

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Caracterización toxigénica de la fosfolipasa C del
Clostridium perfringens (Cp-PLC) y su relación con
aislados de C. perfringens de casos de enterotoxemia en
alpacas**

TESIS

para optar al grado académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

David Remy Pérez Janampa

ASESOR

Abelardo Lenin Maturrano Hernández

Lima-Perú

2010



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
 AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA**

Siendo las 2.00 p.m. del 21 de abril del 2010 se reunieron en el Auditorio de la Unidad de Post-Grado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador de Sustentación de la Tesis, presidido por el Mg. Fernando Merino Rafael e integrado por los siguientes miembros: Dr. Eduardo Flores Juárez, Mg. Susana Mónica Gutiérrez Moreno, Mg. Acela Inés Arnao Salas y Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández; para la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada: **“CARACTERIZACIÓN TOXIGÉNICA DE LA FOSFOLIPASA C DEL *Clostridium perfringens* (Cp-PLC) Y SU RELACIÓN CON AISLADOS DE *C. perfringens* DE CASOS DE ENTEROTOXEMIA EN ALPACAS”**, del Bachiller en Medicina Veterinaria DAVID REMY PÉREZ JANAMPA, de la Maestría en Microbiología.

Acto seguido se procedió a la exposición de la Tesis, con el fin de optar al Grado Académico de Magíster en Microbiología. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Examinador de Sustentación de la Tesis procedió a la votación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

EXCELENTE 19

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Medicina Veterinaria, DAVID REMY PÉREZ JANAMPA, el Grado Académico de Magíster en Microbiología.

Siendo las *15:45* hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las *15:45* hrs. del día miércoles 21 de abril de 2010.

[Signature]
 Mg. Fernando Merino Rafael (P.P., D.E.)
 Presidente

[Signature]
 Dr. Eduardo Flores Juárez (P.P., T.C.)
 Miembro

[Signature]
 Mg. Susana Mónica Gutiérrez Moreno (P.P., T.C.)
 Miembro

[Signature]
 Mg. Acela Inés Arnao Salas (P.P., D.E.)
 Miembro

[Signature]
 Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández (P. Aux. T.C.)
 Miembro

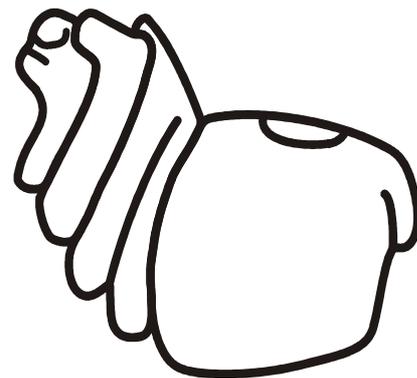
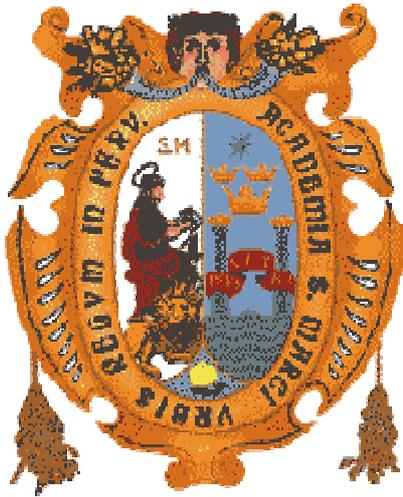
Observaciones:

.....

JURADO EXAMINADOR Y CALIFICADOR:

<i>Mg. Fernando Merino Rafael</i>	Presidente
<i>Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández</i>	Miembro
<i>Dr. Eduardo Florez Juárez</i>	Miembro
<i>Mg. Susana Gutiérrez Moreno</i>	Miembro
<i>Mg. Acela Ines Arnao Salas</i>	Miembro

El presente estudio fue realizado en las instalaciones de la Unidad de Biología y Genética Molecular del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM (Lima, Perú) y del Laboratorio de Bacteriología del Instituto Butantan (SP, Brasil).



CONOPA

...gracias al financiamiento de las siguientes entidades:



A David y Sonia, mis amados padres

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Lenin Maturrano Hernández por su amistad, sus consejos y su apoyo que hicieron posible que este estudio haya sido llevado a buen término.

A la Dra. Roxane Fontes Piazza por el acogimiento, la confianza depositada y su valiosa colaboración.

Al Dr. Raul Rosadio Alcántara y a la Dra. Jane Wheeler por todo el apoyo y la confianza depositada en mí.

Al Laboratorio de Bacteriología e Inmunopatología del Instituto Butantan y a la Unidad de Biotecnología del Instituto de Pesquisas de Energia Nuclear de Brasil, en especial a los Dres. Maysa Dela Casa, Marcia Franzolin, Waldir Pereira y Patrick Spencer por su amistad y todas las facilidades brindadas.

A todos los criadores alpaqueros del Sur del Perú por las facilidades dadas durante la colección de muestras.

A Luis LLanco, Hugo Castillo, Alvaro Veliz, Pablo Londoño e Ivan Carhuallanqui por su colaboración, sus consejos y la amistad brindada.

A mis amigos del grupo de investigación en camelidos sudamericanos del Laboratorio de Biología y Genética de Biología Molecular de la FMV-UNMSM y CONOPA, en especial a Luchin, Antoni, Maria, Karol, Vanya, Jesus, Juan Manuel, Paloma e Isabel.

Aos meus prezados amigos pesquisadores brasileiros do Laboratório do Bacteriologia do Instituto Butantan, especialmente a o Marcio, a Keyde, a Chris, a Sarita, a Julia, a Leticia, a Marina, o Diego, a Gaby, o Hebert, a Cris e o Renato, por sua cooperação, sua amizade e ter feito agradável minha permanência no Brasil.

A mis hermanos, Jenny y Kevin, por hacer de mí una mejor persona.

A Nidia P. por darme fuerza cuando lo necesite.

A Sandra R., Miguel E., Mario V. y Alex O. por su eterna amistad y apoyo en los momentos mas difíciles.

No quiero olvidar a nadie, pero soy consciente de que es muy difícil plasmar en unas líneas toda la ayuda que he recibido durante este tiempo. Por ello, pido disculpas a aquellos que se sientan olvidados, mi agradecimiento es igual de sincero para ellos.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	xii
SUMMARY	xiii
LISTA DE CUADROS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	
2.1. <i>Clostridium perfringens</i>	3
2.1.1. Taxonomía	3
2.1.2. Hábitat	3
2.1.3. Morfología	4
2.1.4. Fisiología	4
2.1.5. Genoma	5
2.1.6. Tipificación	7
2.1.7. Toxinas principales	9
2.1.7.1. Cp-PLC o toxina alfa	9
2.1.7.2. Toxina beta	9
2.1.7.3. Toxina épsilon	10
2.1.7.4. Toxina iota	11
2.1.7.5. Enterotoxina del <i>C. perfringens</i> : CPE	12
2.1.7.6. Toxina beta dos	14
2.2. <i>Fosfolipasas bacterianas</i>	15
2.2.1. Clasificación de la fosfolipasas bacterianas	16
2.2.2. Papel en la virulencia de las fosfolipasas C bacterianas	17
2.2.2.1. PLC de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.2.2.2. Toxina β de <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.2.2.3. PlcA y PlcB de <i>Listeria monocytogenes</i>	20
2.3. <i>Fosfolipasa C de Clostridium perfringens (Cp-PLC)</i>	21

2.3.1. Estructura y disrupción de membrana	21
2.3.2. Regulación de la expresión del gen plc	23
2.3.3. Actividad biológica	25
2.3.4. Efectos locales	26
2.3.4.1. Actividad miotóxica	26
2.3.4.2. Efecto en células endoteliales, plaquetas y leucocitos	29
2.3.5. Efectos sistémicos	33
2.4. <i>Evidencia del rol de Cp-PLC en la patogénesis de enfermedades causadas por C. perfringens tipo A.</i>	33
2.4.1. Gangrena gaseosa	33
2.4.2. Enteritis necrótica en pollos	34
2.4.3. Enfermedades entéricas en otras especies	35
2.5. <i>Enterotoxemia en alpacas</i>	36
2.5.1. Etiología	36
2.5.2. Epidemiología	36
2.5.3. Patogenia	38
2.5.4. Signos clínicos	40
2.5.5. Lesiones anatomopatológicas	40
2.5.6. Lesiones histopatológicas	43
2.5.7. Diagnóstico	44
2.5.8. Tratamiento	44
2.5.9. Control	44
2.5.10. Prevención	45

III.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. <i>Aislados de Clostridium perfringens de casos de enterotoxemia en alpacas</i>	46
3.2. <i>Determinación de la curva de crecimiento de C. perfringens y síntesis de Cp-PLC</i>	47
3.2.1. Condiciones de cultivo	47
3.2.2. Determinación de la curva de crecimiento	47
3.2.3. Determinación de la actividad lecitinasa	47
3.3. <i>Purificación de la fosfolipasa C de C. perfringens (Cp-PLC)</i>	49
3.3.1. Aislado de C. perfringens	49
3.3.2. Etapas de purificación de Cp-PLC	49
3.3.2.1. Extracto crudo	49
3.3.2.2. Precipitación con sales	49
3.3.3. Parámetros de evaluación de la purificación de Cp-PLC	50
3.3.3.1. Determinación de la actividad lecitinasa	50
3.3.3.2. Determinación de la concentración protéica	50

3.3.3.3.	Determinación de perfiles electroforéticos	51
3.3.3.3.1.	Preparación del gel poliacrilamida	52
3.3.3.3.2.	Preparación de las muestras y condiciones de electroforesis	52
3.3.3.3.3.	Coloración del gel de poliacrilamida	53
3.4.	<i>Caracterización toxigénica del Cp-PLC purificado</i>	54
3.4.1.	Determinación de la actividad hemolítica del Cp-PLC purificado	54
3.4.2.	Determinación de la actividad citopática del Cp-PLC purificado	55
3.4.2.1.	Preparación de células HEp-2	55
3.4.2.2.	Desafío con parcialmente purificado	55
3.4.3.	Determinación de la actividad de agregación plaquetaria del Cp-PLC purificado	56
3.4.4.	Determinación de la actividad letal del Cp-PLC purificado	57
3.4.5.	Determinación de la actividad enterotóxica del Cp-PLC purificado	57
3.4.5.1.	Sujetos de experiencia	58
3.4.5.2.	Inóculos	58
3.4.5.3.	Prueba de asa intestinal ligada	58
3.4.5.3.1.	Preanestesia y anestesia	58
3.4.5.3.2.	Operatorio y preparación de las asa intestinales ligadas	58
3.4.5.3.3.	Evaluación de la actividad enterotóxica	59
3.4.5.3.3.1.	Acumulación de fluido	59
3.4.5.3.3.2.	Cambios macroscópicos	59
3.4.5.3.3.3.	Cambios microscópicos	60
3.5.	<i>Caracterización toxigénica de los aislados de C. perfringens asociado a su capacidad de producción de Cp-PLC</i>	60
3.5.1.	Preparación del sobrenadante bacteriano	60
3.5.2.	Determinación de la actividad lecitinasa de los aislados de <i>C. perfringens</i>	60
3.5.3.	Determinación del perfil electroforético de los aislados de <i>C. perfringens</i>	61
3.5.3.1.	Método de concentración proteica por ácido tricloroacético	61
3.5.4.	Determinación de la actividad hemolítica de los aislados de <i>C. perfringens</i>	62
3.5.5.	Determinación de la actividad perfringolisina de los aislados de <i>C. perfringens</i>	62
3.5.6.	Determinación de la actividad citotóxica de los aislados de <i>C. perfringens</i>	63
3.5.7.	Determinación de la actividad de agregación plaquetaria de los aislados de <i>C. perfringens</i>	63
3.5.8.	Determinación de la actividad letal de los aislados de <i>C. perfringens</i>	63
3.5.9.	Determinación de la actividad enterotóxica de los aislados de <i>C. perfringens</i>	63

IV. RESULTADOS

4.1.	<i>Aislados de C. perfringens de casos de enterotoxemia en alpacas</i>	64
4.2.	<i>Curva de crecimiento de C. perfringens y síntesis de Cp-PLC</i>	65
4.3.	<i>Purificación de la fosfolipasa C de C. perfringens</i>	67
4.4.	<i>Caracterización toxigénica de la Cp-PLC parcialmente purificada (Pp.Cp-PLC)</i>	69
4.4.1.	Actividad hemolítica de Pp.Cp-PLC	69
4.4.2.	Actividad citopática en células HEp-2 de Pp.Cp-PLC	69
4.4.3.	Actividad de agregación plaquetaria de Pp.Cp-PLC	71
4.4.4.	Actividad letal de Pp.Cp-PLC	71
4.4.5.	Actividad enterotóxica de Pp.Cp-PLC	76
4.5.	<i>Caracterización toxigénica de los aislados de C. perfringens de casos de enterotoxemia en alpacas asociados a la producción de Cp-PLC</i>	82
4.5.1.	Actividad lecitinasa de los aislados de <i>C. perfringens</i>	82
4.5.2.	Perfiles electroforéticos de los aislados de <i>C. perfringens</i>	86
4.5.3.	Actividad hemolítica de los aislados de <i>C. perfringens</i>	89
4.5.4.	Actividad perfringolisina de los aislados de <i>C. perfringens</i>	94
4.5.5.	Actividad citotóxica de los aislados de <i>C. perfringens</i>	100
4.5.6.	Actividad de agregación plaquetaria de los aislados de <i>C. perfringens</i>	104
4.5.7.	Actividad letal de los aislados de <i>C. perfringens</i>	106
4.5.8.	Actividad enterotóxica de los aislados de <i>C. perfringens</i>	106

V. DISCUSIÓN	111
---------------------	-----

VI. CONCLUSIÓN	122
-----------------------	-----

VII. RECOMENDACIONES	123
-----------------------------	-----

VIII. REVISION BIBLIOGRÁFICA	124
-------------------------------------	-----

IX. ANEXOS	144
-------------------	-----

LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 2.1. Genotipificación de <i>C. perfringens</i> en base a la presencia de los genes codificantes de las toxinas principales.	9
Cuadro 2.2. Subtipos de <i>C. perfringens</i> clasificados en base a la presencia de los genes <i>cpe</i> y <i>cpb2</i> .	9
Cuadro 2.3. Fosfolipasas C bacterianas.	18
Cuadro 2.4. Propiedades de las Zinc-metalofosfolipasas .	19
Cuadro 3.1. Aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia de alpacas empleados	48
Cuadro 3.2. Curva de calibración para determinación de concentración de proteínas.	51
Cuadro 3.3: Soluciones para preparación de gel de resolución al 12% de poliacrilamida para volúmenes de 5 y 10 mL.	52
Cuadro 3.4: Soluciones para preparación de gel de empaquetamiento al 5% de poliacrilamida para volúmenes de 2 y 4 mL.	52
Cuadro 4.1. Estado bacteriano de los aislados de <i>C. perfringens</i> provenientes de casos de enterotoxemia en alpacas	65
Cuadro 4.2. Rendimiento y pureza del proceso de purificación de Cp-PLC con diferentes concentraciones de saturación de sulfato de amonio.	68
Cuadro 4.3. Porcentaje de citopatogenicidad y celularidad en línea celular HEp-2 desafiadas con distintas concentraciones de Pp.Cp-PLC	72
Cuadro 4.4. Actividad letal en ratones por diferentes concentraciones de Pp.Cp-PLC.	75
Cuadro 4.5. Actividad enterotóxica de diferentes concentraciones de Pp.Cp-PLC en asa intestinal ligada de conejos	78
Cuadro 4.6. Distribución de los aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas según su capacidad de producción de Cp-PLC y estado bacteriano y subtipo	84
Cuadro 4.7. Patrón electroforético SDS-PAGE de aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas.	90
Cuadro 4.8. Actividades hemolíticas ¹ de los aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas analizados según capacidad de producción de Cp-PLC y	92

estado bacteriano y subtipo.

Cuadro 4.9: Actividades perfringolisina¹ de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas analizados según capacidad de producción de Cp-PLC y estado bacteriano y subtipo. 96

Cuadro 4.10. Porcentaje de actividad citotóxica¹ de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas según su capacidad de producción de Cp-PLC y estado bacteriano y subtipo. 102

Cuadro 4.11: Promedios de acumulación de fluido intestinal¹ (relación volumen/longitud de AIL) de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas según su capacidad de producción de Cp-PLC y estado bacteriano y subtipo. 108

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 2.1. Centros de corte de las fosfolipasas A1 (PLA1), A2 (PLA2), C (PLC) y D (PLD).	16
Figura 2.2. Representación esquemática del sitio activo de la Cp-PLC.	21
Figura 2.3. Acción de la Cp-PLC en membranas artificiales y biológicas.	24
Figura 2.4. Efectos de la Cp-PLC en células eucariotas.	27
Figura 2.5. Esquema general de eventos desencadenados por Cp-PLC durante la gangrena gaseosa.	30
Figura 2.6. Alpacas neonatas muertas durante una epizootia de enterotoxemia.	37
Figura 2.7. Lesiones macroscópicas en intestino delgado de alpacas muertas por enterotoxemia.	42
Figura 2.8.: Lesiones histopatológicas en intestino delgado de alpacas muertas por enterotoxemia.	43
Figura 4.1: Estados bacterianos de los aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas.	64
Figura 4.2: Curva de crecimiento y de producción de Cp-PLC de aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas.	66
Figura 4.3. Perfiles electroforéticos de los precipitados de extracto crudo con diferentes porcentajes de saturaciones con sulfato de amonio.	69
Figura 4.4. Cambios citopáticos en línea de células HEp-2 desafiadas con distintas concentraciones de Pp.Cp-PLC.	70
Figura 4.5. Porcentaje de citopatogenicidad y celularidad en línea celular HEp-2 desafiadas con distintas concentraciones de Pp.Cp-PLC.	73
Figura 4.6. Actividad de agregación plaquetaria de Pp.Cp-PLC.	74
Figura 4.7. Imagen macroscópica de AIL inoculadas con diferentes concentraciones de Pp.Cp-PLC.	77
Figura 4.8. Actividad enterotóxica de diferentes concentraciones de Pp.Cp-PL en asas intestinales ligadas de conejos	79

Figura 4.9. Imágenes histológicas de las AIL inoculadas con diferentes concentraciones de Pp.Cp-PLC.	80
Figura 4.10. Límite de detección de actividades biológicas del Pp.Cp-PLC	81
Figura 4.11. Actividad lecitinasa de los aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas.	83
Figura 4.12. Porcentajes de aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas de baja, mediana y alta capacidad de producción de Cp-PLC distribuidos según su estado bacteriano.	85
Figura 4.13. Patrón de perfil electroforético SDS-PAGE de los sobrenadante de <i>C. perfringens</i> aislados de casos de enterotoxemia en alpacas.	87
Figura 4.14. Perfiles electroforéticos SDS-PAGE de los sobrenadantes de aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas en estado vegetativo genotipo A subtipo <i>cpe⁻cpb2⁻</i>	88
Figura 4.15. Perfiles electroforéticos SDS-PAGE de los sobrenadantes de aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas en estado esporulado genotipo A subtipo <i>cpe⁻cpb2⁻</i>	88
Figura 4.16. Perfiles electroforéticos SDS-PAGE de los sobrenadantes de aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas en estado vegetativo y esporulado genotipo A subtipo <i>cpe⁻cpb2⁺</i> .	89
Figura 4.17. Actividades hemolítica y lecitinasa de los aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas.	91
Figura 4.18. Actividad hemolítica de los aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas relacionados según su capacidad de producción de Cp-PLC y su estado bacteriano.	93
Figura 4.19. Actividades perfringolisina y lecitinasa de los aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas.	95
Figura 4.20. Actividad perfringolisina de los aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas relacionados según su capacidad de producción de Cp-PLC y su estado bacteriano.	97
Figura 4.21. Actividades hemolítica y perfringolisina de los aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas en estado vegetativo relacionados a su capacidad de producción de Cp-PLC.	99
Figura 4.22. Actividad citotóxica en línea de células HEp-2 por los aislados de <i>C.</i>	100

perfringens de casos de enterotoxemia en alpacas.

