecífico, razón por la cual solo se utilizó en cepas que fueran positivas a los métodos moleculares, los controles usados en estas pruebas fueron los mismos utilizados para la caracterización por PCR. El sistema de ribotipificación no se utilizó en los aislamientos no productores de toxinas.

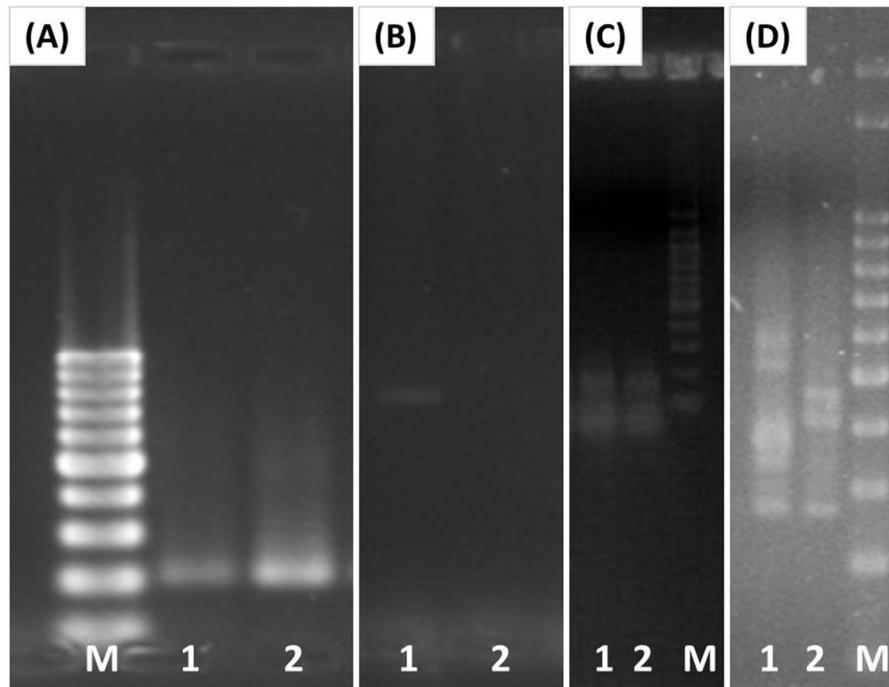


Figura 2.4: Identificación de cepas de *C. difficile* y detección de genes de toxina por PCR. (A) Detección gen *tcdB* (Toxina B). (B) Detección gen *tcdA* (Toxina A). Detección gen *gluD* (glutamato deshidrogenasa). (D) Tipificación por ribotipos. M: marcador peso molecular 100pb; control 1: cepa de *C. difficile* genotipo *gluD+*, *tcdA+*, *tcdB+*; control 2: cepa de *C. difficile* genotipo *gluD+*, *tcdA-*, *tcdB+*.

2.3.2. Cepas de *C. perfringens* de animales de producción:

En el caso de *C. perfringens*, se obtuvieron 98 aislamientos, correspondiente al 39 % de las muestras analizadas: 60/150 a partir de muestras de bovinos adultos (40%) y 38/101 (37.6%) a partir de muestras de terneros. Este microorganismo fue aislado con igual frecuencia en animales adultos sanos como enfermos, por lo que no fue posible establecer una asociación entre el aislamiento y la ocurrencia de enfermedad digestiva (OR 1.00, 95% IC 0.52–1.923, $P > 0.05$), un resultado similar se encontró en las

muestras provenientes de terneros (OR 0.861, 95% IC 0.362–1.812, $P > 0.05$). Todos los aislamientos obtenidos fueron analizados mediante PCR multiplex para la detección de genes de toxinas. Se obtuvieron 88/98 (89.8%) aislamientos con el genotipo *cpa+*, correspondiente al toxinotipo A; 3/98 (3.06%) aislamientos con el genotipo *cpa+*, *cpb2+* (toxinotipo A beta 2 positivo); y 7/98 (7.06%) aislamientos *cpa+*, *cpb2+*, *cpe+*, *iA+* (toxinotipo E). No fue posible establecer una relación significativa entre el aislamiento de cepas *cpb2+* y la presencia de enfermedad digestiva (OR 2.293, 95% IC 0.2–26.219, $P > 0.05$). En el caso de las cepas *iA+* se observó una asociación entre la ocurrencia de enfermedad digestiva y el aislamiento del toxinotipo E ($P < 0.01$). Los resultados obtenidos se resumen en las **figuras 2.5, 2.6 y 2.7**.

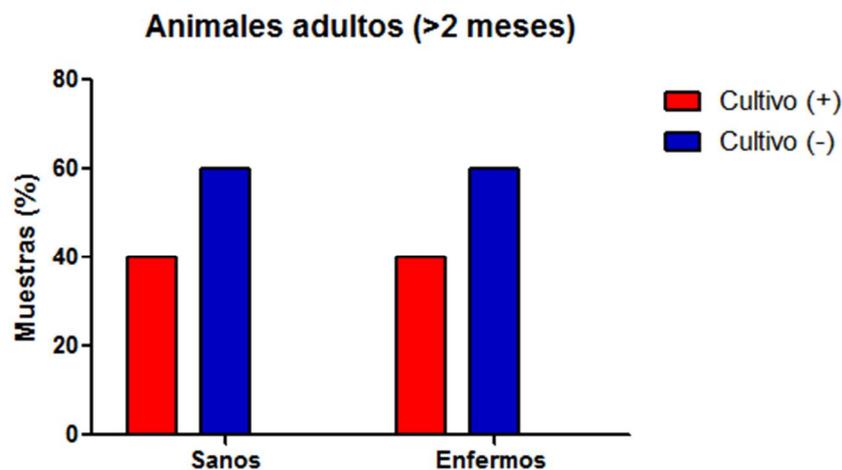


Figura 2.5: Resultados del cultivo bacteriológico de *C. perfringens* a partir de muestras de bovinos adultos, las barras representan el porcentaje de muestras positivas o negativas.

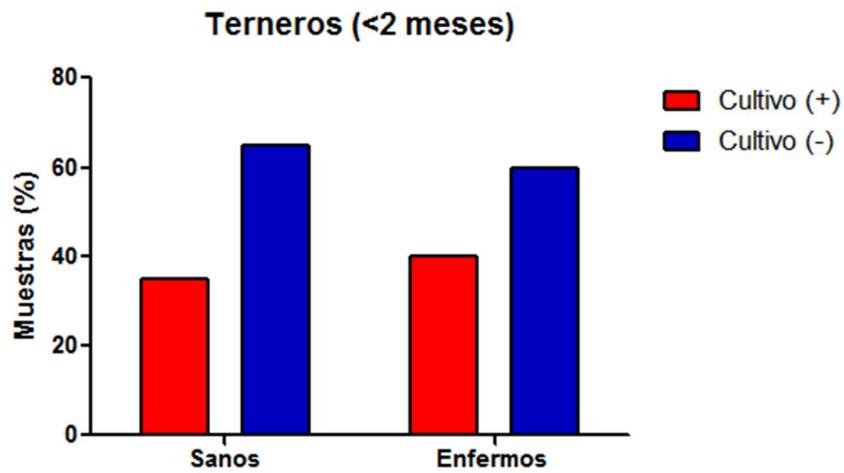


Figura 2.6: Resultados del cultivo bacteriológico de *C. perfringens* a partir de muestras de terneros, las barras representan el porcentaje de muestras positivas o negativas.

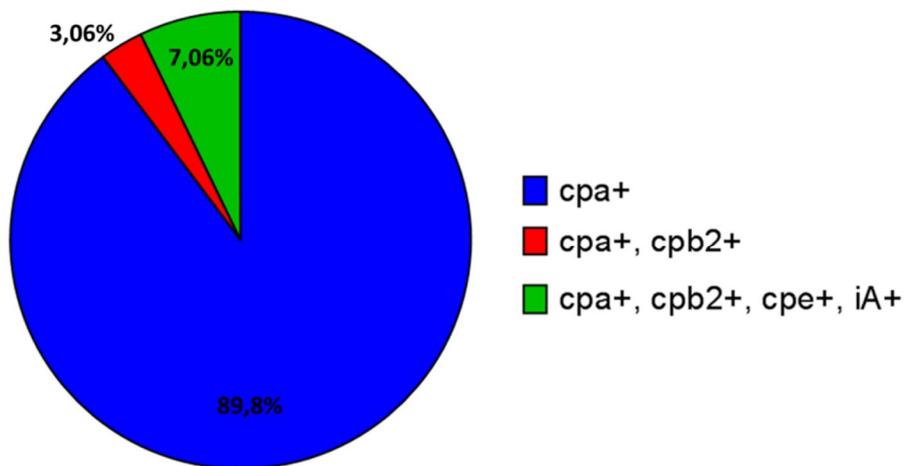


Figura 2.7: Resultados de la tipificación mediante PCR multiplex de los aislamientos de *C. perfringens* obtenidos a partir de muestras de bovinos, los resultados se expresan como porcentaje sobre el total de los aislamientos obtenidos (N= 98).

2.3.3. Reporte de caso:

2.3.3.1. Antecedentes:

El brote ocurrió en un rodeo bovino de cría extensiva en la provincia de Buenos Aires en septiembre de 2010, durante el primer mes luego de iniciada la temporada de partos. El rodeo estaba compuesto de 300 vacas de aproximadamente 3 años de edad, divididas en 3 grupos de 100 animales cada uno. Al momento del brote la alimentación estaba basada en una pastura a base de agropiro (*Thynopyrum ponticus*). En uno de los grupos, 10 animales murieron en el lapso de una semana, en ninguno de estos casos fue posible detectar signos clínicos de enfermedad digestiva. Este síndrome no fue observado en animales de otras categorías.

2.3.3.2. Hallazgos de necropsia e histopatología:

La principal lesión macroscópica observada fue la presencia de hemorragias multifocales en la mucosa del abomaso y del intestino delgado, el contenido de estos órganos era sanguinolento. También se observaron signos de inflamación en la mucosa del colon espiral y los nódulos linfáticos se encontraban inflamados y con edema. Aunque los tejidos mostraban cambios autolíticos leves, fue posible identificar lesiones microscópicas. La principal lesión observada fue necrosis hemorrágica superficial de la mucosa en yeyuno-íleon (**Figura 2.8**). En secciones teñidas con H/E fue posible observar desprendimiento del epitelio y atrofia de las vellosidades. Se observaron hemorragias en la submucosa e infiltrado inflamatorio, principalmente mononuclear. Numerosos bacilos Gram positivos fueron observados adheridos a los restos del epitelio y en la superficie de los focos de necrosis en algunas secciones de yeyuno-íleon. No se hallaron alteraciones macroscópicas o microscópicas en el resto de los órganos.

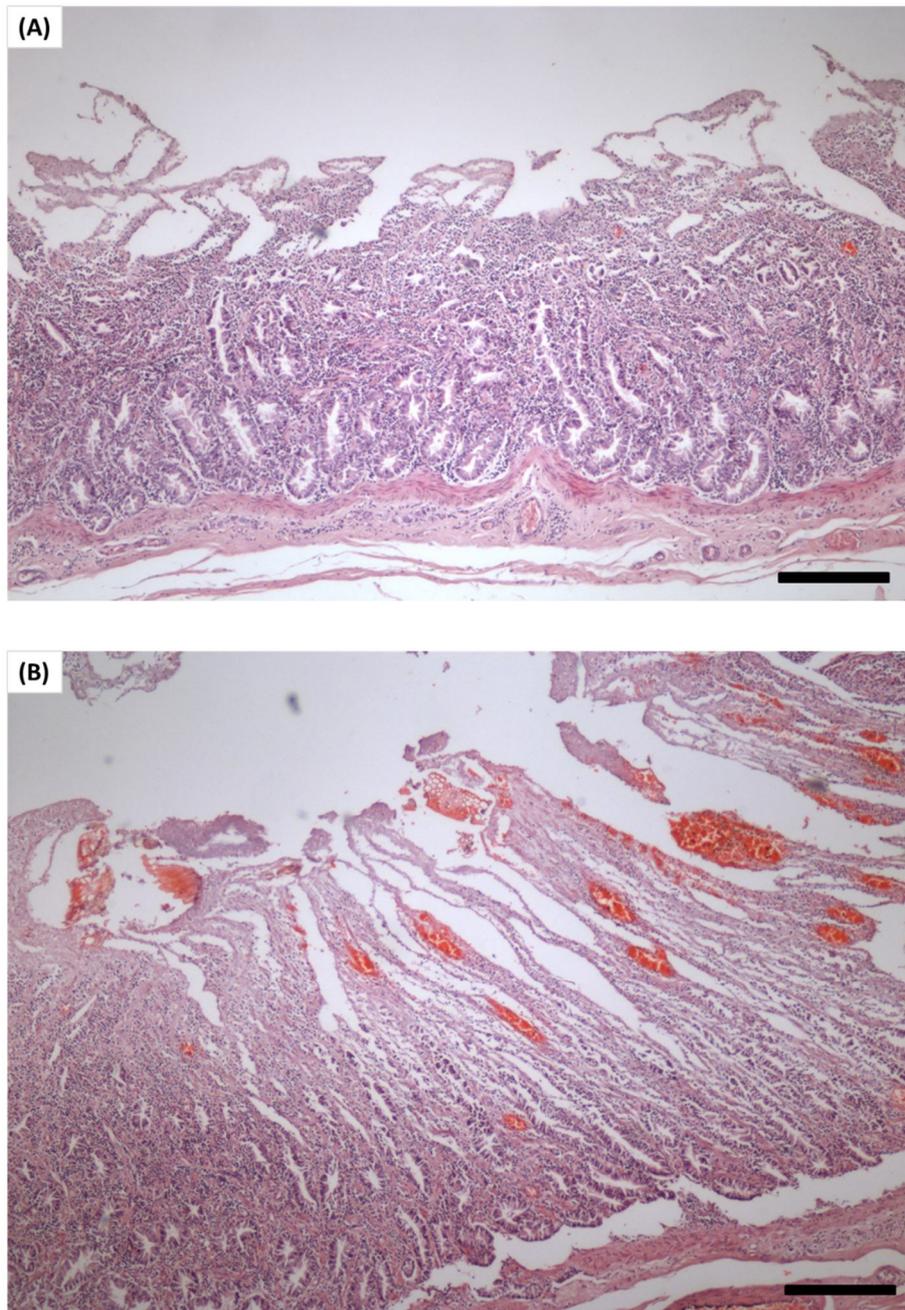


Figura 2.8: Microfotografías de diferentes secciones de íleon de uno de los animales afectados. H/E. (A) Es posible observar el desprendimiento del epitelio, atrofia de las vellosidades. (B) Es posible observar el desprendimiento del epitelio, atrofia de las vellosidades y la presencia de focos hemorrágicos. Barra: 100 μm .

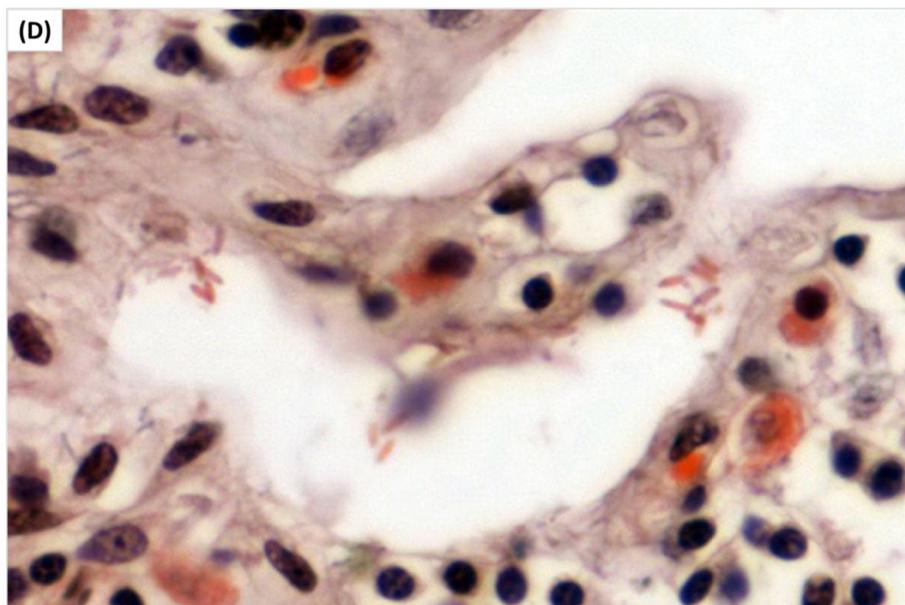
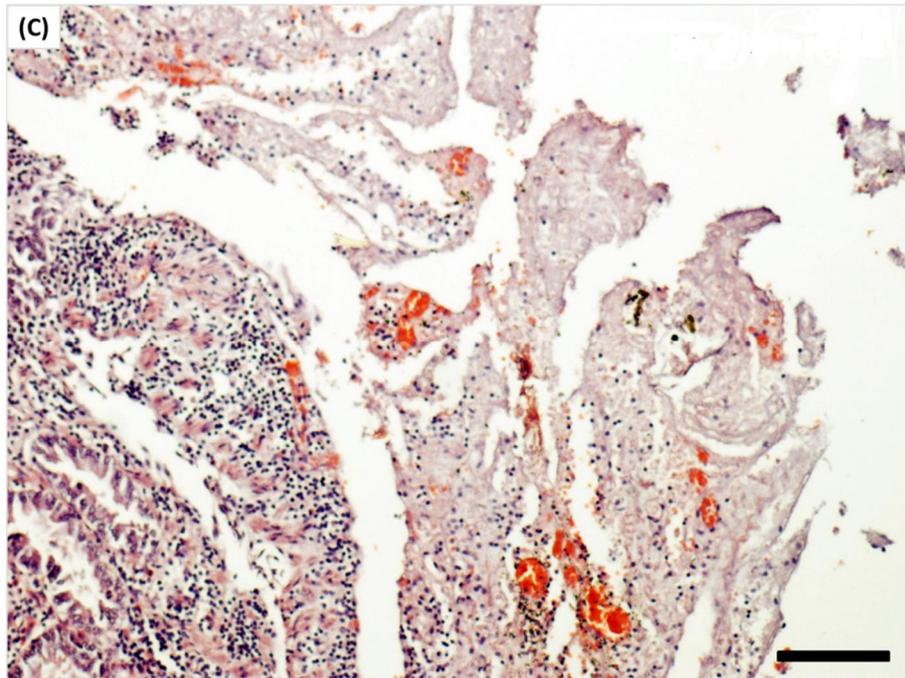


Figura 2.8 cont.: Microfotografías de diferentes secciones de íleon de uno de los animales afectados. H/E. (C) Detalle de una vellosidad, donde se observa atrofia y pérdida de epitelio. En lámina propia se observa un infiltrado mononuclear. Barra: 200 μ m. (D) Entre los restos de tejido necrótico es posible observar bacilos con morfología compatible con *C. perfringens*.

2.3.3.3. Bacteriología:

En improntas de la mucosa del intestino delgado se observó una gran cantidad de bacilos Gram positivos gruesos y con extremos romos. En los cultivos aerobios y anaerobios de hígado, riñón, bazo, pulmón, cerebro y ganglios linfáticos, no se obtuvieron aislamientos. En las muestras de intestino, cultivadas en condiciones aerobias, solo se observó crecimiento de escasas colonias mucosas. A partir de los cultivos anaerobios de intestino se obtuvo abundante crecimiento de colonias hemolíticas compatibles con *C. perfringens*. De cada placa se repicaron 3 colonias en caldo carne picada para conservarlas hasta el momento de su identificación mediante pruebas bioquímicas y moleculares.

2.3.3.4. Toxinotipificación por PCR:

Mediante PCR multiplex se obtuvieron amplificaciones correspondientes con a los genes *cpa* e *iA* correspondientes a las toxinas alfa e iota, respectivamente, lo que corresponde con el toxinotipo E (**Figura 2.9**). Al igual que otras cepas pertenecientes al tipo E, aisladas de casos similares en terneros, las cepas obtenidas a partir de este caso eran portadores de los genes *cpb2* y *cpe* correspondientes a las toxinas beta2 y enterotoxina, respectivamente.

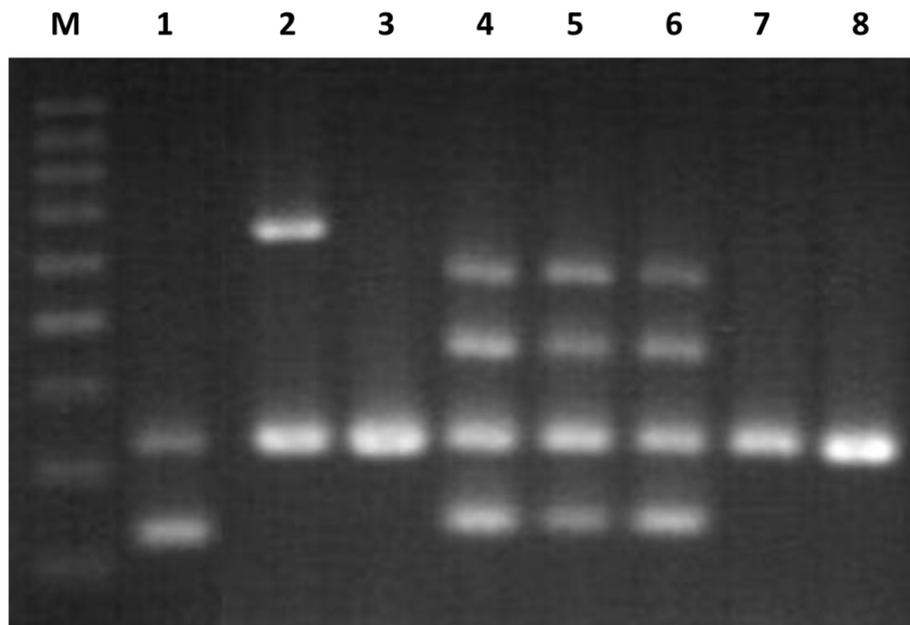


Figura 2.9: Tipificación por PCR multiplex de los aislamientos de *C. perfringens* obtenidos a partir de muestras de bovinos. M: marcador de peso molecular de 100 pb; 1: cepa de *C. perfringens* tipo C de referencia; 2: cepa de *C. perfringens* tipo D de referencia; 3: cepa de *C. perfringens* tipo A de referencia; 4: cepa de *C. perfringens* tipo E de referencia; 5 y 6: cepas de *C. perfringens* tipo E aisladas durante el brote descrito anteriormente; 7 y 8: cepas de *C. perfringens* tipo A aisladas a partir de muestras de bovinos.

2.3.4. Caracterización de aislamientos de *C. perfringens* por MLST:

Se utilizaron 32 cepas de *C. perfringens* aisladas de rumiantes para el análisis de MLST (**Tabla 2.5**). El análisis de MLST de estas cepas de permitió identificar 20 haplotipos, de los cuales 17 (81%) incluían un solo aislamiento. El análisis de eBURST se realizó definiendo grupos que compartan al menos 6 de los 8 genes analizados, de esta manera se formaron dos complejos clónales que contenían al 51,1% (17/33) de los

aislamientos (**Figura 2.10**). El complejo clonal 1 incluye 13 aislamientos del toxinotipo E, agrupados en 3 haplotipos, de estos el número 45 representa la mayor proporción y de acuerdo al análisis de eBURST, este haplotipo es el fundador más probable del complejo clonal. Dentro del haplotipo número 45 se incluyeron todos los aislamientos de *C. perfringens* tipo E de nuestro país y la mayoría de los aislamientos obtenidos en Estados Unidos, junto con la cepa de referencia NCIB 10748. A diferencia de los resultados obtenidos con el complejo clonal 1, el complejo clonal número 2 resultó en un agrupamiento de cepas vagamente definido. Dentro de este grupo se incluyeron 4 aislamientos tipo A, 2 aislamientos de bovinos pertenecientes a distintos haplotipos, y aislamientos de cérvidos pertenecientes al mismo haplotipo. Debido al escaso número de cepas incluidas dentro de este complejo, y el grado de variabilidad dentro del mismo no fue posible definir un haplotipo fundador. No se observaron relaciones con respecto al origen de las cepas o a la especie hospedero, a diferencia de lo observado dentro del complejo número 1 en donde todos los aislamientos tipo E provenían de bovinos con enfermedad digestiva.

Tabla 2.5: Listado de cepas de *C. perfringens* utilizadas en el análisis de MLST.

Toxinotipo	Especie hospedero	País de origen	Numero de aislamientos
A	Bovino	Argentina	3
		Estados Unidos	8
	Ovino	Argentina	-
		Estados Unidos	5
	Cérvido	Argentina	-
		Estados Unidos	2
E	Bovino	Argentina	2 ^a
		Estados Unidos	12 ^a
		Total	32

^a No se incluye la cepa de *C. perfringens* tipo E de referencia NCIB 10748.

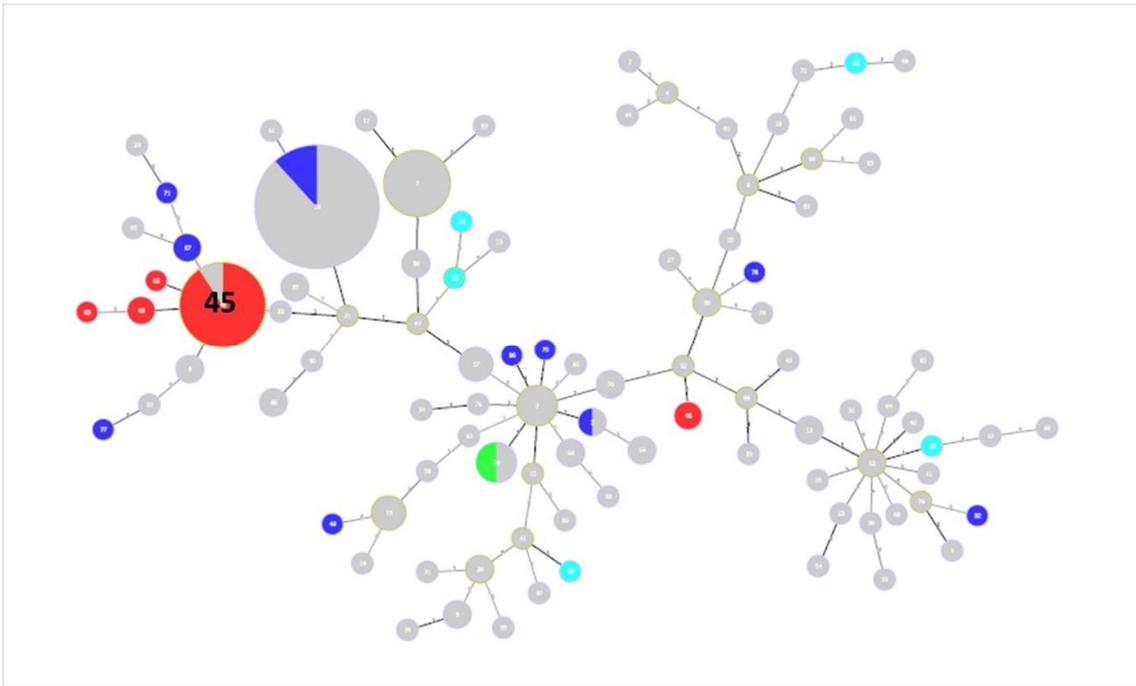


Figura 2.10: Agrupamiento de los aislamientos de *C. perfringens* graficado mediante PHYLOViZ. En rojo se muestran los aislamientos tipo E de origen bovino, los cuales se encuentran principalmente agrupados dentro del haplotipo número 45 independientemente del origen geográfico. En azul se muestran los aislamientos tipo A de bovinos, en celeste los aislamientos tipo A de ovinos y en verde los aislamientos tipo de ciervo. Los aislamientos en gris representan cepas presentes en la base de datos pero no consideradas en este análisis.

2.3.5. Diversidad en los loci caracterizados por MLST:

La diversidad dentro de cada locus analizado mediante MLST se muestra en la **tabla 2.6**. El número de alelos para cada gen housekeeping osciló entre 5 (*tpi*) a 13 (*sod*); el gen *plc* el cual codifica la toxina alfa, mostro la mayor variabilidad de los genes analizados, presentando 15 alelos. El porcentaje de polimorfismos entre alelos de cada gen oscilo desde 15% (*tpi*) a 45% (*plc*), de estos polimorfismos la mayoría resulto en sustituciones de base sinónimos, con una relación entre polimorfismos no sinónimos y

polimorfismos sinónimos (pN/pS) igual a 0.037 (*sod*) a 0.333 (*dut*). No se observaron polimorfismos no sinónimos entre los alelos del gen *recA*. Con el objetivo de identificar cuál de los toxinotipos estudiados poseía el mayor grado de variabilidad se realizó un análisis similar comparando las cepas pertenecientes a los toxinotipos A y E por separado. En este análisis fue posible observar una mayor variabilidad entre las cepas incluidas dentro del tipo A en comparación con las cepas del tipo E, los resultados se resumen en la **tabla 2.7**.

Tabla 2.6: Diversidad dentro de cada loci caracterizado por MLST.

Gen	Alelos (n)	Proporción de alelos (%) ^a	Polimorfismos (%) ^b	pN/pS ^c
Housekeeping:				
<i>ddlA</i>	12	35	8	0,1923
<i>dut</i>	10	29	6	0,3333
<i>glpk</i>	11	32	4	0,1667
<i>gmk</i>	7	21	4	0,1538
<i>recA</i>	8	24	4	0,0000
<i>sod</i>	13	38	7	0,0370
<i>tpi</i>	5	15	3	0,1111
Virulencia:				
<i>plc</i>	15	44	7	0,2667

^a Numero de alelos en relación al número de cepas tipificadas.

^b Porcentaje de sitios variables en relación al tamaño del segmento secuenciado.

^c Relación entre polimorfismos no sinónimos (pN) y polimorfismos sinónimos (pS).

Tabla 2.7: Comparación en la diversidad de los loci caracterizados por MLST entre las cepas tipo A y tipo E.

Gen	Alelos (n)		Proporción de alelos (%) ^a		Polimorfismos (%) ^b		pN/pS ^c	
	A	E	A	E	A	E	A	E
Toxinotipo								
Housekeeping:								
<i>ddlA</i>	10	4	56	25	8	3	0,192	0,250
<i>dut</i>	8	3	44	19	6	2	0,333	0,286
<i>glpK</i>	9	3	50	19	4	1	0,176	0,167
<i>gmk</i>	7	2	39	13	4	1	0,154	0,400
<i>recA</i>	8	2	44	13	4	1	0	0
<i>sod</i>	11	3	61	19	7	4	0,037	0
<i>tpi</i>	5	2	28	13	3	1	0,111	0
Virulencia:								
<i>plc</i>	13	3	72	19	7	2	0,241	0,250

^a Numero de alelos en relación al número de cepas tipificadas.

^b Porcentaje de sitios variables en relación al tamaño del segmento secuenciado.

^c Relación entre polimorfismos no sinónimos (pN) y polimorfismos sinónimos (pS).

2.4. Discusión:

En la actualidad existen pocos trabajos publicados referidos a la prevalencia de *C. difficile* en bovinos (Hammit et al., 2008; Rodriguez-Palacios et al., 2007; Rodriguez-palacios et al., 2006). De acuerdo a estos trabajos, se observa que las tasas de aislamientos son altamente variables entre rodeos. Los resultados del presente trabajo sugieren que la prevalencia de *C. difficile* en sistemas ganaderos de nuestro país es muy baja. La ausencia de aislamientos en animales domésticos podría deberse principalmente a la ausencia de factores predisponentes en los establecimientos ganaderos. Estudios previos realizado en Estados Unidos y Canadá reportan prevalencias aproximadas de 25% (Hammit et al., 2008), 12% (Rodriguez-palacios et

al., 2006) y 4% (Costa et al., 2012) en bovinos. Una de las posibles razones de la variación observada entre los trabajos consultados es la gran variación existente entre las técnicas y los protocolos utilizados por cada grupo. Otra explicación para esta variación se encuentra en las condiciones en la que se encuentran los animales al momento del muestro, ya que en los trabajos consultados no se describen factores vinculados a las características de los rodeos como la higiene, la densidad de la población, la mezcla de animales o la administración de antimicrobianos, los cuales deben ser considerados al momento de interpretar los resultados obtenidos mediante bacteriología, sumado a la existencia de posibles variaciones geográficas. Aunque al momento de iniciar este trabajo se utilizó el protocolo propuesto por Hammitt et al. (2008), posteriormente se decidió incorporar las modificaciones propuestas por Costa et al. (2012), las cuales están dirigidas a obtener aislamientos a partir de muestras obtenidas en una población en la que se asume una prevalencia menor al 5%. En este mismo trabajo reportan que la excreción de *C. difficile* en materia fecal no es continua, situación que también ocurre en los seres humanos portadores asintomáticos (Curry et al., 2013) o incluso en pacientes con síndromes compatibles a la infección por *C. difficile* (Knetsch et al., 2011; Norén et al., 2011), sugiriendo que aunque el cultivo toxicogénico sea considerado la prueba de referencia en cuanto al diagnóstico de la enfermedad asociada a *C. difficile*, los resultados que se obtengan con esta prueba no son concluyentes y deben interpretarse en combinación con pruebas complementarias.

En el caso de *C. perfringens*, los resultados aquí presentados demuestran la presencia de este microorganismo en bovinos de diferentes edades, independientemente de su estado sanitario al momento del muestreo. Trabajos previos referidos a la prevalencia de *C. perfringens* reportan resultados variables según la región o la población estudiada (Ferrarezi et al., 2008; Miyashiro et al., 2009; Songer y Miskimins, 2005). Al igual que en estos trabajos, no fue posible establecer una asociación entre la presencia de *C. perfringens* y la presencia de enfermedad digestiva. Luego de toxintipificar los aislamientos obtenidos, se observó el predominio de aislamientos correspondientes al toxintipo A (genotipo *cpa+*), esto es similar a resultados publicados en trabajos

equivalentes (Dennison et al., 2005; Ferrarezi et al., 2008; Miyashiro et al., 2009). Este resultado era esperado dado que estas cepas se encuentran normalmente en el intestino de animales sanos, inclusive neonatos (Lebrun et al., 2010). Debido a esta situación, es difícil definir el rol de las cepas del tipo A en la enfermedad digestiva de bovinos y otros animales (Nowell et al., 2012). Una situación similar se plantea respecto a los aislamientos tipo A beta2+, aunque numerosos trabajos sugieren que la toxina beta2 podría actuar como un factor de virulencia de importancia, al menos entre las cepas tipo A (Manteca et al., 2002), en este trabajo se encontró una prevalencia menor (3%) a la reportada en otros trabajos (7.5% - 31%) (Dennison et al., 2005; Slavić et al., 2011) y de acuerdo a los resultados obtenidos no fue posible definir una asociación entre la detección del gen *cpb2* mediante PCR y la observación de enfermedad digestiva. Esto también fue sugerido por otros grupos de trabajos (Dennison et al., 2005; Songer y Miskimmins, 2004), los cuales reportan que estos aislamientos *cpb2+* de origen bovino poseen una secuencia atípica silenciada (Jost et al. 2005; 2006). El análisis en conjunto de estos resultados sugiere que la producción de toxina beta2 no sería fundamental en el desarrollo de cuadros digestivos en bovinos, aunque podría tener un rol complementario en estos síndromes.