Figura 4.23. Actividad citotóxica y lecitinasa de los aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas.	101
Figura 4.24. Porcentaje de actividad citotóxica de aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas distribuidos según su capacidad de producción de Cp-PLC y su estado bacteriano.	103
Figura 4.25. Actividad de agregación plaquetaria de los aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas con diferentes grados de producción de Cp-PLC.	105
Figura 4.26. Actividad enterotóxica y actividad lecitinasa de aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas.	107
Figura 4.27. Capacidad de acumulación de fluido intestinal de los aislados de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas distribuidos según su capacidad de producción de Cp-PLC y estado bacteriano.	109
Figura 4.28. Imágenes histológicas de las asas intestinales ligadas inoculadas con sobrenadante de aislado de <i>C. perfringens</i> de casos de enterotoxemia en alpacas.	110

RESUMEN

La enterotoxemia, causada por el *Clostridium perfringens*, es la enfermedad infecciosa más importante que afecta a las alpacas, debido a que ocasiona elevadas tasas de mortalidad neonatal de hasta 70%. Recientes estudios han sugerido la participación de la Cp-PLC (*C. perfringens* fosfolipasa C) como factor de virulencia responsable del cuadro enterotoxémico en alpacas y otras especies domésticas. El presente estudio evaluó las características toxigénicas de la Cp-PLC y de sobrenadantes de diferentes aislados de *C. perfringens* obtenidos de casos de enterotoxemia en alpacas relacionándolos con sus niveles de producción de Cp-PLC. El protocolo de purificación de Cp-PLC mostró ser exitoso, mostrando su comportamiento como una enterotoxina incapaz de generar lesiones entéricas. Asimismo, los aislados de *C. perfringens* analizados evidenciaron distintas características toxigénicas independientes de la presencia de Cp-PLC. Al parecer, la Cp-PLC no sería un factor esencial del *C. perfringens* en la producción de lesiones entéricas en casos de enterotoxemias en alpacas.

Palabras clave: Cp-PLC, *Clostridium perfringens*, enterotoxigénico.

SUMMARY

Enterotoxemia caused by *Clostridium perfringens*, causes a mortality neonatal rate up to 70%, this is why it is considered as the most important infections disease. Recent studies has suggested that Cp-PLC (*Clostridium perfringens* phospholipase C) is a main virulence factor responsible of the enterotoxemic lesions found in alpacas and other domestic animals. This study evaluated the toxigenic characteristics of Cp-PLC and of supercultures of *C. perfringens* isolates from enterotoxemia in alpacas associated with their levels of Cp-PLC production. The Cp-PLC purification protocol used was successful, showing that Cp-PLC as an enterotoxin enteric unable to cause injury. Similarly, *C. perfringens* isolates analyzed showed different toxigenic characteristics independently of the Cp-PLC production. Apparently, Cp-PLC does not be a essential factor from *C. perfringens* in the production of enteric lesions in cases of enterotoxemia in alpacas.

Key word: Cp-PLC, *Clostridium perfringens*, enterotoxigenic.

I. INTRODUCCIÓN

La enterotoxemia es la enfermedad infecciosa más importante que afecta a las alpacas, debido a que ocasiona elevadas tasas de mortalidad neonatal de hasta 70% en centros de crianza alpaquera en el Perú (Ramírez *et al.*, 1991); provocando la merma de su población e interferencia con los programas de mejoramiento genético. El agente causante de la enfermedad es el *Clostridium perfringens*, siendo el tipo A el principal involucrado (Moro, 1987; Ramírez, 1991; Pérez, 2006).

El *C. perfringens* es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, móvil, formador de esporas y causante de una gran variedad de enfermedades en humanos y animales (Hatheway, 1990). La virulencia de este microorganismo está determinada por la presencia de sus cuatro potentes toxinas mayores: la Cp-PLC (*C. perfringens PhosphoLipase C*) o toxina α , la toxina β , la toxina ϵ y la toxina ι , las cuales son empleadas para la tipificación (Petit *et al.*, 1999; Hatheway, 1990; Songer, 1996).

El *C. perfringens* tipo A, el cual solo posee la toxina mayor Cp-PLC, forma parte de la microbiota normal del intestino de animales y de los suelos, pero también se encuentra involucrado en diversas patologías (Songer, 1996; Hatheway, 1990). Dentro de ellas, la gangrena gaseosa ha sido la más estudiada, en donde la Cp-PLC es el factor de virulencia esencial e imprescindible para la patogénesis (Stevens y Bryant, 2002; Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003 y Titball, 2005).

La Cp-PLC es una zinc-metalofosfolipasa que hidroliza exclusivamente la fosfatidilcolina y la esfingomielina, responsable de la actividad letal, citotóxica, necrótica y hemorrágica (Titball *et al.*, 1999). Posee un peso molecular de 43 kDa, un pI de 5.4 y para su actividad requiere la presencia de iones de Zn^{++} y Ca^{++} (Naylor *et al.*, 1998 y Titball *et al.*, 1999).

La Cp-PLC viene siendo postulada como el factor de virulencia clave en la patogénesis de muchas enteropatías causadas por *C. perfringens* tipo A no enterotoxigénico no β 2-toxigénico (subtipo *cpe-cpb2-*) como la enteritis necrótica en pollos (Engstrom *et al.*, 2003 y Gholamiandekhordi *et al.*, 2005), en lechones (Kanakaraj *et al.*, 1998), la enteritis hemorrágica en perros (Songer, 1996), la disentería hemorrágica en corderos (Gkiourtzidis *et al.*, 2001), la enterotoxemia en corderos (Kalender *et al.*, 2005), en venados (Embury-Hyatt *et al.*, 2005) y en alpacas (Moro, 1987 y Pérez, 2006). Sin embargo, son pocos los estudios realizados que demuestren su participación en los cuadros entéricos.

El presente estudio evaluó las características toxigénicas como actividad enzimática, hemolítica, citotóxica, de agregación plaquetaria, letal y enterotóxica de una Cp-PLC purificada y de diferentes aislados de *C. perfringens* obtenidos de casos de enterotoxemia en alpacas relacionándolos con sus diferentes niveles de producción de Cp-PLC.

II. ANTECEDENTES

2.1. *Clostridium perfringens*

2.1.1. TAXONOMÍA

La clasificación taxonómica del *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) según el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Garrity *et al.*, 2001) es:

Dominio: *Bacteria*

Phylum: *Firmicutes*

Clase: *Clostridia*

Orden: *Clostridiales*

Familia: *Clostridiaceae*

Género: *Clostridium*

Especie: *Clostridium perfringens*

2.1.2. HABITAT

El *C. perfringens* tipo A se encuentran ampliamente distribuidos como parte de la flora normal del suelo y del tracto intestinal de los animales de sangre caliente; mientras que los otros tipos (B, C, D y E) son menos comunes en el tracto intestinal y pueden ocasionalmente ser encontrados en el ambiente, en áreas donde las enfermedades producidas por estos microorganismos son enzoóticas (Joclik y Willett, 1991; Songer, 1996).

2.1.3 MORFOLOGÍA

Microscópicamente *C. perfringens* se presenta como un bacilo Gram positivo grueso, recto, solitario o en pares, y rara vez en cadenas (Gillespie y Timoney, 1981). Las dimensiones de este microorganismo son de 0.8 – 1.5 μm de ancho por 4–8 μm de largo (Gillespie y Timoney, 1981; Nicolet, 1986). La longitud varía de acuerdo al estado de proliferación bacteriana, y a la composición iónica y nutricional del medio. Así, los cultivos jóvenes que proliferan con rapidez pueden tener forma casi cocoide o cúbica, mientras que los cultivos viejos evidencian células más elongadas (Joclik y Willett, 1991).

Macroscópicamente desarrolla colonias de superficie larga, redonda, lisa, irregular y ligeramente opaca. Otros tipos de colonias observadas, son aquellas con centro opaco, levantado y de borde plano transparente, que son radialmente estriadas (Cruickshan, 1965).

A diferencia de otros clostridios patógenos, *C. perfringens* es inmóvil y puede presentar una cápsula en frotis directo de fluidos corporales y tejidos, pero no siempre son demostrables en cultivos (Cruickshan, 1965; Cowan, 1974). *C. perfringens* forma esporas, que pueden ser centrales o subterminales, de forma ovalada, y lo suficientemente pequeñas para no causar ensanchamiento del bacilo (Merchant y Packer, 1961; Dushesnes y Mainil, 2005). Además, algunas cepas de *C. perfringens* varían en su habilidad para esporular, necesitando generalmente de medios especiales para hacerlo (Barach *et al.*, 1974).

2.1.4 FISIOLOGÍA

C. perfringens es un microorganismo anaerobio tolerante y puede sobrevivir, e incluso proliferar, con tensiones de oxígeno que son inhibitorios para otros clostridios, los cuales son anaerobios estrictos (Joclik y Willett, 1991). Los clostridios no producen catalasa y sólo sintetizan niveles bajos de superóxido dismutasa. Se cree que una de las causas que sean anaerobios es porque no tienen otra manera de liberarse de H_2O_2 y O^{2-} que son tóxicos para ellos (Madigan *et al.*, 2001).

Además, *C. perfringens* carece del sistema de citocromo y de un mecanismo para la fosforilación por transporte de electrones (ciclo del ácido tricarbóxico), obteniendo ATP sólo por fosforilación a nivel del sustrato (constituido básicamente por azúcares) (Madigan *et al.*, 2001). En las rutas de fermentación, el piruvato es convertido en acetyl-CoA por la piruvato ferredoxin oxidoreductasa, produciendo CO₂ y ferredoxina reducida. Los electrones de la ferredoxina reducida son transferidos a los protones por las hidrogenasas, resultando en la formación de moléculas de hidrógeno que son liberados de la célula junto con CO₂. Esta típica producción de gases podría contribuir a la ventaja en el crecimiento y sobrevivencia en los tejidos del hospedador, generando un ambiente anaeróbico preferido. El piruvato, también, es convertido a lactato por la lactato deshidrogenasa, mientras la acetyl CoA es convertida a etanol, acetato, y butirato a través de varias reacciones enzimáticas (Madigan *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 2002).

C. perfringens puede proliferar en un rango de pH de 5.5 a 8.0, una actividad acuosa mínima de 0.95, y un rango de temperatura entre 20 a 50° C, con un óptimo de 45° C, teniendo un tiempo de germinación tan corto como ocho minutos (Hatheway, 1990; Jocklik y Willett, 1991).

2.1.5. GENOMA

Los genomas clostridiales generalmente consisten de un cromosoma circular de doble hebra, con un tamaño entre 3.5 a 7.0 Mb, y frecuentemente acompañadas de bacteriófagos integrados y episomales, transposones y plásmidos de tamaños entre 3 a 200 kb (Dushesnes y Mainil, 2005).

Shimizu *et al.* (2002) secuenciaron y analizaron el genoma completo de una cepa de *C. perfringens* tipo A (cepa 13), encontrando un cromosoma de 3.03 Mbp con un contenido G+C (28.6%) pronunciadamente bajo y un plásmido (pCP13) de 54.3 kb con un contenido G+C (25.5%) ligeramente más bajo al cromosomal. El plásmido pCP13 presentó 63 posibles ORF, mientras que el cromosoma presentó 2660 ORF que representan al 83.1% de la secuencia cromosomal completa. Este genoma contenía secuencias para las enzimas típicas

de fermentación anaeróbica y para varias enzimas sacarolíticas, pero ninguna para el ciclo de ácido tricarboxílico o cadena respiratoria. Asimismo, muchos genes codificantes de enzimas para la biosíntesis de aminoácidos estuvieron ausentes. No obstante, varios genes codificantes de proteínas importadoras ABC (potencialmente envueltos en el transporte de aminoácido) y nuevos posibles factores de virulencia para *C. perfringens* estuvieron presentes. Entre estos nuevos posibles factores de virulencia tenemos: 5 genes que codifican hemolisinas (además de la Cp-PLC y toxina θ), 4 genes cuyos productos son similares a la enterotoxina de *Bacillus cereus*; 2 genes que codifican posibles proteínas de unión a la fibronectina similares a los de *Listeria monocitogenes* y *Bacillus subtilis*. Además, en el plásmido pCP13 se encontró el gen *cpb2* (codificante de la toxina β_2) y otro gen (*CpCna*) asociado a virulencia, cuyo posible producto mostró similitud a una adhesina de colágeno de *Staphylococcus aureus*. El *CpCna* podría estar envuelto en el adosamiento de *C. perfringens* al colágeno del hospedero y funcionar como un factor de colonización (Shimizu *et al.*, 2002).

Los diferentes genes codificantes de toxinas poseen localización muy variable. Así, los genes *plc* (Cp-PLC), *pfoA* (toxina θ), *colA* (toxina κ) y *nagH* (toxina μ) se localizan en regiones variables del cromosoma cerca al origen de replicación; y los genes *nanH* (neuraminidasa H) y *nanI* (neuraminidasa I) están localizados en regiones conservadas del cromosoma. Mientras que los genes *cpb* (toxina β), *cpb2* (toxina β_2), *etx* (toxina ϵ), *iap* y *ibp* (toxina ι), *lam* (toxina λ) y *ureA-C* (ureasa) están localizados en plásmidos de varios tamaños (Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Brüggemann, 2005). Curiosamente, el gen *cpe* puede ser localizado en una región variable del cromosoma ó en un plásmido de gran tamaño (Petit *et al.*, 1999; Brynstad *et al.*, 1997; Miyamoto *et al.*, 2002; Miyamoto *et al.*, 2004). Asimismo, los cinco tipos de *C. perfringens* tienen una organización genómica muy similar y la habilidad para producir toxinas resulta de la capacidad de pérdida o adquisición de genes específicos (Brüggemann, 2005; Sawires y Songer, 2006). Estos genes de virulencia no se encuentran agrupados, ni forman islas de patogenicidad como en otras bacterias patógenas (Shimizu *et al.*, 2002; Brüggemann, 2005).

La regulación de la síntesis de las toxinas extracelulares está dada básicamente por el sistema de transducción de señales de dos componentes denominado VirR/VirS, que regula la expresión de los genes cromosomales *plc*, *pfoA* y *colA* (Rood, 1998; Shimizu *et al.*, 2002; Brüggemann, 2005), y extracromosomales *cpb2* y *CpCnA* (Brüggemann, 2005). Por otra parte, la regulación de la síntesis de CPE podría ser dependiente de factores sigma esporulación-específica (SigE y SigK) (Rood, 1998; Zhao y Melville, 1998) o por el activador transcripcional *CcpA* necesario para la esporulación eficiente (Brüggemann, 2005).

2.1.6. TIPIFICACIÓN

Las cepas de *C. perfringens* son clasificadas en cinco tipos (A, B, C, D y E) en base a la producción de sus cuatro toxinas letales (Cp-PLC, β , ϵ y ι) (Nicolet, 1986; Hatheway, 1990; Songer, 1996; Petit *et al.* 1999), todas las cuales son secretadas durante la fase de crecimiento exponencial (Petit *et al.*, 1999). Así, las cepas tipo A producen Cp-PLC; las tipo B producen las toxinas Cp-PLC, β y ϵ ; las cepas tipo C producen las toxinas Cp-PLC y β ; las cepas tipo D producen las toxinas Cp-PLC y ϵ ; y las cepas tipo E producen las toxinas Cp-PLC y ι (Nicolet, 1986; Hatheway, 1990; Songer, 1996; Petit *et al.* 1999).

Un sexto tipo, el tipo F, fue descrito para una cepa aislada de un brote humano de enteritis necrótica en Alemania en 1949. La cepa producía Cp-PLC y toxina β y habría sido clasificada como tipo C, pero fue inusualmente resistente al calor y carecía de tres antígenos menores (δ , θ y κ) encontrados en la clásica cepa tipo C. Sin embargo, estas diferencias fueron consideradas injustificadas para establecer un nuevo tipo (Bruner y Gillespie, 1966; Hatheway, 1990).

El método de tipificación clásica se basa en las pruebas de neutralización toxina-antitoxina *in vivo*, empleando sobrenadantes de cultivos líquidos de *C. perfringens*, tratadas y no tratadas con tripsina. La tripsina es capaz de activar a las toxinas ϵ y ι e inactivar a la toxina β . Estos sobrenadantes son enfrentados con y sin antisuero de cada tipo, y después son inoculados vía intradérmica en cobayos o vía intraperitoneal en ratones para evidenciar la seroneutralización

toxina-antitoxina (Cruickshan, 1965; Nicolet, 1986; Hatheway, 1990; Songer, 1996). La respuesta es notada después de 24 a 48 horas en cobayos (dermonecrosis) y a las 72 horas en ratones (letalidad) (Songer, 1996).

La correcta identificación de los tipos de *C. perfringens* es crítica para el desarrollo de estudios epidemiológicos y el establecimiento de efectivas medidas de prevención, incluyendo la vacunación (Petit *et al.*, 1999; Archambault *et al.*, 2002; Baums *et al.*, 2004). Por ello, las técnicas moleculares como PCR e hibridización de ADN han venido siendo desarrolladas para tipificar cepas de *C. perfringens* por ser mucho más confiables y rápidas en comparación con las clásicas pruebas de neutralización *in vivo* en ratones y cobayos (Petit *et al.*, 1999; Baums *et al.*, 2004). Entre ellos, principalmente protocolos de PCR Múltiple han sido elaborados para genotipificar (en base a la presencia de los genes *plc*, *cpb*, *etx* y *iap* [Cuadro 2.1]) y subtipificar (en base a la presencia de los genes *cpe* y *cpb2* [Cuadro 2.2]) cepas de *C. perfringens* (Songer y Meer, 1996; Yoo *et al.*, 1997; Kanakaraj *et al.*, 1998; Herholz *et al.*, 1999; Garmory *et al.*, 2000; Gkiourtzidis *et al.*, 2001; Stagnitta *et al.*, 2002; Bueschel *et al.*, 2003; Engstrom *et al.*, 2003; Waters *et al.*, 2003; Baums *et al.*, 2004; Gholamiandekhordi *et al.*, 2006). No obstante, otras técnicas moleculares como la ADN microarray (Al-Khaldi *et al.*, 2004a; Al-Khaldi *et al.*, 2004b), la ribotipificación (Schalch *et al.*, 2003), la electroforesis de gel en campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis; PFGE) (Nauerby *et al.*, 2003) y el análisis de repeticiones en tandem en número variable de múltiples locus (Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis; MLVA) (Sawires y Songer, 2005) también han sido empleadas para estos fines.

Es importante mencionar que el genotipo sólo manifiesta el potencial de virulencia del microorganismo, puesto que el genotipo no siempre es expresado en fenotipo (Petit *et al.*, 1999).

Cuadro 2.1. Genotipificación de *C. perfringens* en base a la presencia de los genes codificantes de las toxinas principales (Petit *et al.*, 1999).

Gen \ Genotipo	A	B	C	D	E
<i>plc</i>	+	+	+	+	+
<i>cpb</i>	-	+	+	-	-
<i>etx</i>	-	+	-	+	-
<i>iap</i>	-	-	-	-	+

(+) Presencia del gen; (-) Ausencia del gen.

Cuadro 2.2. Subtipos de *C. perfringens* clasificados en base a la presencia de los genes *cpe* y *cpb2* (Garmory *et al.*, 2000)

Gen \ Subtipo	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	<i>cpe</i> ⁺ <i>cpb2</i> ⁻	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁺	<i>cpe</i> ⁺ <i>cpb2</i> ⁺
<i>cpe</i>	-	+	-	+
<i>cpb2</i>	-	-	+	+

(+) Presencia del gen; (-) Ausencia del gen.

2.1.7. TOXINAS PRINCIPALES

2.1.7.1. Cp-PLC o toxina alfa (α)

La fosfolipasa C del *C. perfringens* (Cp-PLC) o la toxina α fue la primera toxina bacteriana que mostró tener actividad enzimática. Las características y actividades serán descritas en mejor detalle más adelante (ver Capítulo 2.3).

2.1.7.2. Toxina beta (β)

La toxina β induce inflamación, necrosis de mucosa intestinal y letalidad en ratones (Songer, 1996). Posee un peso molecular entre 28 y 40 kDa (Hatheway, 1990; Rood y Cole, 1991; Smedley *et al.*, 2004; Dushesnes y Mainil, 2005) y un punto isoeléctrico (pI) de 5.6 (Hatheway, 1990). El gen codificante (gen *cpb*) se encuentra localizado en un plásmido (Smedley *et al.*, 2004; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999), el cual revela un ORF codificante de un polipéptido de 336 aminoácidos que incluye una secuencia señal de 27

aminoácidos, la cual es cortada para producir una toxina activa (Smedley *et al.*, 2004; Rood, 1998). La toxina β es secretada durante la última fase de crecimiento logarítmico (Smedley *et al.*, 2004), es termolábil y sensible a las proteasas (Songer, 1996; Rood y Cole, 1991; Smedley *et al.*, 2004).