De los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo se destaca la prevalencia del toxinotipo E, como así también la ocurrencia de un brote de enteritis asociado a este toxinotipo en animales adultos, no descrito anteriormente. Actualmente existen escasos reportes acerca de enfermedad ocasionada por *C. perfringens* tipo E y se asume que la prevalencia de toxinotipo es muy baja (McClane et al., 2006; Sipos et al., 2003; Songer y Miskimmins, 2004). Históricamente, la toxinotipificación de las cepas aisladas se realizaba mediante pruebas de seroneutralización en ratones con antisueros específicos para cada toxinotipo. De acuerdo a los resultados de Stiles y Wilkins (1986) sobre la toxicidad de la toxina iota en ratones y los presentados en secciones posteriores de esta tesis podemos sugerir que la letalidad de la toxina iota presente en los sobrenadantes del tipo E es comparativamente baja. De esta forma, es posible que muchas cepas tipo E hayan sido erróneamente clasificadas como tipo A durante los años previos a la masificación del

uso de la PCR como técnica diagnóstica. Otro factor que contribuye a la subestimación del toxinotipo E como agente patógeno, es la estimación de la prevalencia de cada toxinotipo de *C. perfringens* en base a la ocurrencia de casos compatibles, en los cuales generalmente no se realiza el diagnóstico bacteriológico y, cuando se realiza, no es acompañado de una adecuada tipificación, por lo que se asume que la causa de estos cuadros serían los toxinotipos A o C supuestamente más comunes. En seres humanos, donde el diagnóstico bacteriológico se realiza con mayor frecuencia y generalmente se acompaña de una tipificación mediante pruebas serológicas, es muy probable que debido a la utilización de sistemas de tipificación basados en pruebas inmunológicas, *C. perfringens* tipo E no haya sido considerado un patógeno en seres humanos hasta el momento. Trabajos recientes reportan la presencia de toxinas binarias relacionadas con la toxina iota en cepas aisladas a partir de brotes de intoxicación alimentaria (Miyamoto et al., 2011; Yonogi et al., 2014), proponiendo una relación entre este toxinotipo y enfermedades gastrointestinales humanas.

De acuerdo a la bibliografía consultada, las cepas pertenecientes al toxinotipo E serían más comunes en ciertos nichos de lo que se supuso históricamente. El examen de 1.113 cepas de *C. perfringens* (Ferrarezi et al., 2008b; Songer y Miskimmins, 2004) de casos de enteritis en animales domésticos reveló 45 cepas de tipo E (4 %), todos de diferentes rebaños. Todas estas cepas provenían de terneros recién nacidos con enteritis hemorrágica (la mayoría presentados como casos de muerte súbita), lo cual es consistente con los hallazgos aquí presentados. Aunque las muestras utilizadas en estos trabajos no sean necesariamente representativas; es destacable el hecho de que todos los aislamientos tipo E se obtengan a partir de una misma especie hospedero y siempre asociado a condiciones clínicas similares, incluso estos autores sugieren que este toxinotipo es hallado en aproximadamente el 46,9 % de todos los casos donde se reportan cuadros de muerte súbita con enteritis hemorrágica en terneros (Songer y Miskimmins, 2004). El brote de enteritis hemorrágica por *C. perfringens* tipo E descrito en este trabajo involucra a vacas adultas en el periparto y se caracteriza por muerte súbita con hallazgos a la necropsia e histopatológicos similares a los reportados en los casos de terneros. Este diagnóstico fue confirmado por la identificación bacteriológica

y molecular de *C. perfringens* tipo E. De acuerdo a la bibliografía consultada, este es el primer reporte de esta enfermedad en bovinos adultos, lo que sugiere que *C. perfringens* tipo E podría ser potencialmente peligroso para los animales de cualquier edad.

Con el objetivo de analizar la relación entre las cepas de *C. perfringens* tipo E aisladas en este caso a partir de animales adultos y las aisladas a partir de caso en neonatos, se desarrolló una base de datos de MLST a partir de lo propuesto por B. H. Jost (Jost et al., 2006; Redondo et al., 2013). Los resultados presentados en esta sección coinciden con reportes previos donde mencionan una gran variabilidad presente entre las cepas del toxinotipo A (Jost et al., 2006), de acuerdo a lo cual no es posible agrupar a los aislamientos de este toxinotipo según la especie hospedero o el origen geográfico. A diferencia de esto, todas las cepas de *C. perfringens* tipo E aisladas a partir de bovinos, se encuentran altamente relacionadas, incluso esta relación se observa entre cepas aisladas en regiones geográficas distantes. Esto sugiere que el toxinotipo E representa un fenotipo exitoso en términos evolutivos dentro de un nicho específico como puede ser el intestino bovino. Estudios previos donde se analizan varias cepas pertenecientes al toxinotipo E sugieren que las mismas no estarían relacionadas clonalmente (Li et al., 2007). Sin embargo en este estudio se definen las relaciones entre aislamientos utilizando PFGE, esta técnica posee un gran poder de discriminación dado que analiza la totalidad del material genético, incluyendo ADN cromosómico como plasmídico, aunque esto puede constituir una desventaja dado que este último es altamente inestable y los resultados pueden variar según el estado de conservación de una cepa y el número de repiques de la misma (Li et al., 2007). El agrupamiento de las cepas tipo E aquí observado, junto a los resultados reportados previamente (Jost et al., 2006), sugieren que estas cepas al menos comparten un acervo génico común. La incorporación de genes "housekeeping" en el análisis de aislamientos mediante MLST, es de gran importancia al momento de interpretar los resultados. Estos genes representan un subconjunto de genes que están presentes en todos los miembros de una especie y, por lo tanto, son presumiblemente más estables debido a que son necesarios para una mayor performance evolutiva a largo plazo. Esta técnica ha

demostrado ser muy útil al momento de definir asociaciones entre complejos de cepas y patotipos específicos en aves (Chalmers et al., 2008) y seres humanos (Miyamoto et al., 2011).

Los resultados aquí presentados muestran que las cepas tipo E aisladas durante brotes de enteritis hemorrágica en nuestro país, pertenecen al mismo haplotipo junto con la cepa tipo E de referencia (NCIB 10748), y cepas tipo E aisladas de brotes similares en bovinos en los Estados Unidos (Jost et al., 2006). Estos resultados se contradicen con las hipótesis aceptadas actualmente en relación a la diseminación del *C. perfringens* tipo E. Dado que este toxinotipo se define por la producción de toxina iota, la cual está presente en un plásmido, anteriormente se propuso que la diseminación de este toxinotipo dependía principalmente de la transferencia del plásmido portador de los genes *iA/iB* desde cepas tipo E (donantes) a cepas tipo A (receptoras) (Li et al., 2007). Sin embargo, el grado de semejanza entre las secuencias analizadas mediante MLST en este y otros trabajos (Jost et al., 2006; Redondo et al., 2013) sugiere que el modo de diseminación del toxinotipo E más probable sea la expansión clonal en lugar de la simple transmisión del plásmido. Nuevos estudios son necesarios para comprender si esto se debe a la acción de factores codificados por genes cromosómicos destinados al mantenimiento del plásmido portador de los genes de la toxina iota (*iA/iB*), o si la combinación de ciertos genes cromosómicos junto con genes presentes en plásmidos, producen un incremento en la performance de estas bacterias en el intestino bovino.

Los reportes de casos de enfermedad digestiva producida por cepas de clostridios enterotóxicos productores de toxinas binarias en seres humanos y animales domésticos, sugieren que este grupo de cepas tendrían una capacidad patogénica aumentada. Esto puede relacionarse con la ocurrencia de enfermedad en grupos que hasta el momento eran considerados de bajo riesgo epidemiológico. En numerosos trabajos realizados con aislamientos de *C. difficile* denominados hipervirulentos obtenidos de pacientes humanos con enfermedad severa se observó que hasta un 35% de los mismos son positivos a CDT (*cdtA/cdtB*) (Geric, 2004; Goncalves et al., 2004), lo

cual sugiere un rol de la toxina binaria en el recrudecimiento de la enfermedad. El brote descrito en este capítulo podría estar sugiriendo la ocurrencia de una situación similar en bovinos con respecto a la ocurrencia de casos de enteritis por *C. perfringens* tipo E (productor de toxina iota), donde este microorganismo afecta a grupos de bajo riesgo como los bovinos adultos. Sin embargo, todas las posibles explicaciones son especulaciones debido a la escasa información disponible sobre el rol de las toxinas binarias en las enfermedades clostridiales entéricas en animales, así como la propia enfermedad producida por el toxinotipo E de *C. perfringens*.

Capítulo 3:

Alteraciones morfológicas y fisiológicas inducidas por efecto de la toxina iota en el intestino.

3.5. Introducción:

Las cepas de *C. perfringens* tipo E son capaces de producir enfermedad intestinal en bovinos de diferentes edades. De acuerdo al sistema de tipificación en base a la producción de toxinas las cepas pertenecientes a este toxinotipo se definen por la producción de la toxina iota (Morris y Fernandez Miyakawa, 2009; Songer, 1996). Esta toxina pertenece a la familia de las toxinas binarias junto con las toxinas CDT de *C. difficile* y CST de *C. spiroforme*. Aunque actualmente se acepta que la toxina iota es el principal factor de virulencia de los aislamientos tipo E (Kim et al., 2013; McClane et al., 2006; Songer y Miskimmins, 2004), los efectos intestinales de *C. perfringens* tipo E o de la toxina iota se encuentran poco caracterizados. La falta de un modelo animal de laboratorio que reproduzca las alteraciones observadas en casos naturales de enteritis hemorrágica producida por *C. perfringens* tipo E, puede ser una de las principales razones de esta falta de trabajos.

Trabajos previos reportan el uso de ratones como modelo de infección para otros toxinotipos de *C. perfringens* (Fernandez Miyakawa et al., 2007; Uzal et al., 2009). Estos modelos han permitido el estudio de los efectos sistémicos y entéricos de las cepas perteneciente a los toxinotipos C o D, y de sus correspondientes toxinas beta y epsilon. En el caso del toxinotipo E y la toxina iota, existen reportes de los efectos sistémicos letales luego de la inoculación endovenosa de sobrenadantes crudos o de toxina iota purificada (Simpson et al., 1987). La vía de inyección endovenosa en el modelo ratón es útil para el estudio de los efectos letales y/o sistémicos, lo que indica la sensibilidad de esta especie a la toxina iota. Sin embargo, este modelo difiere significativamente de lo que ocurre en la enfermedad natural, donde las toxinas se producen en el tracto gastrointestinal donde primero inducen alteraciones sobre el epitelio intestinal, para luego absorberse y generar efectos sistémicos (Songer y Miskimmins, 2004). En esta sección se estudiaron las alteraciones morfológicas y

fisiológicas inducidas en el intestino por efecto de la toxina iota. Mediante el uso de ratones inoculadas con toxina purificada por vía intrainestinal e intragástrica, se logró reproducir las alteraciones morfológicas observadas en casos naturales y se realizó una primera aproximación a las alteraciones fisiológicas involucradas en el desarrollo de la enfermedad intestinal en mamíferos por acción de la toxina iota de *C. perfringens* tipo E.

3.6. Materiales y métodos:

3.6.1. Cepas y condiciones de cultivo:

En la realización de estos ensayos se utilizaron cepas de *C. perfringens* tipo E, aisladas durante un brote de enteritis hemorrágica en bovinos adultos. El aislamiento y la identificación de estas cepas se realizó mediante métodos bioquímicos y moleculares según lo descrito anteriormente (capítulo 2). Al momento de iniciar esta serie de ensayos, las cepas utilizadas fueron sembradas en placas de agar sangre con neomicina (100 mg/L) y cultivadas en condiciones de anaerobiosis durante 18 horas a 37°C. Colonias aisladas fueron repicadas en 10 ml de BHI en atmósfera anaerobia durante 18 horas a 37°C.

3.6.2. Producción de toxina iota *in vitro*:

Colonias aisladas fueron repicadas en 10 ml de BHI e incubadas en atmosfera anaerobia durante 18 horas a 37°C. Del cultivo resultante se tomó una alícuota de 0.1 ml, con esto se inocularon 10 ml de BHI estéril y se incubaron a 37°C en atmosfera anaerobia. Se tomaron alícuotas cada 2 horas y se midió densidad óptica a 600 nm (DO_{600}). (Fernandez Miyakawa et al., 2007; Li y McClane, 2006). Cada una de estas alícuotas fue centrifugada para separar las bacterias a 13.000 g durante 10 minutos y el sobrenadante fue esterilizado mediante filtración con filtro de 0.45 μ m. La concentración de toxina iota en cada sobrenadante se determinó mediante una prueba de efecto citopático en monocapa de células Vero (Stiles y Wilkins, 1986).

3.6.3. Purificación de toxina iota:

Ambas subunidades de la toxina iota fueron purificadas de acuerdo a lo descrito por Stiles (1986). Un cultivo en fase estacionaria de *C. perfringens* tipo E (cepa CpE218) fue centrifugado (7,000 g durante 20 min) para separar las células del sobrenadante, las proteínas del mismo fueron precipitadas mediante la adición de una solución sobresaturada de sulfato de amonio al 70%. El precipitado fue separado mediante centrifugación (7,000 g durante 20 min), resuspendido en buffer Tris-HCl 10 mM a pH 7.5 y dializado en el mismo buffer para eliminar residuos de sulfato de amonio. Para obtener las fracciones ITXa e ITXb de la toxina iota, este sobrenadante concentrado se agregó a una columna de DEAE-Sefarosa CL-6B previamente equilibrada con buffer Tris-HCl 10 mM a pH 7.5. Ambas fracciones de la toxina iota fueron eluidas con un gradiente lineal de NaCl de 0.0 a 0.2 M. La concentración aproximada de proteína en cada fracción se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm. La pureza de la toxina fue verificada mediante SDS/PAGE teñido con Coomassie Blue. Para medir actividad de

la toxina iota purificada se utilizó una prueba de efecto citopático en monocapa de células Vero (Stiles y Wilkins, 1986) y Caco-2 (Papatheodorou et al., 2012). Los cambios en la distribución de los filamentos de actina y la morfología celular se analizaron mediante microscopia de fluorescencia. Para observar los filamentos de actina se utilizó faloidina conjugada con Alexa 488 y DAPI para la observación de los núcleos. Para los ensayos *in vivo*, la dosis de toxina iota utilizada fue expresada en base a la actividad sobre células como unidades arbitrarias de toxina iota (U), las cuales se definen como el recíproco de la mayor dilución en la que observo actividad citopática sobre monocapas de células.

3.6.4. Animales:

En los ensayos planteados se utilizaron ratones machos con un peso de 20-25g, mantenidos bajo condiciones estándar. Todos los procedimientos descritos fueron revisados y avalados por el Comité Institucional para el Cuidado y uso de Animales de Experimentación del CICVyA-INTA (CICUAE). La autorización de los mencionados ensayos se corresponde con el procedimiento 32/2010.

3.6.5. Letalidad en ratones:

La dosis letal 50 por mililitro (LD_{50}/ml) para la toxina iota se determinó administrando toxina purificada en diferentes concentraciones por vía endovenosa a grupos de ratones (Fernandez Miyakawa et al., 2008). Grupos de 2 animales cada uno fueron inoculados con 200, 100 y 50 U de toxina iota, el último grupo fue inoculado con buffer Tris-HCl 10 mM a pH 7.5 como control. Todos los animales fueron inyectados con un

volumen de 0.5ml y observados durante un periodo de 48 horas. Debido a la falta de antecedentes en cuanto a los signos clínicos ocasionados por la toxina iota, el criterio de punto final fue definido en base a trabajos previos de modelos murinos de infecciones por *C. perfringens* (Sayeed et al., 2005; Uzal et al., 2009). En los casos en los que se observó la presencia de signos respiratorios o nerviosos severos se indicó la eutanasia de las animales y estos animales fueron incluidos en los cálculos de letalidad.

3.6.6. Prueba de asas intestinales ligadas:

Con el fin de evaluar los cambios morfológicos producidos por la toxina iota en el intestino, se realizaron ensayos con asas ligadas de acuerdo a lo descrito por Caserta et al. (2011). Los animales fueron sometidos a ayuno de sólidos durante 4 horas y de líquidos durante 1 hora, previo al inicio de los ensayos. Los ratones fueron anestesiados con ketamina (100 mg/kg) y diazepam (5 mg/kg) por vía intraperitoneal. Se realizó una laparotomía por línea media y se identificó el intestino (**Figura 3.1**). Mediante la realización de 2 ligaduras con hilo de algodón, se formaron dos asas intestinales en íleon y colon. Las asas intestinales ligadas obtenidas se inocularon con 100 U y 50 U de toxina iota purificada disuelta en 0.25 ml de PBS. Este procedimiento se repitió en otro grupo de ratones, pero las asas intestinales fueron inoculadas con 0.25 ml de PBS sin toxina como control. Finalmente se cerró el abdomen mediante sutura en un plano. Los ratones fueron mantenidos en plano anestésico mediante la administración periódica de anestesia hasta el final del ensayo. Luego de 4 horas, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Inmediatamente se aisló la porción del intestino ligada y se fijó por inmersión en formalina bufferada al 10%, luego de 48 horas estas muestras fueron procesadas siguiendo protocolos de rutina para realizar tinciones de hematoxilina- eosina (H/E) e inmunohistoquímica.



Figura 3.1: Prueba de asas intestinales ligadas. Luego de alcanzar el plano anestésico, se realiza una laparotomía por línea media y se identifica el íleon tomando el ciego como punto de referencia (Wehner et al., 2011).

3.6.7. Inmunohistoquímica:

Secciones desparafinadas de tejidos, tratados con toxina iota purificada y controles preparadas según lo descrito en la sección anterior, fueron bloqueadas con una solución de albumina al 2% en TBS (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavar 3 veces con TBST (TBS pH 7,5 - 0,05 % Tween-20), y se incubó con el anticuerpo primario, en este caso una dilución 1:50 de IgY anti-ITX producido en gallina ponedora, a 4C° durante toda la noche. Luego se lavó 3 veces con TBST y se incubó de 1 hora con el anticuerpo secundario, en este caso anti-IgY conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich, EEUU) diluido 1:100 en TBST. Después de

lavar 3 veces con TBST se reveló con solución de diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno (DAB cod. K3468; DAKO) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego de lavar 3 veces con agua destilada. Una vez terminado esto se realizó la coloración de contraste con hematoxilina y el montaje de las muestras para ser observadas en el microscopio óptico.

3.6.8. Enteropooling o acumulación de líquido intraluminal:

Los cambios en la homeostasis de líquidos en fueron determinados mediante la prueba de enteropooling, la cual permite evaluar la acumulación total de líquidos en la luz del intestino (Goldstein et al., 2009). Los animales fueron sometidos a ayuno de sólidos durante 4 horas y de líquidos durante 1 hora, previo al inicio de los ensayos. Dos grupos de 6 ratones fueron inoculados por vía intragástrica (**Figura 3.2**) con 200 U de toxina iota disuelta en 0.5 ml de PBS - 1.5% NaHCO₃, y sacrificados a las 6 y 20 horas. Dos grupos más se utilizaron como control en los mismos tiempos, estos animales se inocularon también por vía intragástrica con 0.5 ml de PBS - 1.5% NaHCO₃. En los tiempos indicados los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Rápidamente, luego de acceder a la cavidad abdominal, el intestino delgado se ligó a la altura del píloro e inmediatamente antes de la válvula ileocecal, luego de lo cual se removió de la cavidad abdominal. Se registró la longitud (L) y el peso del intestino (P1), luego se removió el total de líquido y se dejó secar, para ser pesado nuevamente (P2). El valor de "enteropooling", como medida de la acumulación de líquido, fue expresado como la diferencia entre el peso total y el peso seco en relación a la longitud del intestino [(P1-P2)/L].



Figura 3.2: Inoculación por vía intragástrica en ratones. (Wehner et al., 2011)

3.6.9. Acumulación de líquido intraluminal en asas intestinales ligadas:

Debido a que la sensibilidad de la técnica de enteropooling descrita en el párrafo anterior es relativamente baja, se decidió evaluar los cambios en la homeostasis de líquidos producidos por la toxina iota en el intestino delgado mediante pruebas de asas ligadas, según lo descrito anteriormente. Grupos de ratones fueron inoculados con 0.25 ml de PBS conteniendo 100 U y 50 U de toxina iota purificada, otro grupo fue inoculado con 0.25 ml de PBS como control. Luego de cerrar la laparotomía, los ratones fueron mantenidos en plano anestésico mediante la administración periódica de anestesia hasta el final del ensayo. Luego de 4 horas, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Las asas intestinales fueron retiradas del abdomen, y se registró el peso y longitud de las mismas, el aumento de peso neto de cada asa se calculó como la relación entre el peso (en miligramos) y la longitud (en centímetros).

3.6.10. **Medición del tránsito gastrointestinal:**

Los animales fueron sometidos a ayuno de sólidos durante 4 horas previas al inicio de los ensayos. Grupos de 6 ratones fueron inoculados por vía intragástrica con 200 U de toxina iota disuelta en 0.5 ml de PBS - 1.5% NaHCO₃. Los animales del grupo control se inocularon también por vía intragástrica con 0.5 ml de PBS - 1.5% NaHCO₃. Para medir el tránsito gastrointestinal se preparó una solución de carbón al 10% y goma arábiga al 1.5%. A cada uno de los animales inoculados con toxina iota y los del grupo control se le administró por vía intragástrica 0.5 ml de la solución de carbón, a las 6 y 20 horas posteriores a la inoculación con toxina iota. Luego de 30 minutos, se realizó la eutanasia, y se removió la totalidad del sistema digestivo. La distancia recorrida por el marcador (solución de carbón) en relación a la longitud total del intestino desde el píloro hasta la válvula ileocecal, expresada en porcentaje fue utilizada como medida del tránsito gastrointestinal (Losada-Eaton y Fernandez Miyakawa, 2010).

3.6.11. **Análisis estadístico:**

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism 5.0. Para evaluar el grado de correlación entre el crecimiento bacteriano de *C. perfringens* tipo E y la producción de toxina iota, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman. Para el resto de los datos se utilizó la prueba t de Student asumiendo que los efectos de la toxina iota sobre el intestino poseen distribución normal. Los resultados de los ensayos *in vivo* fueron evaluados mediante la prueba t de Student asumiendo que los valores de adherencia y excreción bacteriana poseen distribución normal. En todos los casos, valores de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

3.7. Resultados:

3.7.1. Producción de toxina iota *in vitro*:

Las cepas de *C. perfringens* tipo E fueron cultivadas en BHI con el fin de determinar en qué fase de crecimiento las bacterias del toxinotipo E producen la mayor cantidad de toxina iota. De acuerdo a la curva de crecimiento obtenida y a la evaluación de actividad citopática evaluada sobre monocapas de células, se determinó que la producción de toxina iota se iniciaba luego de 2 horas de cultivo en anaerobiosis. La producción de toxina se mantuvo durante toda la fase de crecimiento exponencial y alcanzaba su máximo nivel en la fase exponencial tardía (aproximadamente 6 horas). Los niveles de actividad citopática se mantuvieron a lo largo de la fase estacionaria (24 horas). El análisis de los resultados obtenidos reveló una fuerte correlación ($R^2=0.906$; $P < 0.001$) entre la densidad celular y la actividad citopática de iota sobre monocapas de células Vero (**Figura 3.3**).

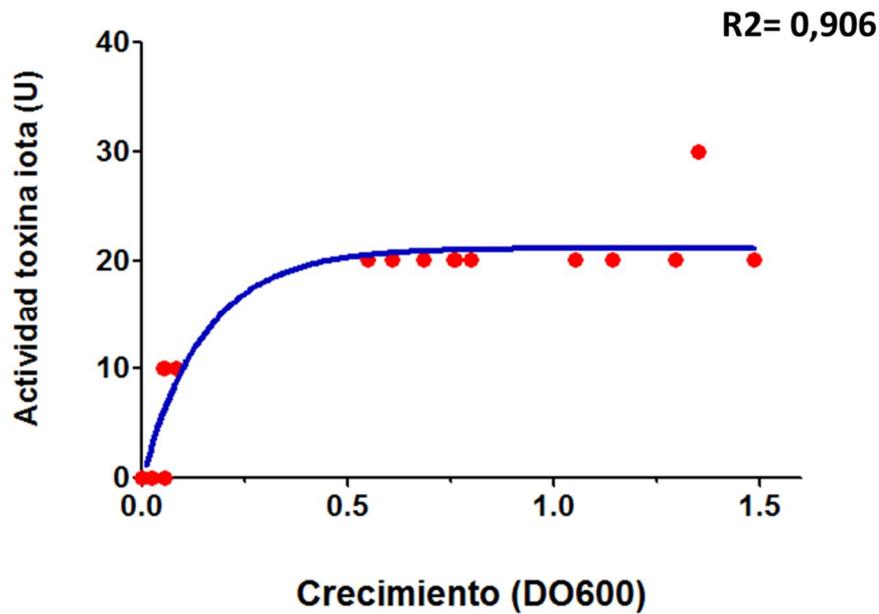


Figura 3.3: Correlación entre el crecimiento celular y la producción de toxina iota. El crecimiento celular se representa como la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}), y la concentración de toxina iota se representa como unidad arbitrarias de toxina iota (U).

3.7.2. Purificación de toxina iota:

Ambas subunidades proteicas de la toxina iota (ITXa e ITXb) se purificaron a partir del sobrenadante de un cultivo concentrado mediante precipitación con sulfato de amonio al 70% de saturación. Luego este concentrado se aplicó a una columna de DEAE-sefariosa. ITXa eluyó con 0.05 a 0.07 M de NaCl e ITXb eluyó con 0.130 a 0.160 M de NaCl. Después de la cromatografía, las fracciones que contenían ambas subunidades (ITXa e ITXb) se mezclaron y se concentraron por ultrafiltración. La pureza final de la toxina, evaluada mediante densitometría a partir de un gel de SDS/PAGE al 12% teñido con Coomassie Blue, fue cercana al 95% (**Figura 3.4**). En el mismo fue posible observar 1 banda de aproximadamente 48 kDa, compatible con la subunidad ITXa, y una banda

de 67 kDa, compatible con la subunidad ITXb. La actividad y el efecto sinérgico de ITXa+ITXb se comprobó en monocapas de células Vero y Caco-2. Al utilizarse las fracciones por separado no se observó ningún efecto sobre la monocapa de células, sin embargo al combinarlas fue posible observar alteraciones en la distribución de los filamentos de actina, y el efecto citopático asociado (**Figura 3.5**). De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad celular fue posible determinar que una concentración de ITXa + ITXb de 1 $\mu\text{g/ml}$ y 2 $\mu\text{g/ml}$, respetivamente, se correspondían a 200 U de toxina iota.

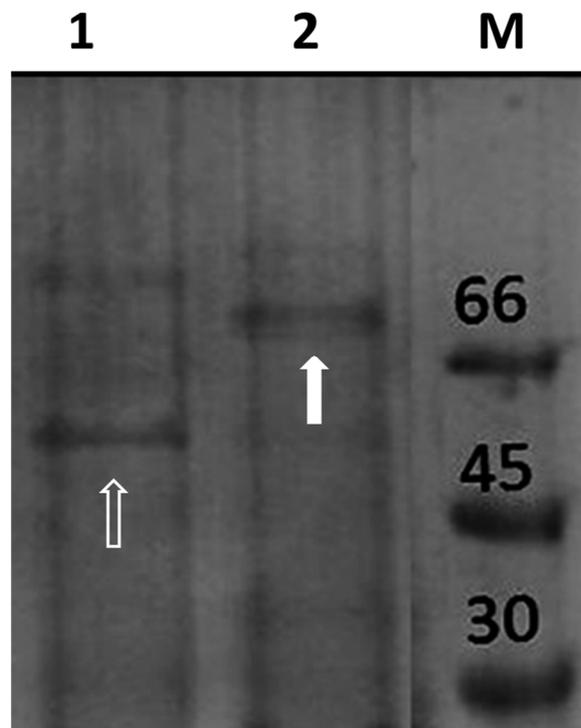


Figura 3.4: SDS-PAGE que muestra los resultados de purificación de ambas subunidades de la toxina iota en condiciones desnaturalizantes. 1: Subunidad ITXa (peso aproximado 48 kDa; flecha hueca). 2: Subunidad ITXb (peso aproximado 67 kDa; flecha blanca). M: marcador de peso molecular (kDa).

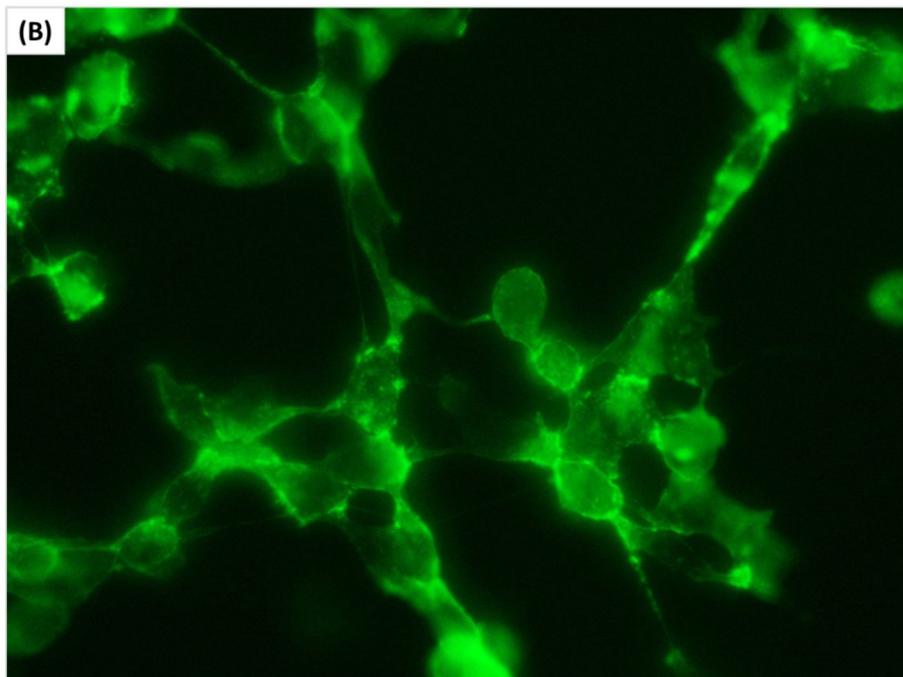
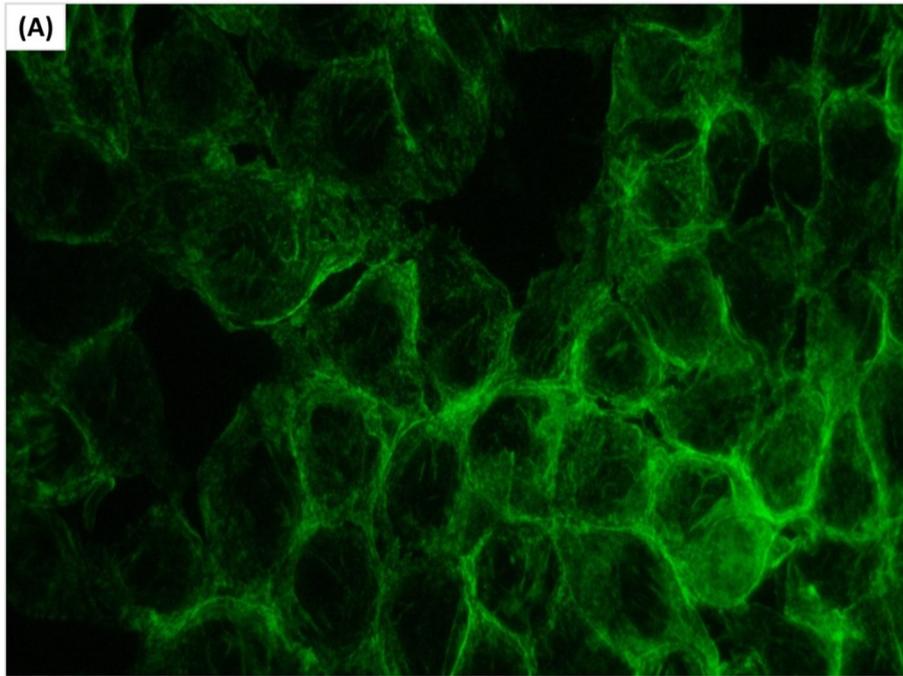


Figura 3.5: Microscopia de fluorescencia para observar el efecto de ambas subunidades de toxina iota sobre monocapas de células Caco-2. (A) Monocapa control. (B) Monocapa tratada con toxina iota. En la monocapa tratada con toxina iota es posible observar falta de adherencia y desprendimiento de las células.