El mecanismo de acción de la toxina β es aún poco conocido. Posee una significativa homología a nivel de aminoácidos con la toxina α , la toxina γ y la leucocidin de *Staphylococcus aureus*, las cuales oligomerizan y forman poros en las membranas celulares. Esto sugiere que la toxina β podría tener una actividad similar, resultando en la alteración de la permeabilidad de la membrana, y consecuente la muerte celular (Rood y Cole, 1991; Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004; Dushesnes y Mainil, 2005).

2.1.7.3. Toxina epsilon (ϵ)

La toxina ϵ es una exotoxina con actividad letal, necrotizante y edematizante (Hatheway, 1990; Songer, 1996; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004). El gen codificante de la toxina ϵ (gen *etx*) es encontrado en un plásmido de gran tamaño (Songer, 1996; Rood y Cole, 1991; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004) y codifica una protoxina relativamente inactiva constituida de 311 aminoácidos y un peso molecular de 35.25 kDa (Hatheway, 1990). Esta protoxina es activada por la acción de las proteasas intestinales, tales como la tripsina y la quimiotripsina, y así como también por las proteasas propias (toxina λ) del *C. perfringens* (Rood y Cole, 1991; Rood, 1998; Smedley *et al.*, 2004), mediante la remoción proteolítica en los residuos 13 aminoterminal y 22 carboxiterminal (Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004) formando así una toxina activa de 283 aminoácidos (Rood, 1998).

La toxina ϵ activada interactúa con receptores (probablemente proteínas glicosiladas) en la membrana celular (Smedley *et al.*, 2004), uniéndose fuertemente (Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004) y formando un largo complejo de membrana (155 kDa) con una sola clase de proteínas de

membrana (Petit *et al.*, 1999). Este largo complejo es un heptámero que actúa como un poro no selectivo, alterando la permeabilidad de la membrana celular (Smedley *et al.*, 2004).

2.1.7.4. Toxina iota (*ι*)

La toxina *ι* posee actividad dermonecrotica, causa alteración de la permeabilidad y es letal en ratones (Hatheway, 1990; Songer, 1996; Rood y Cole, 1991). Esta toxina está compuesta por dos componentes inmunológico y biológicamente distintos: un componente enzimático (Ia) y un componente de unión (Ib), siendo necesaria la presencia de ambos para la actividad citotóxica (Hatheway, 1990; Songer, 1996; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Duchesnes y Mainil, 2005).

La toxina *ι* es codificada por dos genes ubicados en un plásmido (Petit *et al.*, 1999), agrupados y organizados en un operon (Duchesnes y Mainil, 2005). El componente Ia codificado por el gen *iap* (Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999), posee un peso molecular de 47.5 kDa (Hatheway, 1990; Rood, 1998), un pI de 5.2 (Hatheway, 1990) y tiene actividad ADP-ribosiltransferasa-actina específica (Hatheway, 1990; Songer, 1996; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Dushesnes y Mainil, 2005). El componente Ib, codificado por el gen *ibp* (Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999) posee un peso molecular de 100 kDa (Dushesnes y Mainil, 2005), un pI de 4.2 (Hatheway, 1990) y reconoce un receptor de superficie celular necesaria para la internalización de ambos componentes por endocitosis mediada por receptor y la translocación del componente Ia dentro del citoplasma (Petit *et al.*, 1999; Dushesnes y Mainil, 2005). Ambos componentes (Ia y Ib) son sintetizados durante la fase de crecimiento exponencial y secretados como protoxinas; que son proteolíticamente activados por remoción de un péptido N-terminal de 20 kDa en el componente Ib (80 kDa) y un residuo N-terminal de 9 a 11 aminoácidos en el componente Ia (Dushesnes y Mainil, 2005). El componente Ia actúa intracelularmente catalizando la ADP-ribosa, la cual unida al sitio de actina previene la nucleación y la polimerización de los monómeros de actina ADP-ribosiladas. El resultado es la despolimerización

de los filamentos de actina y acumulación de actina en forma de polímeros (Petit *et al.*, 1999; Dushesnes y Mainil, 2005).

2.1.7.5. Enterotoxina del *C. perfringens*: CPE

La enterotoxina del *C. perfringens* (*C. perfringens* enterotoxin; CPE) es una endotoxina sintetizada sólo durante la fase de esporulación, desencadena una significativa secreción de agua e iones en los enterocitos provocando descamación y acortamiento de las microvellosidades intestinales (Rood y Cole, 1991; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; McClane, 2000; Smedley *et al.*, 2004), mas no posee actividad necrotizante (Niilo, 1986). La CPE es producida por menos del 5% de la población de *C. perfringens* (Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004), principalmente por cepas tipo A (Hatheway, 1990; Rood y Cole, 1991; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004), algunas cepas tipo C y D (Hatheway, 1990; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999) y sólo pocas cepas tipo B y E (Hatheway, 1990; Petit *et al.*, 1999).

El gen que codifica la CPE (gen *cpe*) puede ser encontrado o en una región variable del cromosoma (cepas asociadas a intoxicación de origen alimentario) o en un largo plásmido (cepas asociadas a gastroenteritis humana no asociadas a intoxicación de origen alimentario y enteritis en animales) (Songer, 1996; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 2002; Smedley *et al.*, 2004). El gen *cpe* localizado cromosomalmente, es un transposon de 6.3 kb que comprende dos copias flanqueantes de secuencias de inserción IS1470 y una copia de IS1469 (Brynstad *et al.*, 1997; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 2002); mientras que el localizado extracromosomalmente es encontrado en un gran plásmido de 100 a 120 kb, flanqueado por la secuencia de inserción IS1469 y, en algunas cepas, por otra secuencia de inserción, IS1151 (Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 2002). El gen *cpe* plasmídico ha demostrado ser transferido por mecanismos conjugativos (Brynstad *et al.*, 2001; Smedley *et al.*, 2004).

La CPE consiste de un péptido de 309 aminoácidos con un peso molecular de 35 kDa (Hatheway, 1990; Rood y Cole, 1991; Rood, 1998; Smedley *et al.*, 2004), un pI de 4.3 (Hatheway, 1990) y una solubilidad de 3.44 mg/ml (Rood y Cole, 1991). La CPE posee un dominio N-terminal con actividad citotóxica y un dominio C-terminal con actividad de receptor (Rood y Cole, 1991; Songer, 1996; Takahashi *et al.*, 2005). La tripsina y la quimiotripsina provocan la remoción proteolítica de 10 a 44 aminoácidos N-terminales, incrementando, en dos a tres veces, la actividad citotóxica (Hatheway, 1990; Songer, 1996; Rood, 1998).

La biosíntesis de CPE ocurre después de la activación del gen *cpe* por factores transcripcionales (SigE y SigK), los cuales también controlan los genes de esporulación (Rood y Cole, 1991; Zhao y Melville, 1998), acumulándose la CPE en grandes cantidades y formando cuerpos de inclusión en el compartimiento de la célula madre de la espora de *C. perfringens*, y siendo liberado al lumen intestinal sólo cuando la célula madre se lisa y libera su espora (Rood y Cole, 1991; Smedley *et al.*, 2004).

La CPE se une a un receptor proteínaceo (posiblemente un claudin-4) presente en la membrana citoplasmática del borde en ribete del enterocito (McClane, 2000; Smedley *et al.*, 2004). Después de la unión de la CPE con su receptor forman el “complejo pequeño” de 90 kDa, que se inserta en la membrana celular (Rood y Cole, 1991; Smedley *et al.*, 2004). Este complejo *per se* no es suficiente para inducir citotoxicidad. Inmediatamente el “complejo pequeño” se une a otra proteína de membrana (70 kDa) para formar el “gran complejo”, complejo hidrofóbico de 160 kDa. El “gran complejo” aparentemente tiene propiedades tipo poro permitiendo el libre pasaje de pequeñas moléculas a través de la membrana, y conduciendo a la alteración de su permeabilidad. Finalmente, causa un colapso coloidosmótico y la muerte celular (Rood y Cole, 1991; Songer, 1996; Petit *et al.*, 1999; McClane, 2002; Smedley *et al.*, 2004).

2.1.7.6. Toxina beta dos ($\beta 2$)

La toxina $\beta 2$ ha sido recientemente descrita (Gibert *et al.*, 1997) y su gen *cpb2* ha sido asociado a la presentación de enfermedades entéricas en animales (Herholz *et al.*, 1999; Garmory *et al.*, 2000; Gkiourtzidis *et al.*, 2001; Bueschel *et al.*, 2003; Waters *et al.*, 2003; Engstrom *et al.*, 2003; Dray, 2004; Smedley *et al.*, 2004; Embury-Hyatt *et al.*, 2005; Jost *et al.*, 2005; Boujon *et al.*, 2005).

El gen *cpb2* es localizado en un plásmido de 59 a 100 kb (Gibert *et al.*, 1997; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004; Schotte *et al.*, 2004) y su expresión es positivamente regulada por el sistema regulatorio transcripcional VirR/VirS (Schotte *et al.*, 2004), alcanzando su máximo nivel durante la fase logarítmica tardía (Smedley *et al.*, 2004). La presencia de este gen ha sido reportado en varios tipos de *C. perfringens* (Smedley *et al.*, 2004; Schotte *et al.*, 2004; Jost *et al.*, 2005), mas su expresión no ha sido demostrado en todas (Schotte *et al.*, 2004; Jost *et al.*, 2005).

El gen *cpb2* codifica un péptido de 31 kDa, el cual es procesado transcripcional a una toxina biológicamente activa de 28 kDa y un pI de 5.01 (Smedley *et al.*, 2004; Schotte *et al.*, 2004). La toxina $\beta 2$ posee actividad letal para ratones (dosis de 3 μ g) (Smedley *et al.*, 2004; Schotte *et al.*, 2004), actividad citotóxica para algunas líneas celulares (Gibert *et al.*, 1997; Smedley *et al.*, 2004) y también provoca necrosis hemorrágica en mucosa intestinal en las pruebas de intestino ligado (Petit *et al.*, 1999; Schotte *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2004). Esta toxina es altamente susceptible a la acción proteolítica, así tratamientos con tripsina escinden a la toxina en dos péptidos (13 y 15 kDa), resultando en una completa pérdida de la citotoxicidad (Smedley *et al.*, 2004; Schotte *et al.*, 2004). La actividad específica de la toxina $\beta 2$ aún no está totalmente clara, pero posiblemente sea la formación de un poro u otro mecanismo que conduzca a una disrupción de la membrana celular (Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004; Schotte *et al.*, 2004).

A pesar de su denominación, la toxina β_2 no tiene significativa homología con la toxina β (15% de similitud de aminoácidos) (Gibert *et al.*, 1997; Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004; Schotte *et al.*, 2004) sólo existiendo una baja reacción inmunológica cruzada entre estas (Petit *et al.*, 1999; Schotte *et al.*, 2004).

2.2. FOSFOLIPASAS BACTERIANAS

Las fosfolipasas son un grupo heterogéneo de proteínas producidas por muchas bacterias y células eucariotas. Su papel en las células eucariotas ha sido tradicionalmente el control de los niveles de fosfolípidos en las membranas celulares, regulando la estructura de las barreras con el medio extracelular y entre los compartimentos intracelulares. Recientemente, se ha visto que las fosfolipasas juegan además un importante papel en las vías de transducción de señales relacionadas con el metabolismo, la diferenciación y la muerte celular a través de la liberación de los segundos mensajeros lipídicos, productos de su acción degradativa sobre los fosfolípidos de la membrana (Pelech y Vance, 1989; Exton, 1990).

En procariotas la función de las fosfolipasas como reguladores de la estructura de membranas no ha sido aún determinada y su papel como factores de virulencia en las especies patógenas a pesar de haber sido ampliamente estudiado a partir del descubrimiento de la Cp-PLC por MacFarlane y Knight en 1941 (primera toxina bacteriana con actividad enzimática) no han sido realizados aun un gran número de experimentos con fosfolipasas purificadas a partir de patógenos humanos y animales. Actualmente, con el desarrollo de las técnicas en ingeniería genética que se han podido construir mutantes *knock out* en los genes codificantes de las fosfolipasas bacterianas, y así poder asignarles una función específica en la patogénesis de la infección tanto *in vitro* como durante la infección del huésped *in vivo*. Las evidencias experimentales que se están obteniendo muestran que las fosfolipasas bacterianas, además de una función mecánica en la desorganización de la arquitectura de las membranas eucariotas, parecen jugar un papel fundamental en la interferencia de las vías de transducción de señales de las células huésped, alterando la maquinaria celular para favorecer el establecimiento de la infección bacteriana (Schmiel y Miller, 1999; Songer, 1997; Titball, 1993).

2.2.1. CLASIFICACIÓN DE LA FOSFOLIPASAS BACTERIANAS

La estructura general de los fosfolípidos consta de un grupo polar unido a una cadena hidrocarbonada apolar por medio de un grupo fosfato y un esqueleto de glicerol. La naturaleza del grupo polar se utiliza para clasificar a los distintos fosfolípidos. De esta forma, la serina está presente en la fosfatidilserina, la colina en la fosfatidilcolina y en la esfingomiolina, o el inositol en el fosfatidilinositol. La cola hidrocarbonada en los fosfolípidos presenta generalmente de 16-18 átomos de carbono y puede estar insaturada. Las fosfolipasas hidrolizan los fosfolípidos, y el lugar donde actúan se emplea para clasificar a las fosfolipasas en A1, A2, C o D (Figura 2.1) (Murray *et al.*, 2001)

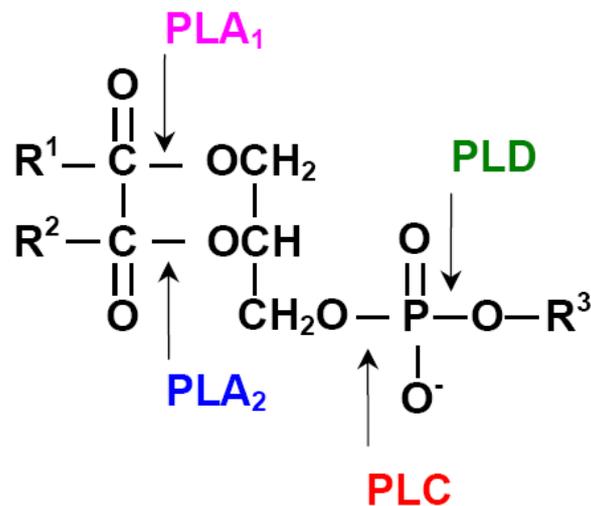


Figura 2.1. Centros de corte de las fosfolipasas A1 (PLA1), A2 (PLA2), C (PLC) y D (PLD) (tomado de Gonzales, 2001).

Además, las fosfolipasas pueden agruparse en función del sustrato por el que tienen preferencia, lo cual ha servido para determinar grupos que tienen una afinidad de sustrato muy específica, como pueden ser las fosfatidilinositol fosfolipasas o las esfingomielininas. Sin embargo, la mayoría de las fosfolipasas bacterianas no tienen afinidad por un solo sustrato, sino que han evolucionado para hidrolizar en mayor o menor medida distintos fosfolípidos en función, probablemente, de las particularidades biológicas del microorganismo que las sintetiza. Por tanto, la clasificación de las fosfolipasas en virtud de sus propiedades exclusivamente enzimáticas ha resultado ser extraordinariamente compleja e ineficaz, por lo que en estos últimos años se está tendiendo a

agruparlas en función de sus homologías estructurales (Titball, 1999, Murray *et al.*, 2001).

2.2.2. PAPEL EN LA VIRULENCIA DE LAS FOSFOLIPASAS C BACTERIANAS

Debido al importante papel que se le está asignando a las fosfolipasas procariotas en la patogenia de las infecciones bacterianas, en estos últimos años se están clonando y secuenciando multitud de genes de fosfolipasas de bacterias patógenas. Entre ellas a las fosfolipasas C (Cuadro 2.3 y 2.4), mediante una aproximación genética, se les ha podido asignar una función clara en la patogénesis de los respectivos procesos infecciosos, y son aquellas en las que vamos a profundizar a continuación.

2.2.2.1. PLC de *Pseudomona aeruginosa*

Pseudomona aeruginosa es un patógeno oportunista de humanos y animales. Puede producir infecciones letales cuando infecta heridas o quemaduras, cuando prolifera en individuos inmunocomprometidos o cuando se establece en el sistema pulmonar de pacientes con fibrosis quística. Posee dos genes que codifican las fosfolipasas C: el gen *plcS* codifica PlcH, una fosfolipasa hemolítica sobre eritrocitos humanos y ovinos con actividad sobre la fosfatidilcolina y la esfingomielina, y el gen *plcN*, cuyo producto, PlcN, es activo sobre la fosfatidilcolina y la fosfatidilserina y no presenta actividad hemolítica. Hasta el momento sólo se ha implicado a PlcH en virulencia, ya que en experimentos realizados en el modelo murino, la DL50 del mutante $\Delta plcS$ fue 2.4 veces mayor que la de la cepa silvestre correspondiente, lo que hace pensar que podría jugar un importante papel en la colonización tisular durante la infección (Saiman *et al.*, 1992; Ostroff *et al.*, 1989; 1990).

Cuadro 2.3. Fosfolipasas C bacterianas (Titball, 1993)

Bacteria	Nombre de PLC	Peso Molecular (Da)	Especificidad de sustrato*	Requerimientos de iones	Hemolisis
	PC-PLC	28 520	PC, PE, PS	Zn ²⁺ , Ca ²⁺ ,	-
<i>Bacillus cereus</i>	SMase	34 233	SPM	Mg ²⁺	+
	PI-PLC	34 466	PI, LPI	Ninguno	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>	PI-PLC	34 515	PI, LPI	NR	NR
<i>Clostridium bifermentans</i>	PLC	42 746	NR	NR	±
	γ-toxin	30 000	PC, SPM, LPC, PE, PI, PG	Zn ²⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺	+
<i>Clostridium novyi</i>	PI-PLC	30 000	PI		
<i>Clostridium perfringens</i>	Cp-PLC	42 500	PC, SPM, PS, LPC	Zn ²⁺ , Ca ²⁺ ,	+
	PLC-A	34 000	PI	Ninguno	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	PLC-B	39 000	PC, PE, PS, SPM	Zn ²⁺	±
	β-toxin	34 546	SPM, LPC	Mg ²⁺	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	PI-PLC	20 000- 30 000	PI, LPI	Ninguno	
	PLC-H	78 352	SPM, LPC, PC	NR	+
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	PLC-N	73 455	PC, PS	NR	-
<i>Pseudomona cepacia</i>	PLC	72 000	PC, SPM	NR	+
<i>Streptomyces hachijoensis</i>	PLC	18 000	PC	Mg ²⁺	NR
	PLC	NR	PC, SPM, PE, PS	Mg ²⁺	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	PLC	NR	PC, SPM, PE, PS	Mg ²⁺	+
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	PLC	NR	pNPPC	NR	NR
<i>Leptospira interrogans</i>	SMase	NR	SPM, PC	Mg ²⁺	+
<i>Leptospira pneumophila</i>	PLC	50 000-54 000	PC	NR	-

(*) PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PS, fosfatidilserina; SPM, esfingomielina; PI, fosfatidilinositol; LPI, lisofosfatilinositol; LPG, lisofosfatidilglicerol, PG, fosfatidilglicerol.

(+) presencia de actividad hemolítica; (-) ausencia de actividad hemolítica; NR, no reportado.

Cuadro 2.4. Propiedades de las Zinc-metalofosfolipasas (Tiball, 1993)

Bacteria	Enzima	Domino C-terminal	Actividad fosfolipasa C (u.y.h./mg) ¹	Actividad esfingomielinasa	Actividad hemolítica (u.h./mg/30 min) ²	Letalidad (µg/raton)
<i>C. perfringens</i>	CP-PLC	Si	252	Si	520 000	0.03-0.1
<i>C. bifermentans</i>	PLC	Si	5	NR	12 000	1-5
<i>L. monocytogenes</i>	PLC-B	No	Si	Si	0	>25
<i>B. cereus</i>	PC-PLC	No	Si	No	0	>30

(1) u.y.h., unidades hidrolizantes de fosfolípidos de yema de huevo

(2) u.h., unidades hemolíticas

NR, no realizado.