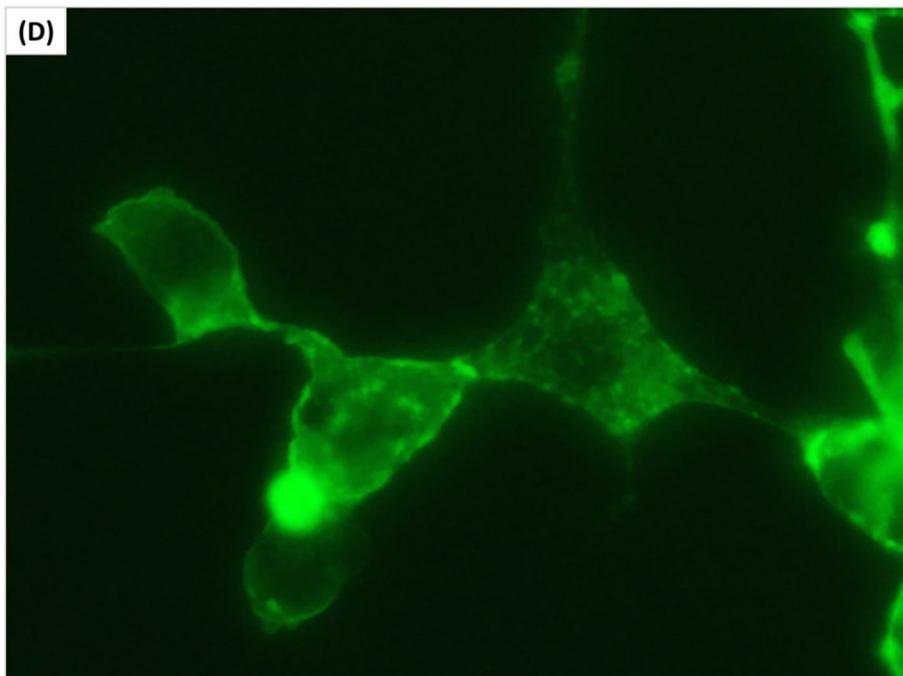
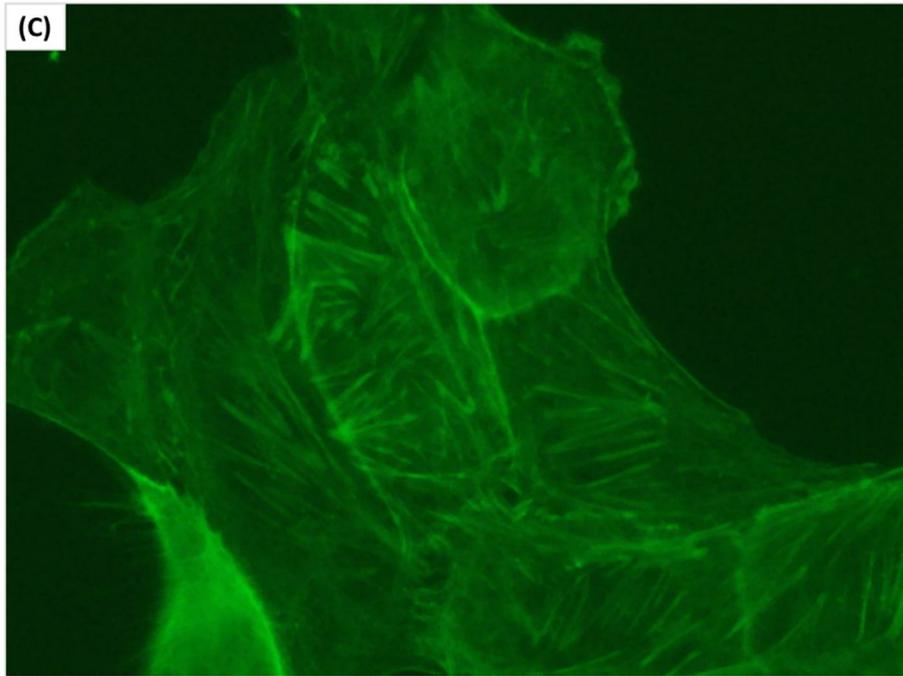


Figura 3.5 cont.: Microscopia de fluorescencia para observar el efecto de la toxina iota sobre monocapas de células Caco-2. (C) Detalle de las células Caco-2 en la monocapa control, se conserva la forma celular y se observa la presencia de filamentos de actina en el citoplasma. (D) Detalle de las células Caco-2 en la monocapa tratada con toxina iota. Se observa el abaloniamiento de las células por desorganización del citoesqueleto y la falta de filamentos de actina.

3.7.3. Letalidad:

Grupos de 2 ratones fueron inoculados con 200 U, 100 U o 50 U de toxina iota (1µg/ml ITXa + 2µg/ml ITXb, 0.5 µg/ml ITXa + 1 µg/ml ITXb, 0.25 µg/ml ITXa + 0.5 µg/ml ITXb, respectivamente). La administración endovenosa de 100 U y 50 U de toxina iota no tuvo efecto en la sobrevivencia de los ratones ($P > 0.05$), ni produjo signos de enfermedad. En el grupo inoculado por vía endovenosa con 200 U, las manifestaciones clínicas (dificultad respiratoria y depresión) se iniciaron durante las primeras 6 horas. En este grupo el tiempo promedio desde el desafío hasta la muerte o presencia de signos severos que justificaran la eutanasia fue de 30 ± 10 horas. De acuerdo a estos resultados se determinó una DL_{50} por vía endovenosa para la toxina iota de 2µg/ml ITXa + 4µg/ml ITXb. (Figura 3.6).

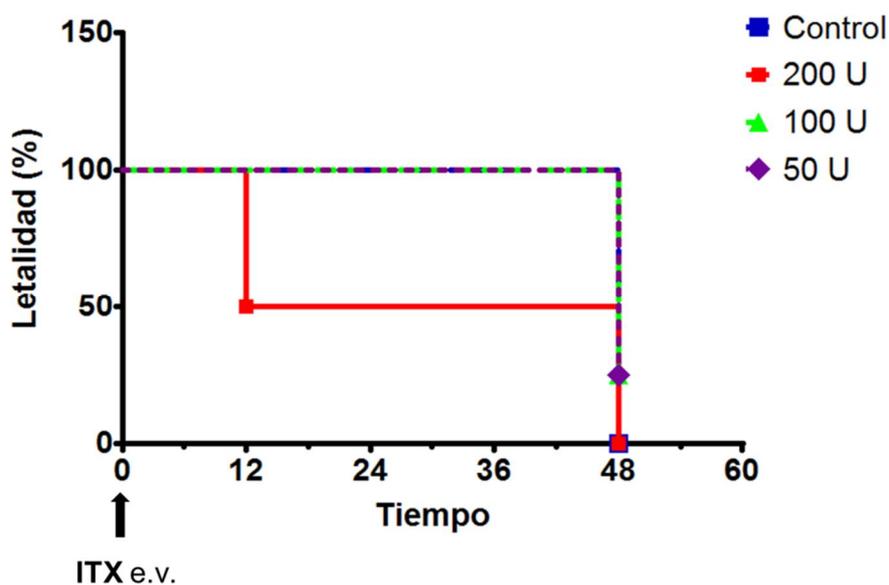


Figura 3.6: Letalidad inducida por acción de la inoculación endovenosa de toxina iota purificada (ITX). En el gráfico se observa una reducción significativa ($P < 0.005$) en el tiempo de sobrevivencia luego de la inoculación de 200 U de toxina purificada (1µg/ml ITXa + 2µg/ml ITXb), la inoculación de 100 U y 50 U no produjo diferencias significativas ($P > 0.05$) en comparación con el control (buffer Tris-HCl 10 mM a pH 7.5).

3.7.4. Efectos morfológicos de la toxina iota en el intestino:

Al examen histológico de los tejidos intestinales, en las asas control (PBS) realizadas en íleon y colon, únicamente fue posible observar edema y congestión leves (**Figuras 3.7; 3.8**). En las asas ligadas de íleon tratadas con 50 U de toxina iota durante 4 horas, se observó denudación de la porción apical y atrofia de las vellosidades. También fue posible observar edema y presencia de infiltrado inflamatorio con predominio de polimorfonucleares. Se observaron cambios degenerativos en los enterocitos de las porciones apical y media de las vellosidades. En las asas ligadas de íleon tratadas con 100 U de toxina iota fue posible observar una marcada necrosis del epitelio con desprendimiento del mismo, presencia de vellosidades fusionadas o atrofiadas. En estos tejidos también fue posible observar formación de seudomembrana y la presencia de infiltrado inflamatorio con predominio de polimorfonucleares en mucosa y submucosa (**Figura 3.7**). No se observaron alteraciones microscópicas en ninguna de las asas ligadas de colon tratadas con toxina iota (**Figura 3.8**).

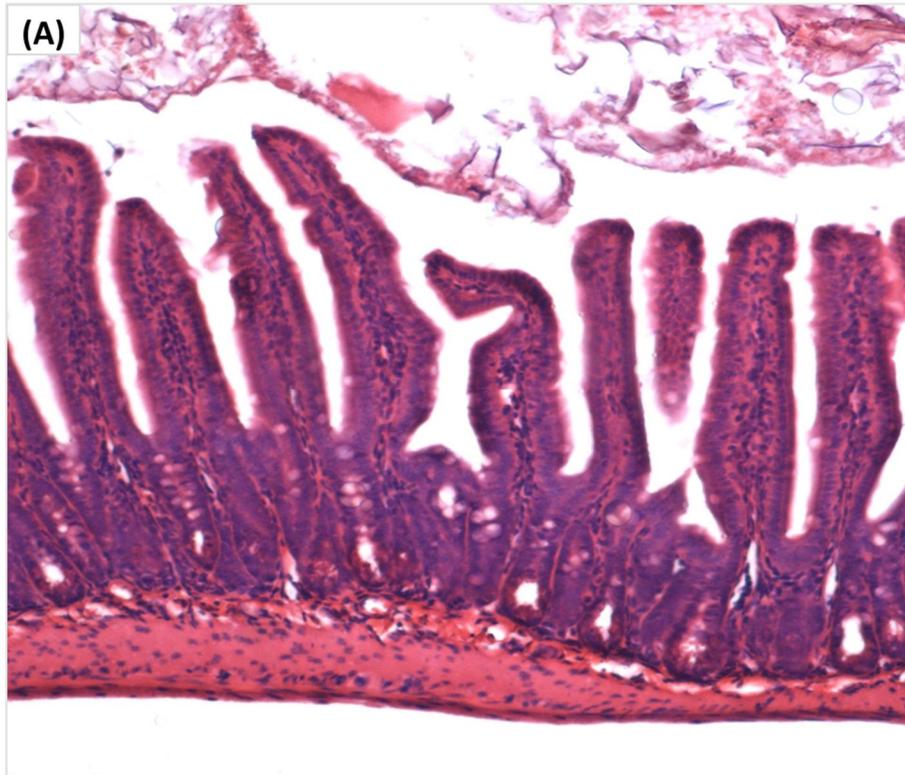


Figura 3.7: Histología de las asas de íleon tratadas con toxina iota. Luego de 4 horas de tratamiento los tejidos fueron fijados con formalina e incluidos en parafina, secciones de 4 μm se tiñeron con H/E. (A) Asas de íleon tratadas con PBS (control).

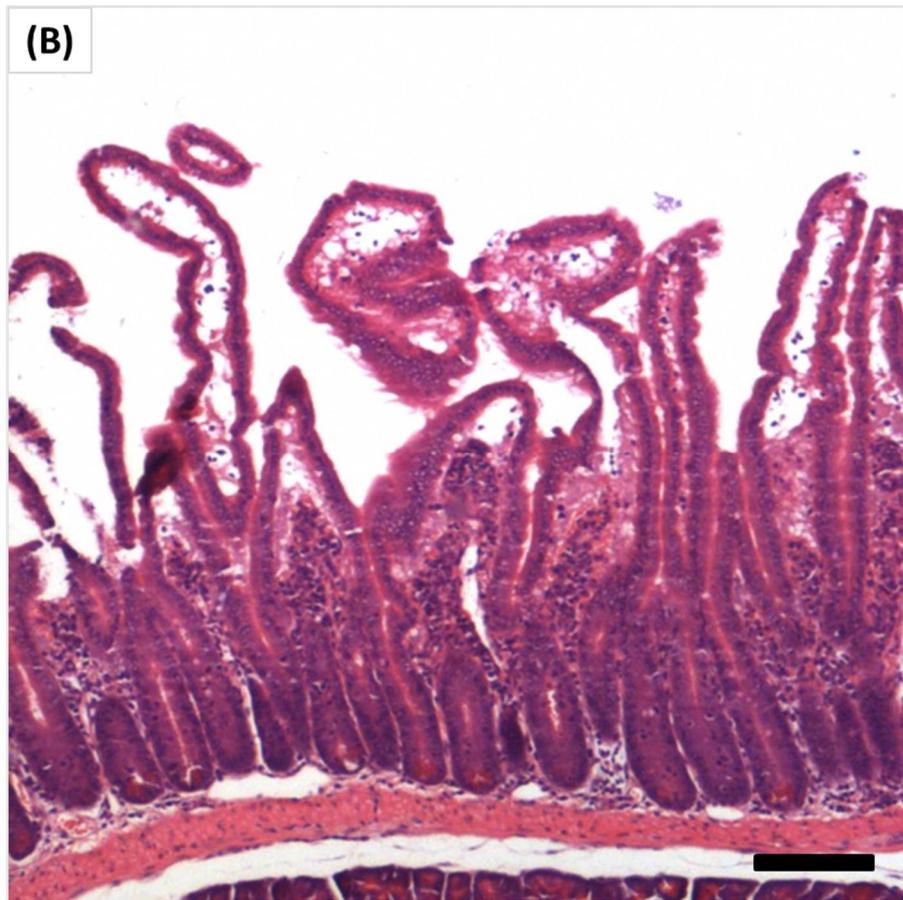


Figura 3.7 cont.: Histología de las asas de íleon tratadas con toxina iota. Luego de 4 horas de tratamiento los tejidos fueron fijados con formalina e incluidos en parafina, secciones de 4 μm se tiñeron con H/E. (B) Asas de íleon tratadas con 50 U de toxina iota.

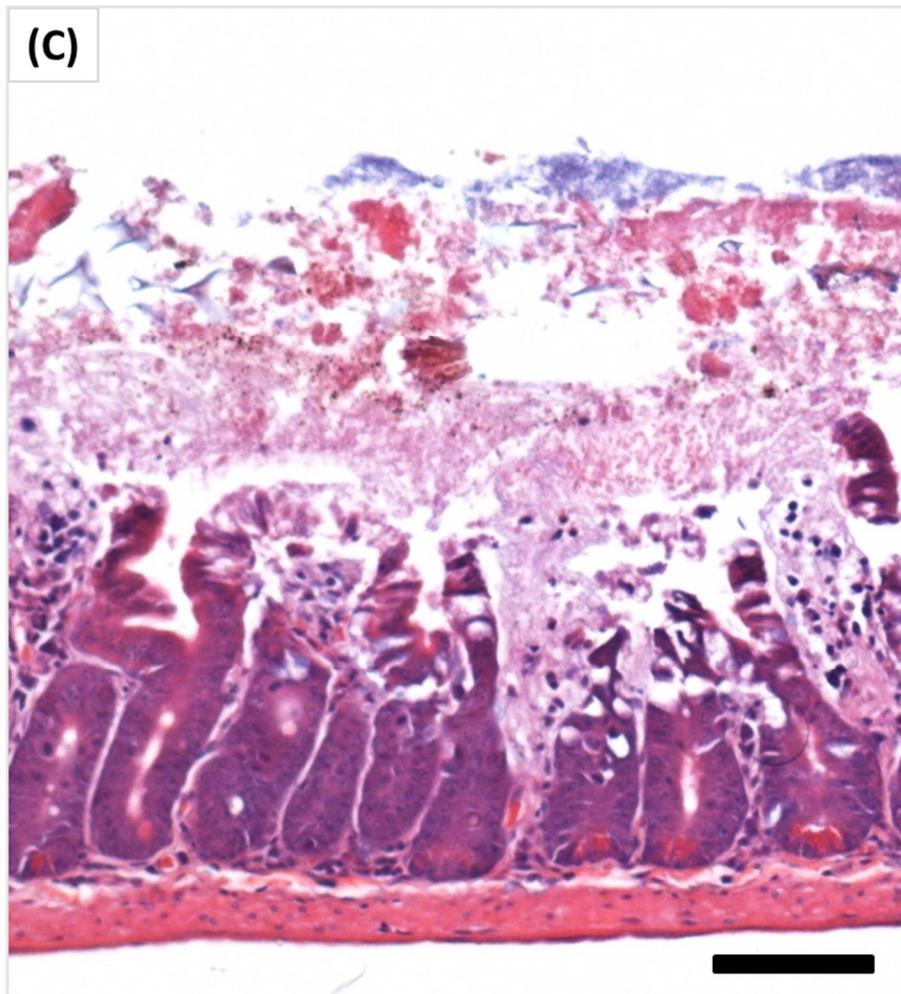


Figura 3.7 cont.: Histología de las asas de íleon tratadas con toxina iota. Luego de 4 horas de tratamiento los tejidos fueron fijados con formalina e incluidos en parafina, secciones de 4 μm se tiñeron con H/E. (C) Asas de íleon tratadas con 100 U de toxina iota.

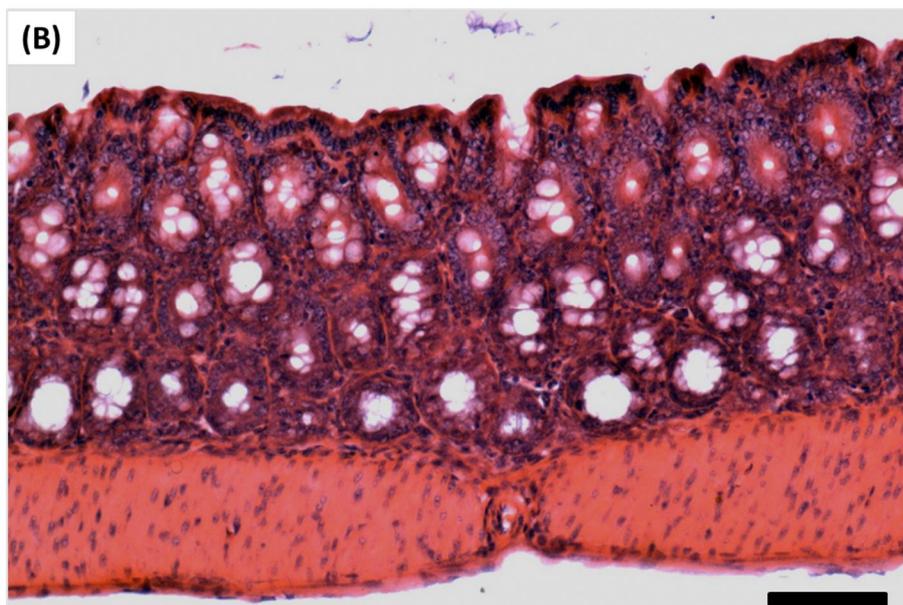
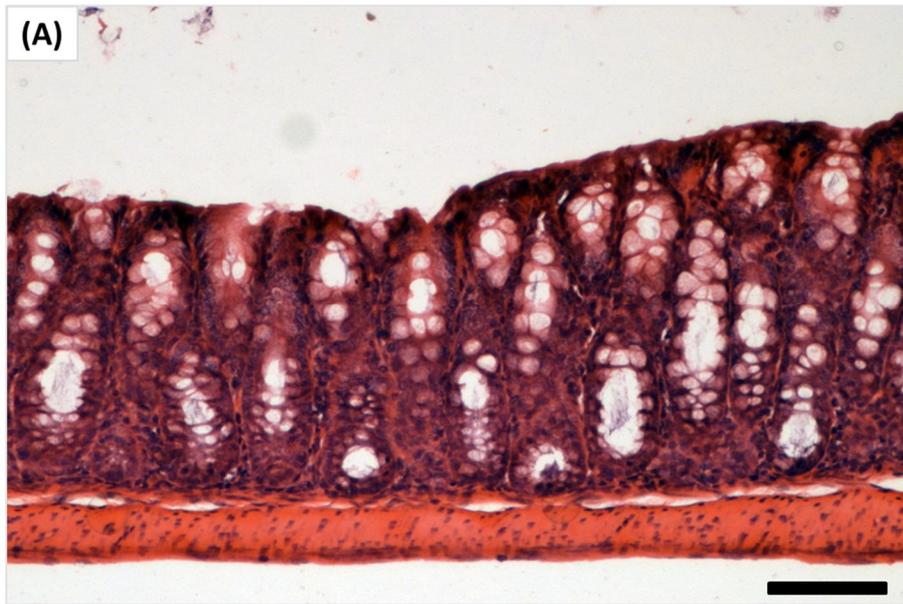


Figura 3.8: Histología de las asas de colon tratadas con toxina iota. Luego de 4 horas de tratamiento los tejidos fueron fijados con formalina e incluidos en parafina, secciones de 4 μ m se tiñeron con H/E. (A) Asas de colon tratadas con PBS (control). (B) Asas de colon tratadas con 100 U de toxina iota.

3.7.5. Pegado de la toxina iota a la mucosa del intestino delgado:

En los tejidos donde se observaron alteraciones se identificó el pegado de toxina iota mediante inmunohistoquímica indirecta. En secciones de asas ligadas de íleon tratadas con toxina iota fue posible observar un extenso pegado de la toxina a lo largo de la mucosa. La unión específica a células de la mucosa del epitelio se limitó al borde apical de los enterocitos, en estas células no se observó marca en el citoplasma y núcleo. En las zonas donde se observó pegado a los enterocitos era posible diferenciar fácilmente la marca específica de cualquier efecto de la técnica o marca inespecífica. El pegado de la toxina iota se observó unión en la punta, el centro y la base de las vellosidades. A pesar de que se observó marca en células de las criptas, la unión en las criptas fue moderada en comparación con la observada en las vellosidades. No se detectó marca en los tejidos controles analizados (**Figura 3.9**).

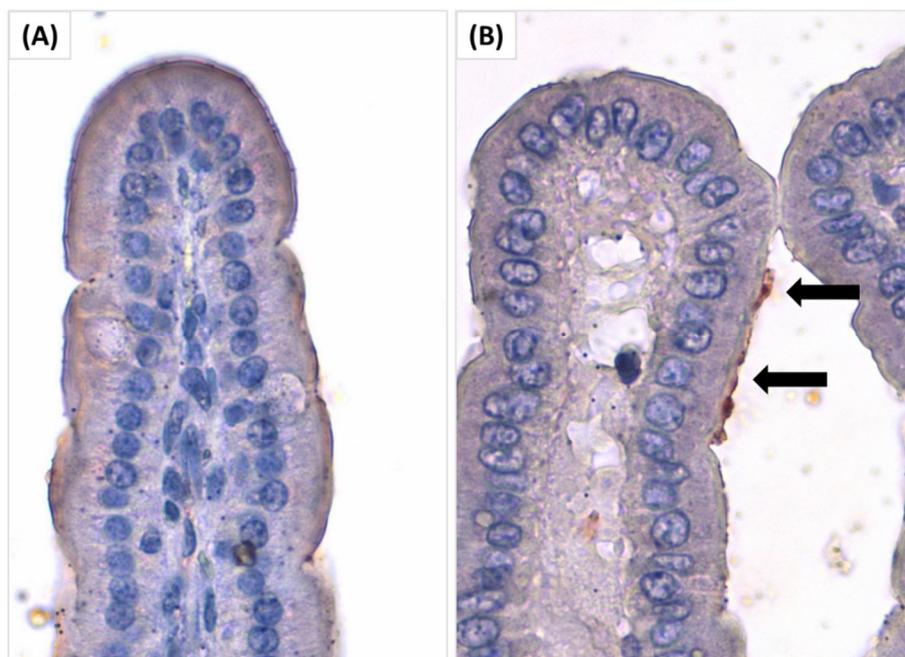


Figura 3.9: Inmunohistoquímica de los tejidos intestinales tratados con toxina iota. (A) tejidos tratados con PBS (control). (B) tejidos tratados con 100 U de toxina iota. Nótese la marca específica en la membrana apical células individuales rodeadas de células sin marca (flecha).

3.7.6. Efecto de la toxina iota sobre el balance de líquidos en intestino delgado:

Debido a que la determinación *in vivo* de la homeostasis de líquidos en el intestino puede ser influenciada por el tiempo durante el cual la mucosa está expuesta a la toxina, se consideró relevante determinar los cambios en la acumulación de fluido intestinal bajo diferentes condiciones experimentales. La acumulación de líquido intestinal en el intestino delgado de ratón fue inicialmente determinada mediante la prueba de "enteropooling". A las 6 y 20 horas luego de inoculada la toxina iota por vía intragástrica no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la cantidad de líquido presente en el intestino delgado de los ratones en relación a los animales del grupo control (**Figura 3.10**).

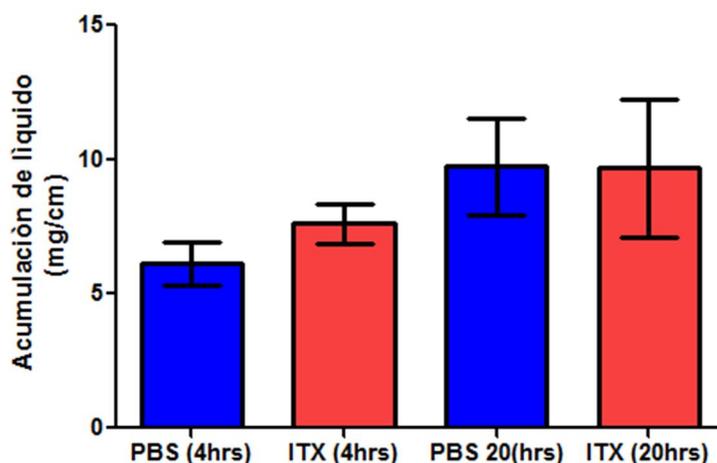


Figura 3.10: Efecto de la toxina iota de *C. perfringens* sobre la homeostasis de líquido en el intestino delgado del ratón medido mediante enteropooling. Los resultados representan la media de cada grupo y las barras el error estándar de la media.

El efecto de la toxina iota sobre el balance de líquidos en el intestino también se evaluó mediante la prueba de las asas ligadas. Luego de 4 horas de incubación fue posible observar un aumento en la cantidad de líquido presente, en las asas inoculadas con 50 y 100 U de toxina iota se acumuló 3 ($P < 0.05$) y 5 ($P < 0.005$) veces más cantidad de líquido, respectivamente en comparación con las asas controles (PBS) (**Figura 3.11**).

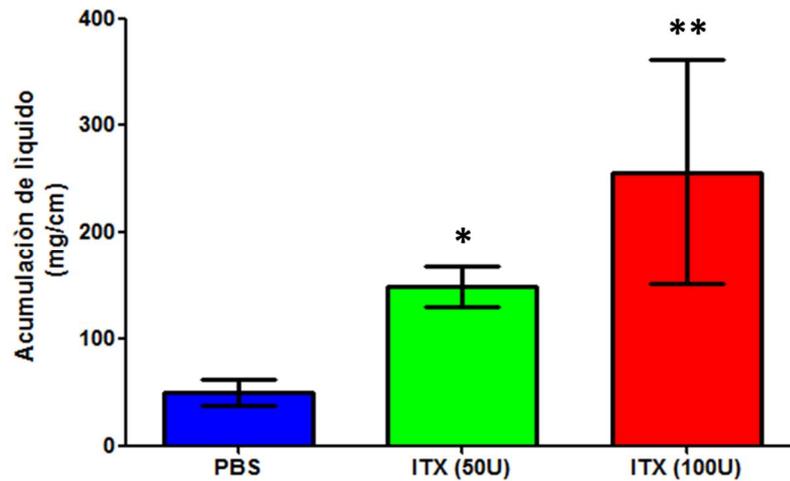


Figura 3.11: Efecto de la toxina iota (ITX) de *C. perfringens* sobre la homeostasis de líquido en el intestino delgado del ratón medido en asas intestinales ligadas. La toxina iota produjo acumulación de líquido. Los resultados representan la media de cada grupo y las barras el error estándar de la media. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$.

3.7.7. Efecto de la toxina iota sobre el tránsito gastrointestinal:

Los resultados de la acción de la toxina iota administrada por vía intragástrica sobre el tránsito gastrointestinal a las 6 y 20 horas post inoculación se muestran en la **tabla 3.1**. A las 6 horas de inoculada la toxina iota se observaron diferencias leves en el avance de las partículas de carbón, aunque las mismas no fueron significativas ($P > 0.05$). Un mayor tiempo de acción permitió ver efectos sobre la motilidad intestinal, luego de 20 horas se observó una reducción del 18 % ($P < 0.05$) en la distancia recorrida por las partículas de carbón en comparación con los animales del grupo control (PBS), indicando una inhibición del tránsito gastrointestinal por acción de la toxina iota.

Tabla 3.1: Efecto de la toxina iota (ITX) sobre el tránsito intestinal de los ratones, medido mediante el uso de una solución de partículas de carbón.

Tiempo (horas)	Grupo	Distancia (%) ^a	SEM ^b	Efecto (%) ^c	P ^d
6	Control	67.21	7,289	10	0,4999
	ITX	60.28	3.814		
20	Control	67.18	0,4086	18	0,0124
	ITX	55.24	3,452		

^a Distancia recorrida por el marcador (partículas de carbón) en relación a la longitud total del intestino.

^b Error estándar de la media.

^c Efecto de la toxina iota sobre la motilidad expresado como el porcentaje de reducción en relación a los grupos control.

^d Diferencias significativas en comparación con el grupo control.

3.8. Discusión:

Las enfermedades producidas por *C. perfringens* tipo E se caracterizan por muerte súbita y enteritis hemorrágica que afectan a animales de diferentes especies y categorías (Redondo et al., 2013; Songer y Miskimmins, 2004; Songer, 1996). En la actualidad los mecanismos involucrados en el inicio de esta enfermedad son escasamente comprendidos, y la mayor parte de este conocimiento está basado en la descripción de casos naturales. De acuerdo a los sistemas de tipificación actuales las cepas pertenecientes al toxinotipo E se definen por la producción de toxina iota, la cual pertenece a la familia de las toxinas binarias. Actualmente no existen trabajos que describan los efectos de estas toxinas sobre el intestino de los mamíferos. A pesar de esto, las toxinas binarias son consideradas los principales factores de virulencia a los cuales se les atribuye la producción de enteritis hemorrágica por *C. perfringens* tipo E en bovinos (Redondo et al., 2013; Songer y Miskimmins, 2004) y por *C. spiroforme* en conejos (Carman y Borriello, 1989). La primera sugerencia del rol potencial de las toxinas binarias en casos de enteritis se realizó a partir de la descripción de brotes de enteritis hemorrágica en conejos por *C. spiroforme* (Carman y Borriello, 1989). En estos informes, el rol de la toxina CST fue determinado en base a estudios con sobrenadantes filtrados y ensayos de neutralización, es importante considerar que en el caso de *C. spiroforme*, la toxina CST es el único factor de virulencia descrito hasta el momento. En el caso de *C. difficile* y *C. perfringens*, esta situación es más compleja debido a la presencia de otras toxinas con efecto sobre el intestino.

Para la realización de los ensayos aquí descritos se utilizó ratones como especie modelo. Según los trabajos consultados esta especie es sensible a la intoxicación por toxina iota (Simpson et al., 1987) y ha sido usada ampliamente en el estudio de la patogénesis de otras toxinas de *C. perfringens* (Caserta et al., 2011; Fernandez Miyakawa, Sayeed, et al., 2007; Uzal et al., 2009). Una vez obtenida una preparación

de toxina iota se determinó la dosis letal 50 (DL₅₀) para la misma. De acuerdo a los resultados obtenidos la DL₅₀ de la preparación de toxina utilizada en este trabajo fue de 4 µg/ml, estos resultados son coincidentes con la DL₅₀ reportada para la toxina iota en trabajos previos (Hatheway, 1990; Stiles y Wilkins, 1986). Esta DL₅₀ es relativamente alta (superior a los 2 µg/ratón) en comparación con otras toxinas de *C. perfringens*, por ejemplo en el caso de las toxinas beta y épsilon la DL₅₀ es 8 ng/ratón y 0.032 ng/ratón respectivamente. En el caso de la toxina épsilon numerosos trabajos describen la reproducción de signos sistémicos observados en casos naturales de enterotoxemia (Fernandez Miyakawa et al., 2007; Filho et al., 2009; Sayeed et al., 2005), luego de la inoculación de toxina por diversas vías. Aunque los resultados aquí presentados, ponen en duda el verdadero rol de la toxina iota en los signos sistémicos descritos en casos naturales, definidos como enterotoxemias por *C. perfringens* tipo E, los resultados *in vitro* de la producción de toxina iota de acuerdo a la fase de crecimiento de bacterias de tipo E plantean una posible explicación. En estos ensayos se observó una relación entre el crecimiento bacteriano y la producción de toxina iota. En los mismos fue posible detectar actividad de toxina iota desde el inicio de la fase exponencial temprana, y determinar que la máxima concentración se alcanza al inicio de la fase estacionaria. Teniendo esto en cuenta y considerando que las enfermedades producidas por *C. perfringens* tipo E se inician debido a un cambio en el ambiente intestinal que favorece el crecimiento anárquico de este microorganismo, es posible plantear que bajo las condiciones que dan inicio a la presentación de casos naturales de esta enfermedad, difícilmente *C. perfringens* tipo E alcance una fase estacionaria manteniéndose en crecimiento activo acompañado de la producción de toxina iota. De este modo el número de bacterias y la concentración de toxina iota presente en el intestino alcance valores superiores a los que es posible obtener en condiciones de laboratorio con sistemas de cultivo convencionales. Esta observación coincide con lo informado en un trabajo realizado con cepas de *C. difficile* productoras de CDT (A- B- CDT+), en el mismo reportan que es necesario concentrar y activar los sobrenadantes para poder observar un efecto leve sobre el intestino (Geric et al., 2006). Sin embargo este mismo grupo sugiere que estas cepas de *C. difficile* no productoras de otras toxinas son pobres productoras de CDT, lo cual explica la necesidad de concentrar los sobrenadantes. A diferencia de lo reportado por este grupo, la toxina iota utilizada en

este trabajo no requirió activación proteolítica ni concentración para provocar su actividad biológica *in vitro* (Geric et al., 2006), sin embargo en los ensayos *in vivo* solo se observaron alteraciones luego de utilizar toxina concentrada.

Los trabajos existentes hasta el momento reportando casos naturales de enfermedad asociada a *C. perfringens* tipo E, coinciden en que el principal hallazgo de necropsia es la enteritis hemorrágica que afecta a yeyuno-íleon (Redondo et al., 2013; Songer y Miskimmins, 2004), en estos mismos trabajos informan que la principal lesión microscópica es la necrosis del epitelio de la mucosa en yeyuno-íleon. Los hallazgos histopatológicos descritos en esta sección coinciden con los reportados en casos naturales. La realización de asas intestinales ligadas y la inoculación intrainestinal permitió reproducir las lesiones descritas en casos naturales de manera dependiente de la dosis. La secuencia de lesiones microscópicas observada en relación a la concentración de toxina empleada, provee nuevas ideas acerca de la patogénesis de estas enfermedades. El tratamiento del intestino delgado con una concentración de toxina baja, ocasiono necrosis en los enterocitos de la punta de la vellosidad y produjo cambios degenerativos en los enterocitos de la región media de la vellosidad. Estas condiciones podrían estar imitando las condiciones presentes al inicio de la enfermedad, donde las primeras células afectadas son los enterocitos en la punta de la vellosidad. A una mayor concentración de toxina es posible observar zonas de mucosa donde el epitelio se ha desprendido completamente, esta lesión puede ser considerada la continuación de los resultados obtenidos con menores concentraciones de toxina. En reportes de casos naturales, se describe la presencia de hemorragias en la mucosa de las porciones intestinales afectadas (Redondo et al., 2013; Songer y Miskimmins, 2004). A diferencia de lo observado en casos naturales, en los tejidos tratados con toxina iota no se observó hemorragia, pero fue posible observar hiperemia y formación de seudomembranas, esto sugiere un compromiso leve de los vasos sanguíneos. Estas diferencias entre las lesiones observadas en casos naturales y las aquí descritas pueden deberse a la acción de toxinas de *C. perfringens* tipo E diferentes de iota (alfa, beta2) no consideradas en estos ensayos (Valgaeren et al., 2013), o en el caso de que la toxina iota fuera capaz de producir cambios en los vasos

sanguíneos estos serían secundarios a las alteraciones ocasionadas en el epitelio. Coincidiendo con los reportes existentes de enfermedad en rumiantes, donde no se observan lesiones en intestino grueso, los ratones desafiados con toxina iota no desarrollaron alteraciones en porciones del intestino grueso cuando fueron desafiados por vía intragástrica, o en colon en el caso de los animales donde se realizaron asas ligadas.

Los reportes de enfermedad en bovinos y otros rumiantes describen a esta enfermedad como un cuadro de muerte súbita. Sin embargo, en algunos casos donde es posible la observación de signos clínicos los autores describen la ocurrencia de diarrea (Kim et al., 2013; Songer y Miskimmins, 2004). Trabajos previos, donde utilizan cepas de *C. difficile* productoras de toxina binaria (A- B- CDT+), sugieren que las toxinas binarias son capaces de inducir la acumulación de líquido en el lumen intestinal. En este estudio se evaluó el efecto de la toxina iota sobre la homeostasis de líquido mediante las técnicas de enteropooling y asas ligadas. La primera de estas técnicas permite evaluar en forma global el movimiento neto de líquido a través de la pared intestinal (Goldstein et al., 2009), de acuerdo a los resultados obtenidos con esta técnica fue posible observar un leve, aunque no significativo, aumento en la acumulación luego del tratamiento con toxina iota. El uso de asas ligadas de íleon permitió confirmar los resultados obtenidos mediante enteropooling. En este caso debido a la exposición a una mayor concentración efectiva de toxina iota, y a que los segmentos intestinales expuestos fueron ligados fue posible observar una mayor acumulación de líquido en forma dependiente de la dosis. La pérdida de líquidos asociada a la diarrea se puede producir por diferentes mecanismos (Field, 2003). Una alta concentración de solutos en la luz intestinal es capaz de producir una intensa fuerza osmótica la cual ocasiona la pérdida de líquido a través del epitelio intestinal (diarrea osmótica). Si se produce una sobrestimulación en la secreción intestinal que supere los mecanismos de absorción se produce una diarrea secretoria, como en el caso de la diarrea inducida por la toxina colérica o la toxina termoestable de *E. coli*. Una situación similar se puede observar si se produce una disminución en los mecanismos involucrados en la absorción de iones y líquido, en este caso se observa

un aumento neto en la cantidad de líquido aunque no haya cambios en las funciones secretorias del intestino. Si se producen alteraciones en el epitelio intestinal, donde se vea afectada la función de barrera de la mucosa intestinal, es posible que se pierdan fluidos y electrolitos como consecuencia de la presión hidrostática de vasos sanguíneos o linfáticos (diarrea exudativa) (Field, 2003). De acuerdo a los resultados obtenidos mediante histopatología de los tejidos tratados con toxina iota, es posible sugerir que la acumulación de líquido observada se deba a la combinación de los 2 últimos mecanismos. En las secciones de íleon tratado con toxina iota se observaron trastornos degenerativos y necrosis de los enterocitos en la región apical de las vellosidades, y al aumentar la concentración de toxina fue posible observar alteraciones en los enterocitos a los laterales. Una disminución en la función de estos enterocitos, los cuales son los principales responsables de la absorción de nutrientes, conduce a un aumento neto en la cantidad de líquido presente en la luz intestinal. Si el agente toxico, en este caso la toxina iota, sigue actuando y se produce la pérdida del epitelio, al mecanismo antes mencionado debemos sumarle la salida de líquido desde vasos sanguíneos y linfáticos.

Además de las alteraciones en la homeostasis de líquidos, los mecanismos involucrados en la patogénesis de las enfermedades intestinales incluyen perturbaciones en la motilidad del tracto gastrointestinal. Mediante la evaluación del tránsito intestinal sobre la base de la retención de colorante (solución de carbón), fue posible observar una inhibición en la motilidad intestinal. Este método para la evaluación de la motilidad gastrointestinal ha sido utilizado ampliamente en diferentes estudios (Chang et al., 1994; Losada-Eaton y Fernandez Miyakawa, 2010; Mittelstadt et al., 2005). Esta técnica se realiza mediante el desafío por vía oral o intragástrica sin la necesidad de administrar anestésicos a los animales. Esto permite la evaluación de la motilidad intestinal en roedores despiertos, evitando así los efectos de la anestesia sobre las funciones gastrointestinales, las cuales están bajo el control de varios neurotransmisores, hormonas, mediadores inflamatorios y los contenidos intraluminales. Por lo tanto, evaluar la respuesta del intestino a la toxina iota en ratones no anestesiados, permite un enfoque más cercano al escenario natural de la

acción de la toxina durante la enfermedad. Al igual que en otros ensayos donde los animales fueron desafiados intragástricamente, en estos ensayos no se observaron cambios morfológicos. Estos resultados sugieren que para lograr un cambio en la motilidad intestinal son necesarias concentraciones de toxina iota menores a las necesarias para lograr cambios morfológicos y/o en la homeostasis de líquido. Aunque no hay reportes de estudios similares con otras toxinas binarias, varias toxinas bacterianas han demostrado tener efecto sobre los patrones mioeléctricos intestinales. Estudios previos mencionan que las concentraciones de toxina épsilon de *C. perfringens* necesarias para inhibir la motilidad intestinal no producen alteraciones evidentes en los enterocitos, por lo cual los autores sugieren que la actividad de esta toxina sobre la motilidad gastrointestinal está mediada por un efecto neuronal (Losada-Eaton y Fernandez Miyakawa, 2010), otros ejemplos incluyen a *Vibrio cholerae* y la toxina colérica (Mathias et al., 1976), y toxinas de *Escherichia coli* (Burns et al., 1978; Mathias et al., 1982; Sjogren et al., 1989). La resolución de este tema en relación a las toxinas binarias requiere más trabajo.

Los resultados presentados en este capítulo, utilizando ratones como animal modelo, permiten proponer los mecanismos implicados en la enteritis causada por *C. perfringens* tipo E y su toxina iota. Como se describió en otras infecciones por clostridios enterotóxicos, el primer paso para el desarrollo de la enteritis por *C. perfringens* tipo E es el efecto de un agente que altere el ambiente intestinal favoreciendo un sobrecrecimiento de bacterias tipo E, el cual se acompaña con la producción de toxina iota. Bajas concentraciones de esta toxina poseen un efecto inhibitorio sobre la motilidad intestinal, lo cual permite la acumulación de bacterias y toxina iota, lo que a su vez contribuye a disminuir aún más el tránsito intestinal. Una vez que se alcanza una concentración determinada de toxina se producen trastornos primero a nivel de los enterocitos que finalmente conducen a la aparición de signos clínicos, o en condiciones particulares ocasionar la muerte del animal, descrita como muerte súbita en los casos naturales de enteritis hemorrágica/enterotoxemia producidas por *C. perfringens* tipo E en rumiantes.

Capítulo 4:

**Rol de la toxina iota en las etapas
iniciales de la colonización intestinal
por *Clostridium perfringens*.**

4.1. Introducción:

Los aislamientos de *C. perfringens* tipo E se definen por la producción de las toxinas alfa e iota (McClane et al., 2006; Songer, 1996). Aunque la información disponible acerca de la patogénesis de *C. perfringens* tipo E es escasa, generalmente se acepta que la toxina iota es el principal factor productor de las alteraciones a nivel intestinal observadas en casos naturales. En el capítulo anterior fue posible reproducir las lesiones descritas en casos naturales mediante la inoculación de toxina iota en ratones, lo que sugiere un rol central para esta toxina en el desarrollo de enfermedad intestinal. Además, los resultados obtenidos permitieron proponer algunos de los mecanismos involucrados en estas alteraciones.

Las cepas tipo E expresan toxina iota, aunque algunos aislamientos pueden poseer factores de virulencia complementarios como las toxinas beta 2, lambda o ureasa (Li et al., 2007). Junto con la producción de toxinas estas cepas pueden tener otros potenciales factores de virulencia, que contribuyan con la capacidad de producir enfermedad en bovinos (Redondo et al., 2013; Songer y Miskimmins, 2004), y seres humanos (Miyamoto et al., 2011; Yonogi et al., 2014). Sin embargo, y de acuerdo a las descripciones existentes en la actualidad de casos de enfermedad por tipo E, sería posible asumir que este grupo de cepas actúan como patógenos oportunistas, y que la producción de enfermedad severa es un evento extraordinario en el ciclo biológico de estas bacterias.

La familia de las toxinas binarias, dentro de la cual se incluyen la toxina iota, CDT y numerosas toxinas producidas por especies de los géneros *Clostridium* y *Bacillus* (Barth et al., 2004). Estas toxinas poseen un alto grado de semejanza y de acuerdo a resultados recientes es posible que la acción de estas toxinas contribuya a la colonización del intestino. De acuerdo a esto, la despolimerización de los filamentos de

actina por acción de la toxina CDT de *C. difficile* induce la formación de proyecciones con ejes de microtúbulos sobre la superficie celular (Schwan et al., 2009), a la vez que causan un redireccionamiento de vesículas secretorias conteniendo proteínas de matriz extracelular desde la membrana basolateral hacia la membrana apical (Schwan et al., 2014). Esto genera una red de proyecciones y proteínas de matriz extracelular, como la fibronectina, que incrementan la adherencia de las células bacterianas sobre células eucariotas (**Figura 4.1**). En los trabajos mencionados sugieren que la toxina iota actúa de manera similar, aunque la información referida a la capacidad de adherencia de *C. perfringens* disponible actualmente es limitada (Katayama et al., 2014; Li y McClane, 2014; Martin y Smyth, 2010).

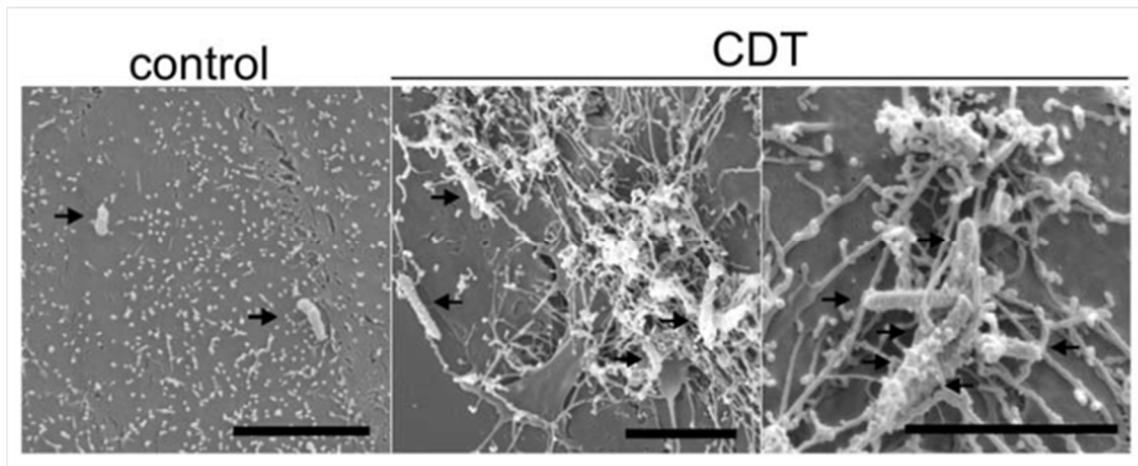


Figura 4.1: El tratamiento con toxina binaria de *C. difficile* (CDT) aumenta la adherencia bacteriana a las células eucariotas. Microscopía electrónica de barrido de células Caco-2. Luego del tratamiento con CDT se puede observar la formación de extensiones sobre la superficie celular y los clostridios adheridos a las mismas. Barra: 5 μm . (Schwan et al., 2009).

Análisis de MLST de diversos aislamientos pertenecientes al toxinotipo E, provenientes de diferentes regiones geográficas (capítulo 2 de este trabajo), demuestran un alto grado de similitud entre las cepas pertenecientes a este toxinotipo, sugiriendo que

estos aislamientos se han especializado para obtener una ventaja evolutiva en un nicho ecológico específico como puede ser el intestino bovino (Jost et al., 2006; Redondo et al., 2013). En base a los resultados presentados en esta sección, se propone un rol biológico para la toxina iota. De acuerdo a esto se sugiere que los efectos de la toxina iota sobre los enterocitos produce alteraciones en la superficie de la célula que incrementan la adherencia de *C. perfringens* tipo E al mismo tiempo que reducen la adherencia de otras cepas de *C. perfringens*.

4.2. Materiales y métodos:

4.2.1. Cepas y condiciones de cultivo:

En la realización de estos ensayos se utilizaron cepas de *C. perfringens* tipo E (CpE218 y CpE132), aisladas durante un brote de enteritis hemorrágica en bovinos, y 2 cepas tipo A aisladas a partir de animales sin signos de enfermedad digestiva (Cp31 y Cp88). El aislamiento y la identificación de estas cepas se realizó mediante métodos bioquímicos y moleculares según lo descrito anteriormente (capítulo 2). Al momento de iniciar esta serie de ensayos, las cepas utilizadas fueron sembradas en placas de agar sangre con neomicina (100 mg/L) y cultivadas en condiciones de anaerobiosis durante 18 horas a 37°C. Colonias aisladas fueron repicadas en 10 ml de BHI en atmósfera anaerobia 18 horas a 37°C.

4.2.2. Curvas de crecimiento:

Para determinar si las cepas a utilizar poseían características fenotípicas similares se determinó el tiempo de generación y crecimiento de cada una. Para esto se tomaron 0.1 ml de un cultivo en fase estacionaria, preparado de acuerdo a lo explicado en el párrafo anterior, con esto se inocularon 10 ml de BHI estéril y se incubaron a 37°C en atmosfera anaerobia. Se tomaron alícuotas cada 2 horas y se midió densidad óptica a 600 nm (DO_{600}). Los valores finales corresponden al promedio de 3 mediciones independientes (Fernandez Miyakawa et al., 2007; Li y McClane, 2006). El tiempo de generación se estimó de acuerdo a lo descrito en la bibliografía consultada (Li y McClane, 2006).

4.2.3. Toxina iota:

En los ensayos aquí descritos se utilizó toxina iota purificada de acuerdo a lo descrito en el capítulo anterior siguiendo el protocolo propuesto por Stiles y Wilkins (1986). La pureza final de la toxina, evaluada mediante densitometría a partir de un gel de SDS/PAGE al 12% teñido con Coomassie Blue, fue cercana al 95%. Para medir actividad de la toxina iota purificada se utilizó una prueba de efecto citopático en células Caco-2 (Stiles et al., 2000; Stiles y Wilkins, 1986). La concentración de toxina iota purificada y la actividad citopática de la misma fue expresada en base a la actividad sobre células como unidades arbitrarias de toxina iota (U), las cuales se definen como el recíproco de la mayor dilución en la que observo actividad citopática sobre monocapas de células.

4.2.4. Cultivo de células Caco-2:

Para medir la actividad de la toxina iota, y realizar los ensayos de adherencia *in vitro* se utilizó la línea celular derivada de epitelio intestinal humano Caco-2. Estas células fueron cultivadas en medio E-MEM (Minimum Essential Medium Eagle) suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10%, aminoácidos no esenciales al 1%, glutamina al 1% y penicilina - estreptomina (100 UI/ml y 100 mg/L, respectivamente). Las células fueron crecidas en atmosfera humidificada con CO₂ al 5% a 37°C. Para la obtención de células polarizadas y diferenciadas las células Caco-2 se dejaron crecer hasta formar una monocapa y luego fueron cultivadas durante 7 días más para obtener enterocitos diferenciados (Martin y Smyth, 2010). Al momento de realizar los ensayos de adherencia el medio de cultivo fue reemplazado por medio sin antibióticos 24 horas antes.

4.2.5. Ensayos de adherencia *in vitro*:

Monocapas de células Caco-2 crecidas en placas de 12 pocillos según lo mencionado anteriormente, fueron infectadas con bacterias lavadas de cada una de las cepas utilizadas. Un ml de cultivo en fase estacionaria fue centrifugado a 13.000 g durante 5 minutos y lavado 3 veces con PBS estéril, el precipitado de bacterias fue resuspendido en E-MEM para obtener una concentración final de 1.5×10^7 UFC/ml de *C. perfringens*. Con 1 ml de esta suspensión de bacterias se infectaron pocillos individuales con células Caco-2, luego de lo cual se incubó durante 2 horas en atmosfera humidificada con CO₂ al 5 % a 37°C. Las monocapas infectadas fueron lavadas 3 veces con PBS estéril para remover las bacterias no adheridas. Luego las células Caco-2 fueron lisadas mediante la adición de agua destilada estéril durante 15 minutos y el número de bacterias se estimó mediante recuento de UFC de *C. perfringens* en placas de agar sangre con

neomicina (Li y McClane, 2014). Las placas fueron incubadas en atmosfera anaerobia a 37°C durante 18 horas. Los valores de adherencia fueron expresados como el porcentaje de bacterias adheridas a la monocapa en relación con el número de bacterias inoculadas.

4.2.6. Efecto de la toxina iota sobre la adherencia de *C. perfringens in vitro*:

El efecto de la toxina iota sobre la adherencia de los clostridios fue evaluado utilizando monocapas previamente tratadas con toxina iota purificada. En un primer paso se evaluó el efecto de la toxina iota sobre el pegado de *C. perfringens* tipo E, para esto se trataron monocapas de células Caco-2 con diferentes concentraciones de toxina iota purificada. Los tratamientos mencionados se aplicaron durante 2 horas previas a la infección con las bacterias lavadas. Los cambios en la adherencia de las bacterias luego del tratamiento fueron expresados como porcentaje de adherencia en relación a la adherencia en monocapas control las que fueron tratadas con BHI estéril en lugar de toxina iota. En una segunda etapa se evaluó en forma comparativa el efecto de la toxina iota sobre la adherencia de bacterias de los toxinotipos A y E, esto se realizó tratando monocapas de células Caco-2 con toxina iota purificada (150 ng/ml de ITXa + 300 ng/ml de ITXb). Los resultados se expresaron de la manera antes descrita.

4.2.7. Neutralización de los cambios inducidos por toxina iota en la adherencia de *C. perfringens*:

Con el objetivo de evaluar si los cambios observados en la adherencia de *C. perfringens* tipo A y tipo E se debían a la acción de la toxina iota, se realizaron ensayos de neutralización. Para estos ensayos se utilizaron anticuerpos IgY anti-ITX preparados de acuerdo a lo descrito por Parma et al. (2011) usando como antígeno toxina iota purificada. Una solución de toxina iota (150 ng/ml de ITXa + 300 ng/ml de ITXb) fue mezclada con una solución de anticuerpos neutralizantes IgY anti-ITX o un anticuerpo IgY no específico (control negativo). Ambas soluciones fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de esto se realizaron ensayos de adherencia utilizando cepas tipo A y tipo E sobre monocapas de células Caco-2 tratadas con toxina iota o con toxina iota + anticuerpos, siguiendo los pasos mencionados anteriormente. Los cambios en la adherencia observados se cuantificaron como porcentajes en relación a monocapas control (sin tratamiento).

4.2.8. Microscopia electrónica de barrido:

Para la observación de las células Caco-2 infectadas por *C. perfringens* al microscopio electrónico de barrido, se utilizaron monocapas de células Caco-2 tratadas con toxina iota e infectadas con *C. perfringens* de acuerdo a lo explicado anteriormente en los ensayos de adherencia (sección 4.2.6. de este capítulo). Luego de lavar con PBS las monocapas tratadas e infectadas fueron fijadas. El buffer de lavado fue reemplazado por buffer cacodilato (cacodilato 0.1 M, CaCl₂ 0.01 M, MgCl₂ 0.01 M, sacarosa 0.09 M, pH 6.9) y fijado con glutaraldehído al 2%. Luego las células fueron deshidratadas mediante pasajes en etanol a concentraciones crecientes, de 10% a 100%. El secado de estas muestras se realizó mediante punto crítico en CO₂ líquido (EMS 850 Critical Point

Drier de Electron Microscopy Sciences.) y metalizadas con una cubierta de paladio-oro (60-40%) (SC7620 Mini Sputer Coater de Thermo VG Scientific). Las muestras fueron observadas en el Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" utilizando un microscopio electrónico de barrido DSM982 Gemini a un voltaje de aceleración de 5 kV. Para el procesamiento de muestras y toma de fotografías se contó con la colaboración de Fabián Tricarico de la mencionada institución.

4.2.9. Ensayos de adherencia *in vivo*:

4.2.9.1. Ensayos en ratones:

Para evaluar la capacidad de adherencia de cepas de *C. perfringens* tipo E en comparación con cepas tipo A se utilizaron ratones macho de 20 a 25 g de peso. Un cultivo en fase estacionaria de *C. perfringens* tipo E (CpE218) o tipo A (Cp88) fue preparado de acuerdo a lo explicado en párrafos anteriores. Grupos de 4 ratones fueron inoculados por vía intragástrica con 0.5 ml de cultivo conteniendo aproximadamente 1×10^7 UFC de cada una de las cepas mencionadas, previo ayuno de sólidos durante 4 horas. Los animales fueron monitoreados bacteriológicamente para determinar el momento de inicio, duración y fin de la excreción de *C. perfringens* como indicador de colonización (Geric et al., 2006) para lo cual se tomaron muestras seriadas de materia fecal y se sembraron placas de agar sangre con neomicina, las cuales fueron cultivadas en anaerobiosis a 37°C durante 18 horas. Como criterio de punto final se consideró la aparición de signos asociados a enfermedad severa (disnea severa o presencia de signos nerviosos), para el monitoreo bacteriológico de excreción de *C. perfringens* se consideró 2 cultivos fecales consecutivos con resultado negativo. Al final del ensayo se realizó la necropsia de todos los animales de cada grupo y se tomaron muestras de diferentes segmentos del intestino delgado, las cuales se fijaron por inmersión en formalina bufferada al 10%, y luego de 48 horas procesada mediante protocolos de rutina para realizar tinciones de H/E e inmunohistoquímica.

4.2.9.2. Ensayos en terneros:

Grupos de 3 terneros de raza Holando de 24 horas de vida fueron transportados a una unidad de aislamiento biológico y alojados en corrales individuales hasta el final del ensayo. Los terneros fueron alimentados con sustituto lácteo comercial (2 L cada 12 horas). Para preparar el inóculo de *C. perfringens*, se utilizaron 10 ml de cultivo en fase estacionaria de cada cepa. Este cultivo se usó para inocular 400 ml de caldo BHI, luego de lo cual se incubó a 37°C en anaerobiosis durante 18 horas, y este cultivo fue utilizado para inocular a los terneros. Un grupo de animales recibió únicamente caldo BHI estéril como tratamiento control. Los animales fueron examinados físicamente y se tomaron muestras de materia fecal seriadas para detección de *C. perfringens*. Los criterios de punto final y de finalización del ensayo fueron iguales a los aplicados en los ensayos con ratones. Al final del ensayo se realizó la necropsia de todos los animales de cada grupo y se tomaron muestras de diferentes segmentos del intestino delgado, las cuales se fijaron por inmersión en formalina bufferada al 10%, y luego de 48 horas procesada mediante protocolos de rutina para realizar tinciones de H/E e inmunohistoquímica.

4.2.9.3. Comité institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación (CICUAE):

Todos los ensayos *in vivo* aquí planteados fueron revisados y aprobados por el CICVyA-INTA CICUAE. La autorización de los mencionados ensayos se corresponde con los protocolos 32/2010 y 27/2011.

4.2.10. Inmunohistoquímica:

Secciones desparafinadas de tejidos de los ratones y terneros inoculados con las cepas mencionadas de *C. perfringens* y sus correspondientes controles fueron bloqueadas con una solución de albumina al 2% en TBS (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavar 3 veces con TBST (TBS pH 7,5 - 0,05 % Tween-20), y se incubó con el anticuerpo primario, en este caso una dilución 1:50 de IgY anti- *C. perfringens* producido en gallina ponedora (Parma et al., 2011), a 4C° durante toda la noche. Luego se lavó 3 veces con TBST y se incubó de 1 hora con el anticuerpo secundario, en este caso anti-IgY conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich, EEUU) diluido 1:100 en TBST. Después de lavar 3 veces con TBST se reveló con solución de diaminobenzidina y peróxido de hidrogeno (DAB cod. K3468; DAKO) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego de lavar 3 veces con agua destilada se realizó una coloración de contraste con hematoxilina, y el montado de las muestras para ser observadas en el microscopio óptico.

4.2.11. Análisis estadístico:

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism 5.0. La comparación entre cepas en cada unidad de tiempo individual se realizó mediante one-way ANOVA. Para evaluar las tendencias generales de crecimiento y los correspondientes rasgos fenotípicos a lo largo del tiempo, se determinó el área bajo la curva se realizó (ABC) para cada cepa, y los valores de ABC se compararon por one-way ANOVA. Para el resto de los datos se utilizó la prueba t de Student asumiendo que los valores de adherencia y excreción bacteriana poseen distribución normal. Los valores de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4.3. Resultados:

4.3.1. Patrón de crecimiento de *C. perfringens* tipo A y tipo E:

Las diferencias en los patrones de crecimiento entre las cepas estudiadas fueron determinadas para reducir el impacto de estas diferencias en la interpretación de los resultados mostrados en este capítulo. Las curvas de crecimiento *in vitro* de las cepas tipo A y tipo E mostraron tasas de crecimiento similares ($P > 0.05$) y ambos toxinotipos alcanzaron una densidad celular similar al alcanzar la fase estacionaria temprana (6 horas) (**Figura 4.2**). El tiempo de generación estimado para las cepas tipo A fue de 13 minutos y para las cepas tipo E de 12 minutos.

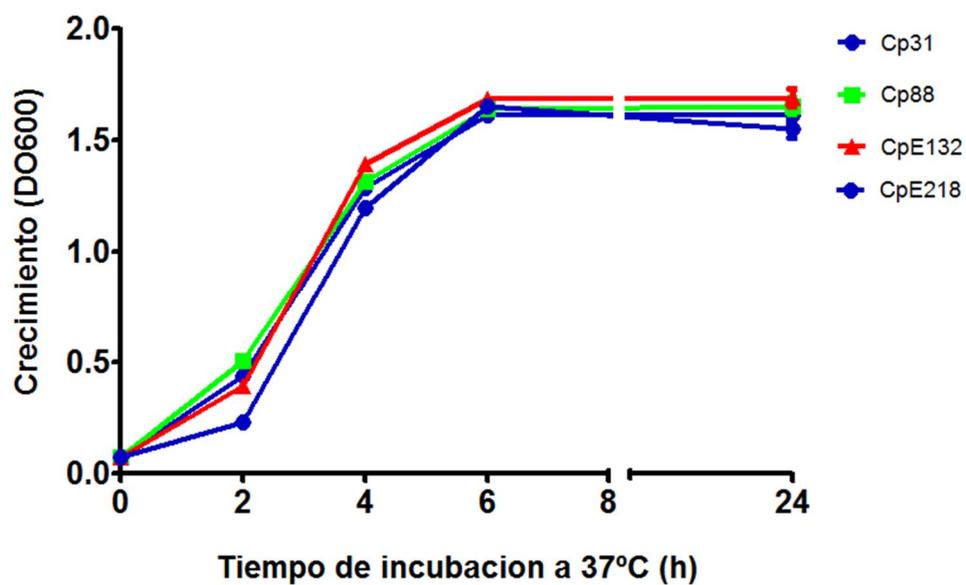


Figura 4.2: Curvas de crecimiento de las cepas de *C. perfringens* utilizadas. El crecimiento de dos cepas de tipo E (CpE218 y CpE132) y dos cepas de un tipo (CP88 y CP31) se midió por DO_{600} durante 24 horas. Los patrones de crecimiento fueron similares para todas las cepas. Los resultados mostrados representan la media de tres repeticiones; las barras de error indican el error estándar de la media.

4.3.2. Efecto de la toxina iota sobre la adherencia de *C. perfringens* *in vitro*:

El tratamiento de las células Caco-2 con diferentes concentraciones de toxina iota purificada produjo un marcado incremento ($P < 0.05$), dependiente de la dosis, en la capacidad de adherencia de las células bacterianas de la cepa CpE218 (**Figura 4.3**), a partir de estos resultados se decidió utilizar una concentración de 10 U de toxina iota en los siguientes ensayos de adherencia.

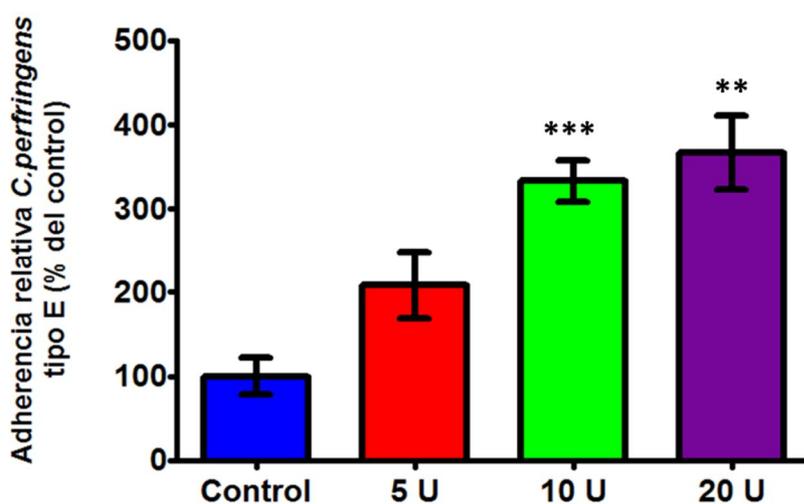


Figura 4.3: Efecto del tratamiento con toxina iota sobre el pegado de *C. perfringens* tipo E (CpE218) a células Caco-2. La toxina iota aumenta la adherencia de las bacterias de manera dosis dependiente, 5 U: 75ng/ml ITXa + 150ng/ml ITXb; 10 U: 150ng/ml ITXa + 300ng/ml ITXb; y 20 U: 300ng/ml ITXa + 600ng/ml ITXb. Los resultados representan la media de tres repeticiones; las barras de error indican error estándar de la media. ** ($P < 0.01$); *** ($P < 0.001$).

Al comparar la capacidad de adherencia de las cepas tipo A y tipo E se observó un porcentaje de adherencia para cada toxinotipo de 76.3% y 35.5%, respectivamente, lo que sugiere que las cepas tipo A pueden adherirse en forma más eficiente a las células Caco-2 en comparación con las cepas tipo E. Luego del tratamiento de la monocapa de células Caco-2 con toxina iota purificada la adherencia relativa de las células del toxinotipo E aumento 2.15 veces ($P < 0.0001$). En el caso de las cepas tipo A, se observó una reducción del 58.4% y 52% en los valores de adherencia de las cepas Cp88 y Cp31 ($P < 0.001$) respectivamente (**Figura 4.4**). Con el objetivo de evaluar si los cambios observados en la adherencia de *C. perfringens* tipo A y tipo E se debían a la acción de la toxina iota, se realizaron ensayos de neutralización. El tratamiento de toxina iota con IgY anti-ITX, antes de realizar los ensayos sobre células logro neutralizar los efectos antes descritos ($P < 0.05$), el mismo tratamiento utilizando IgY control (de animales no inmunizados) no fue capaz de evitar los mencionados efectos (**Figura 4.5**). El análisis mediante microscopia electrónica de barrido permitió observar la formación de extensiones de diferente tamaño sobre la superficie de las células tratadas con toxina iota, en estas muestras también fue posible observar numerosas bacterias con morfología compatible a *C. perfringens* adheridas a las mencionadas extensiones. En las células control no se observaron extensiones, aunque fue posible observar numerosas bacterias adheridas a la superficie celular (**Figura 4.6**).

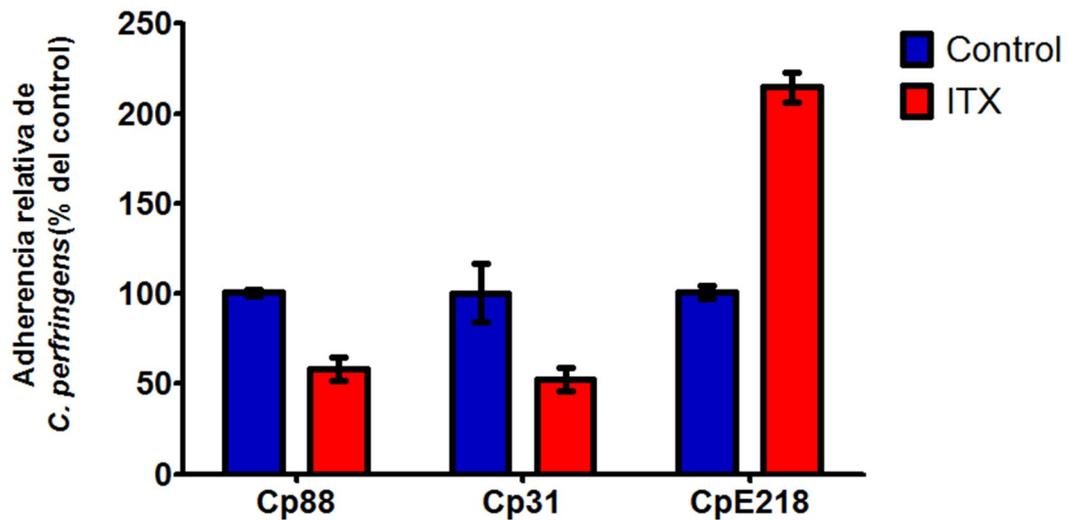


Figura 4.4: Efecto del tratamiento con toxina iota (ITX) sobre el pegado de diferentes cepas de *C. perfringens* tipo A (Cp88 y Cp31) y tipo E (CpE218) a células Caco-2. La toxina iota (150ng/ml ITXa +300ng/ml ITXb) aumenta la adherencia de bacterias tipo E (CpE218), a la vez que reduce la adherencia de bacterias tipo A. Los resultados representan la media de tres repeticiones; las barras de error indican error estándar de la media.