2.2.2.2. Toxina β de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es el agente causal de multitud de infecciones nosocomiales en humanos, y de mastitis en rumiantes. Produce una potente esfingomielinasa o toxina β , que está implicada en las propiedades hemolíticas de la bacteria en agar sangre. Hay una gran cantidad de información disponible acerca de los efectos de la toxina β purificada *in vitro* e *in vivo*, que le confieren propiedades citotóxicas frente a monocitos y células epiteliales humanas así como capacidad inflamatoria en el modelo de queratitis cunícola (Walev *et al.*, 1996; O'Callaghan *et al.*, 1997). Estos resultados son difícilmente interpretables, debido a que la utilización de proteínas purificadas no reproduce el modo natural de la exposición a la toxina ni permite descartar la presencia de contaminantes en el purificado. Por tanto, en la actualidad no existen pruebas concluyentes acerca de si la toxina β está o no implicada en la patogénesis de la infección por *S. aureus*. Sin embargo, la evidencia de que la mayoría de las cepas de *S. aureus* aisladas de pacientes son toxina β positivos, hace pensar que realmente esta toxina juega algún papel en la virulencia (Hummel *et al.*, 1976). Las únicas aproximaciones genéticas que se han realizado para determinar su papel *in vivo* se han basado en la utilización de cepas toxina β negativas, como resultado de la inserción del fago ϕ 13 en su gen codificante, *h1b*. Esta cepa es menos virulenta en el modelo de glándula mamaria murina, aunque, sorprendentemente, parece estimular el flujo de neutrófilos al lugar de infección en mayor medida que la cepa toxina β positiva (Bramley *et al.*, 1989). Sin embargo, no se puede descartar en estos experimentos que exista un efecto pleiotrópico del fago ϕ 13 sobre la expresión de otros

factores de *S. aureus*, con lo que habrá que esperar a la realización de ensayos de virulencia con mutantes *hly*- genéticamente definidos para establecer si la β -toxina está implicada en la virulencia de *S. aureus*.

2.2.2.3. PlcA y PlcB de *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes posee dos fosfolipasas C cuyos genes, *plcA* y *plcB*, están ubicados en el cluster *hly* de virulencia. Mutantes por transposición en *plcA* dieron lugar a un incremento en la DL50 respecto a la cepa parental de *L. monocytogenes* de 1000 veces (Camilli *et al.*, 1991). Sin embargo, posteriormente se observó que ese incremento se debía principalmente al efecto polar que el transposón ejercía sobre la transcripción de *prfA*, que se encuentra downstream de *plcA* y con el que se co-transcribe mayoritariamente en forma de bicistrón. Mutantes de delección en *plcA* mostraron un aumento en la DL50 de sólo 2 veces, minimizando la función de PlcA en la virulencia de *Listeria* respecto a lo que se había vaticinado inicialmente.

La actividad de PlcB es importante para la virulencia de *Listeria in vivo*, ya que mutantes $\Delta plcB$ poseen una DL50 20 veces mayor que *L. monocytogenes* silvestre. Mutantes dobles $\Delta plcAB$ presentan una pérdida de virulencia de 500 veces, lo que indica que ambas fosfolipasas actúan de forma sinérgica en la patogénesis de *Listeria* (Marquis *et al.*, 1995). Además del papel mecánico de PlcA y PlcB como factores membranoactivos en el escape de la bacteria al citoplasma de la célula infectada, en el que actúan como adyuvantes de Hly, estas fosfolipasas constituyen el modelo actual más extendido para el estudio de la interferencia bacteriana en las vías de transducción de señales de las células eucariotas.

2.3. FOSFOLIPASA C DE *Clostridium perfringens* (Cp-PLC)

2.3.1. ESTRUCTURA Y DISRUPCION DE MEMBRANA

La Cp-PLC es una Zn^{2+} -metaloenzima (EC 3.1.4.3) compuesta de 370 aminoácidos cuya estructura tridimensional muestra dos dominios unidos por una corta región unidora flexible (Naylor *et al.*, 1998). El dominio N-terminal (residuos 1-246) consiste de nueve α -hélices cuidadosamente empaçadas, conteniendo el sitio activo (Naylor *et al.*, 1998). El dominio C-terminal (residuos 256-370) consiste de un motivo de 8 cadenas antiparalelas β -sandwich necesarios para la interacción dependiente de Ca^{2+} con el sustrato (Guillouard *et al.*, 1997; Naylor *et al.*, 1998). La Cp-PLC se une a las bicapas artificiales que contienen colesterol y esfingomiélinea ó fosfatidilcolina, degrada los fosfolípidos, y causa disrupción de la membrana (Nagahama *et al.*, 1996) (Figura 2.2).

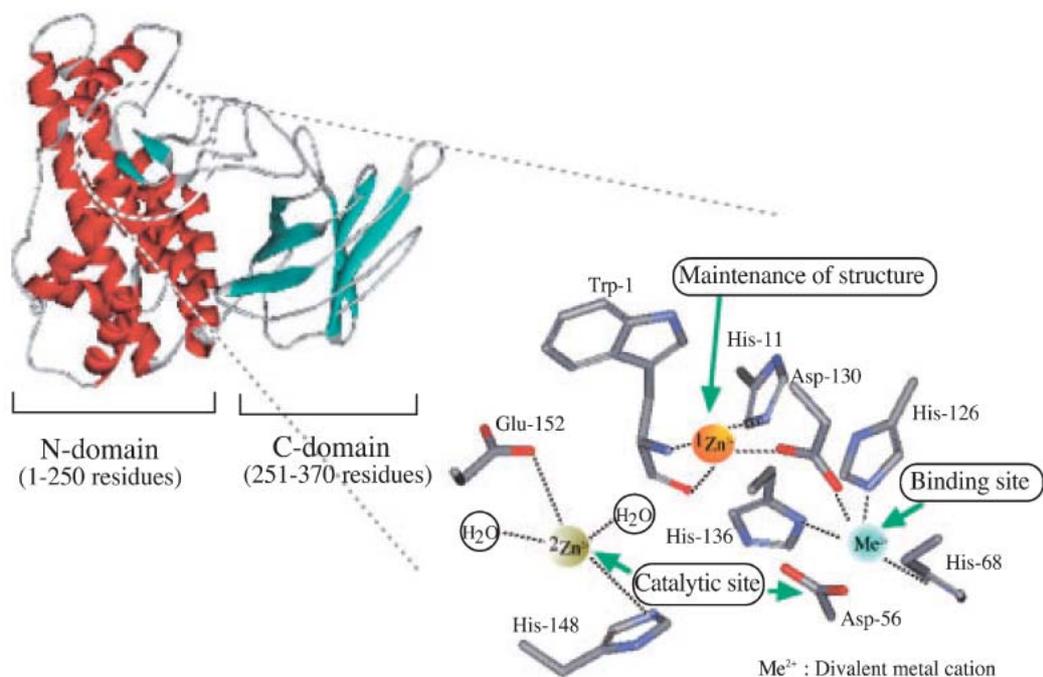


Figura 2.2. Representación esquemática del sitio activo de la Cp-PLC (tomado de Sakurai *et al.*, 2004)

En su forma activa, la Cp-PLC contiene tres iones Zn^{2+} en el sitio hendido (Naylor *et al.*, 1998). Estos iones son coordinados por los residuos Tyr-1, Glu-152, Asp-56, Asp-130, e His en las posiciones 11, 68, 126, 136, y 148, respectivamente (Naylor *et al.*, 1998). Mutagénesis dirigidas a estos residuos resulta en variantes ausentes de actividad enzimática y tóxica, demostrando que la capacidad catalítica es requerida para la toxicidad (Guillouard *et al.*, 1996; Nagahama *et al.*, 1995; 1997, 2000).

El dominio C-terminal posee tres iones Ca^{2+} y tiene analogía a los dominios C2 presentes en las proteínas eucarióticas envueltas en el transporte vesicular y la transducción de señales, tal como la sinaptotagmina y la proteínquinasa C (Guillouard *et al.*, 1997; Naylor *et al.*, 1998). Una variante truncada de Cp-PLC ausente del dominio C-terminal, que retiene la actividad lecitinasa pero ausente la actividad esfingomielinasa, no disrumpe las membranas artificiales (Nagahama *et al.*, 1998) y no posee actividad hemolítica ni citotóxica (Titball *et al.*, 1991; Nagahama *et al.*, 1994; Florez-Diaz *et al.*, 1998). Estos hallazgos demuestran que el dominio C-terminal y la actividad esfingomielinasa son requeridos para causar disrupción de membrana, hemolisis y citototoxicidad.

Por otra parte, los iones de Ca^{2+} son esenciales para la interacción de Cp-PLC con las bicapas fosfolipídicas (Guillouard *et al.*, 1997). Los sitios de unión a Ca^{2+} llamados Ca1, Ca2 y Ca3 son localizados en la superficie de interacción de la membrana con la proteína, y envuelven a los residuos 265-275, 292-303 y 330-339 (Nagahama *et al.*, 2000). Ha sido propuesto que las uniones de Cp-PLC al target de la membrana es el resultado de la interacción entre los iones Ca^{2+} unidos al dominio C-terminal y los grupos de cabezas polares de los fosfolípidos (Guillouard *et al.*, 1997; Naylor *et al.*, 1998; 1999). La mutagénesis del sitio directo de los residuos individuales de unión a Ca^{2+} resultan en variantes que muestran una decrecida actividad enzimática y una reducida toxicidad (Alape-Girón, 2000; Walker *et al.*, 2000). Los residuos Tyr-331 y Phe-334, localizados en la superficie de unión a Ca^{2+} , han sido propuestos a participar en la interacción con la membrana (Naylor *et al.*, 1998). Estos residuos podrían llegar a ser escondidos en el target de la membrana después de

la unión mediada por Ca^{2+} de la toxina (Naylor *et al.*, 1998; Nagahama *et al.*, 2002). Mutagénesis de sitio directo de estos residuos resulta en variantes con baja actividad enzimática y tóxica, lo cual soporta su función en la unión a la membrana celular (Jepson *et al.*, 2001).

Estudios cristalográficos han revelado que la Cp-PLC existe en dos conformaciones: una forma cerrada inactiva y una forma abierta activa. En la forma cerrada hay solo dos iones de Zn^{2+} en el sitio activo y la hendidura del sitio activo es enterrado por los loop que abarcan los residuos 132-149 y por lo tanto, inaccesible al sustrato (Eaton *et al.*, 2002). En la forma abierta el sitio activo es accesible y tiene tres iones de Zn^{2+} . Además, en la forma cerrada, el loop que abarcan los residuos 55-93 hace contacto con el dominio C-terminal a través de los residuos Phe-78, Leu-86 y Tyr-88; mientras en la forma abierta los dominios interactúan principalmente por medio de contactos hidrofóbicos, la interacción iónica ocurre entre el residuo Tyr-62 y los residuos Asn-294 y Thr-306 y entre los residuos Asp-92 y Thr-308 a través de una molécula de agua (Naylor *et al.*, 1998). Esto sugiere que la unión del dominio C-terminal de Cp-PLC y el target de la membrana induce un cambio conformacional en el dominio N-terminal, el cual descubre el sitio activo, así permitiendo la hidrólisis de los sustratos fosfolipídicos (Eaton *et al.*, 2002).

Aunque considerables progresos han sido alcanzados en los recientes años, el conocimiento de la estructura de Cp-PLC y su actividad de disrupción de membranas artificiales, y el entendimiento de las interacciones moleculares envueltas en la unión, inserción y disrupción de membranas celulares (Figura 2.3) aun es incompleto.

2.3.2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *plc*

El gen *plc* es transcrito constitutivamente a un nivel basal (Ba-Thein *et al.*, 1996). Sin embargo, su transcripción esta incrementada durante la fase de exponencial de crecimiento por la activación de un sistema de transducción de 2-componentes, constituido por el sensor transmembrana histidin-quinasa, VirS; y la proteína unidora a ADN, VirR (Ba-Thein *et al.*, 1996). El mecanismo por el

cual el sistema VirR/VirS controla la producción de Cp-PLC envuelve a la molécula reguladora RNA VR-RNA codificada por el gen *hyp 7* (Shimizu *et al.* 2002b). Sin embargo, el preciso modo de acción de este regulador de RNA no ha sido elucidado.

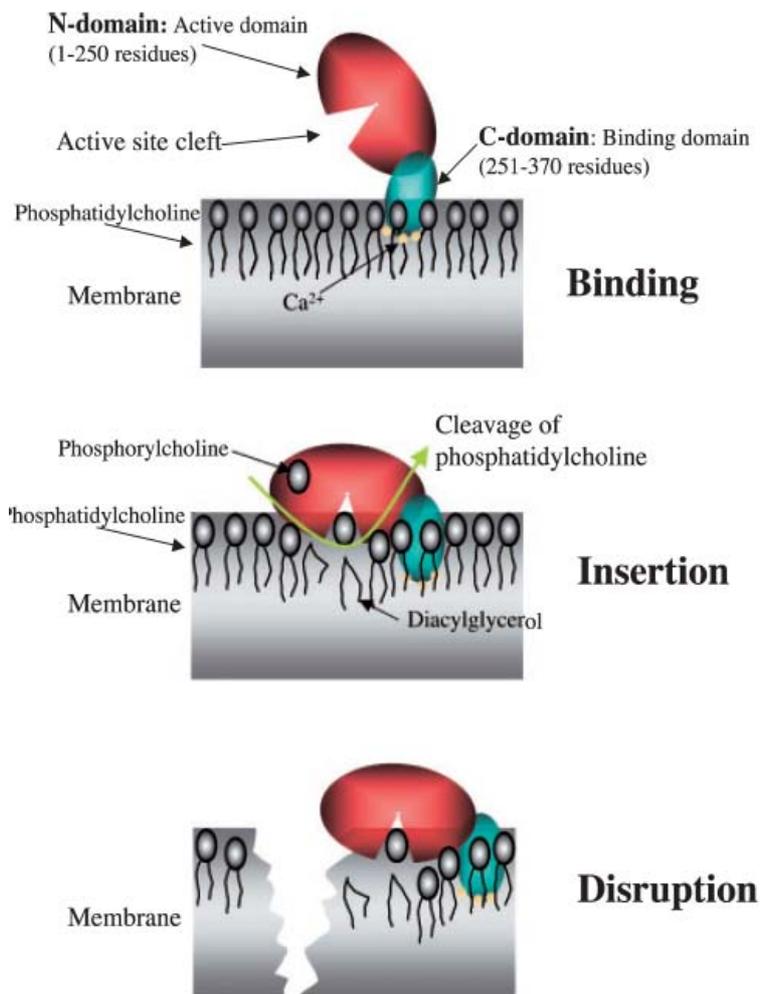


Figura 2.3. Acción de la Cp-PLC en membranas artificiales y biológicas (tomado de Sakurai *et al.*, 2004)

El sistema VirR/VirS es conocido por regular la producción de varias toxinas y enzimas en una forma global, pero el factor(es) que estimula(n) la cascada regulatoria VirS/VirR aún permanece(n) desconocido(s) (Rood, 1998). Una pequeña molécula de señalización intracelular producida por *C. perfringens* ha sido postulada como sensor quórum que controlaría la expresión del regulon VirS/VirR (Rood, 1998). Así, una vez alcanzada determinada densidad de

concentración de *C. perfringens* en el tejido del huésped, los niveles de esta molécula señal podrían llegar a ser suficientes para unirse a VirS, así activando la cascada regulatoria (Rood, 1998). La activación de esta cascada podría conducir a una incrementada producción de toxinas y enzimas hidrolíticas que permitan a la bacteria ganar una eficientemente fuente nutricional a través de la degradación del tejido del huésped.

La expresión del gen *plc* en *C. perfringens* muestra una dependencia de la temperatura, observándose altos niveles de producción de Cp-PLC a bajas temperaturas (Matsushita *et al.*, 1996). Este efecto es dependiente de una región de flexión inherente al ADN constituida por tres tramos d(A)₅₋₆ localizados *up stream* del box-35 del promotor *plc* (Matsushita *et al.*, 1996; Katayama *et al.*, 1999). La curvatura del ADN inducida por las colas poly (A) incrementa la formación del complejo RNA polimerasa-promotor *plc*, el cual favorece la transcripción del gen (Katayama *et al.*, 1999). Ha sido sugerido que la incrementada expresión del gen *plc* a bajas temperaturas podría ser ventajosa para la bacteria seguida a la muerte del hospedero, debido a que una alta producción de Cp-PLC permitiría un eficiente uso de los fosfolípidos como fuente de carbono y energía durante su vida saprofitica (Katayama *et al.*, 1999).

2.3.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La Cp-PLC es una fosfohidrolasa con una marcada preferencia por la fosfatidicolina y la esfingomielina, dos principales componentes de la capa externa de las membranas celulares (Krug y Kent, 1984; Nagahama *et al.*, 1996). *In vivo*, Cp-PLC tiene varias actividades: incrementa la contractibilidad cardiaca, incrementa la permeabilidad capilar, induce la agregación plaquetaria, hemólisis, myonecrosis, y es letal (Titball *et al.*, 1999). Estas actividades de Cp-PLC son dependientes en su capacidad para hidrolizar membranas fosfolipídicas (Titball *et al.*, 1999). A bajas concentraciones, Cp-PLC causa una limitada hidrólisis de la fosfatidilcolina y la esfingomielina, generando segundos mensajeros: el diacylglicerol (DAG) y la ceramida. Estos gatillan varias señales de transducción y conducen a la producción descontrolada de mediadores intercelulares (Titball *et al.*, 1999) (Figura 2.4). A altas concentraciones, Cp-

PLC causa masiva degradación fosfolipidica, disrupción de membrana y citolisis (Titball *et al.*, 1999). Sin embargo, la sensibilidad de diferentes células al daño de membrana por Cp-PLC varia marcadamente dependiendo de la regulación de la síntesis de fosfatidilcolina así como la proporción de fosfolipidos y gangliosidos en la membrana plasmática (Flores-Diaz *et al.*, 2003). La capacidad celular de la síntesis de fosfatidilcolina y la disponibilidad de precursores determina si la célula podrá reemplazar los fosfolipidos degradados (Flores-Diaz *et al.*, 2003). El contenido de gangliosidos en la membrana plasmática podría afectar la extensión de la degradación fosfolipidica y la capacidad de Cp-PLC de unirse y adquirir su conformación activa (Flores-Diaz *et al.*, 2003).

2.3.4. EFECTOS LOCALES

2.3.4.1. Actividad miotóxica

La inyección intradérmica de Cp-PLC en cobayos causa daño en la membrana de las fibras musculares subcutánea circundantes (Strunk *et al.*, 1967). El análisis ultraestructural revela conspicuas interrupciones en la integridad de la membrana plasmática celular del músculo (Strunk *et al.*, 1967). La toxicidad de Cp-PLC en células musculares es ampliamente dependiente del daño en la membrana, evidenciada por el inmediato incremento en niveles plasmáticos de creatin quinasa (CK) después de su inyección intramuscular (Alape-Giron *et al.*, 2000). La alta susceptibilidad de las células musculares al directo efecto de Cp-PLC podría ser relacionada a su bajo contenido de glicoesfingolipidos (Flores-Diaz, 2001). Ha sido mostrado que la reducción de estos glicoesfingolipidos en la membrana celular de cultivos celulares incrementa la susceptibilidad a la disrupción de membrana inducida por esta toxina (Flores-Diaz, 2001). Además, la susceptibilidad de las células musculares bajo condiciones de isquemia podrían incrementarse aún más debido a que la síntesis de gangliosidos decrece en las células expuestas a bajas tensiones de oxígeno (Zhao *et al.*, 2003).