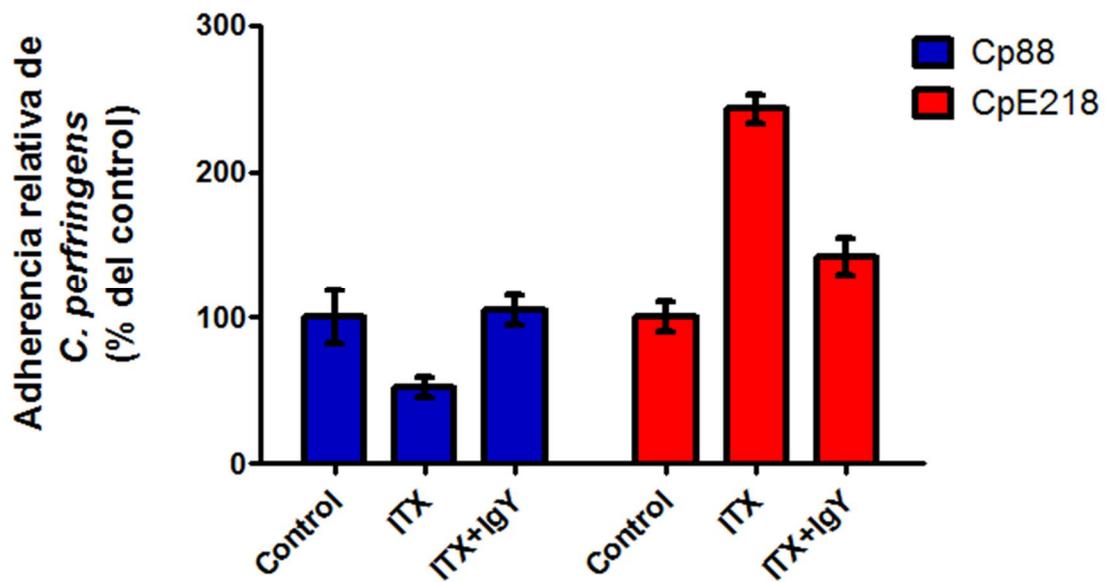


Figura 4.5: Los cambios en la adherencia de *C. perfringens* tipo A y tipo E, inducidos por acción de toxina iota son neutralizadas por IgY anti-ITX. Monocapas de células Caco-2 fueron tratadas con toxina iota (150ng/ml ITXa +300ng/ml ITXb) previamente incubada con/sin IgY anti-ITX. Luego del tratamiento las células fueron infectadas con bacterias de las cepas indicadas. Los resultados representan la media de tres repeticiones; las barras de error indican error estándar de la media.

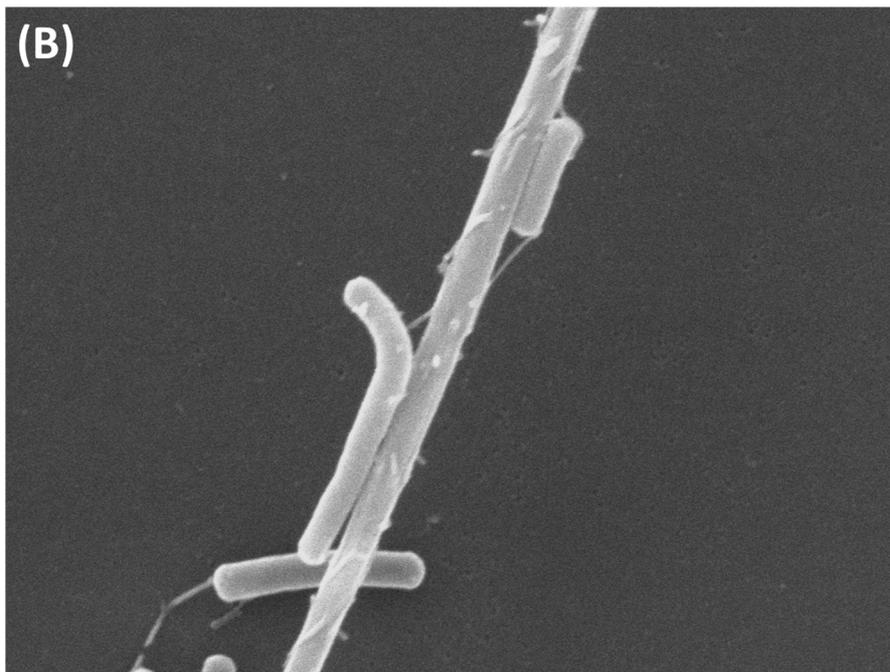
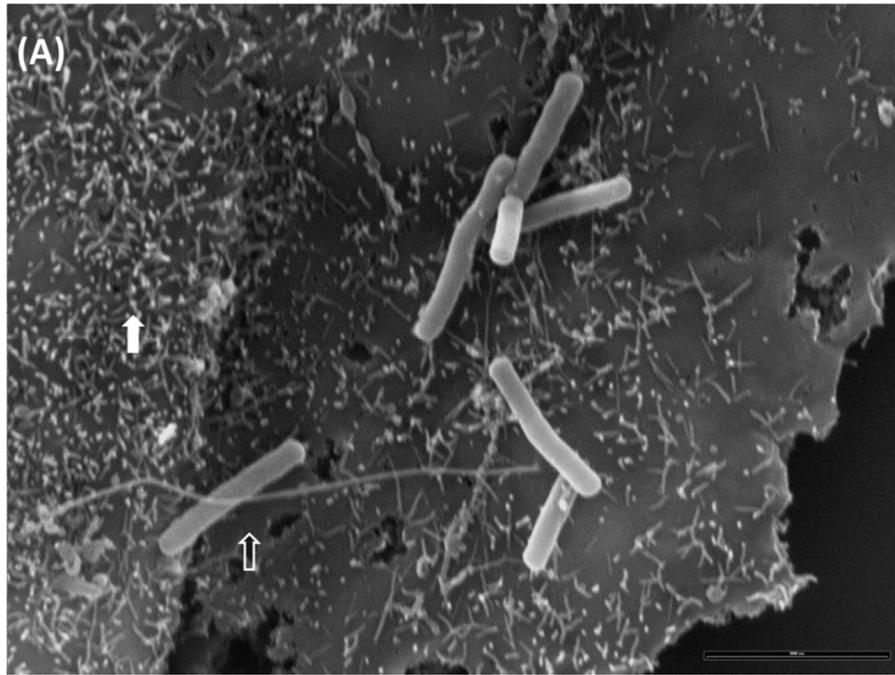


Figura 4.6: Microscopía electrónica de barrido de la interacción de *C. perfringens* con células Caco-2. (A) Monocapa de células Caco-2 incubadas con toxina iota durante 2 horas. Nótese la presencia de extensiones en la superficie de las células Caco-2, también es posible observar bacilos adheridas a estas prolongaciones (barra: 10 μm). (B) Detalle de las extensiones en la superficie de las células Caco-2 formadas por acción de toxina iota, donde se observan los bacilos adheridos.

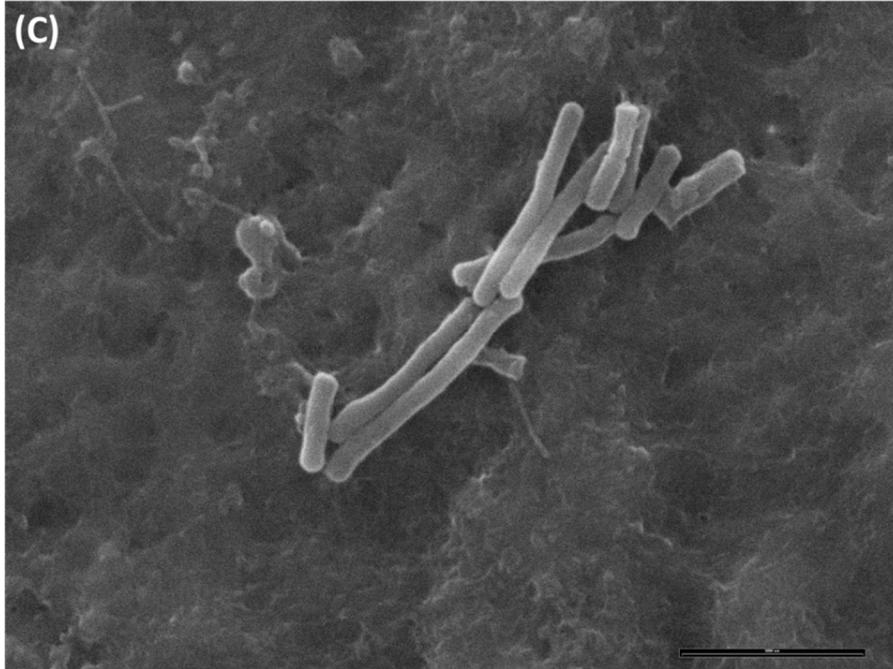


Figura 4.6 cont.: Microscopía electrónica de barrido de la interacción de *C. perfringens* con células Caco-2. (C) Monocapas de células Caco-2 fueron incubadas con BHI estéril (control), nótese los bacilos adheridos a la superficie de la célula (barra: 10 μm).

4.3.3. Adherencia de las células de *C. perfringens* a la mucosa intestinal:

Ratones y terneros fueron desafiados oralmente con cepas de *C. perfringens* tipo E (CpE218) y tipo A (Cp88). Ninguno de los animales desarrollaron manifestaciones clínicas durante este ensayo. El inicio de la colonización por *C. perfringens* fue determinado mediante cultivos de materia fecal periódicos. En los ratones, la excreción de ambas cepas de *C. perfringens* comenzó a las 24 horas luego del desafío, en el 60% de los animales inoculados. En el caso de los terneros, no fue posible obtener aislamientos de los grupos infectados con las cepas CpE218 y Cp88. Luego de

2 cultivos negativos consecutivos (72 horas), se realizó la eutanasia de los animales e inmediatamente se realizó la necropsia de los mismos. Durante el examen macroscópico no se observaron alteraciones en ninguno de los animales. Aunque al examen histopatológico no se observaron alteraciones microscópicas, en secciones de yeyuno-íleon de ratones inoculados con la cepa CpE218 fue posible observar gran número de bacilos Gram positivos con morfología compatible con *C. perfringens*. Estas bacterias se hallaban adheridas a la superficie mucosa. En los ratones inoculados con la cepa Cp88 (tipo A) no se observaron bacterias adheridas en la mucosa (**Figura 4.7**). En los terneros se obtuvieron resultados equivalentes. Mediante inmunohistoquímica se confirmó la identidad de los bacilos como *C. perfringens* (**Figura 4.8**).

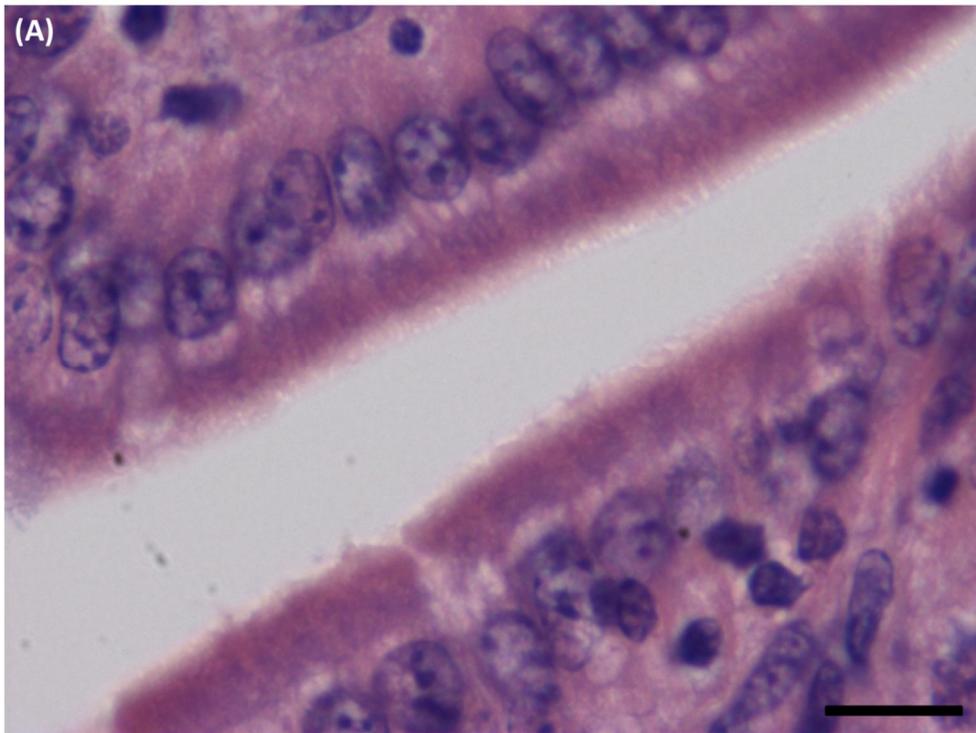


Figura 4.7: Tinción de H/E de secciones de íleon de ratones desafiados con *C. perfringens*. Los animales fueron inoculados por vía intragástrica con las cepas indicadas y se sacrificaron 72 horas después de la infección. (A) En el grupo desafiado con *C. perfringens* tipo A no se observan bacterias compatibles con *C. perfringens*. Barra: 20 μm .

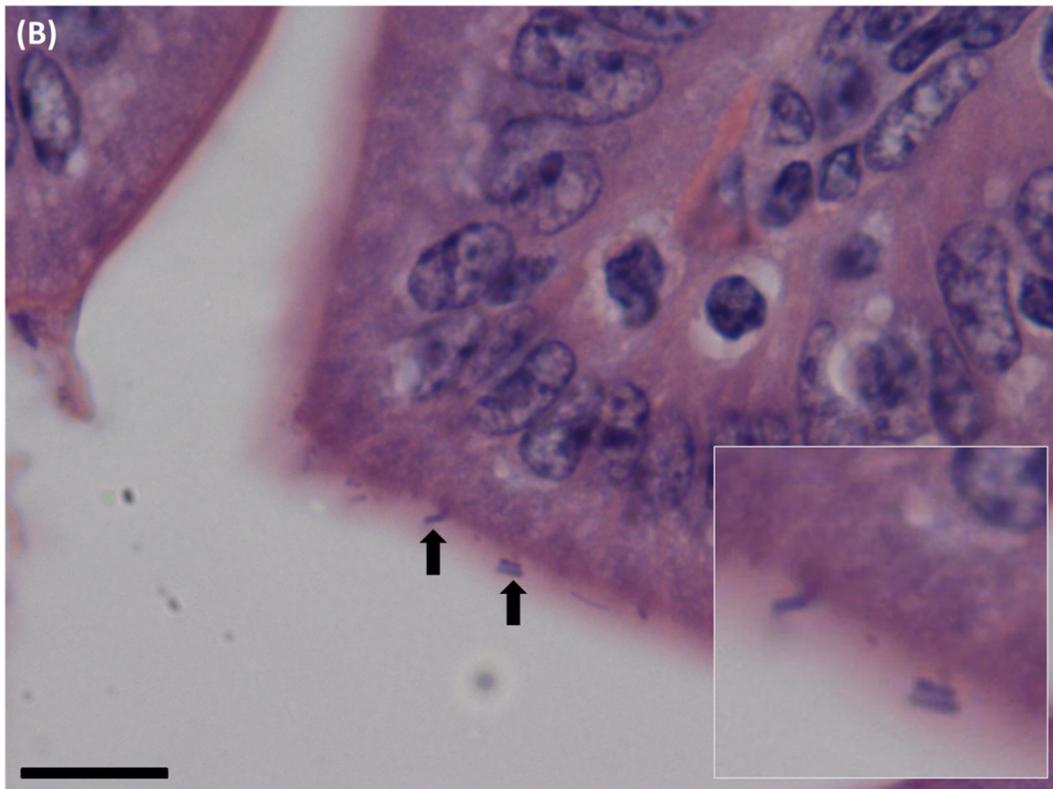


Figura 4.7 cont.: Tinción de H/E de secciones de íleon de ratones desafiados con *C. perfringens*. (B) Secciones de íleon de los ratones desafiados con la cepa tipo E (CpE218), se observaran numerosas bacterias compatibles con *C. perfringens* (flechas negras) íntimamente unidos a la mucosa intestinal. Barra: 20 μm .

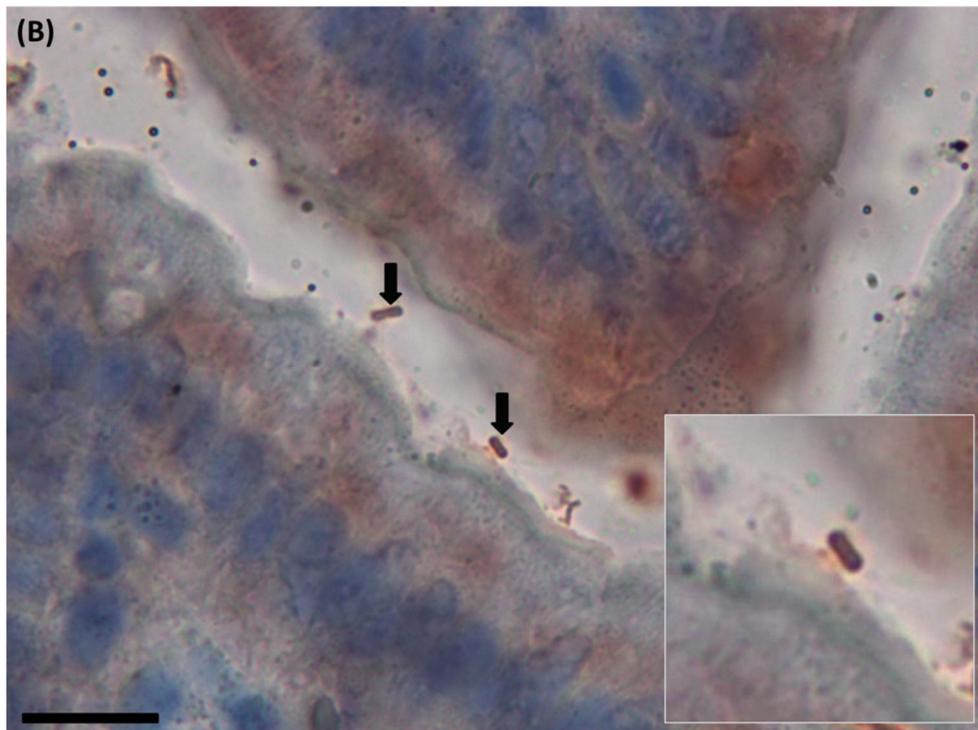


Figura 4.8: Inmunohistoquímica de secciones de íleon de ratones desafiados con *C. perfringens*. (A) Secciones de íleon de los ratones desafiados con *C. perfringens* tipo A, no se observaron bacterias adheridas. (B) En el grupo desafiado con *C. perfringens* tipo E, se observaron numerosas bacilos de color rojo identificados como *C. perfringens* (flechas negras) íntimamente unidos a la mucosa intestinal. Barra: 20 μm .

4.4. Discusión:

Clostridium perfringens tipo E ha sido identificado como un patógeno asociado con enteritis hemorrágica y muerte súbita en los rumiantes. Estos aislamientos se definen por la producción de toxinas alfa e iota, esta última perteneciente a la familia de las toxinas binarias (Barth et al., 2004). Aunque trabajos previos demostraron que las toxinas de este grupo comparten un mecanismo de acción común, el efecto de las toxinas binarias en las infecciones intestinales y el rol biológico de las mismas todavía no está claro. Del mismo modo que *C. perfringens* tipo E y su toxina iota, *C. spiroforme* también causa enteritis fulminantes en conejos (Carman and Borriello, 1989), y posiblemente en humanos (Miyamoto et al., 2011), mediante la acción de una toxina muy parecida a la toxina iota conocida como CST. A su vez la toxina CDT producida por *C. difficile*, se encuentra estrechamente relacionada con ambas toxinas; incluso los componentes proteicos de las 3 toxinas se pueden intercambiar generando toxinas quimeras (Barth et al., 2004) que conservan su actividad biológica, demostrando que este tipo de toxinas se encuentran ampliamente difundidas y conservadas entre especies de clostridios enterotóxicos. Esto podría sugerir un camino evolutivo compartido por estas 3 especies, las cuales explotan nichos ecológicos similares. Las toxinas binarias actúan ribosilando la actina, lo cual produce la despolimerización de los filamentos de actina lo que induce la producción de extensiones de la membrana celular sobre un eje de microtúbulos (Schwan et al., 2009) y causan una desviación de las vesículas secretoras de proteínas de matriz extracelular, principalmente fibronectina (Schwan et al., 2014), estas proteínas junto con las proyecciones de microtúbulos forman un entramado sobre la superficie celular que aumentan la adherencia de las células bacterianas.

Durante el desarrollo de este trabajo fue posible observar un incremento en la adherencia de bacterias *C. perfringens* tipo E a células Caco-2 mediado por la toxina

iota, similar a lo reportado para *C. difficile* (Schwan et al., 2009). A diferencia de lo sugerido para la toxina CDT, los resultados de este trabajo muestran que los cambios descritos en la superficie celular inducidos por la toxina iota, no solo aumentaban la adherencia de bacterias tipo E, sino que también producen una reducción en la adherencia de bacterias de *C. perfringens* tipo A. Esto sugiere que las bacterias del toxinotipo E no solo producen toxina iota, si no que a su vez poseen factores de adherencia específicos que les permiten aprovechar los cambios inducidos por la toxina iota. Esta observación es consistente con los resultados presentados anteriormente por otros, los cuales sugieren que las cepas patógenas de *C. perfringens* poseen una afinidad mayor por las proteínas de matriz extracelular en comparación con las cepas comensales (Martin y Smyth, 2010), trabajos posteriores atribuyen estas diferencias a la expresión diferencial de isoformas de la proteína de unión a fibronectina, presentes en la superficie de las células de *C. perfringens* de diferentes cepas (Katayama et al., 2014).

En los ratones desafiados por vía intragástrica con *C. perfringens* tipo E, se observó un patrón de adherencia similar al observado en las células de cultivo, lo cual no fue posible de observar en los grupos desafiados por la misma vía con cepas del toxinotipo A (no productoras de toxina iota). Es interesante destacar que también fue posible observar este patrón en cortes histológicos de intestinos bovinos obtenidos durante casos naturales de enteritis por tipo E (Capítulo 2; Figura 2.8). Al igual que lo observado en ratones, únicamente fue posible reproducir estos hallazgos en los terneros inoculados con *C. perfringens* tipo E. Resultados similares se obtuvieron con *C. difficile* y la toxina CDT (Geric et al., 2006; Schwan et al., 2009). Estos trabajos, junto con los resultados aquí presentados, sugieren que el aumento de la adherencia bacteriana debido a la acción de las toxinas binarias desempeña un papel central en los primeros pasos de la colonización intestinal por células de *C. perfringens* tipo E y otras especies de clostridios enterotóxicos productores de toxinas binarias.

Capítulo 5:

**Factores de virulencia presentes en
cepas de *Clostridium perfringens*
productoras de toxina binaria.**

5.1. Introducción:

Clostridium perfringens es una bacteria ampliamente distribuida en el ambiente que puede estar presente en el intestino de seres humanos y animales sanos. En los aislamientos de *C. perfringens* obtenidos a partir de animales sanos se observa una gran variabilidad genética, incluso entre cepas aisladas de un mismo individuo. En contraste con esta situación, y según fue determinado mediante análisis de MLST descritos en capítulos anteriores, los aislamientos de *C. perfringens* tipo E obtenidos durante un brote de enteritis hemorrágica se corresponden a grupos de cepas pertenecientes al mismo subtipo (Redondo et al., 2013). Este fenómeno de dominancia clonal e inhibición intraespecífica ha sido reportado anteriormente para diversas especies bacterianas (Bavananthasivam et al., 2012; Dassanayake et al., 2010). Trabajos previos demuestran que algunas cepas de *C. perfringens* poseen la capacidad de producir factores solubles con actividad inhibitoria intraespecífica (Mahony, 1974; Timbermont et al., 2009). Esta característica otorgaría a una cepa específica una ventaja competitiva sobre otras cepas presentes en el intestino, y si además esta cepa posee la capacidad de secretar toxinas enterotóxicas (toxina iota, beta2), la misma sería capaz de colonizar el intestino, y bajo condiciones específicas proliferar produciendo toxinas, lo que finalmente genera los procesos patológicos descritos en capítulos anteriores.

La secreción de péptidos antibacterianos, comúnmente denominados bacteriocinas (Garnier y Cole, 1986; Mihelc et al., 1978; Timbermont et al., 2014), es considerado como el principal mecanismo involucrado en la inhibición intraespecífica por diversas especies bacterianas, incluidas cepas patógenas de *C. perfringens* (Barbara et al., 2008; Leen Timbermont et al., 2014). Las bacteriocinas son compuestos proteicos tóxicos producidos por bacterias que generalmente inhiben el crecimiento de cepas estrechamente relacionadas. Aunque este mecanismo ha sido descrito en cepas patógenas avícolas (Leen Timbermont et al., 2009, 2014), no hay estudios relacionados

a este mecanismo en cepas patógenas de mamíferos. En esta sección se propone este mecanismo de inhibición intraespecífica como una estrategia de virulencia utilizada por cepas de *C. perfringens* tipo E para la colonización del intestino.

5.2. Materiales y métodos:

5.2.1. Cepas y condiciones de cultivo:

Las cepas utilizadas se enumeran en la **tabla 5.1**, las mismas se obtuvieron de acuerdo a lo descrito en secciones anteriores. Al momento de ser utilizadas fueron sembradas en placas de agar sangre con neomicina (100 mg/L) y cultivadas en condiciones de anaerobiosis durante 18 horas a 37°C. Colonias aisladas fueron repicadas en 10 ml de BHI en atmósfera anaerobia 18 horas a 37°C. La identidad de las colonias fue confirmada mediante pruebas bioquímicas y moleculares.

Tabla 5.1: Cepas utilizadas en los ensayos de inhibición intraespecífica.

Cepa	Toxinotipo	Genotipo	Especie hospedero	Enfermedad
Cp001	A	<i>cpa</i>	Ovino	Enteritis
Cp010	A	<i>cpa</i>	Bovino	Sano
Cp013	A	<i>cpa</i>	Llama	Enterotoxemia
Cp015	A	<i>cpa</i>	Bovino	Enteritis
Cp027	A	<i>cpa</i>	Bovino	Sano
Cp031	A	<i>cpa</i>	Bovino	Sano
Cp038	A	<i>cpa</i>	Bovino	Sano
Cp044	A	<i>cpa</i>	Ovino	Enteritis
Cp064	A	<i>cpa</i>	Bovino	Enterotoxemia
Cp068	A	<i>cpa</i>	Bovino	Enteritis
Cp069	A	<i>cpa</i>	Bovino	Sano
Cp081	A	<i>cpa</i>	Bovino	Sano
Cp085	A	<i>cpa</i>	Bovino	Sano
Cp088	A	<i>cpa</i>	Bovino	Sano
Cp090	A	<i>cpa</i>	Bovino	Muerte súbita
Cp098	A	<i>cpa</i>	Bovino	Sano
Cp104	A	<i>cpa</i>	Bovino	Enteritis
Cp129	A	<i>cpa</i>	Bovino	Sano
CpE130	E	<i>cpa, cpe, cpb2, iA</i>	Bovino	Enteritis hemorrágica
CpE132	E	<i>cpa, cpe, cpb2, iA</i>	Bovino	Enteritis hemorrágica
Cp155	A	<i>cpa</i>	Bovino	Sano
Cp159	A	<i>cpa</i>	Bovino	Sano
Cp162	A	<i>cpa</i>	Bovino	Enteritis
Cp207	A	<i>cpa</i>	Bovino	Enteritis
CpE218	E	<i>cpa, cpe, cpb2, iA</i>	Bovino	Enteritis hemorrágica

5.2.2. Detección de actividad inhibitoria *in vitro*:

Las cepas fueron cultivadas en 10 ml de caldo BHI a 37°C en anaerobiosis hasta alcanzar la fase estacionaria tardía, aproximadamente a las 18 horas. Una alícuota del cultivo crecido fue centrifugada a 13.000 g durante 10 minutos y el sobrenadante fue esterilizado mediante filtración con filtro de 0.45 µm, este sobrenadante se reservó para medir actividad inhibitoria. Otra alícuota fue diluida en BHI estéril hasta alcanzar una turbidez de 0.5 en escala de McFarland, mezclado con 5 ml de agar al 4% y colocados sobre una placa de agar BHI para formar una capa homogénea, la cual se dejó solidificar. Sobre esta capa de agar se colocaron 10 µl de los sobrenadantes filtrados (método "spot on"). La capacidad de inhibición y la susceptibilidad entre cepas fue evaluada en forma de tablero de ajedrez luego de incubar a 37°C en anaerobiosis durante 18 horas (Mahony, 1974; Leen Timbermont et al., 2009).

5.2.3. Detección de fagos:

En los sobrenadantes filtrados en los que se detectó actividad inhibitoria se realizaron pruebas para descartar la presencia de bacteriófagos. Para esto se realizaron diluciones de los sobrenadantes y se mezclaron 5 ml de agar al 4% inoculado con 0,1 ml de cultivo en fase exponencial de una cepa sensible, la elección de la cepa sensible se realizó en base en los resultados obtenidos en las pruebas de detección de actividad inhibitoria. La mezcla se vertió sobre placas de BHI agar y se incubó durante 18 horas a 37°C en anaerobiosis, luego de lo cual se observó la presencia de placas de lisis (Zimmer et al., 2002).

5.2.4. Caracterización del factor antimicrobiano:

Con el objetivo de realizar una primera aproximación a la naturaleza del factor con actividad antimicrobiana, se determinó la estabilidad térmica y sensibilidad a la digestión por proteasas. Estas determinaciones se realizaron utilizando un sobrenadante de *C. perfringens* tipo E (CpE218) concentrado mediante precipitación con una solución sobresaturada de sulfato de amonio. Para esto se preparó 1L de cultivo de la cepa en caldo BHI. El sobrenadante de dicho cultivo se obtuvo por centrifugación a 7,000 g durante 20 minutos, y las proteínas del mismo fueron precipitadas mediante la adición de una solución sobresaturada de sulfato de amonio al 70%. El precipitado fue separado mediante centrifugación (7,000 g durante 20 minutos) y resuspendido en buffer Tris-HCl 10mM a pH 7.5, luego fue dializado en el mismo buffer para eliminar residuos de sulfato de amonio. Una vez obtenido el sobrenadante concentrado, primero se comprobó la presencia de actividad antibacteriana. Luego para determinar la estabilidad térmica del compuesto antibacteriano, el sobrenadante obtenido se incubó a 4, 24, 37, 42, 60, 80 y 100C° durante 10, 30 y 60 minutos. También se determinó la sensibilidad a la digestión por proteasas. Se prepararon soluciones de tripsina, proteinasa K y papaína a una concentración de 10 mg/ml. Estas soluciones se mezclaron con el sobrenadante concentrado para obtener una concentración de cada enzima de 1 mg/ml, luego de lo cual se incubaron durante 1 hora a 37C°. En todos los casos luego de realizar los tratamientos mencionados, se determinó la actividad antimicrobiana remanente, según lo descrito para la detección de actividad antimicrobiana. Para esto se realizaron diluciones seriadas dobles de cada sobrenadante tratado y su correspondiente control. Finalmente se colocó una gota de cada dilución sobre un cultivo de una cepa sensible (Cp88). Las determinaciones se realizaron por triplicado y los valores se expresaron como el porcentaje de actividad en comparación con el control.

5.2.5. Purificación del péptido antimicrobiano:

El sobrenadante concentrado preparado según se describió en la sección anterior, se agregó a una columna de DEAE-Sefarosa CL-6B previamente equilibrada con buffer Tris-HCl 10 mM a pH 7.5. Las proteínas presentes en el sobrenadante concentrado fueron eluidas con un gradiente lineal de NaCl de 0.0 a 0.2 M. Se determinó la actividad antibacteriana de cada fracción mediante el método "spot on" utilizado para detectar cepas con actividad antibacteriana. Las fracciones con actividad antibacteriana se mezclaron y concentraron mediante ultrafiltración con membranas de 10, 30 y 50 kDa. La pureza de la proteína tipo bacteriocina fue verificada mediante SDS/PAGE teñido con plata.

5.2.6. Microscopia electrónica de transmisión:

Los cambios inducidos por el péptido antibacteriano purificado sobre las bacterias sensibles se determinaron mediante microscopia electrónica de transmisión. Para esto 1 ml de cultivo en fase estacionaria fue centrifugado a 13.000 g durante 5 minutos y lavado 3 veces con PBS estéril, el precipitado de bacterias fue resuspendido en PBS estéril para obtener una concentración final de 1.5×10^7 UFC/ml de *C. perfringens*. Otra alícuota del mismo cultivo fue preparada de la misma manera y resuspendida en PBS estéril conteniendo la bacteriocina purificada, ambos tubos fueron incubados a 37°C en anaerobiosis durante 6 horas. Luego de incubar los cultivos fueron centrifugados y lavados, para luego ser fijados con una solución de glutaraldehído al 2% y paraformaldehído en buffer fosfato 0.1 M, pH 7.25, durante una hora a 4°C. A continuación, se enjuagaron en buffer Tris y posteriormente se fijaron con buffer cacodilato de sodio al 1% con tetróxido de osmio durante 60 minutos. Después de la deshidratación con etanol, las secciones fueron tratadas con óxido de propileno y

embebidos en Epon Polybed 812 (Poli/Bed; Polysciences, Warrington, PA). Con el fin de seleccionar las áreas adecuadas para observar al microscopio electrónico de transmisión, las muestras teñidas con azul de toluidina se evaluaron primariamente en un microscopio óptico. .

5.2.7. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM):

Para seleccionar los medios de cultivo adecuados para la diferenciación de cepas en ensayos posteriores de crecimiento en cocultivo, se determinó la CIM para los antimicrobianos eritromicina, cloranfenicol, tetraciclina y ácido nalidixico. La CIM se determinó mediante microdilución en caldo de acuerdo a lo descrito en la bibliografía consultada (Elizondo et al., 2010; Slavić et al., 2011). Esta prueba se realizó en microplacas de 96 pocillos (Cell Star, Greiner Bio-one, Germany). En cada fila, con excepción de la primera, se agregaron 100 μ l de caldo BHI estéril. En la primera se agregaron 200 μ l de una solución de los mencionados antimicrobianos a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas dobles para generar un gradiente de concentraciones de entre 4 y 512 mg/L a lo largo de la placa. Posteriormente, cultivos en fase estacionaria de cada cepa fueron diluidos en BHI estéril hasta alcanzar una turbidez de 0.5 según la escala de McFarland. Finalmente, 100 μ l de esta suspensión de bacterias se agregó a cada pocillo en toda de la placa, con excepción de una columna que se utilizó para los controles (**Figura 5.1**). Estas placas fueron incubadas a 37°C en anaerobiosis durante 18 horas. La CIM para cada cepa y cada antimicrobiano fue definida como la menor concentración en la que no se observó crecimiento. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los valores de CIM representan el promedio de las 3 mediciones realizadas.