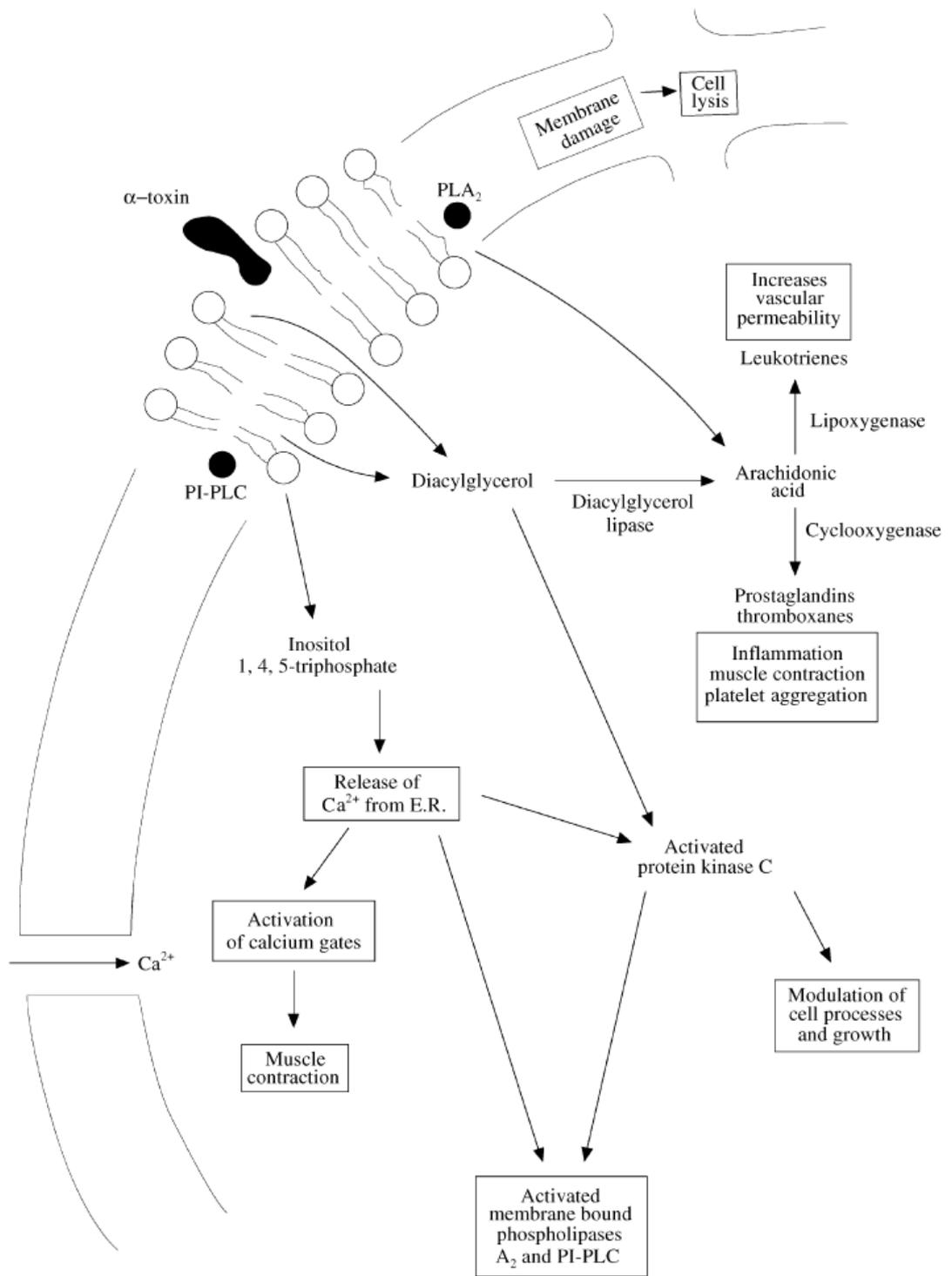


Figura 2.4.: Efectos de la Cp-PLC en células eucariotas (tomado de Titball *et al*, 1999)

Los efectos miotóxicos de Cp-PLC dependen de su actividad catalítica. Así la inyección intramuscular de la variante Cp-PLC enzimáticamente inactiva (D56N) sólo causó un ligero incremento en los niveles de actividad CK plasmática y fue incapaz de inducir lesiones de mionecrosis evaluados macroscópicamente e histológicamente (Alape-Giron *et al.*, 2000). Además, el dominio C-terminal es también necesario para conferirle una total actividad miotóxica. La inyección intramuscular de una variante de Cp-PLC truncada conteniendo sólo los 249 residuos N-terminales conducen a niveles de actividad CK 50 veces más bajos que la inducida por la holotoxina (Alape-Girón *et al.*, 2000). Desde que la variante Cp-PLC truncada retiene la actividad lecitinasa, demuestra que esta actividad *per se* no es suficiente para conferir una total miotoxicidad. Tres ligandos de Ca^{2+} (residuos Asp-269, Asp-293 y Asp-336) y tres residuos hidrofóbicos expuestos en la superficie (Tyr-275, Phe-334 y Tyr-331) han mostrado ser importantes para la miotoxicidad. Variantes de Cp-PLC en las cuales dichos residuos fueron substituidos mostraron marcada reducción de la actividad miotóxica en comparación con la toxina nativa (Alape-Girón *et al.*, 2000; Jepson *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2000).

Durante infecciones de *C. perfringens*, la Cp-PLC también desencadena diversas señales de transducción en varios tipos celulares, conduciendo a la producción incontrolada de mediadores intercelulares que promueven posteriormente la isquemia (Stevens, 2000). Se considera que la miotoxicidad de Cp-PLC es ampliamente debida a las alteraciones que ocasiona en el flujo sanguíneo regional (Stevens, 2000). Sin embargo, ha sido mostrado que tempranas lesiones ultraestructurales en la membrana plasmática de las células musculares después de la isquemia requieren de 2 horas para ocurrir (Kallpati *et al.*, 1974). Desde que las lesiones causadas por Cp-PLC ocurren más rápidamente, esto es probable que las células musculares son irreversiblemente dañadas por el tiempo de reducido flujo sanguíneo. No obstante, el déficit de perfusión causado por Cp-PLC en el tejido infectado podría posteriormente sensibilizar a las células musculares en el tejido isquémico al efecto del daño directo a la membrana por la toxina. Ha sido demostrado que la exposición de cultivos celulares a

condiciones tipo isquémicas tales como inanición de glucosa o inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial, incrementan su sensibilidad a la disrupción de membrana por la Cp-PLC (Kristensen, 1994; Thelestam *et al.*, 1998)

2.3.4.2. Efectos en células endoteliales, plaquetas y leucocitos

La marcada leucostasis y la ausencia de infiltrado inflamatorio en el tejido infectado por *C. perfringens* son en mayor parte debidos a los efectos de la Cp-PLC en las células endoteliales, plaquetas y leucocitos (Stevens, 2000). Esta toxina induce la producción de mediadores intercelulares por las células endoteliales y la sobrerregulación de las moléculas de adhesión en células endoteliales y leucocitos, así alterando el proceso de adherencia leucocitaria y extravasación (Stevens, 2000). Además, Cp-PLC también induce la formación de agregados entre plaquetas y neutrófilos, los cuales causan oclusión vascular (Bryant *et al.*, 2000a,b). La alterada respuesta del hospedero a la infección, y la reducción de la tensión de oxígeno asociada a los eventos trombóticos, inhiben la depuración de la bacteria e incrementan las condiciones para el crecimiento anaeróbico, promoviendo una rápida diseminación de la infección en tejidos del hospedero (Stevens, 2000).

Las células endoteliales expuestas a altas concentraciones de Cp-PLC sufren cambios morfológicos similares a los inducidos después de prolongada exposición a TNF- α ó IFN- γ (Bryant y Stevens, 1996). Estos cambios podrían contribuir al incremento de la permeabilidad vascular y al edema inducido por Cp-PLC (Sugahara *et al.*, 1977). En adición, Cp-PLC también induce la sobrerregulación de la molécula de adhesión leucocitaria endotelial (ELAM-1), la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), y la P-selectina en la superficie de cultivos de células endoteliales (Bryant y Stevens, 1996; Bunting *et al.*, 1997) y estimula la producción endotelial de interleucina 8 (IL-8). Esta interleucina, a altas concentraciones, inhibe la transmigración de neutrófilos a través de las monocapas de células endoteliales en respuesta a diferentes quimioatrayentes (Stevens, 2000). Además, Cp-PLC también estimula a las células endoteliales para producir

los mediadores lipídicos: la prostaciclina y el factor de activador plaquetario (PAF) (Bunting *et al.*, 1997; Stevens y Bryant, 1997). La síntesis de PAF, el cual depende en la generación de DAG y activación PKC, comúnmente contribuye a incrementar la permeabilidad vascular y la adhesión neutrofílica a células endoteliales (Stevens y Bryant, 1997). En adición, Cp-PLC induce la síntesis de TNF- α por células mononucleares los cuales también podrían contribuir a los cambios observados en la microvasculatura durante infecciones con *C. perfringens* (Figura 2.5).

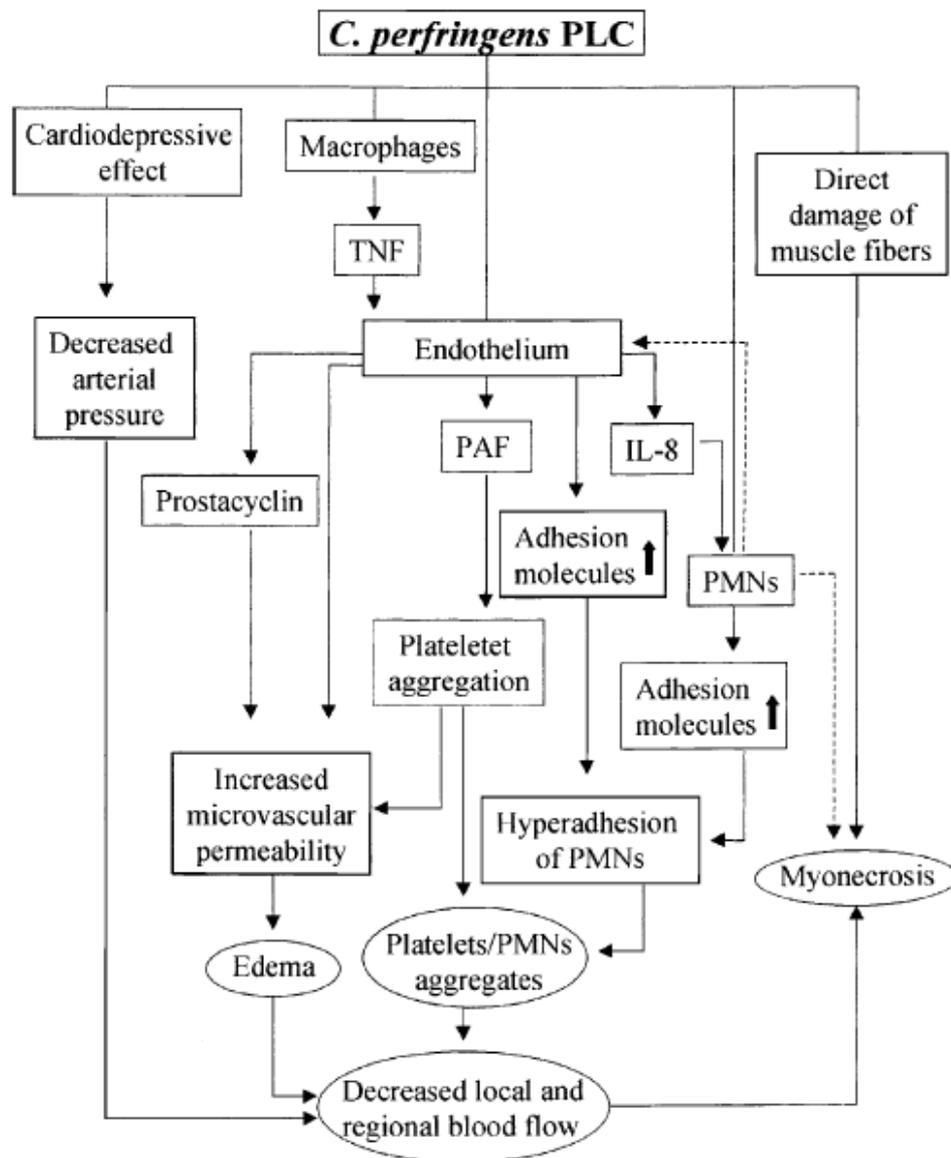


Figura 2.5.: Esquema general de eventos desencadenados por Cp-PLC durante la gangrena gaseosa. Las líneas concisas denotan efectos documentados, mientras las líneas punteadas denotan posibles efectos. (Tomado de Flores-Díaz y Alape-Girón, 2003)

La Cp-PLC induce la translocación del receptor del fibrinógeno plaquetario gpIIbIIIa de los depósitos intercelulares hacia la membrana celular, y produce un cambio conformacional en las moléculas de superficie expresadas (Bryant *et al.*, 2000b, 2003). Estos efectos permiten a las plaquetas unirse al fibrinógeno soluble e inducir la formación de los agregados plaquetas/plaquetas (Bryant *et al.*, 2000a,b, 2003). Por otro lado, la activación de gpIIbIIIa también permite la agregación de las plaquetas trombina-activadas y los neutrófilos (Bryant *et al.*, 2000a,b, 2003). La activación inducida por Cp-PLC de gpIIbIIIa es altamente dependiente de calcio, siendo bloqueada por quelación del calcio intracelular ó inhibición de la operación de la entrada de calcio almacenado (Bryant *et al.*, 2003).

La Cp-PLC no es citotóxica para los neutrófilos aún a concentraciones de 50 µg/mL, no causando la eliminación de marcadores intracelulares (Stevens *et al.*, 1987). Sin embargo, a concentraciones de 2.5 a 20 µg/mL, induce la producción de DAG y ácido fosfatídico, y subsecuentemente estimula la adhesión al fibrinógeno y la fibronectina (Ochi *et al.*, 2002). Desde que CD11b/CD18 en su conformación activa es el ligando para el fibrinógeno, es común que la adhesión de fibrinógeno inducida por Cp-PLC es debida a la activación de tales integrinas en los neutrófilos (Ochi *et al.*, 2002). Además, Cp-PLC provoca la producción de O_2^- e induce un estallido respiratorio en los neutrófilos a través de una ruta dependiente de la ruptura de fosfolípidos e inhibidores de DAG (Ochi *et al.*, 2002). Ambas, la estimulación de la adhesión y la producción de O_2^- son bloqueadas por diferentes inhibidores PKC (Ochi *et al.*, 2002).

La Cp-PLC podría inducir errores en la migración de los neutrófilos a través de los tejidos en diferentes rutas: la sobrerregulación de las moléculas de adhesión en las células endoteliales podrían contribuir a la captura de neutrófilos en la superficie de los vasos sanguíneos y prevenir su extravasación (Bunting *et al.*, 1997; Stevens, 2000). La producción local de IL-8 comúnmente amplifica el reclutamiento de neutrófilos, atenúa su transmigración a través del endotelio y prioriza en ellos el estallido respiratorio (Bryant y Stevens, 1996; Stevens, 2000). Finalmente, la

incrementada activación de moléculas de adhesión, tales como CD11b/CD18 en la superficie de los neutrófilos podrían contribuir a la reducida diapédesis (Stevens, 2000; Ochi *et al.*, 2002).

Los efectos de la Cp-PLC en el tejido muscular y en su microcirculación han sido estudiados por microscopia intravital (Alape-Giron *et al.* 2000; Bryant *et al.*, 2000a,b). La hiperconcentración y la alteración morfológica conspicua de las fibras musculares debido al directo daño a la membrana por Cp-PLC son ya evidentes en los primeros minutos después de la aplicación de la toxina (Alape-Giron *et al.*, 2000). Concomitantemente con la alteración de la fibra muscular, Cp-PLC puede producir progresivamente una reducción en el flujo sanguíneo (Alape-Girón *et al.*, 2000; Bryant *et al.*, 2000a,b). Cerca de 2 a 5 minutos después de la exposición, Cp-PLC induce la rápida formación de los agregados plaquetarios libres móviles, primero en las paredes de las vénulas y luego en las arteriolas (Alape-Girón *et al.*, 2000 Bryant *et al.*, 2000a,b). El análisis inmunohistoquímico ha revelado que en tempranos estadios estos agregados sólo consisten de plaquetas activadas, pero en los últimos estadios ellos también contienen fibrina y neutrófilos (Bryant *et al.*, 2000a). Los agregados heterotrópicos crecen en tamaño y número, disturbando el flujo sanguíneo local con progresiva oclusión de pequeños, medianos y grandes vasos, finalmente conduciendo a un irreversible detenimiento de la circulación regional en un periodo de 15 ó 20 minutos (Alape-Girón *et al.*, 2000; Bryant *et al.*, 2000a). Estos eventos no ocurren en los tejidos expuestos a la variante D56N enzimáticamente inactiva, el dominio N-terminal aislado ó las variantes D269, D336N, Y275N y Y331L, cuyos residuos considerados críticos para la interacción con la membrana han sido reemplazados (Alape-Girón *et al.*, 2000).

La deficiente perfusión inducida por Cp-PLC es prevenible por tratamiento con heparina 10 minutos antes de la inyección de la toxina (Bryant *et al.*, 2000b). La formación de agregados plaqueta/plaqueta y plaqueta/neutrófilo inducido por Cp-PLC es causado por la activación de la glicoproteína gpIIbIIIa. La formación de ambos tipos de agregados pueden

prevenirse por anticuerpos monoclonales contra gpIIbIIIa (Bryant *et al.*, 2000b). Interesantemente, el pretratamiento de ratones durante 18 ó 24 hrs con suero antineutrofílico previene completamente la formación de agregados mediados por Cp-PLC y el déficit de perfusión sanguínea causada también por este (Bryant *et al.*, 2000b).

2.3.5. EFECTOS SISTÉMICOS

En animales experimentales la inyección intravenosa de Cp-PLC induce una rápida reducción en la frecuencia cardíaca, con una marcada declinación de la presión arterial, bradicardia y shock (Asmuth *et al.*, 1995; Stevens *et al.*, 1987). En pedazos aislados de atrio, la Cp-PLC reduce directamente la contractibilidad miocárdica, pudiendo ser al menos parcialmente responsable para el colapso hemodinámico inducido por infecciones de *C. perfringens* (Asmuth *et al.*, 1995; Stevens *et al.*, 1987). La Cp-PLC también contribuye indirectamente al shock por estimulación de la producción de mediadores tales como TNF- por células mononucleares y PAF por células endoteliales (Bunting *et al.*, 1997; Stevens y Bryant, 1997).

2.4. EVIDENCIA DEL ROL DE LA Cp-PLC EN LA PATOGENESIS DE ENFERMEDADES CAUSADAS POR *C. perfringens* TIPO A

2.4.1. GANGRENA GASEOSA

Entre las toxinas extracelulares producidas por *C. perfringens* dos de ellas, la Cp-PLC y la perfringolisina, han mostrado contribuir a la patogénesis de la gangrena gaseosa mediante diferentes mecanismos (Awad *et al.*, 2001; Stevens, 2000). Sin embargo, varios estudios indican que Cp-PLC es el principal factor de virulencia en esta enfermedad. Primero, la inoculación intramuscular de Cp-PLC recombinante en ratones causa mionecrosis y reproduce muchas de las características histopatológicas de la gangrena gaseosa (Bunting *et al.*, 1997). Segundo, la inmunización con el dominio C-terminal de Cp-PLC recombinante

protege a ratones de desafíos con 10^9 células salvajes vegetativas viables de *C. perfringens* inyectadas intramuscularmente (Williamson y Titball, 1993, Titball, 2005). Tercero, una cepa mutante de *C. perfringens*, cuyo gen *plc* ha sido inactivado por recombinación homóloga, es incapaz de producir gangrena gaseosa (Awad *et al.*, 1995). Ratones infectados con cerca de 10^9 bacterias de esta cepa mutante tuvieron mínima hinchazón y necrosis, y no murieron dentro de las 18 horas después del inóculo. Gran número de neutrófilos estuvieron presentes en el tejido infectado, la acumulación de leucocitos en vasos sanguíneos fue significativamente reducida y la trombosis ausente (Ellemor *et al.*, 1999). Posteriormente, estas cepas deficientes en Cp-PLC recuperaron su virulencia por complementación con un plásmido transportador del gen *plc* tipo salvaje (Awad *et al.*, 1995). Ratones infectados con estas cepas complementadas exhibieron masiva hinchazón, severa mionecrosis, y 70% de mortalidad a las 18 horas después de la inoculación (Awad *et al.*, 1995). Así, Cp-PLC es ampliamente responsable de la necrosis muscular, contribuye significativamente a la acumulación de neutrófilos en el lumen de los vasos sanguíneos, y es esencial para trombosis (Awad *et al.*, 1995; Ellemor *et al.*, 1999, Titball, 2005).