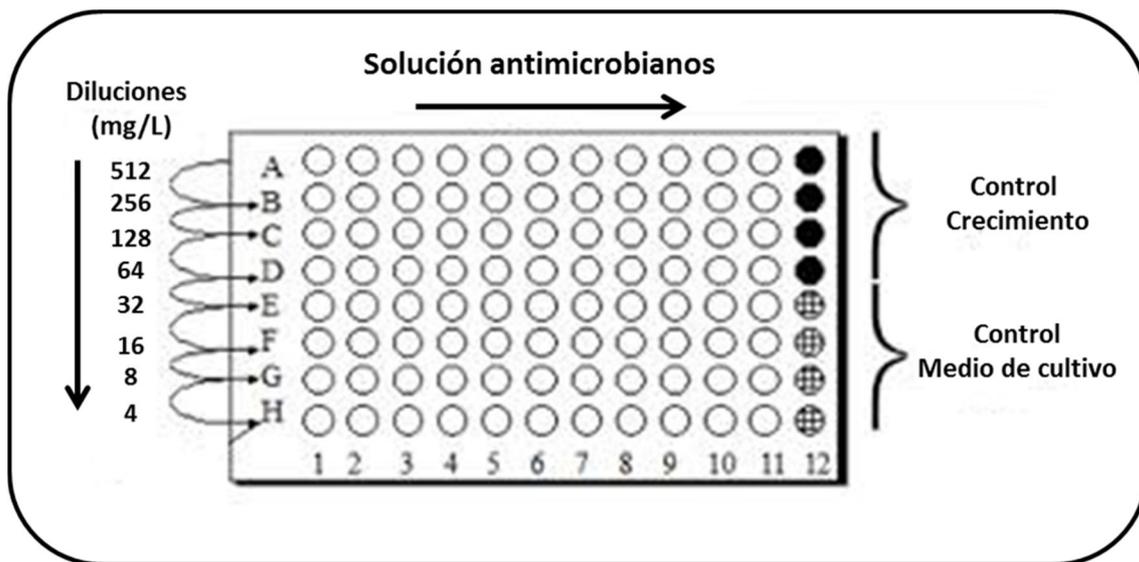


Figura 5.1: Esquema de las placas utilizadas para determinar la CIM de las cepas a utilizar en los ensayos de cocultivo.

5.2.8. Crecimiento de *C. perfringens* en monocultivo y cocultivo:

Con el objetivo de evaluar si la capacidad inhibitoria, observada previamente en placa, representaba una ventaja competitiva, se utilizaron cepas de *C. perfringens* tipo E con capacidad de inhibición intraespecifica, y cepas tipo A sensibles a la inhibición por cepas tipo E (Cp88). Como control adicional se incluyó una cepa tipo A sin capacidad inhibitoria (Cp31). Estas cepas fueron sembradas en placas de agar sangre con 100 mg/L de neomicina y cultivadas en condiciones de anaerobiosis durante 18 horas a 37°C. Colonias aisladas fueron subcultivadas en 10 ml de BHI en atmosfera anaerobia 18 horas a 37°C. A partir de este cultivo se prepararon monocultivos de la cepa Cp 88 (tipo A), y cocultivos incluyendo cepas Cp31 (tipo A) y CpE 218 (tipo E). Los cultivos se realizaron inoculando 1×10^7 bacterias de la cepa Cp88 y 1×10^6 bacterias de la cepa

CpE218 en 10 ml de caldo BHI (relación cepa inhibida/inhibidor 10:1). Como control se realizó un cocultivo incluyendo la cepa Cp31 (tipo A sin actividad inhibitoria) en la misma relación (10:1). Todos los cultivos fueron incubados a 37°C en atmosfera anaerobia y se tomaron alícuotas a las 0, 2, 4, 6 y 24 horas. Las diferencias en el crecimiento de la cepa tipo A, en monocultivo y cocultivo, fueron observadas realizando recuento de UFC. Para esto se utilizaron placas de agar sangre con neomicina (100 mg/L) y ácido nalidixico (25 mg/L), de acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad antes descritas, este medio permitió únicamente el crecimiento de la cepa Cp88 (resistente a ácido nalidixico y sensible a la inhibición por tipo E). En los tiempos mencionados se tomaron alícuotas de cada cultivo y se diluyeron en forma seriada para realizar recuentos de UFC resistentes a ácido nalidixico (nalR). La identidad de las colonias resistentes fue confirmada mediante PCR multiplex (Meer y Songer, 1997).

5.2.9. Exclusión competitiva y desplazamiento de cepas *in vitro*:

Para los ensayos de exclusión competitiva, una suspensión de bacterias fue preparada utilizando 1×10^7 bacterias de la cepa Cp88 (tipo A) y 1×10^6 bacterias de la cepa CpE218 (tipo E) (relación cepa inhibida/inhibidor 10:1), estas bacterias fueron lavadas y resuspendidas en medio E-MEM (Minimun Essential Medium Eagle). Otras dos suspensiones de bacterias fueron preparadas conteniendo solo bacterias de la cepa tipo A o tipo E, para ser utilizadas como controles de adherencia en los ensayos de desplazamiento. Estas suspensiones de bacterias fueron utilizadas para infectar la monocapa de células Caco-2. Las monocapas de células fueron preparadas de acuerdo a lo planteado en las secciones anteriores (Capítulo 4; sección 4.2.4.). Para los ensayos de exclusión competitiva ambas cepas fueron agregadas en simultáneo e incubadas durante 2 horas en atmosfera anaerobia. Para evaluar si era posible que las cepas tipo

E desplazaran a las cepas tipo A, monocapas de células Caco-2 fueron infectadas con una suspensión de bacterias conteniendo 1×10^7 bacterias de la cepa Cp88 únicamente, las cuales se cultivaron durante 2 horas para permitir el pegado a las células. Luego de esto la monocapa se lavó 3 veces con PBS estéril, para remover las bacterias no adheridas, y se infectó la monocapa con una suspensión de 1×10^6 bacterias de la cepa CpE218, luego de lo cual se incubó durante 1 hora. Luego de incubar las monocapas fueron lavadas 3 veces con PBS estéril, y fueron incubadas durante 15 minutos con agua destilada estéril para producir la lisis de las células y recuperar las bacterias adheridas. Finalmente se determinó el número de UFC resistentes a ácido nalidixico (nalR) según lo descrito anteriormente. En estos ensayos se incluyó como control una cepa tipo A sin actividad inhibitoria (Cp31) según lo descrito en los ensayos de cocultivo.

5.2.10. Exclusión competitiva *in vivo*:

Para evaluar la interacción de *C. perfringens* tipo E con cepas tipo A *in vivo*, se utilizaron ratones macho de 20 a 25 g de peso. Un cultivo en fase estacionaria de *C. perfringens* tipo E (CpE218) y tipo A (Cp088) fue preparado de acuerdo a lo explicado en párrafos anteriores. Grupos de 4 ratones fueron inoculados por vía intragástrica con 0.2 ml de cultivo conteniendo aproximadamente 1×10^7 UFC de la cepa Cp88 (tipo A) y 1×10^6 UFC de la cepa CpE218 (tipo E) (relación 10:1), previo ayuno de sólidos durante 4 horas. Los animales fueron monitoreados bacteriológicamente para determinar el momento de inicio, duración y fin de la excreción de *C. perfringens* como indicador de colonización (Barbara Geric et al., 2006) para lo cual se tomaron muestras seriadas de materia fecal las cuales fueron sembradas en placas de agar sangre suplementadas con neomicina (100 mg/L) y ácido nalidixico (25 mg/L) para recuento de UFC resistentes a ácido nalidixico (nalR), y luego incubadas en anaerobiosis a 37°C durante 18 horas. Al

final del ensayo se realizó la necropsia de todos los animales de cada grupo y se tomaron muestras para histopatología inmediatamente después de la eutanasia.

5.2.11. Comité institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación (CICUAE):

Los ensayos *in vivo* planteados fueron revisados y aprobados por el CICVyA-INTA CICUAE. La autorización de los mencionados ensayos se corresponde con los protocolos 32/2010.

5.2.12. Análisis estadístico:

Los datos fueron analizados con el programa estadístico Graphpad 5, utilizando la prueba de chi cuadrado para comparar el número de cepas del grupo comensales en relación al número de cepas del grupo patógenas que fueron capaces de inhibir otras cepas. Para la comparación de las curvas de crecimiento se determinó el área bajo la curva se realizó (ABC) para cada cepa, y los valores de ABC se compararon por one-way ANOVA. En los ensayos de inhibición *in vivo* e *in vitro* se utilizó la prueba t de Student. En todos los casos se consideraron significativas diferencias con un valor de $P < 0,05$.

5.3. Resultados:

5.3.1. Cepas de *C. perfringens*:

La lista completa de cepas utilizadas en los ensayos descritos en esta sección se detalla en la **tabla 5.1**. Del total de las cepas obtenidas, se seleccionaron únicamente aquellas con menos de 6 meses desde la obtención del aislamiento original. En total se utilizaron 25 cepas; de estas, 22 pertenecían al toxinotipo A (genotipo *cpa+*), 12 se aislaron a partir de muestras de animales sanos y 10 de animales con enfermedad digestiva, además se incluyeron 3 cepas del toxinotipo E aisladas a partir de casos de enteritis hemorrágica (genotipo *cpa+*, *cpe+*, *cpb2+*, *iA+*).

5.3.2. Detección de cepas productoras de bacteriocinas:

De las cepas estudiadas el 72% (18/25) inhibió el crecimiento de al menos una cepa de *C. perfringens* (evidente por la presencia de un halo de inhibición donde se colocó una gota del sobrenadante filtrado, **figura 5.2**). Mientras que algunas cepas (32%) mostraron un amplio espectro de inhibición (inhibiendo 5 o cepas), otras tenían un espectro limitado. Aunque no se registraron diferencias en el número de cepas con capacidad inhibitoria entre cepas tipo A comensales o patógenas (9/12 vs. 9/10), las cepas patógenas mostraron un espectro de inhibición 2 veces mayor en comparación con las comensales (OR 1.93, 95% IC 1.12–3.32, $P > 0.01$). La **tabla 5.2** muestra las cepas productoras de bacteriocinas con el espectro más amplio de inhibición entre las cepas estudiadas. Las cepas pertenecientes al toxinotipo E mostraron una mayor capacidad inhibitoria en comparación con las cepas tipo A (OR 30.03, 95% IC 16.71–

53.97, $P > 0.001$), siendo capaces de inhibir al 91% (20/22) de las cepas tipo A probadas. Aunque no se observaron diferencias en el espectro de inhibición de estas cepas, la cepa CpE218 mostró mayor potencia inhibitoria, incluso fue capaz de inhibir a las otras cepas tipo E (CpE130 y CpE132). Ninguna de las cepas con capacidad inhibitoria resulto positiva a los ensayos para detección de bacteriófagos.

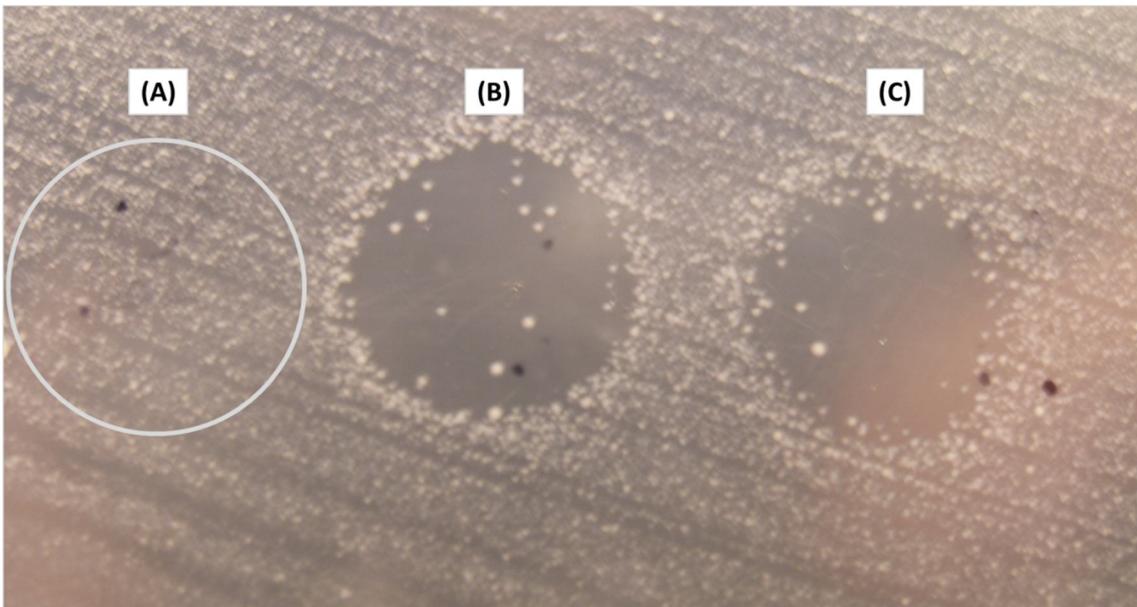


Figura 5.2: Resultado del ensayo de inhibición "spot on" en agar. (A) Sobrenadante de un cepa de *C. perfringens* de tipo A sin actividad inhibitoria (Cp31). Cuando se utilizó sobrenadante de cepas tipo E (CpE218 y CpE132; B y C, respectivamente) se observó una clara zona de inhibición.

Tabla 5.2: Cepas con el mayor espectro de inhibición, se consideraron cepas que inhibieron a 5 o + de las cepas testeadas.

Cepa	Toxinotipo	Cepas inhibidas (%)
CpE218	E	20/22 (91)
CpE130	E	20/22 (91)
CpE132	E	20/22 (91)
Cp068	A	14/22 (64)
Cp015	A	11/22 (50)
Cp069	A	7/22 (32)
Cp155	A	5/22 (23)
Cp044	A	5/22 (23)

5.3.3. Purificación y caracterización del péptido antimicrobiano producido por CpE 218:

El tratamiento térmico de sobrenadante concentrado de una cepa de *C. perfringens* tipo E (CpE218) a diferentes temperaturas, produjo una completa inactivación luego de incubar a 100 C° durante 10 minutos y a 80 C° durante 30 minutos. Luego del tratamiento con proteasas, se observó una reducción en la actividad antibacteriana se observó en los sobrenadantes tratados con tripsina y proteinasa K, la digestión con papaína no tuvo ninguna efecto sobre la actividad antimicrobiana. Estos resultados en conjunto sugieren que el factor soluble con actividad antimicrobiana es de naturaleza proteica. De acuerdo a estos resultados se realizó la purificación de este péptido a partir de un sobrenadante concentrado mediante precipitación con sulfato de amonio al 70% de saturación. Luego de aplicar este concentrado a una columna de DEAE-sefarosa, el péptido antimicrobiano eluyó con 0.00 a 0.05 M de NaCl. Después de la cromatografía, se midió la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas, y las que tenían actividad se mezclaron y se concentraron por ultrafiltración. La masa estimada por SDS-PAGE y ultrafiltración fue de aproximadamente 30kDa (**Figura 5.3**).

Finalmente, se caracterizó el péptido obtenido en cuanto a sensibilidad al calor a y la hidrolisis por proteasas de la manera antes descrita. Los resultados fueron similares a los obtenidos para el sobrenadante concentrado (**tabla 5.3**).

Tabla 5.3: Efecto del tratamiento térmico y la hidrolisis con proteasas sobre el péptido antimicrobiano purificado de *C. perfringens* tipo E.

Tratamiento		Actividad remanente (%)
Tripsina		35
Proteínasa K		25
Papaína		100
Temperatura (tiempo):		
4°C	(60min)	100
24°C	(60min)	100
37 °C	(60min)	100
42 °C	(60min)	100
60 °C	(60min)	100
80 °C	(30min)	0
100 °C	(10min)	0

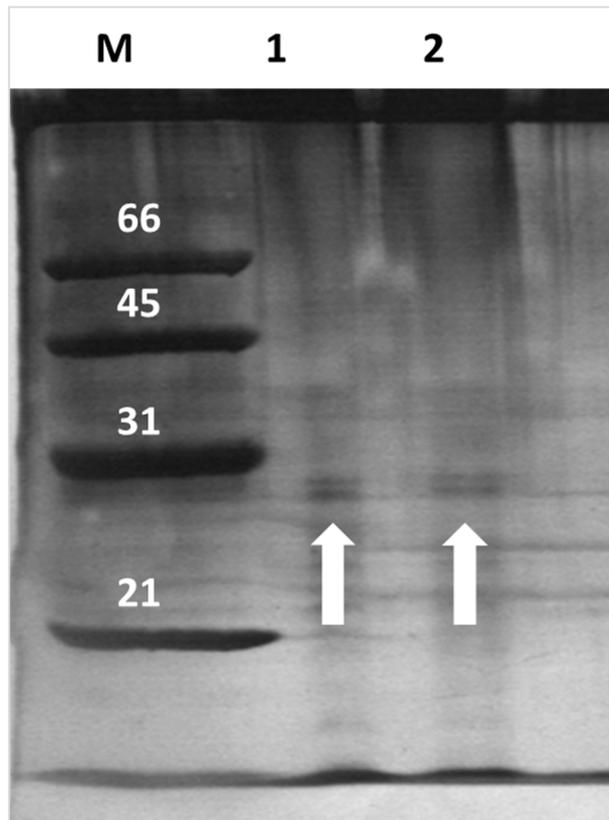


Figura 5-3: SDS-PAGE que muestra los resultados de la purificación del péptido con actividad antibacteriana presente en el sobrenadante de cepas tipo E en condiciones desnaturizantes. M: marcador de peso molecular (kDa). 1: Péptido con actividad antibacteriana concentrada con filtro de 10kDA (flecha). 2: Péptido con actividad antibacteriana concentrada con filtro de 30kDA (flecha).

5.3.4. Análisis de microscopía electrónica de transmisión:

Las células bacterianas de cepas sensibles a la bacteriocina de *C. perfringens* tipo E se observaron al microscopio electrónico de transmisión luego de ser incubadas durante 6 horas con bacteriocina purificada. En las secciones ultrafinas de bacterias expuestas a bacteriocinas predominaban las células con alteraciones en la pared celular, en la mayoría de ellas era posible observar la solución de continuidad de dicha estructura a

la vez que se observaban restos de pared adheridos a las células bacterianas (**Figura 5.4 A**). El análisis a mayor aumento permitió observar la presencia de gránulos oscuros dentro del citoplasma, lo cual es compatible con daño citoplasmático (**Figura 5.4 C**). Ninguna de estas alteraciones fue observada en las células control (**Figura 5.4 B y D**).

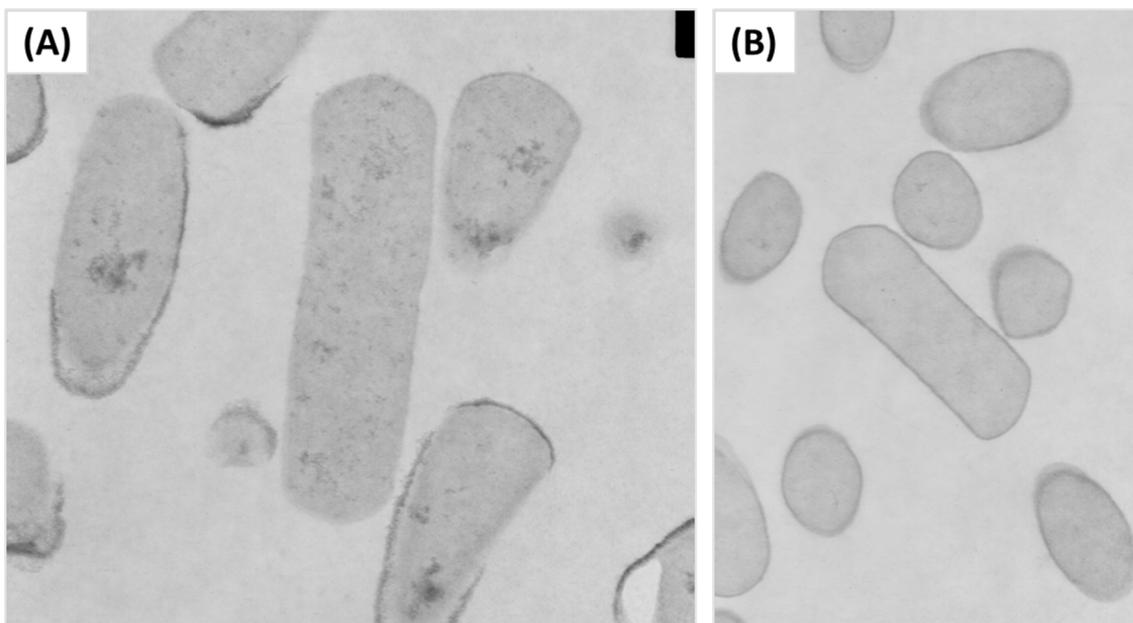


Figura 5.4: Imágenes de secciones ultrafinas de una cepa de *C. perfringens* sensible a las bacteriocinas de CpE218. (A) Bacterias incubadas en presencia de bacteriocina, es posible observar la discontinuidad de la pared celular y restos de la misma adheridos a las bacterias. (B) Bacterias incubadas en medio libre de sustancias antibacterianas, nótese la continuidad de la membrana celular.

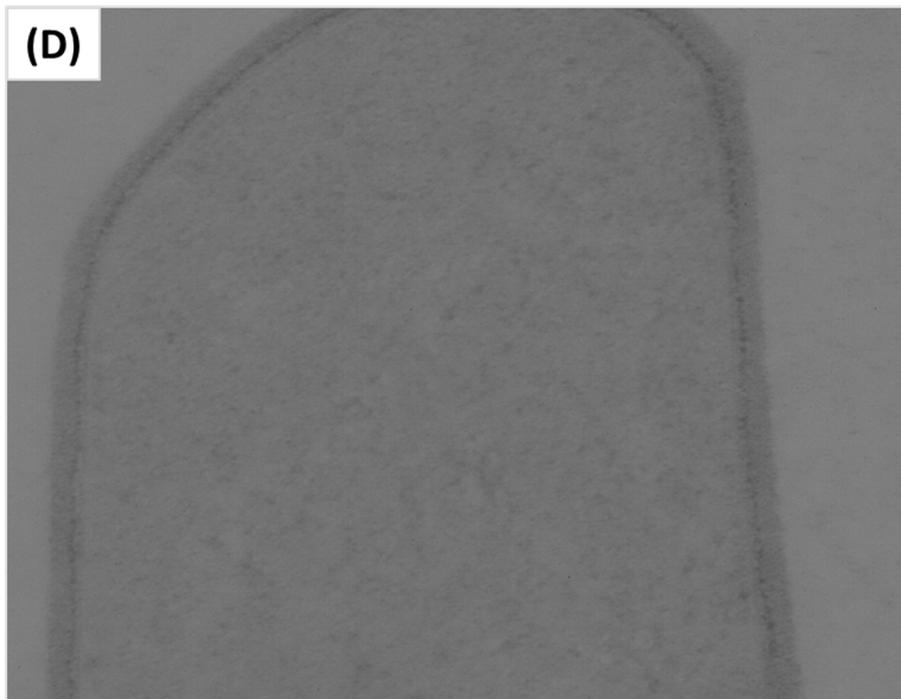
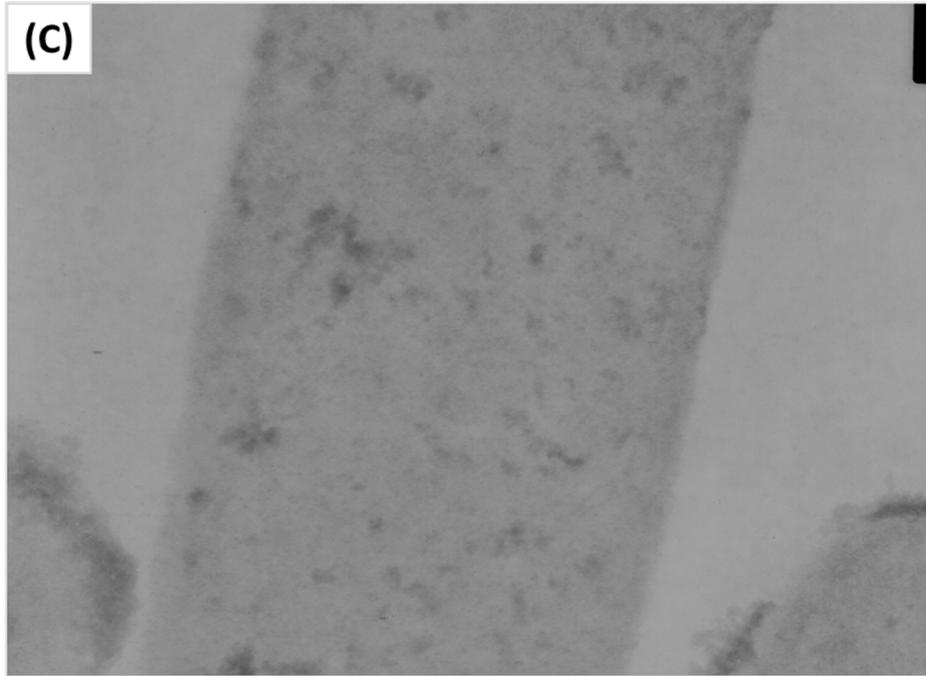


Figura 5.4 cont.: Imágenes de secciones ultrafinas de una cepa de *C. perfringens* sensible a las bacteriocinas de CpE218. (C) Detalle del citoplasma de una bacteria incubada en presencia de bacteriocina, los gránulos oscuros son compatibles con daño citoplasmático. (D) Detalle del citoplasma de una bacteria del grupo control, es posible observar el aspecto granular y homogéneo del citoplasma.

5.3.5. Crecimiento de cepas tipo A y tipo E:

Para los ensayos de inhibición se seleccionaron 2 cepas tipo A comensales (Cp31 y Cp88) y 2 cepas tipo E (CpE132 y CpE218). Estas cepas se seleccionaron por que no poseían diferencias significativas en la curva de crecimiento y el tiempo de generación ($P > 0.05$), según se determinó en secciones anteriores (**Capítulo 4; Fig.4.2**). Además de la tasa de crecimiento se determinó el patrón de susceptibilidad a antimicrobianos seleccionados, para ser utilizado como medio selectivo para diferenciar entre cepas en los ensayos de cocultivo posteriores. De acuerdo a estos resultados todos los ensayos de cocultivo se realizaron utilizando las cepas Cp88 (tipo A resistente a ácido nalidixico) y la cepa CpE218 (tipo E), se incluyó la cepa Cp31 (tipo A sensible a ácido nalidixico) como control de efectos inespecíficos sobre el crecimiento de la cepa Cp88. Como medio selectivo se utilizaron placas de agar sangre suplementadas con neomicina (100 mg/L) y ácido nalidixico (25 mg/L), este medio permitió únicamente el crecimiento de Cp88 (tipo A sensible a la inhibición por tipo E).

5.3.6. Inhibición en cocultivo:

Los ensayos de cocultivo de una cepa tipo A comensal (Cp88) y una cepa tipo E patógena (CpE218) se realizaron en medio líquido (caldo BHI). Durante la realización de este ensayo no se observaron diferencias en la densidad óptica (DO_{600}) de los cultivos utilizados ($P > 0.05$). Estos resultados nos indican que la densidad de bacterias fue similar en los monocultivos como en los cocultivos (**Figura 5.5 A**). Los recuentos de UFC resistentes a ácido nalidixico (UFC nalR), correspondientes a la cepa Cp88, se mantuvieron en niveles similares a los controles (Cp88 en monocultivo) durante las 2 primeras horas de cultivo ($P > 0.05$). Luego de las 4 horas de cultivo se observó una disminución significativa en los recuentos de UFC nalR ($P < 0.01$), esta reducción se

mantuvo hasta la fase estacionaria tardía. A las 24 horas de cultivo los recuentos de UFC naIR fueron 6 veces menores ($P < 0.001$) en comparación con los recuentos en los tubos control (Cp88 en monocultivo) (**Figura 5.5 B**). Ensayos similares con cepas tipo A comensales sensibles a ácido nalidixico sin actividad antimicrobiana (Cp31), causaron una reducción no significativa a las 4 horas de cultivo en los recuentos de UFC naIR ($P > 0.05$), al alcanzar la fase estacionaria los recuentos para ambos controles (Cp88 monocultivo; Cp88 + Cp31) alcanzaron recuentos similares (**Figura 5.5 B**). Esto sugiere la participación de mecanismos inespecíficos, como consumo de nutrientes o señales tipo *quorum sensing*. La especificidad del medio selectivo se confirmó mediante PCR multiplex demostrando que las colonias obtenidas (naIR) correspondían únicamente a las cepas tipo A.

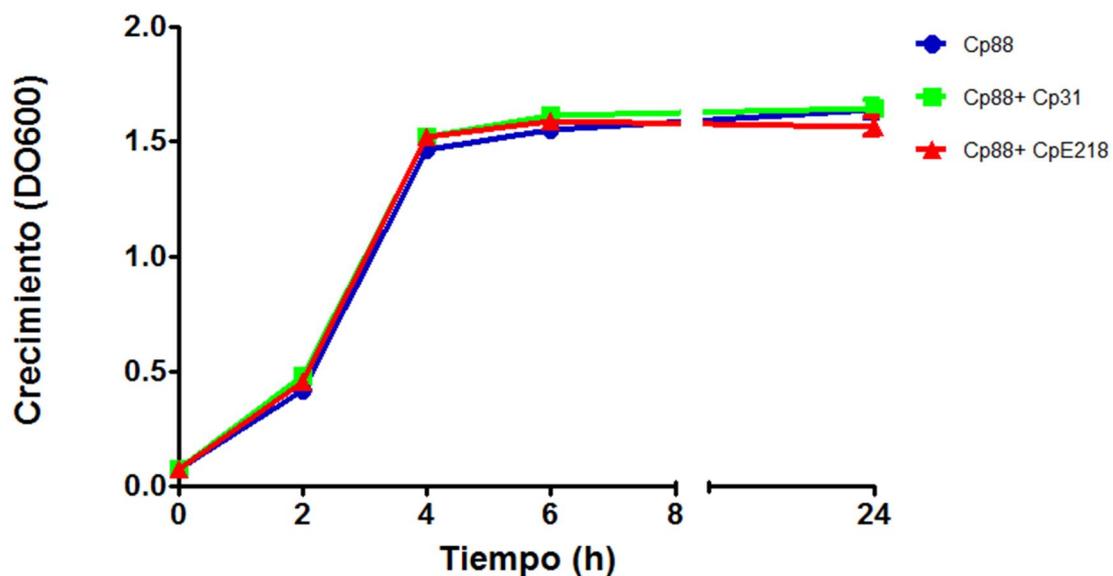


Figura 5.5: Resultados obtenidos en los ensayos de cocultivo en medio líquido. (A) Durante el desarrollo de los ensayos de cocultivo no se observaron diferencias en la DO_{600} (densidad bacteriana) entre los monocultivos (Cp88) y los cocultivos con una cepa tipo E productora de bacteriocina (Cp88+CpE218) y con una cepa no productora de bacteriocina (Cp88 + Cp31).

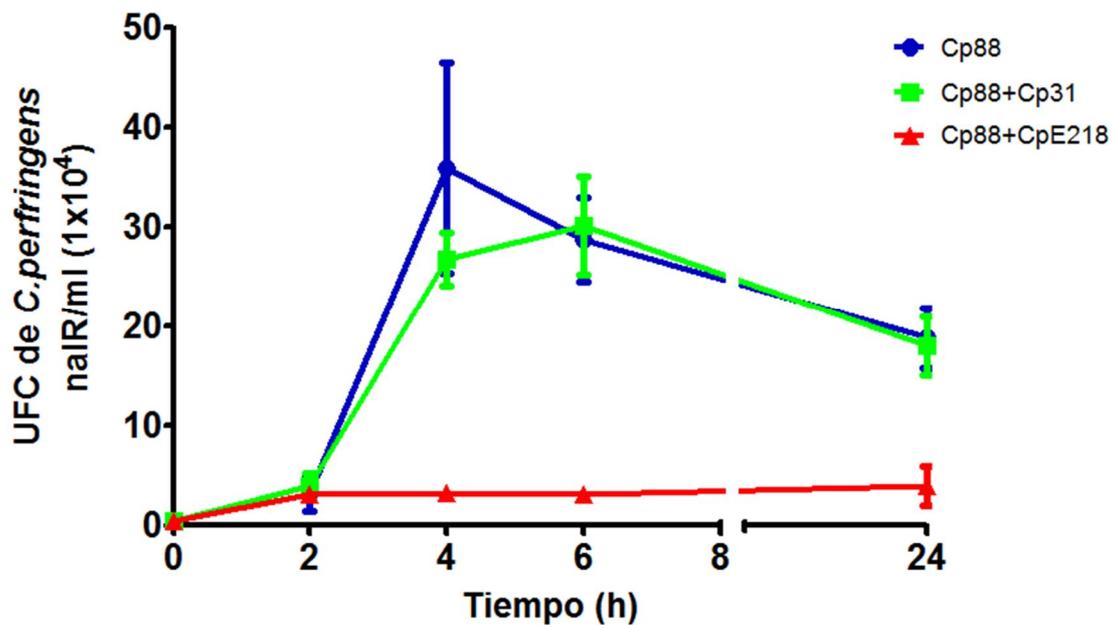


Figura 5.5 cont.: Resultados obtenidos en los ensayos de cocultivo en medio líquido. (B) Resultados del cocultivo de cepas de *C. perfringens* tipo A y tipo E. Ambas cepas fueron cultivadas bajo condiciones anaeróbicas. Se tomaron alícuotas cada 2 horas y se realizó recuento de UFC nalR. Se compararon los recuentos con monocultivos de la cepa Cp88, y cocultivos con la cepa Cp31 (tipo A sin actividad inhibitoria). Los resultados representan la media de tres experimentos independientes y las barras de error muestran el error estándar de la media.

5.3.7. Inhibición de la adherencia a células Caco-2:

La exclusión competitiva y el desplazamiento entre cepas se comprobó utilizando el modelo de infección utilizando células Caco-2 propuesto en el capítulo anterior. Luego de agregar ambas cepas al mismo tiempo en una relación 10:1, se observó una reducción en la capacidad de adherencia de la cepa tipo A determinada mediante recuento de UFC naIR, en comparación con los controles ($P < 0.0001$) (**Figura 5.6**). El agregado de una cepa sin efecto inhibitorio (Cp31) causó una leve reducción en la adherencia de la cepa Cp88, sin embargo esta diferencia no fue significativa ($P > 0.05$). En los ensayos de desplazamiento, inicialmente se agregaron bacterias del tipo A únicamente para permitir el pegado de las mismas, para luego agregar la cepa tipo E con el fin de desplazar las bacterias adheridas. En una primer etapa de estos ensayos se mantuvo la relación 10:1 utilizada en los ensayos anteriores. En este caso no fue posible observar un efecto significativo en los recuentos de UFC naIR ($P > 0.05$). Aumentando el número relativo de bacterias del tipo E, con una relación cepa inhibida/inhibidor 2:1, fue posible obtener una disminución significativa en los recuentos de UFC naIR ($P < 0.05$) (**Figura 5.7**). Ensayos similares con cepas tipo A comensales sensibles a ácido nalidixico sin actividad inhibitoria (Cp31) no tuvieron un efecto significativo en los recuentos de UFC naIR ($P > 0.05$).

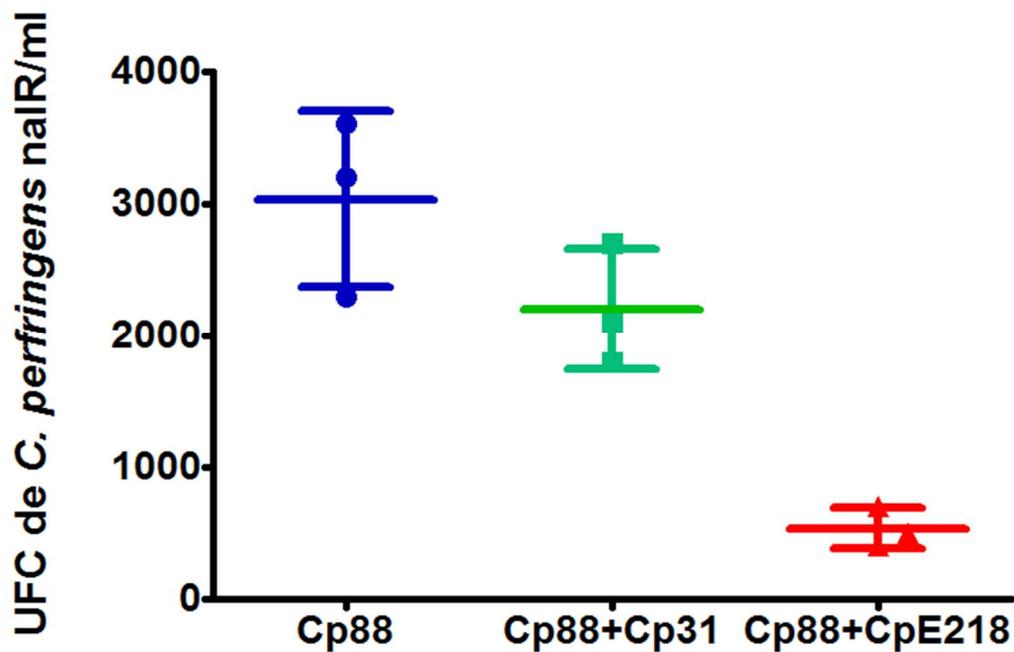


Figura 5.6: Resultados de los ensayos de inhibición de adherencia entre cepas de *C. perfringens* tipo A y tipo E. Monocapas de células Caco-2 fueron infectadas con mezclas de cepas de *C. perfringens*. Al final del ensayo se lisaron las monocapas y se realizaron recuentos de UFC naIR. Se compararon los recuentos con monocapas infectadas únicamente con la cepa Cp88 (control), con mezcla de la cepa Cp88 + Cp31, y mezcla de la cepa Cp88 + CpE218. Los resultados representan la media de tres experimentos independientes y las barras de error muestran el error estándar de la media.

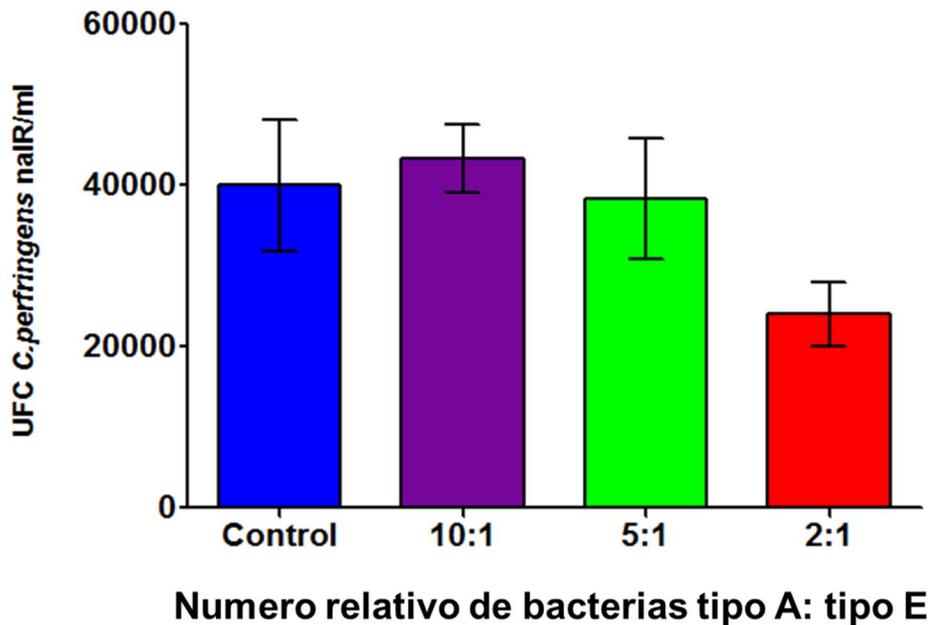


Figura 5.7: Resultados de los ensayos de desplazamiento entre cepas de *C. perfringens* tipo A y tipo E. Las bacterias pertenecientes al toxinotipo E son capaces de desplazar a las bacterias tipo A únicamente cuando se encuentran en alta proporción. Los números ubicados debajo de cada columna representan la relación entre el número de bacterias tipo A adheridas y el número de bacterias tipo E competidoras presentes en solución. Los resultados representan el promedio en los recuentos de UFC nalR (Cp88, tipo A) de 3 experimentos independientes, las barras de error indican la desviación estándar.

5.3.8. Inhibición de la colonización *in vivo*:

La inoculación de ratones por vía intragástrica con las cepas CpE218 y Cp88 por separado resultó en la colonización del 60% de los animales. El tiempo de excreción de *C. perfringens* fue variable entre individuos del mismo grupo, desde 6 horas hasta 24 horas. No se observaron diferencias significativas entre las tasas de colonización y el

tiempo de excreción de las cepas tipo A y tipo E ($P>0.05$). Ninguno de los ratones inoculados mostro signos de enfermedad durante el periodo de observación. Todos los animales del grupo control resultaron negativos a los recuentos de UFC de *C. perfringens* en materia fecal. En el grupo de ratones inoculados con una mezcla de las cepas tipo A y tipo E (relación 10:1), se observó una reducción significativa en la tasa de colonización de la cepa tipo A (60 % vs. 30 %). Además fue posible observar una reducción en el tiempo de excreción de las bacterias del toxinotipo A (18 horas vs. 2 horas; $P<0.005$).

5.4. Discusión:

Clostridium perfringens tipo E ha sido identificado como un patógeno asociado con enteritis hemorrágica y muerte súbita en los rumiantes. Aunque actualmente la patogenia de este toxinotipo se encuentra poco descrita, en los capítulos anteriores se presentaron resultados que sugieren que este toxinotipo es capaz de causar alteraciones en el intestino delgado de los mamíferos mediante la producción de toxina iota. Aunque en situaciones particulares estas alteraciones producen enfermedad intestinal y pueden llevar a la muerte del animal, en las primeras etapas de la colonización intestinal, representan una ventaja biológica para las cepas productoras de toxina iota. Los resultados del presente capítulo sugieren que la capacidad de inhibir el crecimiento de otras cepas de *C. perfringens* es otro mecanismo de importancia en la colonización intestinal, y posiblemente en el inicio de las enfermedades causadas por este toxinotipo.

Las comunidades microbianas complejas, como la microbiota intestinal, se componen de diversas especies, las cuales se encuentran en una intensa competencia por

recursos y un nicho ecológico determinado, para lo cual a menudo desarrollan diversas estrategias para predominar sobre el resto de los microorganismos integrantes. La importancia de la inhibición intraespecífica como una estrategia de virulencia por algunas cepas de *C. perfringens* ha sido propuesta en trabajos previos donde analizan cepas patógenas de seres humanos (Watson, 1985) y de aves (Leen Timbermont et al., 2009, 2014), de acuerdo a esto algunos autores proponen que este mecanismo es el principal responsable de la dominancia clonal observada en casos naturales de enteritis necrótica en aves (Chalmers et al., 2008). Otros trabajos informan acerca de la reproducción experimental de este mecanismo de competencia intraespecífica y dominancia clonal (Barbara et al., 2008; Leen Timbermont et al., 2009). Hasta el momento no se han realizado trabajos de este tipo analizando cepas patógenas de mamíferos. En el capítulo 2 de este trabajo, se propuso que los casos naturales de enteritis hemorrágica producidas por *C. perfringens* tipo E en bovinos se deben al crecimiento descontrolado de un único clon (Redondo et al., 2013). Los resultados aquí presentados muestran que las cepas del toxinotipo E producen una sustancia similar a una bacteriocina con actividad frente a otras cepas de *C. perfringens* lo que podría explicar la afirmación anterior.

Las bacteriocinas son las sustancias con actividad antimicrobiana más comunes entre las bacterias (Riley y Chavan, 2007). La razón principal para que las bacterias produzcan bacteriocinas es proporcionar al organismo productor una ventaja ecológica sobre sus competidores más cercanos (Riley y Wertz, 2002). Las bacteriocinas son toxinas proteicas que permiten a los organismos productores defender su hábitat contra invasores, y limitar el avance de las células vecinas (Kerr et al., 2002) o en el caso de microorganismos patógenos invadir una comunidad bacteriana previamente establecida, como puede ser en el caso aquí planteado la microbiota intestinal (Lenski y Riley, 2002; Riley y Gordon, 1999). Por lo tanto, la producción de bacteriocinas por *C. perfringens* tipo E (y posiblemente de otros toxinotipos patógenos) podría ser importante para mejorar su supervivencia en el ambiente intestinal, ya sea permitiendo la defensa de su espacio de otras cepas o invadir un ambiente establecido. Nuestros experimentos *in vitro* mostraron que *C. perfringens* de tipo E no

es capaz de desplazar a las células de tipo A establecidos, a no ser que se encuentre en cantidades muy altas, lo que sugiere que en condiciones fisiológicas estas bacteriocinas tendrían un papel defensivo en el ambiente intestinal.

Con el fin de entender cómo las cepas de tipo E podrían hacer frente a las cepas de tipo A en el ambiente intestinal, en este trabajo se inocularon distintos grupos de ratones con una mezcla de ambas cepas. La colonización intestinal por una cepa tipo A se redujo significativamente cuando las células vegetativas de esta cepa se administraron junto con una fracción menor (10:1) de las células del tipo E. Los resultados de los ensayos con ratones sugieren que el toxinotipo E tiene la capacidad de inhibir a otras cepas de *C. perfringens in vivo*. Sin embargo, en el modelo de coinfección, no fue posible recuperar *C. perfringens* tipo E ni tipo A, a partir del cultivo de muestras fecales o del contenido intestinal de estos ratones, lo que sugiere una aparente interacción competitiva negativa entre ambas cepas. En ambientes mixtos, no estructurados (como la luz intestinal) las bacterias que producen un bajo nivel de bacteriocinas poseen una ventaja selectiva y son capaces de superar a cepas fuertemente productoras de bacteriocinas (Majeed et al., 2013). A partir de nuestros resultados *in vitro*, es posible suponer que las bacterias del tipo E son fuertes productoras de bacteriocina con actividad contra la cepa tipo A sensible seleccionada. Una posible explicación para los resultados *in vivo* es que la fuerte actividad bacteriocinogénica de la cepa tipo E fuera suficiente para eliminar las células de tipo A, aunque a un elevado costo metabólico, esto sumado a la posibilidad de que la cantidad de bacterias tipo E administradas fuera relativamente baja. Bajo estas condiciones no fue posible que las células tipo E alcanzaran un nivel crítico necesario colonizar el ambiente intestinal.

En capítulos anteriores se mostró una relación clonal entre aislamientos de *C. perfringens* tipo E y se planteó que este toxinotipo fuera especialmente exitoso dentro de un nicho ecológico específico como puede ser el intestino de bovino (Jost et al., 2006; Redondo et al., 2013). Las propiedades adhesivas especializadas de *C.*

perfringens tipo E y otras especies del genero *Clostridium* a los enterocitos, presentadas y discutidas en el capítulo 4, junto con la síntesis de sustancias inhibitoras parecen ser una respuesta adaptativa a una variedad de factores presentes en un medio complejo y competitivo como es el entorno intestinal. Estas características facilitarían el desarrollo de poblaciones clónales, como probablemente ocurre en el caso de *C. perfringens* tipo E.

Discusión general
Conclusiones Finales
Direcciones futuras

Discusión general:

El trabajo aquí presentado se realizó en base a la hipótesis de que las cepas productoras de toxinas binarias de las especies *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile* representan un grupo de patógenos intestinales altamente especializados, capaces de afectar a bovinos de diferentes edades. A pesar de que existe alguna información publicada que muestra una prevalencia variable de *Clostridium* spp. productor de toxinas binarias en rodeos de bovinos de países del hemisferio norte, al momento de iniciar este trabajo no se contaba con datos referidos a la prevalencia de estos microorganismos en nuestro país, por lo que fue necesario incluir una primer etapa de aislamiento y caracterización de las cepas de *C. perfringens* y *C. difficile* presentes en establecimientos de la región pampeana. Trabajando bajo un estricto protocolo, no se obtuvieron aislamientos de *C. difficile*, lo que sugiere que este microorganismo no tiene una presencia importante en los rodeos de nuestro país y no es un patógeno de importancia en bovinos, al menos en las condiciones analizadas en esta tesis. La baja prevalencia de *C. difficile* en las poblaciones estudiadas se podría deber a (i) la ausencia de factores predisponentes considerados en casos de enfermedad en humanos, (ii) la presencia de factores protectores, o (iii) a interacciones a nivel de microbiota o presencia de patógenos compitiendo por un mismo nicho ecológico (ej. *C. perfringens* tipo E). En el futuro será necesario realizar nuevos trabajos con el fin de responder estos interrogantes. En el caso de *C. perfringens*, se obtuvieron aislamientos de animales sanos y enfermos de diferentes edades, en proporciones similares. Mediante estudios de toxinotipificación por PCR multiplex se demostró que la mayor parte de los aislamientos corresponden al toxinotipo A (genotipo *cpa+*), la frecuencia de aislamientos de este tipo de cepas fue similar en animales con signos de enfermedad digestiva y sanos. Esto dificulta la definición de este toxinotipo como un agente patógeno en bovinos, y resalta el carácter oportunista de este agente en la producción de enfermedades enterotóxicas.

La falta de asociaciones entre los aislamientos del toxinotipo A puede deberse a que las cepas patógenas poseen factores de virulencia no detectados con los sistemas de tipificación actuales, o a que el efecto de factores predisponentes determinados sea variable de acuerdo a características fenotípicas específicas de cada cepa. Entre los resultados obtenidos en esta primer etapa de aislamiento y caracterización de cepas, se destaca la identificación de cepas de *C. perfringens* tipo E, productor de toxina iota (toxina binaria). Según la bibliografía consultada, este es el primer reporte de enfermedad asociada a este toxinotipo en bovinos de nuestro país. A nivel mundial existen pocos reportes de enfermedades asociadas a este toxinotipo, situación que contribuye a la escasa comprensión de la patogenia de las infecciones por estas bacterias.

Estas cepas de *C. perfringens* tipo E obtenidas de bovinos de nuestro país pertenecen a un mismo complejo clonal, que a su vez es el mismo de la mayoría de las cepas del toxinotipo E aisladas en casos clínicos similares en América del Norte. La amplia distribución geográfica de este complejo clonal asociado a una enfermedad específica, como la enteritis hemorrágica, en una especie huésped determinada, como los bovinos, sugiere que este microorganismo se encuentra altamente adaptado a un nicho ecológico específico como es el intestino bovino. La capacidad de producir enfermedad en bovinos por parte de estas cepas se debería a la acción combinada de factores de virulencia codificados por genes presentes en plásmidos, junto con factores codificados por genes ubicados en el cromosoma. En base a este concepto se plantea que la virulencia de *C. perfringens* tipo E depende de la secreción de la toxina iota, junto a características fenotípicas complementarias de la bacteria.

El sistema de tipificación de cepas en base a las toxinas producidas es el más difundido actualmente para agrupar los aislamientos de *C. perfringens*. En base a este sistema las cepas tipo E se definen por la producción de toxina iota. Hasta el momento y pese a la falta de estudios que soporten esta afirmación, es ampliamente aceptado que esta toxina es responsable de las alteraciones observadas en casos naturales. En los

modelos de desafío utilizados en esta tesis y en la bibliografía disponible, el efecto letal sistémico de la toxina iota ocurre únicamente a dosis relativamente altas de la misma. Esto genera interrogantes acerca de la verdadera naturaleza de la enfermedad producida por *C. perfringens* tipo E, comúnmente denominada “enterotoxemia tipo E” o “enterotoxemia iota”. En cuanto a los efectos intestinales, el uso de ratones como especie modelo permitió determinar efectos enterotóxicos de la toxina iota luego del desafío por vía intragástrica e intrainestinal (asas intestinales ligadas). Mediante la inoculación intragástrica de toxina iota purificada se observó una inhibición parcial de la motilidad gastrointestinal, aunque en los animales desafiados por esta vía no se observaron de lesiones compatibles con cuadros de enteritis. El desafío por vía intrainestinal permitió observar cambios en la homeostasis de líquidos y reproducir las lesiones intestinales observadas en casos naturales de la enfermedad. Según lo observado en los ensayos *in vivo* aquí realizados, es necesaria una mayor concentración efectiva de toxina iota para lograr cambios en la permeabilidad intestinal, en comparación con la necesaria para producir efectos sobre la motilidad. Estos resultados permiten explicar los hallazgos de casos naturales de enteritis hemorrágica producida por *C. perfringens* tipo E. En primer instancia es necesario que *C. perfringens* tipo E se encuentre presente en el intestino, incluso como integrante de la microbiota normal, y ante ciertos cambios en el ambiente intestinal, se produce un sobrecrecimiento de estas bacterias acompañado por la producción de toxina iota, la cual es secretada durante la fase de crecimiento de este toxinotipo según los resultados de esta tesis. La presencia de esta toxina en la luz intestinal produce, inicialmente, cambios en la motilidad que favorece el crecimiento y acumulación de células vegetativas del tipo E, del mismo modo que favorece la producción y acumulación de más toxina iota. La acumulación de grandes niveles toxina iota en la luz intestinal llevarían a producir lesiones en el epitelio del tracto gastrointestinal, tal cual se observa en los casos naturales de enfermedad por *C. perfringens* tipo E.

El desarrollo de muchas enfermedades clostridiales intestinales se debe a la multiplicación de células vegetativas de *C. perfringens* en la luz intestinal por factores predisponentes, con la consiguiente producción de toxinas y desarrollo de lesiones. Sin embargo, existe evidencia de que algunas enfermedades intestinales asociadas a

determinadas cepas de *C. perfringens* son producidas por el pegado de las células a la mucosa gastrointestinal, lo cual podría ser factible en las enfermedades producidas por el toxinotipo E. Considerando la colonización intestinal por *C. perfringens* tipo E como el primer paso en la enfermedad producida por esta bacteria, y reconociendo que la enfermedad ocasionada por cepas del toxinotipo E pueda ser un evento accidental en el ciclo biológico de la bacteria, se realizaron estudios con el objetivo de definir un potencial rol biológico para la toxina iota, y su participación en la colonización del intestino de los mamíferos. Las primeras aproximaciones se realizaron utilizando un modelo *in vitro* en células Caco-2 y un modelo *in vivo* utilizando ratones. En los ensayos *in vitro* se observó que la toxina iota induce la formación de extensiones en la superficie de los enterocitos a las cuales se adhieren las células vegetativas de *C. perfringens* tipo E, de acuerdo a los resultados obtenidos comparando el efecto de la toxina iota sobre la adherencia de otras cepas de *C. perfringens*, es posible sugerir que estas extensiones son aprovechadas de manera diferencial por las bacterias pertenecientes al tipo E. Los resultados *in vivo* demostraron que las cepas tipo E poseen una mayor capacidad de colonización que las cepas tipo A, pero debido a la complejidad del medio intestinal no fue posible determinar el efecto individual de la toxina iota sobre la colonización. Además de la capacidad de adherencia diferencial relacionada con el efecto de la toxina iota, fue posible determinar que las cepas tipo E son capaces de inhibir a otras cepas de *C. perfringens*. En relación a esta observación, primero se determinó que esta capacidad dependía de un factor soluble presente en los sobrenadantes de cepas tipo E. Finalmente, fue posible purificar un péptido con acción antimicrobiana a partir de sobrenadantes de estas cepas, el cual demostró poseer un amplio espectro de inhibición contra diversas cepas de *C. perfringens* incluyendo cepas patógenas y comensales. Según los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*, se propone que esta inhibición intraespecífica, puede ser un mecanismo involucrado en la colonización intestinal, y posiblemente en la dominancia clonal observada en casos naturales de enteritis hemorrágica producida por *C. perfringens* tipo E, según se determinó con el análisis de MLST.

Estos resultados nos permiten completar un modelo de ciclo biológico/infección de cepas tipo E propuesto anteriormente. En un primer paso y luego de que bacterias tipo E alcancen la luz intestinal, el efecto de la toxina iota sobre la superficie del enterocito induce la formación de extensiones de la membrana sobre las que se adhieren en forma preferencial las células del toxinotipo E facilitando la colonización de la mucosa. Ante la presencia de células vegetativas de otros *C. perfringens* que puedan actuar como potenciales competidoras, la secreción de péptidos tipo bacteriocinas actuaría limitando la expansión de estas bacterias competidoras. Estas células de *C. perfringens* tipo E íntimamente adheridas al epitelio intestinal pueden permanecer en equilibrio, junto con otros componentes de la microbiota, hasta que la acción de un factor predisponente, como pueden ser cambios bruscos en la dieta u otras situaciones de estrés fisiológico, generan alteraciones en el ambiente intestinal que inducen un sobrecrecimiento de este grupo de cepas. Si las células bacterianas pegadas a la mucosa intestinal se multiplican y se mantienen pegadas, es probable que vayan produciendo cambios morfológicos en la mucosa, por medio de la acción de la toxina iota, que lleven a producir lesiones hemorrágicas, características de las enfermedades descritas por este toxinotipo E. Si este fuese el caso, es muy probable que no se acumulen suficientes niveles de toxina iota en el contenido intestinal, con lo cual la detección de toxinas en contenido intestinal sería dificultosa, particularmente por seroneutralización. Pero como se mencionó más arriba, si estas células bacterianas se desprenden y se multiplican rápidamente en el tracto intestinal y se acumula toxina iota en cantidades suficientes para causar daño en la mucosa, es probable que también se termine erosionando la mucosa intestinal. Estas dos alternativas no son excluyentes, pero los escasos datos e información disponible no permiten rechazar ninguna posibilidad.

Conclusiones finales:

1. *Clostridium perfringens* tipo E, productor de toxina iota (toxina binaria), produce enfermedad en bovinos de diferentes edades. El brote descrito en este trabajo es el primer reporte de enfermedad asociada a este toxinotipo en bovinos de nuestro país. La virulencia de este grupo de cepas depende de factores presentes en plásmidos y en el cromosoma.
2. La toxina iota produce una inhibición en la motilidad gastrointestinal e induce un incremento en la permeabilidad intestinal. De acuerdo a los resultados obtenidos estos mecanismos serían los responsables de las alteraciones observadas en casos naturales de enteritis hemorrágica por *C. perfringens* tipo E.
3. La producción de enfermedad intestinal es un evento accidental en el ciclo biológico de *C. perfringens* tipo E. La producción de toxina iota tiene un rol central en la colonización intestinal por *C. perfringens* tipo E, de acuerdo a los resultados presentados en este trabajo la toxina iota incrementa la adherencia de cepas tipo E al mismo tiempo que reduce la adherencia de otras cepas competidoras.
4. Las cepas de *C. perfringens* tipo E son capaces de producir péptidos con acción antibacteriana contra otras cepas de *C. perfringens* incluyendo cepas patógenas y comensales, los cuales contribuyen al mantenimiento de un nicho ecológico específico.

Direcciones futuras

Durante el desarrollo de este trabajo no se obtuvieron aislamientos de *C. difficile* a partir de muestras de diferentes sistemas ganaderos. Estos resultados no son concluyentes por lo que será necesario realizar nuevos trabajos, en los que se estudie el efecto de potenciales factores de riesgo o protectores que puedan estar presentes en los sistemas ganaderos de nuestro país. En el caso de *C. perfringens*, la amplia distribución del toxinotipo A, detectada en este trabajo y otros discutidos en el capítulo correspondiente, dificulta la definición de este toxinotipo como un agente patógeno y resalta el carácter oportunista de este agente en la producción de enfermedades enterotóxicas. En este momento se están realizando diferentes trabajos con el objetivo de determinar si esto se debe a que las cepas patógenas poseen factores de virulencia no descritos hasta el momento, o a que el efecto de factores predisponentes determinados sea variable de acuerdo a características fenotípicas específicas de cada cepa.

La capacidad de *C. perfringens* tipo E de producir enfermedad en bovinos se debe a la acción combinada de factores de virulencia, codificados por genes presentes en plásmidos, junto con factores codificados por genes ubicados en el cromosoma. Próximos trabajos serán orientados a explicar en detalle los factores de virulencia planteados en este trabajo (ej.: Bacteriocinas y mecanismos de regulación relacionados). Nuevos estudios de los genes presentes en plásmidos o en el cromosoma serán necesarios para identificar factores responsables del mantenimiento de plásmidos portadores de genes de toxina iota (*iA/iB*), o factores de virulencia no identificados hasta el momento.

La toxina iota es capaz de producir numerosos efectos a nivel intestinal y posiblemente a nivel sistémico. En el caso de los efectos sistémicos nuevos trabajos están siendo realizados con el fin de identificar que órganos se ven afectados, cuales son las alteraciones fisiopatológicas que produce la toxina iota y los potenciales mecanismos

involucrados. En relación a los efectos intestinales, nuevos estudios serán realizados con el fin de comprender en mayor detalle los fenómenos aquí descritos. En este trabajo se propuso que la toxina iota interviene en la colonización intestinal por parte de *C. perfringens* tipo E. Las próximas líneas de trabajos deberán ser orientadas a responder cuales son los potenciales receptores involucrados en la adherencia de *C. perfringens* y de qué manera la acción de la toxina iota induce cambios en la expresión y/o distribución sobre la células de estos receptores. Próximos trabajos relacionados con la regulación de la síntesis y secreción de toxina iota por células tipo E deberán ser realizados con el fin de explicar si posibles cambios en la ubicación de la bacteria respecto de los enterocitos puede desencadenar la aparición de las alteraciones descritas en casos de enteritis hemorrágica por tipo E.

A pesar de que el trabajo aquí presentado está enfocado en cepas de *C. perfringens* tipo E, los mecanismos de patogénesis propuestos pueden servir como punto de partida para explicar las alteraciones ocasionadas por otros toxinotipos de *C. perfringens* u otras especies de clostridios enterotóxicos, nuevos estudios deben ser realizados con el fin de extender estas afirmaciones.

Referencias:

Arroyo, L. G., Staempfli, H., & Weese, J. S. (2007). Molecular analysis of *Clostridium difficile* isolates recovered from horses with diarrhea. *Veterinary Microbiology*, *120*(1-2), 179–83. doi:10.1016/j.vetmic.2006.10.013

Arroyo, L. G., Weese, J. S., & Staempfli, H. R. (2004). Experimental *Clostridium difficile* enterocolitis in foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, *18*(5), 734–8.

Aspinall, S. T., & Hutchinson, D. N. (1992). New selective medium for isolating *Clostridium difficile* from faeces. *Journal of Clinical Pathology*, *45*(9), 812–814. doi:10.1136/jcp.45.9.812

Barbara, A. J., Trinh, H. T., Glock, R. D., & Glenn Songer, J. (2008). Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. *Veterinary Microbiology*, *126*(4), 377–82. doi:10.1016/j.vetmic.2007.07.019

Barbut, F. (2005). Clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains. *Journal of Medical Microbiology*, *54*(2), 181–185. doi:10.1099/jmm.0.45804-0

Barth, H., Aktories, K., Popoff, M. R., & Stiles, B. G. (2004). Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *68*(3), 373–402. doi:10.1128/MMBR.68.3.373

Bartlett, J. G. (1992). Antibiotic-Associated Diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*, *15*(4), 573–581. doi:10.1093/clind/15.4.573

Bartlett, J. G., Moon, N., Chang, T. W., Taylor, N., & Onderdonk, A. B. (1978). Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology*, *75*(5), 778–82.

Baskerville, M., Wood, M., & Seamer, J. H. (1980). *Clostridium perfringens* type E enterotoxaemia in rabbits. *Veterinary Record*, *107*(1), 18–19.

Bavananthasivam, J., Dassanayake, R. P., Kugadas, A., Shanthalingam, S., Call, D. R., Knowles, D. P., & Srikumaran, S. (2012). Proximity-dependent inhibition of growth of *Mannheimia haemolytica* by *Pasteurella multocida*. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(18), 6683–8. doi:10.1128/AEM.01119-12

Bidet, P., & Petit, J. (1999). Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiology Letters*, 175, 261–266.

Billington, S. J., Wieckowski, E. U., Sarker, M. R., Bueschel, D., Songer, J. G., & McClane, B. a. (1998). *Clostridium perfringens* type E animal enteritis isolates with highly conserved, silent enterotoxin gene sequences. *Infection and Immunity*, 66(9), 4531–6.

Borriello, S. P. (1995). Clostridial disease of the gut. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 20 Suppl 2, S242–50.

Borriello, S. P., Ketley, J. M., Mitchell, T. J., Barclay, F. E., Welch, A. R., Price, A. B., & Stephen, J. (1987). *Clostridium difficile*--a spectrum of virulence and analysis of putative virulence determinants in the hamster model of antibiotic-associated colitis. *Journal of Medical Microbiology*, 24(1), 53–64.

Borriello, S. P., Larson, H. E., Welch, A. R., Barclay, F., Stringer, M. F., & Bartholomew, B. A. (1984). Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: a possible cause of antibiotic-associated diarrhoea. *Lancet*, 1(8372), 305–7.

Bosworth, T. J. (1943). On a New Type of Toxin Produced by *Clostridium Welchii*. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 53, 245–255.

Briolat, V., & Reysset, G. (2002). Identification of the *Clostridium perfringens* genes involved in the adaptive response to oxidative stress. *Journal of Bacteriology*, 184(9), 2333–43.

Burns, T., Mathias, , JR, Carlson, G. M., Martin, J., & Shields, R. (1978). Effect of toxigenic *Escherichia coli* on myoelectric activity of small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 235(3), G311–315.

Cappuccio, J., Quiroga, M., Moredo, F., Canigia, L., Machuca M, Capponi, O., Perfumo, C. (2009). Neonatal piglets mesocolon edema and colitis due to *Clostridium difficile* infection: prevalence, clinical disease and pathological studies. ... *of Veterinary Pathology*, 2(1), 35–40.

Carman, R., & Borriello, S. (1989). Alternative animal models of *Clostridium spiroforme* mediated diarrhoea of rabbits. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2, 69–73.

Carter, G. P., Awad, M. M., Kelly, M. L., Rood, J. I., & Lyras, D. (2011). TcdB or not TcdB: a tale of two *Clostridium difficile* toxins. *Future Microbiology*, 6(2), 121–3. doi:10.2217/fmb.10.169

Caserta, J. a, Robertson, S. L., Saputo, J., Shrestha, A., McClane, B. a, & Uzal, F. a. (2011). Development and application of a mouse intestinal loop model to study the in vivo action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infection and Immunity*, 79(8), 3020–7. doi:10.1128/IAI.01342-10

Cervetto, J. L. (1996). [Antibiotic-induced diarrhea: recent findings about *Clostridium difficile*]. *Acta Gastroenterologica Latinoamericana*, 26(4), 251–4.

Chalmers, G., Bruce, H. L., Hunter, D. B., Parreira, V. R., Kulkarni, R. R., Jiang, Y.-F., ... Boerlin, P. (2008). Multilocus sequence typing analysis of *Clostridium perfringens* isolates from necrotic enteritis outbreaks in broiler chicken populations. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(12), 3957–64. doi:10.1128/JCM.01548-08

Chang, F. Y., Lee, S. D., Yeh, G. H., & Wang, P. S. (1994). Comparison of two orogastric feeding markers for measuring gastrointestinal motor functions in rats. *Pharmacology*, 49(3), 151–8.

Chen, X., Katchar, K., Goldsmith, J. D., Nanthakumar, N., Cheknis, A., Gerding, D. N., & Kelly, C. P. (2008). A mouse model of *Clostridium difficile*-associated disease. *Gastroenterology*, 135(6), 1984–92. doi:10.1053/j.gastro.2008.09.002

Costa, M. C., Reid-Smith, R., Gow, S., Hannon, S. J., Booker, C., Rousseau, J., Weese, J. S. (2012). Prevalence and molecular characterization of *Clostridium difficile* isolated from feedlot beef cattle upon arrival and mid-feeding period. *BMC Veterinary Research*, 8, 38. doi:10.1186/1746-6148-8-38

Curry, S. R., Muto, C. A., Schlackman, J. L., Pasculle, A. W., Shutt, K. A., Marsh, J. W., & Harrison, L. H. (2013). Use of multilocus variable number of tandem repeats analysis genotyping to determine the role of asymptomatic carriers in *Clostridium difficile* transmission. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57(8), 1094–102. doi:10.1093/cid/cit475

Dassanayake, R. P., Call, D. R., Sawant, A. a, Casavant, N. C., Weiser, G. C., Knowles, D. P., & Srikumaran, S. (2010). *Bibersteinia trehalosi* inhibits the growth of *Mannheimia haemolytica* by a proximity-dependent mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(4), 1008–13. doi:10.1128/AEM.02086-09

Dennison, A. C., Van Metre, D. C., Morley, P. S., Callan, R. J., Plampin, E. C., & Ellis, R. P. (2005). Comparison of the odds of isolation, genotypes, and in vivo production of major toxins by *Clostridium perfringens* obtained from the gastrointestinal tract of dairy cows with hemorrhagic bowel syndrome or left-displaced abomasum. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(1), 132–8.