2.4.2. ENTERITIS NECRÓTICA EN POLLOS

La enteritis necrótica, una enfermedad de aves domesticas alrededor del mundo (Songer, 1996), es usualmente causada por *C. perfringens* tipo A (Long *et al.*, 1974; Al-Sheikhly y Truscott, 1977c; Truscott y Al-Sheikhly, 1977). La leve forma de la enfermedad resulta principalmente en la reducción del índice de ganancia de peso. Depresión, inapetencia, anorexia, y diarrea ocurren en algunas aves afectadas, pero el curso es usualmente corto, sin signos observados y simplemente encontrados muertos (Helmboldt y Bryant, 1971; Long *et al.*, 1974). La principal lesión encontrada es necrosis del yeyuno e íleon que puede extenderse a lo largo del intestino (Ratz *et al.*, 1989).

C. perfringens tipo A es común en el tracto intestinal de pollos (Shane *et al.*, 1984). El suelo, polvo, alimento contaminado y camas han sido indicados como fuentes de infección (Dososky, 1989; Songer, 1996). La enfermedad

puede ser reproducida por la administración de alimento contaminado (Long *et al.*, 1974; Truscott y Al-Sheikhly, 1977), cultivo de *C. perfringens* (Parish, 1961; Al-Sheikhly y Truscott, 1977a) o sobrenadante de cultivo (Al-Sheikhly y Truscott, 1977b).

La Cp-PLC ha sido detectada en heces y contenido intestinal de pollos y otras aves (El-Seedy, 1990). Lesiones pueden ser reproducidas por la administración de preparaciones crudas de Cp-PLC a pollitos normales (Al-Sheikhly y Truscott, 1977a) o libres de gérmenes (Fukata *et al.*, 1988). El efecto letal del desafío con Cp-PLC en pollitos libres de gérmenes puede ser neutralizado por administración antisuero específico (Fukata *et al.*, 1988), y anti-Cp-PLC podría jugar un rol en la protección de las aves contra enteritis necrótica (Nadas *et al.*, 1991).

2.4.3. ENFERMEDADES ENTERICAS EN OTRAS ESPECIES

La clostridiosis en caballos adultos es caracterizado por profusa diarrea acuosa con alta mortalidad y un gran número de *C. perfringens* tipo A demostrables en el intestino (Wierup, 1977). Infecciones de *C. perfringens* también han sido descritos en caballos con cistitis hemorrágica (Radostis *et al.*, 2002), pero su definitivo rol no es claro.

C. perfringens tipo A también ha sido asociado con enfermedades entéricas en cerdos lactantes y de recría con leve enterocolitis necrotizante y atrofia de vellosidades (Olubunmi y Taylor, 1985; Collins *et al.*, 1989). Las lesiones son generalmente más severas en intestino delgado, particularmente en yeyuno e íleon (Olubunmi y Taylor, 1985). Experimentos en asas intestinales de cerdo inoculadas con Cp-PLC sugieren que la toxina sola no podría ser suficiente para producir significantes lesiones o pérdida de fluidos (Popoff y Jestin, 1985).

Otros reportes de enfermedades entéricas asociadas con *C. perfringens* tipo A incluyen a la enterotoxemia en corderos (Kalender *et al.*, 2005), terneros (Dennison *et al.*, 2005), mink (Macarie *et al.*, 1980), y alpacas (Moro, 1987;

Ramirez, 1991), la gastroenteritis en ferrets (Schulman *et al.*, 1993), y la toxemia aguda de buffalos de agua (Worrall *et al.*, 1987).

Aunque es poco conocida la permeabilidad del intestino a la Cp-PLC, este podría ser un factor de virulencia en casos de presumible enterotoxemia (Daube *et al.*, 1994). En algunos casos, el síndrome en corderos y terneros es consistente con la acción de una toxina hemolítica en la circulación, causando masiva hemolisis intravascular y daño en capilares, inflamación, agregación plaquetaria, shock y efectos cardiacos, culminando en la muerte (Stevens *et al.*, 1988). Grandes cantidades de Cp-PLC pueden ser encontrados en heces en casos naturales de enfermedad en ganado. Por otro lado, la Cp-PLC administrado solo en lechones de 1 a 6 horas de edad causó ligera enteritis y edema en las vellosidades, con mínimo daño al epitelio y a vasos sanguíneos, pero no cambios ultraestructurales en las vellosidades, ganglios linfáticos u otros órganos (Johannsen *et al.*, 1993).

2.5. ENTEROTOXEMIA EN ALPACAS

2.5.1. ETIOLOGÍA

La enterotoxemia de las alpacas también conocida como diarrea bacilar o enfermedad de Moro es causada por las toxinas del *C. perfringens* (Moro, 1987), siendo involucrado mayormente el tipo A (Moro, 1987; Ramírez *et al.*, 1985; Ramírez y Ellis, 1988; Ramírez, 1991, Pérez, 2006) y, sólo en algunos casos, el tipo C (Moro, 1987) en la sierra sur del Perú. Mientras, en Chile y en E.U.A. han sido reportados los tipos A y B, (Prehn *et al.*, 1999) y los tipos A (Fowler, 1998), C (Fowler, 1998; Whitehead, 2005) y, posiblemente, el D (Fowler, 1998), respectivamente, en casos de enterotoxemia en alpacas.

2.5.2. EPIDEMIOLOGÍA

La enterotoxemia de las alpacas se presenta en forma de brotes epizooticos durante la época de parición, y está relacionada a factores climáticos

(principalmente abundantes lluvias) y deficiencias en el manejo e higiene del hato (Moro, 1987; Ramírez *et al.*, 1985; Ramírez, 1991; Ameghino y De Martini, 1991; Bustinza, 2000).

La enfermedad ocasiona elevadas tasas de mortalidad neonatal en alpacas (Figura 2.6) en pequeños (comunidades alpaqueras) y grandes (centros experimentales y grandes empresas alpaqueras) hatos alpaqueros, reportándose tasas anuales de mortalidad neonatal por la enfermedad de 0.6 a 48.9% en la estación experimental “La Raya” en Puno durante 1973-1979 (Ramírez *et al.*, 1985); de 24.16% promedio en doce fundos alpaqueros de Puno durante 1972-1973 (Carbajal, 1974), de 5.1 a 25.8% en doce fundos alpaqueros de Puno en 1974 (Bustinza, 2000), y un estimado de 70% en medianos criadores alpaqueros en Cusco en 1980 (Ramírez *et al.*, 1985).



Figura 2.6.: Alpacas neonatas muertas durante una epizootia de enterotoxemia (Tomada de Pérez, 2006)

La enterotoxemia afecta principalmente a las crías de alpacas entre los 3 a 80 días de edad, siendo más vulnerables entre las 2 a 3 semanas de edad (Moro, 1987; Ramírez *et al.*, 1985; Ameghino y De Martini, 1991; Fowler, 1998; Bustinza, 2000). Este periodo coincide con el dramático descenso de los niveles de gammaglobulina de 1.4 mg/mL al nacimiento a 0.98, 0.76 y 0.79 mg/mL a los 8, 15 y 22 días, respectivamente (Ramírez *et al.*, 1985). Asimismo, se ha

observado que las crías en buena condición corporal son más susceptibles a desarrollar la enfermedad (Ramírez *et al.*, 1985; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Bustinza, 2000). Esto presumiblemente debido a su ingesta prematura de forraje contaminado del entorno.

Por otro lado, la época de parición en los camélidos sudamericanos dada durante los meses de Enero a Marzo, periodo de intensa precipitación fluvial, sumada al hacinamiento de los animales favorecerían a la presentación de epizootias de enterotoxemia, debido a que la alta humedad del suelo propician la presencia, multiplicación y modificación biológica de esporas a células vegetativas de *C. perfringens*. Asimismo, la extrema variación entre temperaturas máxima (14° C) y mínima (3° C) durante el día que soportan las crías de alpacas en el altiplano generan un gran estrés en ellos (Ramírez *et al.*, 1985).

2.5.3. PATOGENIA

La principal vía de ingreso del *C. perfringens* es la oral. Es probable que las crías ingieran una masiva cantidad de esporas y/o células vegetativas de clostridios (Ramírez *et al.*, 1985). Posteriormente, en el lumen intestinal un ligero pH alcalino y el incremento de carbohidratos en la dieta (cambio de dieta, inicio de consumo de forraje) (Ramírez y Ellis, 1988) o una excesiva ingestión de leche (Ameghino y De Martini, 1991) generarían un ambiente óptimo para la multiplicación y/o esporulación del *C. perfringens* y la síntesis de la(s) toxina(s) responsable(s) del cuadro fatal (Ramírez y Ellis, 1988; Ameghino y De Martini, 1991; Pérez, 2006). Hasta el momento, no se conoce cual(es) es(son) el(los) factor(es) de virulencia de *C. perfringens* responsable(s) de la enfermedad.

Inicialmente, la Cp-PLC fue considerada como el principal factor de virulencia involucrado en cuadros enterotoxémicos por *C. perfringens* tipo A (Moro, 1987). Sin embargo, estudios realizados por Ramírez (1987) mostraron la producción de CPE por algunas cepas de *C. perfringens* tipo A aislados de casos de enterotoxemia en alpacas, dichas cepas mostraron escasa capacidad de producción de Cp-PLC *in vitro*. Asimismo, ensayos en intestino ligado en

llamas inoculadas con cepas enterotoxigénicas esporuladas provocaron la acumulación de fluidos y la formación de gas, así como la aparición de algunos signos clínicos (postración, ligera lagrimación y congestión de mucosas), consiguiendo ser evidenciada serológicamente la CPE en el contenido intestinal. Todo esto llevó a concluir al autor que la CPE es el principal factor de virulencia involucrado en el desarrollo de la enfermedad (Ramírez, 1987; Ramírez, 1988; Ramírez y Ellis, 1988).

No obstante, recientes estudios moleculares de cepas aisladas de casos de enterotoxemia de alpacas muestran la escasa presencia del gen *cpe*, poniendo en cuestión la participación de la CPE como el factor de virulencia esencial para la enfermedad (Pérez, 2006). Además, la actividad biológica de la CPE se encuentra asociada con diarreas profusas, esporádicas y autolimitantes en individuos inmunocompetentes (Sparks *et al.*, 2001), y no con enteritis necróticas y/o hemorrágicas que cursan sin diarreas como los típicos cuadros descritos de enterotoxemia en alpacas (Moro, 1987; Ameghino y DeMartíni, 1991; Palacios, 2004). Con todo lo mencionado anteriormente, la participación de la CPE ha sido descartada y han empezado a buscar nuevos factores de virulencia de *C. perfringens*.

Así, se ha reportado la presencia de *C. perfringens* genotipo A subtipo β 2-toxigénico en casos de enterotoxemia de alpacas (Pérez, 2006). Este subtipo además de tener el gen *cpa* posee el gen *cpb2*, evidenciando una posible participación de la toxina β 2 en la etiopatogénesis de la enfermedad. Similares hallazgos han sido reportados por investigadores estadounidenses, quienes detectaron la presencia del gen *cpb2* en 18.6% (8/43) de los *C. perfringens* aislados de alpacas con problemas entéricos (Bueschel *et al.*, 2003; Ellis, 2006). La presencia de la toxina β 2 viene siendo asociada con problemas entéricos en diferentes animales, principalmente en enteritis necrótica en cerdos y tiflocolitis en caballos (Bueschel *et al.*, 2003, Garmory *et al.*, 2000; Herholz *et al.*, 1999), así como con cuadros de enterotoxemia en terneros, cabras y venados (Manteca *et al.*, 2002; Embury-Hyatt *et al.*, 2005; Dray, 2004) y disentería hemorrágica en corderos (Gkiourtzidis *et al.*, 2001).

Por otro lado, Luna (2009) ha aislado cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) y enteropatógena (EPEC) en el 21% (5/24) y 25% (6/24) de casos enterotoxemia de alpacas, sugiriendo la participación de la shigatoxina e íntima de *E. coli* en la patogenia de la enfermedad. Asimismo, Rosadio *et al.* (2009) han reportado una asociación de la enfermedad con *Eimeria macusaniensis*, encontrándose la presencia del parásito en 31% (33/108) de los casos. Probablemente, el daño producido por la coccidia en la mucosa intestinal facilitaría la proliferación de *C. perfringens* y sus toxinas.

2.5.4. SIGNOS CLÍNICOS

La muerte súbita puede ser muchas veces el único signo encontrado. Los signos clínicos y su intensidad dependerán de la cantidad de toxinas presentes en el organismo. Las crías afectadas muestran depresión, anorexia, permanecen postradas y alejadas de su madre con las orejas dirigidas hacia atrás, los ojos cerrados y los miembros estirados. El cuadro progresa y las crías aparecen con los miembros anteriores estirados, la cabeza apoyada sobre el suelo, el abdomen distendido y la emisión de quejidos, posiblemente debido al dolor abdominal. Algunas ingieren abundante cantidad de agua (polidipsia) y otras desarrollan apetito depravado (polifagia) que se manifiesta por la ingestión de arena, piedrecillas, etc. del suelo. La temperatura tiende a ser normal, pero a veces sobrepasa los 40° C, y suelen echarse ventralmente en los arroyos y charcos de agua. La temperatura disminuye notablemente (hipotermia) en el estado agónico. El cuadro toxémico en su etapa final, se acompaña de alteraciones nerviosas tales como convulsiones y opistótonos. Finalmente, el animal entra en coma y muere (Ramírez *et al.*, 1985; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez, 1991; Fowler, 1998; Bustinza, 2000).

2.5.5. LESIONES ANATOMOPATOLÓGICAS

Frecuentemente el animal externamente muestra una carcasa en buena condición muscular y con el abdomen distendido por la presencia de gas en intestinos. El tejido subcutáneo puede estar congestionado y presentar hemorragias petequiales

(Ramírez, 1991; Fowler, 1998). En cavidad torácica, la tráquea y los bronquios con contenido espumoso, algunas veces acompañado de ingesta. Los pulmones aparecen congestionados y edematosos (Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez, 1991; Fowler, 1998). Los nódulos linfáticos torácicos de tamaño incrementado y hemorrágicos (Ramírez, 1991; Fowler, 1998). El timo se presenta congestionado y con hemorragias petequiales en su superficie (Ameghino y De Martini, 1991; Oha, 1994; Fowler, 1998). En cavidad torácica y en saco pericárdico frecuentemente existe presencia de abundante exudado seroso claro y ligeramente viscoso (Ramírez, 1991; Fowler, 1998). En corazón, las arterias coronarias se encuentran dilatadas y las aurículas presentan petequias en su superficie (Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Oha, 1994; Ramírez, 1991; Fowler, 1998).

Al explorar la cavidad abdominal, es perceptible un olor desagradable y característico a la enfermedad (Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez, 1991). Los intestinos están distendidos con fluido acuoso, cuyo color varía de acuerdo al tipo de ingesta, pudiendo ser blanquecino, amarillento, verdoso y plomizo (Moro, 1987; Ramírez, 1991). El intestino delgado, particularmente yeyuno e ileon, se encuentra congestionado (Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Fowler, 1998) y hemorrágico (Ameghino y De Martini, 1991; Oha, 1994) (Figura 2.7). En el intestino grueso se presentan hemorragias focales con zonas de impacción conteniendo heces duras (Oha, 1994). Las placas de Peyer se encuentran inflamadas, siendo más notorias en el intestino grueso (Ameghino y De Martini, 1991; Fowler, 1998). Los ganglios linfáticos mesentéricos, aparecen incrementados de tamaño, congestionados y/o hemorrágicos (Ameghino y De Martini, 1991; Oha, 1994; Ramírez, 1991; Fowler, 1998). En el estómago glandular, la mucosa puede estar congestionada o hemorrágica (Ameghino y De Martini, 1991; Fowler, 1998).

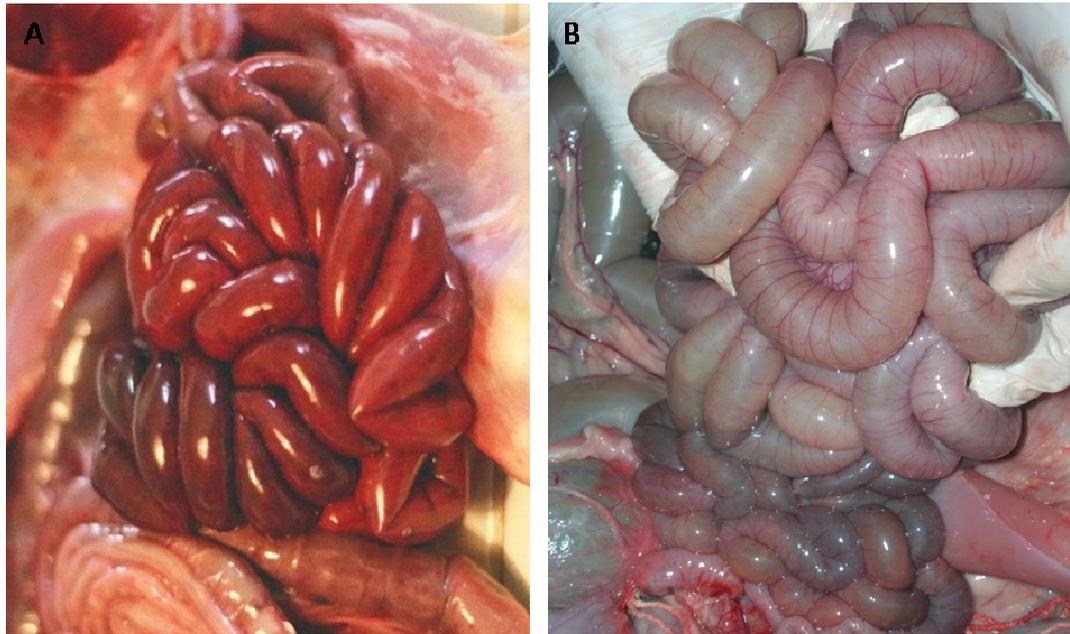


Figura 2.7.: Lesiones macroscópicas en intestino delgado de alpacas muertas por enterotoxemia. A, Severa enteritis necrótica hemorrágica, nótese la severa hemorragia, distensión y acumulo de fluido en intestino. B, severa enteritis necrótica, nótese la severa congestión, distensión y acumulo de fluido en intestino (Tomada de Pérez, 2006)

El bazo, a veces, aumentado de tamaño (Moro, 1971; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991). El hígado aparentemente normal, pero algunas veces congestionado (Ameghino y De Martini, 1991; Oha, 1994; Ramírez, 1991). En los riñones es posible observar congestión de la corteza renal (Ameghino y De Martini, 1991; Oha, 1994; Fowler, 1998) y, a veces, hemorragias petequiales en su superficie (Oha, 1994). La vejiga generalmente se encuentra distendida debido a la acumulación de orina como consecuencia de su parálisis. El encéfalo se presenta severamente congestionado y es notorio el acúmulo de líquido cefalorraquídeo entre las meninges (Ramírez, 1991; Fowler, 1998).

Palacios (2004) caracterizó las lesiones entéricas de cuadros clínicos compatibles con la enfermedad describiendo las siguientes lesiones anatomopatológicas: enteritis catarral (100%) en duodeno; enteritis hemorrágica (46.7%), panenteritis hemorrágica (26.7%) y enteritis necrótica (16.6%) en yeyuno; enteritis necrótica (56.6%), enteritis hemorrágica (20%) y enteritis fibrinosa (13.3%) en íleon; tiflitis catarral (40%), tiflitis necrótica (26.7%) y tiflitis fibrinosa (13.3%) en ciego; y colitis catarral (63.3%), colitis necrótica (30%), colitis hemorrágica (10%) y colitis fibrinosa (16.7%) en colon.