Diab, S. S., Songer, J. G., & Uzal, F. A. (2013). *Clostridium difficile* infection in horses: A review. *Veterinary Microbiology*, null(null). doi:10.1016/j.vetmic.2013.03.032

Douce, G., & Goulding, D. (2010). Refinement of the hamster model of *Clostridium difficile* disease. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 646, 215–27. doi:10.1007/978-1-60327-365-7_14

Elizondo, A. M., Mercado, E. C., Rabinovitz, B. C., & Fernandez Miyakawa, M. E. (2010). Effect of tannins on the in vitro growth of *Clostridium perfringens*. *Veterinary Microbiology*, 145(3-4), 308–14. doi:10.1016/j.vetmic.2010.04.003

Engström, B. E. (2003). Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Veterinary Microbiology*, 94(3), 225–235. doi:10.1016/S0378-1135(03)00106-8

Fawley, W. N., Wilcox, M. H., Klaassen, C. H. W., de Valk-Van Haren, H. A., & Horrevorts, A. M. (2002). Pulsed-Field Gel Electrophoresis Can Yield DNA Fingerprints of Degradation-Susceptible *Clostridium difficile* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), 3546–3547. doi:10.1128/JCM.40.9.3546-3547.2002

Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P., & Spratt, B. G. (2004). eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *Journal of Bacteriology*, 186(5), 1518–1530. doi:10.1128/JB.186.5.1518-1530.2004

Fernandez Miyakawa, M. E., Fisher, D. J., Poon, R., Sayeed, S., Adams, V., Rood, J. I., Uzal, F. A. (2007). Both epsilon-toxin and beta-toxin are important for the lethal properties of *Clostridium perfringens* type B isolates in the mouse intravenous injection model. *Infection and Immunity*, 75(3), 1443–52. doi:10.1128/IAI.01672-06

Fernandez Miyakawa, M. E., Ibarra, C. a., & Uzal, F. a. (2003). In vitro effects of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin on water and ion transport in ovine and caprine intestine. *Anaerobe*, 9, 145–149. doi:10.1016/S1075-9964(03)00069-6

Fernandez Miyakawa, M. E., Jost, B. H., Billington, S. J., & Uzal, F. A. (2008). Lethal effects of *Clostridium perfringens* epsilon toxin are potentiated by alpha and perfringolysin-O toxins in a mouse model. *Veterinary Microbiology*, 127(3-4), 379–85. doi:10.1016/j.vetmic.2007.09.013

Fernandez Miyakawa, M. E., Marcellino, R., & Uzal, F. a. (2007). *Clostridium Perfringens* type A Toxin Production in 3 Commonly Used Culture Media. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(2), 184–186. doi:10.1177/104063870701900208

Fernandez Miyakawa, M. E., Sayeed, S., Fisher, D. J., Poon, R., Adams, V., Rood, J. I., Uzal, F. a. (2007). Development and application of an oral challenge mouse model for studying *Clostridium perfringens* type D infection. *Infection and Immunity*, 75(9), 4282–8. doi:10.1128/IAI.00562-07

Fernandez Miyakawa, M. E., & Uzal, F. A. (2005). Morphologic and physiologic changes induced by *Clostridium perfringens* type A alpha toxin in the intestine of sheep. *American Journal of Veterinary Research*, 66(2), 251–5.

Ferrarezi, M. C., Cardoso, T. C., & Dutra, I. S. (2008). Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from calves with neonatal diarrhea. *Anaerobe*, 14(6), 328–31. doi:10.1016/j.anaerobe.2008.12.001

Field, M. (2003). Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(7), 931–43. doi:10.1172/JCI18326

Filho, E. J. F., Carvalho, a U., Assis, R. a, Lobato, F. C. F., Rachid, M. a, Carvalho, a a, ... Uzal, F. a. (2009). Clinicopathologic features of experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in cattle. *Veterinary Pathology*, 46(6), 1213–20. doi:10.1354/vp.08-VP-0304-U-FL

Flores-Díaz, M., & Alape-Girón, A. (2003). Role of *Clostridium perfringens* phospholipase C in the pathogenesis of gas gangrene. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 42(8), 979–86. doi:10.1016/j.toxicon.2003.11.013

Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, Melo-Cristino J, Ramirez M, Carriço JA (2012) PHYLOViZ: Phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. *BMC Bioinformatics*, 13: 87.

Freeman, J., Bauer, M. P., Baines, S. D., Corver, J., Fawley, W. N., Goorhuis, B., Wilcox, M. H. (2010). The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(3), 529–49. doi:10.1128/CMR.00082-09

Garnier, T., & Cole, S. T. (1986). Characterization of a Bacteriocinogenic Plasmid from *Clostridium perfringens* and Molecular Genetic Analysis of the. *Journal of Bacteriology*, 168(3), 1189–1196.

George, W. L., Sutter, V. L., Citron, D., & Finegold, S. M. (1979). Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.*, 9(2), 214–219.

Gerding, D. N., Johnson, S., Rupnik, M., & Aktories, K. (2014). *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes*, 5(1), 15–27. doi:10.4161/gmic.26854

Geric, B. (2004). Distribution of *Clostridium difficile* variant toxinotypes and strains with binary toxin genes among clinical isolates in an American hospital. *Journal of Medical Microbiology*, 53(9), 887–894. doi:10.1099/jmm.0.45610-0

Geric, B., Carman, R. J., Rupnik, M., Genheimer, C. W., Sambol, S. P., Lyerly, D. M., Johnson, S. (2006). Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. *The Journal of Infectious Diseases*, 193(8), 1143–50. doi:10.1086/501368

Gibert, M., Petit, L., Raffestin, S., Okabe, A., & Popoff, M. R. (2000). *Clostridium perfringens* iota-toxin requires activation of both binding and enzymatic components for cytopathic activity. *Infection and Immunity*, 68(7), 3848–53.

Goldstein, J., Morris, W. E., Loidl, C. F., Tironi-Farinati, C., McClane, B. A., Uzal, F. A., & Fernandez Miyakawa, M. E. (2009). *Clostridium perfringens* epsilon toxin increases the small intestinal permeability in mice and rats. *PloS One*, 4(9), e7065. doi:10.1371/journal.pone.0007065

Goncalves, C., Decre, D., Barbut, F., Burghoffer, B., & Petit, J.-C. (2004). Prevalence and Characterization of a Binary Toxin (Actin-Specific ADP-Ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 1933–1939. doi:10.1128/JCM.42.5.1933-1939.2004

Goossens, E., Verherstraeten, S., Timbermont, L., Valgaeren, B. R., Pardon, B., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F. (2014). *Clostridium perfringens* strains from bovine enterotoxemia cases are not superior in in vitro production of alpha toxin, perfringolysin O and proteolytic enzymes. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 32. doi:10.1186/1746-6148-10-32

Gui, L., Subramony, C., Fratkin, J., & Hughson, M. D. (2002). Fatal enteritis necroticans (pigbel) in a diabetic adult. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 15(1), 66–70. doi:10.1038/modpathol.3880491

Hammit, M. C., Bueschel, D. M., Keel, M. K., Glock, R. D., Cuneo, P., DeYoung, D. W., Songer, J. G. (2008). A possible role for *Clostridium difficile* in the etiology of calf enteritis. *Veterinary Microbiology*, 127(3-4), 343–52. doi:10.1016/j.vetmic.2007.09.002

Harkness, J. M., Li, J., & McClane, B. A. (2012). Identification of a lambda toxin-negative *Clostridium perfringens* strain that processes and activates epsilon prototoxin intracellularly. *Anaerobe*, 18(5), 546–52. doi:10.1016/j.anaerobe.2012.09.001

Hatheway, C. L. (1990). Toxigenic clostridia. *Clinical Microbiology Reviews*, 3(1), 66–98.

Hilger, H., Pust, S., von Figura, G., Kaiser, E., Stiles, B. G., Popoff, M. R., & Barth, H. (2009). The long-lived nature of *clostridium perfringens* iota toxin in mammalian cells induces delayed apoptosis. *Infection and Immunity*, 77(12), 5593–601. doi:10.1128/IAI.00710-09

Oldfield IV, E. C. O., Oldfield III, E. C. O., & Johnson, D. a. (2014). Clinical update for the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infection. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 5(1), 1–26. doi:10.4292/wjgpt.v5.i1.1

Jolley, K. A., Feil, E. J., Chan, M.-S., & Maiden, M. C. J. (2001). Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics*, 17(12), 1230–1231. doi:10.1093/bioinformatics/17.12.1230

Jones, R. L. (1989). Diagnostic procedures for isolation and characterization of *Clostridium difficile* associated with enterocolitis in foals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 1(1), 84–6.

Jost, B. H., Billington, S. J., Trinh, H. T., Bueschel, D. M., & Songer, J. G. (2005). Atypical *cpb2* genes, encoding beta2-toxin in *Clostridium perfringens* isolates of nonporcine origin. *Infection and Immunity*, 73(1), 652–6. doi:10.1128/IAI.73.1.652-656.2005

Jost, B. H., Trinh, H., & Songer, J. G. (2006). Clonal relationships among *Clostridium perfringens* of porcine origin as determined by multilocus sequence typing. *Veterinary Microbiology*, *116*, 158–165. doi:10.1016/j.vetmic.2006.03.025

Katayama, S., Tagomori, M., Morita, N., Yamasaki, T., Nariya, H., Okada, M., Hitsumoto, Y. (2014). Determination of the *Clostridium perfringens*-binding site on fibronectin. *Anaerobe*, (November), 1–8. doi:10.1016/j.anaerobe.2014.11.007

Keel, M. K., & Songer, J. G. (2006). The comparative pathology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Veterinary Pathology*, *43*(3), 225–40. doi:10.1354/vp.43-3-225

Kerr, B., Riley, M. A., Feldman, M. W., & Bohannan, B. J. M. (2002). Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. *Nature*, *418*(6894), 171–4. doi:10.1038/nature00823

Keyburn, A. L., Boyce, J. D., Vaz, P., Bannam, T. L., Ford, M. E., Parker, D., Moore, R. J. (2008). NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathogens*, *4*(2), e26. doi:10.1371/journal.ppat.0040026

Kim, H.-Y., Byun, J.-W., Roh, I.-S., Bae, Y.-C., Lee, M.-H., Kim, B., Jung, B. Y. (2013). First isolation of *Clostridium perfringens* type E from a goat with diarrhea. *Anaerobe* (Vol. 22, pp. 141–143).

Knetsch, C. W., Bakker, D., de Boer, R. F., Sanders, I., Hofs, S., Kooistra-Smid, A. M. D., Kuijper, E. J. (2011). Comparison of real-time PCR techniques to cytotoxigenic culture methods for diagnosing *Clostridium difficile* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, *49*(1), 227–31. doi:10.1128/JCM.01743-10

Kreft, B., Dalhoff, K., & Sack, K. (2000). [Necrotizing enterocolitis: a historical and current review]. *Medizinische Klinik (Munich, Germany: 1983)*, *95*(8), 435–41.

Kuijper, E. J., & van Dissel, J. T. (2008). Spectrum of *Clostridium difficile* infections outside health care facilities. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Medicale Canadienne*, *179*(8), 747–8. doi:10.1503/cmaj.081211

Lebrun, M., Mainil, J. G., & Linden, a. (2010). Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens*: description, diagnosis and prophylaxis. *The Veterinary Record*, *167*(1), 13–22. doi:10.1136/vr.b4859

Lemee, L., Dhalluin, A., Pestel-Caron, M., Lemeland, J.-F., & Pons, J.-L. (2004). Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(6), 2609–17. doi:10.1128/JCM.42.6.2609-2617.2004

Lenski, R. E., & Riley, M. A. (2002). Chemical warfare from an ecological perspective. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(2), 556–8. doi:10.1073/pnas.022641999

Levett, P. N. (1985). Effect of antibiotic concentration in a selective medium on the isolation of *Clostridium difficile* from faecal specimens. *Journal of Clinical Pathology*, 38(2), 233–4.

Li, J., & McClane, B. a. (2006a). Comparative effects of osmotic, sodium nitrite-induced, and pH-induced stress on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying chromosomal or plasmid-borne enterotoxin genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7620–5. doi:10.1128/AEM.01911-06

Li, J., & McClane, B. a. (2006b). Further comparison of temperature effects on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying a chromosomal or plasmid-borne enterotoxin gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4561–8. doi:10.1128/AEM.00177-06

Li, J., & McClane, B. a. (2014). Contributions of NanI Sialidase to Caco-2 Cell Adherence by *Clostridium perfringens* Type A and C Human Intestinal Disease Strains. *Infection and immunity*. doi:10.1128/IAI.02322-14

Li, J., Miyamoto, K., & McClane, B. a. (2007). Comparison of virulence plasmids among *Clostridium perfringens* type E isolates. *Infection and Immunity*, 75(4), 1811–9. doi:10.1128/IAI.01981-06

Long, J. R. (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. Revue Canadienne de Médecine Comparée*, 37(3), 302–8.

Lopardo, G., Morfin-Otero, R., Moran-Vazquez, I. I., Noriega, F., Zambrano, B., Luxemburger, C., Rivas, E. E. (2014). Epidemiology of *Clostridium difficile*: a hospital-based descriptive study in Argentina and Mexico. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. doi:10.1016/j.bjid.2014.07.004

Losada-Eaton, D. M., & Fernandez Miyakawa, M. E. (2010). *Clostridium perfringens* epsilon toxin inhibits the gastrointestinal transit in mice. *Research in Veterinary Science*, 89(3), 404–8. doi:10.1016/j.rvsc.2010.04.006

Losada-Eaton, D. M., Uzal, F. a, & Fernandez Miyakawa, M. E. (2008). *Clostridium perfringens* epsilon toxin is absorbed from different intestinal segments of mice. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 51(7), 1207–13. doi:10.1016/j.toxicon.2008.02.008

Ma, M., Li, J., & McClane, B. A. (2012). Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* isolates from Darmbrand cases in post-World War II Germany. *Infection and Immunity*, 80(12), 4354–63. doi:10.1128/IAI.00818-12

Mahony, D. E. (1974). Bacteriocin susceptibility of *Clostridium perfringens*: a provisional typing schema. *Applied Microbiology*, 28(2), 172–6.

Majeed, H., Lampert, A., Ghazaryan, L., & Gillor, O. (2013). The weak shall inherit: bacteriocin-mediated interactions in bacterial populations. *PloS One*, *8*(5), e63837. doi:10.1371/journal.pone.0063837

Manteca, C., Daube, G., Jauniaux, T., Linden, A., Pirson, V., Detilleux, J., Mainil, J. . (2002). A role for the *Clostridium perfringens* β 2 toxin in bovine enterotoxaemia? *Veterinary Microbiology*, *86*(3), 191–202. doi:10.1016/S0378-1135(02)00008-1

Marler, L. M., Siders, J. A., Wolters, L. C., Pettigrew, Y., Skitt, B. L., & Allen, S. D. (1992). Comparison of five cultural procedures for isolation of *Clostridium difficile* from stools. *J. Clin. Microbiol.*, *30*(2), 514–516.

Marshall, R. (1965). Rapid technique for the enumeration of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology*, *13*(4), 559–563.

Martin, T. G., & Smyth, J. a. (2010). The ability of disease and non-disease producing strains of *Clostridium perfringens* from chickens to adhere to extracellular matrix molecules and Caco-2 cells. *Anaerobe*, *16*(5), 533–9. doi:10.1016/j.anaerobe.2010.07.003

Mathias, J. R., Carlson, G. M., DiMarino, A. J., Bertiger, G., Morton, H. E., & Cohen, S. (1976). Intestinal myoelectric activity in response to live *Vibrio cholerae* and cholera enterotoxin. *The Journal of Clinical Investigation*, *58*(1), 91–6. doi:10.1172/JCI108464

Mathias, J. R., Nogueira, J., Martin, J. L., Carlson, G. M., & Giannella, R. A. (1982). *Escherichia coli* heat-stable toxin: its effect on motility of the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *242*(4), G360–363.

McClane, B. A., Uzal, F. A., Fernandez Miyakawa, M. E., Lyerly, D. M., & Wilkins, T. D. (2006). *The enterotoxic clostridia*. (M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt, Eds.) (pp. 698–752). New York, NY: Springer US. doi:10.1007/0-387-30744-3

McClung, L. S. (1945). Human food poisoning due to growth of *Clostridium perfringens* (*C. welchii*) in freshly cooked chicken. *Journal of Bacteriology*, *50*(2), 229–231.

McDonald, L. C., Killgore, G. E., Thompson, A., Sc, M. M., Johnson, S., & Gerding, D. N. (2005). An Epidemic, Toxin Gene –Variant Strain of *Clostridium difficile*. *New England Journal*, 2433–2441.

McDonel, J. L. (1986). Toxins of *Clostridium perfringens* types A, B, C, D and E. *Pharmacology of bacterial toxins*, 477-517.

Meer, R. R., & Songer, J. G. (1997). Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *American Journal of Veterinary Research*, *58*(7), 702–5.

Metcalf, D. S., & Weese, J. S. (2011). Binary toxin locus analysis in *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology*, 60(Pt 8), 1137–45. doi:10.1099/jmm.0.028498-0

Meyer-Kawohl, R., & Bockemühl, J. (1986a). [*Clostridium difficile*-induced enterocolitis: pathogenesis, clinical course, epidemiology and laboratory diagnosis]. *Immunität Und Infektion*, 14(2), 63–7.

Meyer-Kawohl, R., & Bockemühl, J. (1986b). [*Clostridium difficile*-induced enterocolitis: pathogenesis, clinical course, epidemiology and laboratory diagnosis]. *Immunität Und Infektion*, 14(2), 63–7.

Mihelc, V. A., Duncan, C. L., & Chambliss, G. H. (1978). Characterization of a Bacteriocinogenic Plasmid in *Clostridium perfringens* CW55. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. doi:10.1128/AAC.14.5.771.Updated

Mittelstadt, S. W., Hemenway, C. L., & Spruell, R. D. (2005). Effects of fasting on evaluation of gastrointestinal transit with charcoal meal. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 52(1), 154–8. doi:10.1016/j.vascn.2005.04.017

Miyakawa, M. E. F., & Uzal, F. a. (2003). The early effects of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in ligated intestinal loops of goats and sheep. *Veterinary Research Communications*, 27, 231–241. doi:10.1023/A:1023348708599

Miyamoto, K., Yumine, N., Mimura, K., Nagahama, M., Li, J., McClane, B. a, & Akimoto, S. (2011). Identification of novel *Clostridium perfringens* type E strains that carry an iota toxin plasmid with a functional enterotoxin gene. *PLoS One*, 6(5), e20376. doi:10.1371/journal.pone.0020376

Miyashiro, S., Baldassi, L., & Nassar, A. (2009). Genotyping of *Clostridium perfringens* associated with sudden death in cattle. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 15, 491–497.

Morris, W. E., & Fernandez Miyakawa, M. E. (2009). Toxinas de *Clostridium perfringens*. *Revista Argentina de Microbiologia*, 41, 251–260.

Nagahama, M., Sakaguchi, Y., Kobayashi, K., Ochi, S., & Sakurai, J. (2000). Characterization of the Enzymatic Component of *Clostridium perfringens* Iota-Toxin. *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2096–2103. doi:10.1128/JB.182.8.2096-2103.2000

Nagahama, M., Umezaki, M., Oda, M., Kobayashi, K., Tone, S., Suda, T., ... Sakurai, J. (2011). *Clostridium perfringens* iota-toxin b induces rapid cell necrosis. *Infection and Immunity*, 79(11), 4353–60. doi:10.1128/IAI.05677-11

Nagahama, M., & Yamaguchi, A. (2004). Binding and internalization of *Clostridium perfringens* iota-toxin in lipid rafts. *Infection and Immunity*, 72(6), 3267–3275. doi:10.1128/IAI.72.6.3267

Nauerby, B. (2003). Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Veterinary Microbiology*, *94*(3), 257–266. doi:10.1016/S0378-1135(03)00118-4

Navaneethan, U. (2010). *Clostridium difficile* infection and inflammatory bowel disease: Understanding the evolving relationship. *World Journal of Gastroenterology*, *16*(39), 4892. doi:10.3748/wjg.v16.i39.4892

Norén, T., Alriksson, I., Andersson, J., Akerlund, T., & Unemo, M. (2011). Rapid and sensitive loop-mediated isothermal amplification test for *Clostridium difficile* detection challenges cytotoxin B cell test and culture as gold standard. *Journal of Clinical Microbiology*, *49*(2), 710–1. doi:10.1128/JCM.01824-10

Nowell, V. J., Kropinski, A. M., Songer, J. G., MacInnes, J. I., Parreira, V. R., & Prescott, J. F. (2012). Genome sequencing and analysis of a type A *Clostridium perfringens* isolate from a case of bovine clostridial abomasitis. *PloS One*, *7*(3), e32271. doi:10.1371/journal.pone.0032271

Odeón, A. C. 2001. Diarrea neonatal de los terneros; etiopatogenia, tratamiento y control. www.produccion-animal.com.ar

O'Neill, G., Ogunisola, F., Brazier, J., & Duerden, B. (1996). Modification of a PCR Ribotyping Method for Application as a Routine Typing Scheme for *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, 205–209.

Ohishi, I., Iwasaki, M., & Sakaguchi, G. (1980). Purification and characterization of two components of botulinum C2 toxin. *Infect. Immun.*, *30*(3), 668–673.

Paltansing, S., van den Berg, R. J., Guseinova, R. a, Visser, C. E., van der Vorm, E. R., & Kuijper, E. J. (2007). Characteristics and incidence of *Clostridium difficile*-associated disease in The Netherlands, 2005. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *13*(11), 1058–64. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01793.x

Papatheodorou, P., Carette, J. E., Bell, G. W., Schwan, C., Guttenberg, G., Brummelkamp, T. R., & Aktories, K. (2011). Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is the host receptor for the binary toxin *Clostridium difficile* transferase (CDT). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(39), 16422–7. doi:10.1073/pnas.1109772108

Papatheodorou, P., Wilczek, C., Nölke, T., Guttenberg, G., Hornuss, D., Schwan, C., & Aktories, K. (2012). Identification of the cellular receptor of *Clostridium* spiroforme toxin. *Infection and Immunity*, *80*(4), 1418–23. doi:10.1128/IAI.06378-11

Parma, Y. R., Chacana, P. A., Rogé, A., Kahl, A., Cangelosi, A., Geoghegan, P., Fernandez Miyakawa, M. E. (2011). Antibodies anti-Shiga toxin 2 B subunit from chicken egg yolk: isolation, purification and neutralization efficacy. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, *58*(4), 380–8. doi:10.1016/j.toxicon.2011.07.009

Parreño V. 2008. Diarrea neonatal bovina: Protegerlos desde la panza.
www.produccion-animal.com.ar

Perelle, S., Gibert, M., Boquet, P., & Popoff, M. R. (1995). Characterization of *Clostridium perfringens* iota-toxin genes and expression in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 63(12), 4967.

Petit, L., Gibert, M., & Popoff, M. R. (1999). *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends in Microbiology*, 7(3), 104–10.

Petrillo, T. M., Beck-Sagué, C. M., Songer, J. G., Abramowsky, C., Fortenberry, J. D., Meacham, L., Nesheim, S. R. (2000). Enteritis necroticans (pigbel) in a diabetic child. *The New England Journal of Medicine*, 342(17), 1250–3. doi:10.1056/NEJM200004273421704

Philippe, V. a, Méndez, M. B., Huang, I.-H., Orsaria, L. M., Sarker, M. R., & Grau, R. R. (2006). Inorganic phosphate induces spore morphogenesis and enterotoxin production in the intestinal pathogen *Clostridium perfringens*. *Infection and Immunity*, 74(6), 3651–6. doi:10.1128/IAI.02090-05

Pirs, T., Ocepek, M., & Rupnik, M. (2008). Isolation of *Clostridium difficile* from food animals in Slovenia. *Journal of Medical Microbiology*, 57(Pt 6), 790–2. doi:10.1099/jmm.0.47669-0

Popescu, F., Wyder, M., Gurtner, C., Frey, J., Cooke, R. A., Greenhill, A. R., & Posthaus, H. (2011). Susceptibility of primary human endothelial cells to *C. perfringens* beta-toxin suggesting similar pathogenesis in human and porcine necrotizing enteritis. *Veterinary Microbiology*, 153(1-2), 173–7. doi:10.1016/j.vetmic.2011.02.017

Popoff, M. R., Milward, F. W., Bancillon, B., & Boquet, P. (1989). Purification of the *Clostridium* spiroforme binary toxin and activity of the toxin on HEp-2 cells. *Infect. Immun.*, 57(8), 2462–2469.

Redondo, L. M., Farber, M., Venzano, A., Jost, B. H., Parma, Y. R., & Fernandez Miyakawa, M. E. (2013). Sudden death syndrome in adult cows associated with *Clostridium perfringens* type E. *Anaerobe*. doi:10.1016/j.anaerobe.2013.01.001

Riley, M. A., & Chavan, M. A. (2007). *Bacteriocins: Ecology and Evolution* (pp. 45–50). Berlin; New York: Springer US.

Riley, M. A., & Gordon, D. M. (1999). The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology*, 7(3), 129–33.

Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology*, 56, 117–37. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.161024

Rodriguez-Palacios, A., Staempfli, H. R., Duffield, T., & Weese, J. S. (2007). Clostridium difficile in retail ground meat, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 13(3), 485–7. doi:10.3201/eid1303.060988

Rodriguez-palacios, A., Stämpfli, H. R., Duffield, T., Peregrine, A. S., Trotz-williams, L. A., Arroyo, L. G., Weese, J. S. (2006). Clostridium difficile PCR Ribotypes in Calves , Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 12(11).

Rodriguez-Palacios, A., Stämpfli, H. R., Stalker, M., Duffield, T., & Weese, J. S. (2007). *Natural and experimental infection of neonatal calves with Clostridium difficile. Veterinary Microbiology* (Vol. 124, pp. 166–172).

Rumah, K. R., Linden, J., Fischetti, V. A., & Vartanian, T. (2013). Isolation of Clostridium perfringens type B in an individual at first clinical presentation of multiple sclerosis provides clues for environmental triggers of the disease. *PLoS One*, 8(10), e76359. doi:10.1371/journal.pone.0076359

Rupnik, M., Grabnar, M., & Geric, B. (2003). Binary toxin producing Clostridium difficile strains. *Anaerobe*, 9(6), 289–294.

Sawires, Y. S., & Songer, J. G. (2005). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for strain typing of Clostridium perfringens. *Anaerobe*, 11(5), 262–72. doi:10.1016/j.anaerobe.2005.03.004

Sayeed, S., Fernandez Miyakawa, M. E., Fisher, D. J., Adams, V., Poon, R., Rood, J. I., McClane, B. A. (2005). Epsilon-toxin is required for most Clostridium perfringens type D vegetative culture supernatants to cause lethality in the mouse intravenous injection model. *Infection and Immunity*, 73(11), 7413–21. doi:10.1128/IAI.73.11.7413-7421.2005

Sayeed, S., Uzal, F. A., Fisher, D. J., Saputo, J., Vidal, J. E., Chen, Y., McClane, B. A. (2008). Beta toxin is essential for the intestinal virulence of Clostridium perfringens type C disease isolate CN3685 in a rabbit ileal loop model. *Molecular Microbiology*, 67(1), 15–30. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06007.x

Schalch, B., Bader, L., Schau, H.-P., Bergmann, R., Rometsch, A., Maydl, G., & Kessler, S. (2003). Molecular Typing of Clostridium perfringens from a Food-Borne Disease Outbreak in a Nursing Home: Ribotyping versus Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2), 892–895. doi:10.1128/JCM.41.2.892-895.2003

Schering, B., Barmann, M., Chhatwal, G. S., Geipel, U., & Aktories, K. (1988). ADP-ribosylation of skeletal muscle and non-muscle actin by Clostridium perfringens iota toxin. *European Journal of Biochemistry*, 171(1-2), 225–229. doi:10.1111/j.1432-1033.1988.tb13780.x

Schwan, C., Kruppke, A. S., Nölke, T., Schumacher, L., Koch-Nolte, F., Kudryashev, M., Aktories, K. (2014). Clostridium difficile toxin CDT hijacks microtubule organization and reroutes vesicle traffic to increase pathogen adherence. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 111(6), 2313–8.
doi:10.1073/pnas.1311589111

Schwan, C., Stecher, B., Tzivelekidis, T., van Ham, M., Rohde, M., Hardt, W.-D., Aktories, K. (2009). Clostridium difficile toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathogens*, 5(10), e1000626. doi:10.1371/journal.ppat.1000626

Simpson, L. L., Stiles, B. G., Zepeda, H. H., & Wilkins, T. D. (1987). Molecular basis for the pathological actions of Clostridium perfringens iota toxin. *Infection and Immunity*, 55(1), 118–22.

Sipos, W., Fischer, L., Schindler, M., & Schmoll, F. (2003). Genotyping of Clostridium perfringens isolated from domestic and exotic ruminants and swine. *Journal of Veterinary Medicine, B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 50(7), 360–2.

Sjogren, R. W., Sherman, P. M., & Boedeker, E. C. (1989). Altered intestinal motility precedes diarrhea during Escherichia coli enteric infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 257(5), G725–731.

Slavić, D., Boerlin, P., Fabri, M., Klotins, K. C., Zoethout, J. K., Weir, P. E., & Bateman, D. (2011). Antimicrobial susceptibility of Clostridium perfringens isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire*, 75(2), 89–97.

Smedley, J. G., Fisher, D. J., Sayeed, S., Chakrabarti, G., & McClane, B. a. (2004). The enteric toxins of Clostridium perfringens. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 152(October), 183–204. doi:10.1007/s10254-004-0036-2

Songer, J. G. (1996). Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2), 216–34.

Songer, J. G. (1998). Clostridial diseases of small ruminants. *Veterinary Research*, 29(3-4), 219–32.

Songer, J. G. (2010). Clostridia as agents of zoonotic disease. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 399–404. doi:10.1016/j.vetmic.2009.07.003

Songer, J. G., & Miskimmins, D. W. (2004). Clostridium perfringens type E enteritis in calves: two cases and a brief review of the literature. *Anaerobe*, 10(4), 239–42. doi:10.1016/j.anaerobe.2004.05.001

Songer, J. G., & Miskimmins, D. W. (2005). Clostridial abomasitis in calves: case report and review of the literature. *Anaerobe*, 11(5), 290–4. doi:10.1016/j.anaerobe.2004.12.004

Songer, J. G., & Uzal, F. a. (2005). Clostridial enteric infections in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 17(6), 528–36.

Stabler, R. a, He, M., Dawson, L., Martin, M., Valiente, E., Corton, C., ... Wren, B. W. (2009). Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biology*, 10(9), R102. doi:10.1186/gb-2009-10-9-r102

Stiles, B. G., Hale, M. L., Marvaud, J. C., & Popoff, M. R. (2000). *Clostridium perfringens* iota toxin: binding studies and characterization of cell surface receptor by fluorescence-activated cytometry. *Infection and Immunity*, 68(6), 3475–84.

Stiles, B. G., Hale, M. L., Marvaud, J. C., & Popoff, M. R. (2002). *Clostridium perfringens* iota toxin: characterization of the cell-associated iota b complex. *Biochemical Journal*, 367, 301–808.

Stiles, B. G., Pradhan, K., Fleming, J. M., Samy, R. P., Barth, H., & Popoff, M. R. (2014). *Clostridium* and *Bacillus* Binary Enterotoxins: Bad for the Bowels, and Eukaryotic Being. *Toxins*, 6(9), 2626–2656. doi:10.3390/toxins6092626

Stiles, B. G., & Wilkins, T. D. (1986). Purification and characterization of *Clostridium perfringens* iota toxin: dependence on two nonlinked proteins for biological activity. *Infection and Immunity*, 54(3), 683–8.

Stringer, M. F., Turnbull, P. C., & Gilbert, R. J. (1980). Application of serological typing to the investigation of outbreaks of *Clostridium perfringens* food poisoning, 1970-1978. *The Journal of Hygiene*, 84(3), 443–56.

Timbermont, L., De Smet, L., Van Nieuwerburgh, F., Parreira, V. R., Van Driessche, G., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F. (2014). Perfrin, a novel bacteriocin associated with netB positive *Clostridium perfringens* strains from broilers with necrotic enteritis. *Veterinary Research*, 45(1), 40. doi:10.1186/1297-9716-45-40

Timbermont, L., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., & Van Immerseel, F. (2011). Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A*, 40(4), 341–7. doi:10.1080/03079457.2011.590967

Timbermont, L., Lanckriet, A., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., & Van Immerseel, F. (2009). Intra-species growth-inhibition by *Clostridium perfringens* is a possible virulence trait in necrotic enteritis in broilers. *Veterinary Microbiology*, 137(3-4), 388–91. doi:10.1016/j.vetmic.2009.01.017

Titball, R. W., Naylor, C. E., & Basak, A. K. (1999). The *Clostridium perfringens* α -toxin. *Anaerobe*, 5(2), 51–64.

Urwin, R., & Maiden, M. C. J. (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology*, 11(10), 479–487. doi:10.1016/j.tim.2003.08.006

Uzal FA, Marcellino RM. Clostridium perfringens Clostridium perfringens in clinically healthy sheep of Patagonia, Argentina. The 6th Biennial Congress of the Anaerobe Society of the Americas, 2002, Park City, USA.

Uzal, F. a, Saputo, J., Sayeed, S., Vidal, J. E., Fisher, D. J., Poon, R., McClane, B. a. (2009). Development and application of new mouse models to study the pathogenesis of Clostridium perfringens type C Enterotoxemias. *Infection and Immunity*, 77(12), 5291–9. doi:10.1128/IAI.00825-09

Uzal, F. A., & McClane, B. A. (2011). Recent progress in understanding the pathogenesis of Clostridium perfringens type C infections. *Veterinary Microbiology*, 153(1-2), 37–43. doi:10.1016/j.vetmic.2011.02.048

Uzal, F. A., & Songer, J. G. (2008). Diagnosis of Clostridium Perfringens Intestinal Infections in Sheep and Goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(3), 253–265. doi:10.1177/104063870802000301

Valgaeren, B., Pardon, B., Goossens, E., Verherstraeten, S., Schauvliege, S., Timbermont, L., Van Immerseel, F. (2013). Lesion Development in a New Intestinal Loop Model Indicates the Involvement of a Shared Clostridium perfringens Virulence Factor in Haemorrhagic Enteritis in Calves. *Journal of Comparative Pathology*. doi:10.1016/j.jcpa.2012.11.237

Varga, J. J., Therit, B., & Melville, S. B. (2008). Type IV pili and the CcpA protein are needed for maximal biofilm formation by the gram-positive anaerobic pathogen Clostridium perfringens. *Infection and Immunity*, 76(11), 4944–51. doi:10.1128/IAI.00692-08

Virginia Stagnitta, P., Micalizzi, B., & Stefanini de Guzmán, A. M. (2002). Prevalence of Enterotoxigenic Clostridium perfringens in Meats in San Luis, Argentina. *Anaerobe*, 8(5), 253–258. doi:10.1006/anae.2002.0433

Warny, M., Pepin, J., Fang, A., Killgore, G., Thompson, A., Brazier, J., McDonald, L. C. (2005). Toxin production by an emerging strain of Clostridium difficile associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *The Lancet*, 366(9491), 1079–1084. doi:10.1016/S0140-6736(05)67420-X

Watson, G. N. (1985). The assessment and application of a bacteriocin typing scheme for Clostridium perfringens. *The Journal of Hygiene*, 94(1), 69–79.

Wehner, S., Koscielny, A., Vilz, T. O., Stoffels, B., Engel, D. R., Kurts, C., & Kalff, J. (2011). Measurement of gastrointestinal and colonic transit in mice. *Protocol Exchange*, 2–9. doi:10.1038/protex.2011.219

Yonogi, S., Matsuda, S., Kawai, T., Yoda, T., Harada, T., Kumeda, Y., Iida, T. (2014). BEC, a novel enterotoxin of Clostridium perfringens found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks. *Infection and Immunity*, 82(6), 2390–9. doi:10.1128/IAI.01759-14

Zimmer, M., Scherer, S., & Loessner, M. J. (2002). Genomic analysis of *Clostridium perfringens* bacteriophage phi3626, which integrates into *guaA* and possibly affects sporulation. *Journal of Bacteriology*, 184(16), 4359–68.