2.5.6. LESIONES HISTOPATOLÓGICAS

Palacios (2004) describe las siguientes lesiones histopatológicas: enteritis necrótica (90%) y enteritis catarral (10%) en duodeno; enteritis necrótica (60%), panenteritis necrótica hemorrágica (20%), enteritis necrótica hemorrágica (13.3%) (Figura 2.8B) y panenteritis necrótica supurativa (6.7%) en yeyuno; enteritis necrótica (70%), enteritis fibrinonecrótica (13.3%), panenteritis necrótica hemorrágica (Figura 2.8A) (6.7%), enteritis necrótica supurativa (6.7%) y panenteritis necrótica supurativa (3.3%) en íleon; tiflitis necrótica (46.7%), tiflitis muconecrótica (20%), tiflitis fibrinonecrótica (13.3%), tiflitis catarral (10%), tiflitis mucocatarral (6.7%) y tiflitis necrótica hemorrágica (3.3%) en ciego; colitis necrótica (46.6%), colitis muconecrótica (20%), colitis catarral (16.7%) y colitis necrótico hemorrágico (6.7%) en colon.

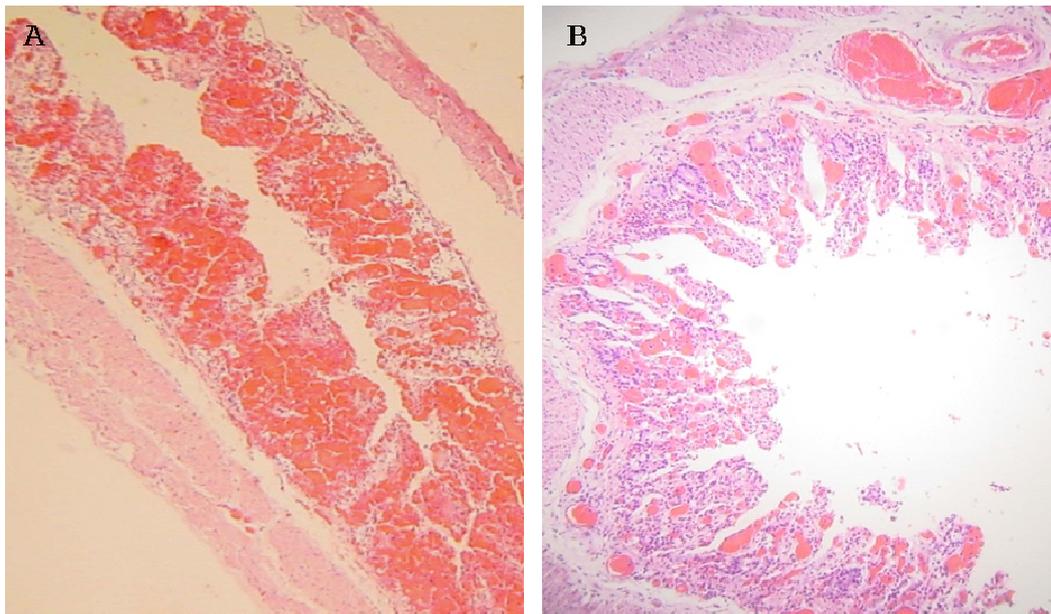


Figura 2.8.: Lesiones histopatológicas en intestino delgado de alpacas muertas por enterotoxemia. A, severa enteritis hemorrágica difusa aguda. B, severa enteritis necrótica hemorrágica difusa aguda (10X-Tinción H.E.). Tomado de Pérez, 2006.

Oha (1994) describe lesiones histopatológicas en diferentes órganos, encontrando congestión pericárdica aguda (86.67%) y pericarditis aguda (13.33%); congestión miocárdica (53.33%), miocarditis hemorrágica (40%) y miocarditis aguda (6.67%); tinitis hemorrágica (46.47%), congestión timpica (33.33%) y tinitis fibrinosa (20%); ileítis regional hemorrágica (100%); colitis catarral aguda (53.33%) y colitis hemorrágica (47.67%); congestión hepática

aguda (40%) y colangitis supurativa (13.33%); hipoplasia nodular mesentérica (40%) y linfadenitis mesentérica hemorrágica (60%); nefritis tubular degenerativa (56.67%), nefritis hemorrágica (36.67%), pielonefritis supurativa (3.33%) y degeneración grasa (3.33%); congestión vesical (53.33%) y cistitis catarral aguda (46.67%).

2.5.7. DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico de la enterotoxemia de las alpacas se deben tomar en cuenta los siguientes criterios: *i*) identificar la magnitud del problema en el campo mediante la identificación de las características epidemiológicas de la mortalidad de las crías enfermas y muertas, *ii*) los signos clínicos y *iii*) las lesiones anatómo-histológicas; *iv*) efectuar el reconocimiento de esporas y/o bacilos en fróntes directos del contenido intestinal (íleon y yeyuno) teñidos con coloraciones específicas (Ramírez, 1988; Ramírez y Ellis, 1988; Ramírez, 1989a; Ramírez, 1990); *v*) el aislamiento de *C. perfringens* y su caracterización toxigénica (genotipificación) y *vi*) la identificación de otros agentes infecciosos, como *E. coli* y *E. macusaniensis*, que pudieran estar agravando la presentación de la enfermedad (Pérez, 2006, Rosadio *et al.*, 2009, Luna 2009).

2.5.8. TRATAMIENTO

Aún no existe un tratamiento satisfactorio contra la enterotoxemia de las alpacas. Los tratamientos con antibióticos y laxantes muestran resultados ineficaces y variables.

2.5.9. CONTROL

Establecida la epizootia en el rebaño es necesario cambiar de lugar los dormideros y las canchas o parideros hacia lugares más alejados (Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991). No obstante, estos procedimientos han mostrado no tener significativa reducción de la mortalidad una vez establecida la epizootia (Melo *et al.*, 1999).

La administración de antibióticos de uso oral a todas las crías del rebaño afectado durante 3 días consecutivos también han sido recomendados (Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991).

2.5.10. PREVENCIÓN

La prevención está dada básicamente por medidas inmunoproliféricas a través del uso de vacunas tipo anacultivos de *C. perfringens*, asociados a adecuadas medidas de manejo (higiene de corrales) para hacerlas más efectivas (Moro, 1987). Yaya y Rosadio (2005) en un estudio de tres años sobre prevención contra la enterotoxemia de las alpacas, usando vacunas (anacultivos) conteniendo *C. perfringens* tipo A, B, C y D aplicados tanto a madres como a crías, mostraron una significativa reducción de la mortalidad neonatal por enterotoxemia de 19.5 a 1%, demostrando su utilidad en el campo.

Prevención en base a antibióticos (Ampicilina+sulfato de colistina) administrados vía parenteral hasta la onceava semana de edad demostraron no tener efecto significativo en la prevención de la enfermedad (Pezo *et al.*, 1999).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 AISLADOS DE *Clostridium perfringens* DE CASOS DE ENTEROTOXEMIA EN ALPACAS

Venticuatro aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas fueron proporcionados gentilmente por el Dr. Raúl Rosadio Alcántara, responsable de la Unidad de Biología y Genética Molecular del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Estos aislados fueron debidamente identificados y genotificados según la metodología empleada por Pérez (2006); todos pertenecieron al genotipo A (presencia del gen *cpa*), y de ellos 18 pertenecieron al subtipo *cpe*⁻*cpb2*⁻ (ausencia de los genes *cpe* y *cpb2*) y 06 al subtipo *cpe*⁻*cpb2*⁺ (ausencia del gen *cpe* y presencia del gen *cpb2*). Los detalles de los aislamientos se encuentran descritos en el Cuadro 3.1.

Los aislados (mantenidos en almacenamiento a 4° C) fueron reactivados mediante siembra de alícuotas en placas de agar sangre (medio base agar tripticosa soya [Merck] suplementado con 5% de sangre de ovino desfibrinada estéril) e incubados bajo condiciones de anaerobiosis (Campanas Gaspac con generadores de anaerobiosis [Anaerobac, Probac]) a 37° C por 24 horas. Las colonias crecidas fueron evaluadas y clasificadas de acuerdo a su estado bacteriano (VEGETATIVO ó ESPORULADO), en base a sus características morfológicas de la colonia, patrón hemolítico y evaluación microscópica (coloración Gram). Dos a 3 colonias de cada

aislado fueron inoculadas en 3 mL de medio caldo Brain Heart Infusion (BHI [Merck]) e incubadas bajo condiciones de anaerobiosis a 37° C durante 24 horas.

3.2. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE *C. perfringens* Y SÍNTESIS DE Cp-PLC

La cinética de crecimiento de *C. perfringens* y su relación con los niveles de producción de Cp-PLC fueron evaluados según la metodología descrita por Fernández-Miyakawa *et al.*, 2007a,b.

3.2.1. CONDICIONES DE CULTIVO

Tres colonias de cada aislado (reactivado) fueron inoculados en 3 mL de medio caldo BHI e incubados bajo condiciones de anaerobiosis a 37° C durante 24 horas. Después de la incubación, 2.5 mL de estos cultivos fueron inoculados en 250 mL de medio caldo BHI (1%, v/v) e incubados bajo condiciones de anaerobiosis (generación de anaerobiosis mediante una capa de 1 cm de espesura de vaselina líquida estéril) a 37° C durante un periodo de 24 horas. Durante este periodo fueron colectados 2 mL de cultivo a intervalos de una hora (0 hrs-24hrs).

3.2.2. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO

Un mililitro de cada muestra de cultivo colectada durante el ensayo fue centrifugada a 13 000 x g durante 20 minutos. El precipitado fue resuspendido en 1 mL de PBS 1X (pH 7.3) y leído en un espectrofotómetro (Termo, Genesys 10UV) a una densidad óptica de 620 nm (OD_{620nm}).

3.2.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LECITINASA

Un mililitro de cada muestra de cultivo colectada durante el ensayo fue centrifugada a 13 000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido fue analizado según la metodología descrita más adelante (ver punto 3.5.2).

Cuadro 3.1. Aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia de alpacas empleados

AISLADO ¹	PROCEDENCIA			LESIONES EN HUESPED		CARACTERISTICAS FENOTIPICAS				PERFIL GENÉTICO		
	AÑO	DEPARTAMENTO	HATO ALPAQUERO	LESIONES MACROSCOPICAS ²	LESIONES MICROSCOPICAS ³	PATRON DOBLE HEMOLITICO	REACCION DE NAGLER	REDUCCION DE SULFITO	ACTIVIDAD CATALASA	GENES	GENOTIPO	SUBTIPO
19-2005	2005	Puno	I	M. enteritis hemorrágica	S.E.N.H.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa, cpb2</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁺</i>
41-2005	2005	Cusco	II	S. congestión intestinal	S.E.N.H.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁻</i>
15-2005	2005	Puno	I	M. enteritis hemorrágica	S.E.N.H.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa, cpb2</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁺</i>
18-2005	2005	Puno	I	M. enteritis hemorrágica	S.E.N.H.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa, cpb2</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁺</i>
25-2005	2005	Puno	I	L. enteritis hemorrágica	S.E.C.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa, cpb2</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁺</i>
A4-2006	2006	Arequipa	III	M. enteritis hemorrágica	S.E.N.H.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁻</i>
A17-2006	2006	Arequipa	III	M. enteritis hemorrágica	S.E.N.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa, cpb2</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁺</i>
A8-2006	2006	Arequipa	III	S. Congestión intestinal	S.E.N.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁻</i>
P4b-2007	2007	Puno	IV	M enteritis necrotico hemorrágico	S.E.N.H.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁻</i>
P9b-2007	2007	Puno	IV	M. enteritis hemorrágica	M.E.N.H.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁻</i>
PH1b-2007	2007	Puno	V	congestión intestinal	S.E.N.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁻</i>
A1a-2007	2007	Arequipa	VI	M. enteritis hemorrágica	S.E.N.H.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁻</i>
A12a-2007	2007	Arequipa	VII	congestión intestinal	S.E.N.H.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁻</i>
C13b-2007	2007	Cusco	VIII	S. enteritis hemorrágica	S.E.N.H.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁻</i>
A13b-2007	2007	Arequipa	IX	Congestión intestinal	S.E.N.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa, cpb2</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁺</i>
L1-2008	2008	Puno	X	S. enteritis necrotico hemorrágica	S.E.N.H.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁻</i>
L10-2008	2008	Puno	X	S. enteritis necrotico hemorrágica	S.E.N.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁻</i>
L12-2008	2008	Puno	X	S. enteritis necrotico hemorrágica	S.E.N.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁻</i>
L21-2008	2008	Puno	X	S. enteritis hemorrágica	S.E.N.H.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁻</i>
L22-2008	2008	Puno	X	S. enteritis necrotico hemorragica	S.E.N.H.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁻</i>
L24-2008	2008	Puno	X	S. enteritis necrotico hemorragica	S.E.N.H.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁻</i>
L26-2008	2008	Puno	X	S. enteritis necrótica	S.E.N.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁻</i>
DA3-2008	2008	Puno	XI	severa congestion intestinal	S.E.C.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁻</i>
DA6-2008	2008	Puno	XII	S. enteritis necrotico hemorragica	S.E.N.H.D.A.	+	+	+	-	<i>cpa</i>	A	<i>cpe⁻ cpb2⁻</i>

(1) Código de los aislados del Laboratorio de Biología y Genética Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM.

(2) L = leve, M = Moderada, S = Severa

(3) S.E.N.D.A. = Severa enteritis necrótica difusa aguda, S.E.N.H.D.A. = Severa enteritis necrótica hemorrágica difusa aguda, S.E.C.D.A. = Severa enteritis catarral aguda

3.3. PURIFICACIÓN DE LA FOSFOLIPASA C DE *C. perfringens* (Cp-PLC)

El proceso de purificación de la Cp-PLC se realizó teniendo en consideración experiencias previas de purificación descritas por Satterlee y Walken, (1969), Tso Siebel (1989), Titball *et al.* (1989), Tsutsui *et al.* (1995), Jepson *et al.* (1999) y Komoriya *et al.* (2007).

3.3.1. AISLADO DE *C. perfringens*

El aislado empleado para la purificación de la Cp-PLC fue el de más alta capacidad de producción de Cp-PLC. Para ello, todos los aislados fueron analizados siguiendo la metodología descrita en el punto 3.5.2.

3.3.2. ETAPAS DE PURIFICACIÓN DE Cp-PLC

3.3.2.1. Extracto Crudo

Tres litros de caldo BHI fueron inoculados con 30 mL (~1%, vol/vol) del cultivo del aislado seleccionado e incubados bajo condiciones de anaerobiosis (Campanas Gaspack con generadores de anaerobiosis [Anaerobac, Probac]) a 37° C durante tiempo necesario para la síntesis de mayor cantidad de Cp-PLC (17 hrs, dato obtenido de la cinética de crecimiento y síntesis de Cp-PLC). Después de la incubación, el cultivo fue centrifugado a 10 000 x g durante 20 minutos a 4° C. El sobrenadante obtenido fue denominado extracto crudo.

3.3.2.2. Precipitación con sales

El extracto crudo fue ajustado a pH 5.5 con HCl 6N y saturado al 50% con sulfato de amonio (Synth). La mezcla fue centrifugada a 15 000 x g durante 30 minutos a 0° C. El precipitado obtenido fue resuspendido en Tris HCl 50 mM (pH 7.5) y el sobrenadante fue saturado al 85% con sulfato de amonio, incubado a 4° C durante 72 horas y centrifugado a 15 000 x g durante 30 minutos a 0° C. El precipitado resultante fue resuspendido en Tris HCl 50 mM (pH 7.5) y el sobrenadante fue saturado

al 100% con sulfato de amonio y centrifugado a 15 000 x g durante 30 minutos a 0° C. Finalmente, el precipitado resultante fue resuspendido en Tris HCl 50 mM (pH 7.5).

Los resuspendidos de las precipitaciones con saturaciones al 50, 85 y 100% de sulfato de amonio fueron dializados en 400 volúmenes de Tris HCl 50 mM (pH 7.5) usando membrana de celulosa de cut off 8000 Da durante 03 días con cambios diarios de solución.

3.3.3. PARÁMETROS DE EVALUACIÓN DE LA PURIFICACIÓN DE Cp-PLC

Cada una de las etapas de purificación fue evaluada en su rendimiento y pureza mediante datos obtenidos de su actividad lecitinasa, concentración de proteínas y perfil electroforético.

3.3.3.1. Determinación de la actividad lecitinasa

La actividad lecitinasa fue determinada mediante el *método de microtitulación* descrito por Karasawa *et al.* (2003). En resumen, la muestra fue seriadamente diluida (1/2 a 1/1024; [Log₂]) en PBS 1X (pH 7.3) a volúmenes finales de 100 µL y distribuidas en una microplaca de 96 pocillos. Luego, 100 µL de emulsión de yema de huevo (ver punto 6.2.) fueron añadidos a cada pocillo y mezclaron suavemente. La microplaca fue incubada a 37° C durante 3 horas, e inmediatamente después fue leída en una lectora de microplaca de ELISA a una densidad óptica de 620 nm (OD_{620nm}). La actividad lecitinasa fue expresada como unidades arbitrarias de yema de huevo (u.a.y.) por mililitro y correspondió a la dilución en la cual resultó un incremento del 50% en la turbidez de los pocillos. La OD_{620 nm} de 200 µL de emulsión de yema de huevo correspondió a un incremento del 50% de la turbidez.

3.3.3.2. Determinación de concentración proteica

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (Arce *et al.*, 2007), basada en las propiedades bioquímicas del azul brillante de Coomassie G-250 de unirse a los enlaces peptídicos de

las proteínas. En resumen, primero se realizó la curva de calibración (según lo indica el Cuadro 3.2) empleando como estándar diluciones seriadas (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 µg/mL) de albúmina sérica bovina en agua destilada. Para ello, 10 µL de cada dilución (por triplicado) fueron mezclados con 100 µL de reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich) en una microplaca de 96 pocillos, e incubados durante 5 minutos a temperatura de ambiente en obscuridad. Después de la incubación, la placa fue leída a una densidad óptica de 595 nm (OD_{595nm}) en un lector de microplacas de ELISA (Multiskan EY, Labsystems). Los valores de las lecturas fueron procesados mediante un software (Windows Excel) obteniendo la ecuación lineal que represente el gráfico.

Cuadro 3.2. Curva de calibración para determinación de concentración de proteínas.

Estándar	Albúmina sérica bovina (20 mg/mL)	Agua destilada	Reactivo de Bradford	Concentración final
	[µL]	[µL]	[µL]	[µg/mL]
Blanco	-	10	100	0
1	1	9	100	200
2	2	8	100	400
3	3	7	100	600
4	4	6	100	800
5	5	5	100	1000

Realizada la curva de calibración, 10 µL de cada muestra (por duplicado) fueron mezclados con 100 µL de reactivo de Bradford en la microplaca de 96 pocillos, e incubados durante 5 minutos a temperatura de ambiente en obscuridad y después leídos a una OD_{595nm}. La concentración de proteínas de las muestras fue estimada usando la ecuación lineal obtenida de la curva de calibración.

3.3.3.3. *Determinación de perfiles electroforéticos*

Los perfiles electroforéticos fueron obtenidos usando un sistema discontinuo, reductor (Electroforesis en gel de poliacrilamida-sodio dodecil sulfato; SDS-PAGE) y denaturante, el cual permitió separar proteínas sólo por tamaño molecular (Sambrook *et al.*, 1989). El equipo y

sistema de electroforesis (*Miniprotean Cell*, BIORAD) empleados fueron ensamblados siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.3.3.1. Preparación del gel poliacrilamida

El *gel de resolución* fue preparado a una concentración de 12% de poliacrilamida (Cuadro 3.3.) mientras que el *gel de empaquetamiento* lo fue a una concentración de 5% de poliacrilamida (Cuadro 3.4).

Cuadro 3.3: Soluciones para preparación de gel de resolución al 12% de poliacrilamida para volúmenes de 5 y 10 mL.

COMPONENTES	Para 5 mL	Para 10 mL
	[mL]	[mL]
H ₂ O	1.7	3.3
30% Acrilamida/bisacrilamida	2.0	4.0
Tris 1.5 M (pH 8.8)	1.3	2.6
10% SDS	0.05	0.1
10% Persulfato de amonio	0.05	0.1
TEMED	0.002	0.004

Cuadro 3.4: Soluciones para preparación de gel de empaquetamiento al 5% de poliacrilamida para volúmenes de 2 y 4 mL.

COMPONENTES	Para 2 mL	Para 4 mL
	[mL]	[mL]
H ₂ O	1.4	2.7
30% Acrilamida/bisacrilamida	0.33	0.67
Tris 1.0 M (pH 6.8)	0.25	0.50
10% SDS	0.02	0.04
10% Persulfato de amonio	0.02	0.04
TEMED	0.002	0.004

3.3.3.3.2. Preparación de las muestras y condiciones de electroforesis

Las muestras (concentradas 10X) fueron sometidas a un proceso físico-químico para desnaturalizar las proteínas. Para lo cual, las muestras fueron mezcladas con buffer de tratamiento de muestra 5X (0.156 M de Tris·HCl [pH 6.8], 3.1 % de SDS, 31.3% de 2-mercaptoetanol, 31.3% de glicerol y 0.1 mg /mL de azul de

Bromofenol) en proporción 4:1 (vol/vol) y sometieron a calentamiento a 100° C durante cinco minutos.

La corrida electroforética fue mantenida en un sistema con buffer de corrida Tris-Glicina (3.03 gr de Tris·Base, 14.42 gr de glicina y 1 gr de SDS en 1 L de agua destilada [pH 8.3]) y un voltaje de 50V durante 3.5 horas. El peso molecular de las bandas fue calculado por comparación con el perfil de bandas del marcador de peso molecular de *Low Molecular Weight Calibration* de 97 a 14.4 kDa (Amersheim Biosciences).

3.3.3.3. Coloración del gel de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida fueron coloreados con Nitrato de Plata. Para ello, el gel fue inmerso en al menos 5 volúmenes de solución fijadora (50 mL de metanol, 12 mL de ácido acético glacial y 5 µL de formaldehído ajustado a un volumen de 100 mL con agua destilada) e incubó durante 5 minutos en agitación a temperatura ambiente previo calentamiento (el calentamiento consistió de una incubación durante 30 segundos en horno microondas M-200E [CCE®] a temperatura máxima). Después de la incubación, se eliminó la solución y el gel se incubó con solución etanol 30% (30 mL de etanol absoluto ajustado a un volumen de 100 mL con agua destilada [vol/vol]) durante 5 minutos en agitación a temperatura ambiente previo calentamiento. Eliminó la solución y el gel se incubó con solución tiosulfato de sodio (20 mg de tiosulfato de sodio en 100 mL de agua destilada) durante 2 minutos en agitación a temperatura ambiente previo calentamiento. Eliminó la solución y el gel fue lavado dos veces con agua destilada por incubación durante 2 minutos en agitación a temperatura ambiente previo calentamiento. Luego, el gel fue incubado con solución de nitrato de plata (200 mg de nitrato de plata y 75 µL de formaldehído ajustado en 100 mL de agua destilada) durante 5 minutos en agitación a temperatura ambiente previo calentamiento. Eliminó

la solución y el gel fue lavado con agua destilada por calentamiento. Seguidamente, el gel fue incubado con solución reveladora (6 g de Na₂CO₃, 50 µL de formaldehído, 400 µg de tiosulfato de sodio ajustado en 100 mL de agua destilada) en agitación a temperatura de ambiente hasta evidenciar las bandas, momento en el cual la reacción fue detenida agregando la solución stop (50 mL de metanol, 12 mL de ácido acético glacial ajustado a un volumen de 100 mL con agua destilada). Finalmente el gel fue secado y fotografiado.

3.4. CARACTERIZACIÓN TOXIGÉNICA DEL Cp-PLC PURIFICADO

3.4.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL Cp-PLC PURIFICADO

La actividad hemolítica de los sobrenadantes bacterianos fue determinada mediante el método de microtitulación descrito por Titball *et al.* (1989). En resumen, la muestra fue seriadamente diluida (1/2 a 1/128; [Log₂]) en buffer borato isotónico (BBI; 0.57 gr de NaB₄O₇·10H₂O, 2.1 gr de H₃BO₃, 1.8 gr de CaCl₂·2H₂O, y 7.5 gr de NaCl disueltos en 1 L de agua destilada [pH 7.6]) en una microplaca de 96 pocillos a volúmenes finales de 150 µL, por duplicado. Luego, 150 µL de *solución de eritrocitos de ovino* (eritrocitos de ovino previamente lavados tres veces con PBS 1X [pH 7.3] y resuspendidos en BBI al 1% [vol/vol]) fueron agregados a cada pocillo. La microplaca fue incubada a 37° C durante 1 hora seguidos de otra a 4° C durante 1 hora, para efectos de hemólisis hot-cold. Posteriormente, la microplaca fue centrifugada a 2 000 x g durante 10 minutos a 4° C. Doscientos µL de cada sobrenadante fueron traspasados a otra microplaca y leídos a una densidad óptica de 550 nm (OD_{550nm}) en una lectora de microplacas de ELISA. La actividad hemolítica fue expresada como unidades arbitrarias hemolíticas (u.a.h.) por mililitro y correspondió a la dilución en la cual resultó un incremento del 50% de hemólisis. Se tuvo como referencia la OD_{550nm} de una dilución de la solución de

eritrocitos en agua destilada (vol/vol, 1:3) que correspondió a una hemólisis del 50%.

3.4.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOPÁTICA DEL Cp-PLC PURIFICADO

La capacidad de producción de efectos citopáticos en células HEp-2 por el purificado de Cp-PLC fue determinado según la siguiente metodología.

3.4.2.1 Preparación de células HEp-2

Las células HEp-2 fueron cultivadas en botellas conteniendo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con antibiótico y 10% de suero fetal bovino (SFB) e incubadas a 37° C durante 2 ó 3 días en estufa CO₂. Posteriormente, el medio fue eliminado y la monocapa celular adherida fue lavada dos veces con 10 mL de PBS 1X (pH 7.3) estéril. Seguidamente, 2 mL de ATV (Antibiotic-Trypsina-Versene) fueron agregados a la monocapa e incubadas a 37° C durante 2 minutos dando batidos y fuerte agitación a la botella para facilitar el desprendimiento y fragmentación de la monocapa. Luego, se agregaron 10 mL de DMEM suplementado con 10% de SFB y mezcló mediante pipeteo repetido para obtener una suspensión homogénea. El número de células de la suspensión fue calculado usando una cámara de Neubauer y llevado a una concentración celular final de 5×10^4 células/mL con medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Posteriormente, en una placa de 24 pocillos, con laminillas estériles en su fondo, fue distribuido 1 mL de la suspensión celular en cada pocillo. La placa fue incubada a 37° C durante 48 horas en estufa de CO₂ ó hasta evidenciar semi-confluencia.

3.4.2.2. Desafío con parcialmente purificado

Después de la incubación, el medio de las placas fue eliminado y cada pocillo fue lavado con PBS 1X estéril. Posteriormente, 800 µL de DMEM (sin antibiótico) suplementado con 2% de SFB y 1 % de manosa fueron distribuidos en cada pocillo y mezclados suavemente con 200 µL

de diferentes concentraciones de purificado de Cp-PLC (dilución 1:4, vol/vol). Inmediatamente la placa fue incubada a 37° C durante 18 ó 24 horas en estufa de CO₂. Pasada la incubación, el medio de cada pocillo fue retirado y lavado cuidadosamente 6 veces con PBS 1X estéril.

Las laminillas fueron fijadas con 1 mL de metanol al 70% por incubación a 4° C durante 18 horas. El metanol fue eliminado de las placas y las laminillas fueron coloreadas con 1 mL de colorante Giemsa (Merck) por incubación a temperatura de ambiente durante 20 minutos. El colorante fue eliminado y enjuagaron los pocillos en agua corriente hasta retirar todo el colorante. Las laminillas fueron secadas a temperatura ambiental y montadas sobre láminas con Entelon (Merck).

Los efectos citopáticos fueron determinados mediante evaluación microscópica a objetivos 10X y 40X, dados básicamente por cambios morfológicos celulares (alongamiento celular y/o abalnamiento celular) en relación al control negativo (PBS) (células estrelladas). Para cuantificar el grado de lesión provocada por las diferentes concentraciones de Pp.Cp-PLC, se obtuvo el número promedio de células normales y alargadas por campo microscópico a un objetivo de 40X (n=100 campos) de las diferentes diluciones de Pp.Cp-PLC y determinó el porcentaje de celularidad y citopatogenicidad.

3.4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA DEL Cp-PLC PURIFICADO

Para evaluar los efectos del purificado de Cp-PLC sobre las plaquetas, 100 µL de las mismas fueron incubadas con 400 µL de PRP (plasma rico en plaquetas) a 37° C, sobre agitación. Como control positivo de agregación plaquetaria (agonista), fue empleado 10 µM ADP (Sigma). La extensión de la agregación fue estimada como el porcentaje de transmisión de luz, tomándose como 100% el valor obtenido con la incubación de PRP con la solución diluyente (PBS 1X), apropiadamente usada como control negativo y desafiado posteriormente con

ADP. La transmisión de luz fue monitoreada a través de un agregómetro (Chrono-Log), calibrado para 100% de transmitancia con PPP (plasma libre de plaquetas) y para 0% de transmitancia con PRP. Para la obtención de PRP, aproximadamente 40 mL de sangre humana, obtenida de donadores saludables, fueron colectados en una solución conteniendo 3.8% de citrato de sodio y centrifugados a 125 x g durante 20 minutos a 25° C. El PRP, correspondió a la fracción superior del tubo, el cual fue colectado cuidadosamente. Para la obtención de PPP, utilizado como control negativo, 1mL de PRP fue centrifugado a 10 000 x g y el sobrenadante fue colectado. El número de plaquetas fue contado en cámara de Newbawer y ajustado entre 2 y 4 x 10⁸ células/mL.

3.4.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LETAL DEL Cp-PLC PURIFICADO

La actividad letal del purificado de Cp-PLC fue determinada de acuerdo a la metodología descrita por Fernández-Miyakawa *et al.* (2007b), con ligeras modificaciones. En resumen, grupos de 2 ratones por muestra fueron inoculados vía intraperitoneal con 0.5 mL de diferentes concentraciones (diluciones de 1/5 a 1/320) del purificado. Los ratones fueron monitoreados durante 48 horas y consideró como punto final del tiempo de sobrevivencia el inicio de un desorden neurológico (incoordinación, ataxia, parálisis, temblores musculares o convulsiones).

3.4.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENTEROTOXICA DEL Cp-PLC PURIFICADO

Para la evaluación de la actividad enterotóxica del purificado de Cp-PLC se empleó una adaptación de los modelos de la prueba de asa intestinal ligada descritos por Duncan *et al.* (1968), Fiore *et al.* (1997) y Campos *et al.* (2004).

3.4.5.1. Sujetos de experiencia

Los animales empleados fueron conejos clínicamente sanos, de raza Nueva Zelanda, de 6 a 7 meses de edad. Estos animales 5 días antes del experimento iniciaron un tratamiento con sulquinoxalina (50 mg/kg p.v. vía oral) y praziquantel (5 mg/kg p.v. vía oral) más pamoato de pirantel (5 mg/kg p.v. vía oral.) por 3 días. El alimento les fue restringido 48 horas antes del experimento no habiendo restricción del agua.

3.4.5.2. Inóculos

Los inóculos consistieron de: *i*) diferentes concentraciones de Cp-PLC purificada (diluciones de 1/2 a 1/64 [Log_2]) a volúmenes finales de 500 μL en BBI, y *ii*) 500 μL de BBI como control negativo.

3.4.5.3. Prueba de asa intestinal ligada en conejos

3.4.5.3.1. Preanestesia y anestesia

Los animales fueron preanestesiados con xilazina (3 mg/kg p.v. cada 4 horas vía intramuscular) como tranquilizante, y Tramadol (10 mg/kg p.v. cada 8 horas vía intramuscular) y N-butilbromide de hioscina (0.6 mg/kg p.v. cada 8 horas vía intramuscular) para brindar analgesia y reducir el peristaltismo intestinal, respectivamente. La anestesia fue llevada a cabo con clorhidrato de ketamina (30 mg/kg p.v. vía intramuscular) asociada a clorhidrato de xilazina (3 mg/kg p.v. vía intramuscular). El animal fue mantenido bajo anestesia general durante todo el experimento y las constantes fisiológicas (temperatura corporal, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, llenado capilar) fueron monitoreados antes y durante el experimento. Finalmente, pasado el periodo del ensayo, el animal fue sacrificado por sobredosis de pentobarbital sódico (200 mg/kg p.v. vía intravenosa).

3.4.5.3.2. Operatorio y preparación de las Asas Intestinales Ligadas

El animal fue colocado en posición decúbito dorsal y la zona abdominal fue rasurada y desinfectada. Inmediatamente, se

procedió a realizar una incisión sobre la línea medio ventral a nivel de cicatriz umbilical, prolongándola 10 cm hacia atrás; se abarcó piel y tejido celular. Expuesto el epiplón este fue desplazado hacia delante, a fin de exponer el íleon y preparar las asas intestinales ligadas (AILs). Las AILs tuvieron una longitud de 5 cm aproximadamente y fueron ligadas mediante nudos simples con hilo de sutura catgut N° 000 sobre la superficie del íleon, evitando bloquear los vasos sanguíneos mesentéricos. Se prepararon las AILs con una distancia entre asa y asa de 3 cm aproximadamente. Los inóculos fueron administrados intraluminalmente en las AILs con jeringas tipo tuberculina. El número de AILs y la distribución de los inóculos fueron de acuerdo al número de muestras. Finalizada las inoculaciones, se reintrodujo el íleon a la cavidad abdominal y procedió a cerrar las distintas capas titulares mediante sutura simple.

3.4.5.3.3. Evaluación de la actividad enterotóxica

La actividad enterotóxica del purificado de Cp-PLC en cada AIL fue determinada mediante: *i*) la acumulación de fluido intestinal, *ii*) cambios macroscópicos, y *iii*) cambios microscópicos en las AILs.

3.4.5.3.3.1. Acumulación de Fluido Intestinal

La acumulación de fluido fue obtenido de la relación volumen (mL)/longitud (mm) del AIL. Para ello, las mediciones de longitud y volumen de fluido intestinal de AIL fueron tomados exactamente.

3.4.5.3.3.2. Cambios macroscópicos

Los cambios macroscópicos evaluados en cada AIL fueron: coloración intestinal externa e interna, grosor de la pared intestinal y características del fluido intestinal.

3.4.5.3.3. *Cambios microscópicos*

Un segmento de cada AIL fue fijado en formol al 10% bufferado. Posteriormente, fueron inmersos en parafina y realizaron finos cortes para ser montados en laminas portaobjetos y después coloreados con Hematoxilina y Eosina (H&E). Los cambios microscópicos evaluados fueron: composición celular en la mucosa, submucosa y serosa del intestino, longitud e integridad de las vellosidades intestinales.

3.5 CARACTERIZACIÓN TOXIGÉNICA DE LOS AISLADOS DE *C. perfringens* ASOCIADO A SU CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE Cp-PLC

3.5.1 PREPARACIÓN DEL SOBRENADANTE BACTERIANO

Posteriormente, 70 μ L de los aislados reactivados fueron inoculados en 7 mL de caldo BHI (1%, v/v) e incubados bajo condiciones de anaerobiosis a 37° C durante el tiempo necesario para la síntesis de mayor cantidad de Cp-PLC (17 hrs, dato obtenido de la cinética de crecimiento y síntesis de Cp-PLC). Después de la incubación, los cultivos fueron centrifugados a 13 000 x g durante 10 minutos a 4° C. Los sobrenadantes obtenidos fueron suplementados con phenylmethanesulfon fluoride (PMSF [Sigma]) a una concentración final de 1 mM para inactivar proteasas y conservados a -20° C, hasta su uso. Paralelamente, los precipitados fueron sometidos a coloraciones Gram para confirmar su estado bacteriano (esporulado o vegetativo).

3.5.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LECITINASA DE LOS AISLADOS DE *C. perfringens*

Para la determinación de la actividad lecitinasa de los sobrenadantes bacterianos fue empleado el *método directo*. En resumen, en una microplaca de 96 pocillos 100 μ L de muestra (por triplicado) fueron mezclados con 100 μ L de

emulsión de yema de huevo (10% [vol/vol] de yema de huevo en PBS 1X [pH 7.3], centrifugados a 5 000 x g durante 10 minutos a 4° C, y pasados por un filtro de 0.45 µm) e incubaron a 37° C durante 3 horas. Después de la incubación, la placa fue leída en un lector de microplacas de ELISA (Multiskan EY, Labsystems) a una densidad óptica de 620 nm (OD_{620nm}). El blanco consistió de 100 µL de BHI estéril mezclados con 100 µL de emulsión yema de huevo. La actividad lecitinasa fue expresada en unidades arbitrarias (u.a.) y obtenida a partir de la diferencia entre los valores de OD_{620nm} de la muestra y el blanco divididos entre el valor de OD_{620nm} del blanco. A continuación la formula:

$$\text{Actividad Lecitinasa (u.a)} = \frac{\text{OD}_{620\text{nm}} (\text{MUESTRA}) - \text{OD}_{620\text{nm}} (\text{BLANCO})}{\text{OD}_{620\text{nm}} (\text{BLANCO})}$$

Los aislados fueron clasificados, arbitrariamente por los autores, en base a los niveles de actividad lecitinasa. Así tenemos, aislados de baja (< 1 u.a.), mediana (1–3 u.a.) y alta (> 3 u.a.) capacidad de producción de Cp-PLC.

3.5.3. DETERMINACIÓN DEL PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS AISLADOS DE *C. perfringens*

Los diferentes perfiles electroforéticos de los sobrenadantes bacterianos fueron obtenidos según la metodología descrita anteriormente (ver punto 3.3.3.3.). Sin embargo, previamente todas las muestras fueron concentradas 10 veces (10X) por el método del ácido tricloroacético.

3.5.3.1. Método de concentración proteica por Ácido Tricloroacético

La metodología empleada fue la descrita en *pET System Manual, Novagen* (2005). En resumen, 1 mL de muestra fue mezclada con 100 µL (vol/vol; 1:10) de ácido tricloroacético (SigmaUltra, Sigma Aldrich) mediante agitación con vortex fuerte durante 15 segundos. Inmediatamente, la mezcla fue incubada en hielo durante 15 minutos. Después de la incubación, la mezcla fue centrifugada a 14 000 x g

durante 10 minutos. El sobrenadante fue eliminado y el precipitado fue lavado con 2 mL de acetona mediante centrifugación a 14 000 x g durante 10 minutos. El precipitado fue dejado secar a temperatura de ambiente durante 18 horas, para finalmente poder ser resuspendido en 100 µL de PBS 1X (pH 7.3). La muestra concentrada 10X obtenida fue conservada a -20° C.

3.5.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE LOS AISLADOS DE *C. perfringens*

La actividad hemolítica de los sobrenadantes bacterianos fue determinada según la metodología descrita anteriormente (ver punto 3.4.1.).

3.5.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PERFRINGOLISINA DE LOS AISLADOS DE *C. perfringens*

La actividad perfringolisina de los sobrenadantes bacterianos fue determinada mediante el método de microtitulación hemolítico descrito por Fisher *et al.*, (2006). En resumen, los sobrenadantes fueron seriadamente diluidos (1/2 a 1/128; [Log₂]) en BBI suplementado con 1 mM de EDTA a volúmenes finales de 150 µL y distribuidos en una microplaca de 96 pocillos. Luego, 150 µL de solución de eritrocitos de caballo (eritrocitos de caballo previamente lavados tres veces con PBS 1X [pH 7.3] y resuspendidos en BBI suplementado con 1 mM EDTA al 1% [vol/vol]) fueron agregados a cada pocillo. La microplaca fue incubada a 37° C durante 1 hora. Después de la incubación, la microplaca fue centrifugada a 2 000 x g durante 10 minutos a 4° C. Luego, 200 µL de cada sobrenadante fueron traspasados a otra microplaca y leídos en una lectora de microplacas de ELISA a una OD_{550nm}. La actividad hemolítica fue expresada como unidades arbitrarias hemolíticas (u.a.h.) por mililitro y correspondió a la dilución en la cual resultó un incremento del 50% de hemólisis. Se tuvo como referencia la OD_{550 nm} de una dilución de la solución de eritrocitos de caballo en agua destilada (vol/vol, 1:3) que correspondió a una hemólisis del 50%.

3.5.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS AISLADOS DE *C. perfringens*

Los efectos citotóxicos de los sobrenadantes fueron determinados según la metodología descrita anteriormente (ver punto 3.4.2.). Los resultados fueron dados básicamente por la despoblación celular en relación al control negativo (medio caldo BHI) mediante evaluación microscópica a 10X y 40X de objetivo.

3.5.8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA DE LOS AISLADOS DE *C. perfringens*

Los efectos de los sobrenadantes de los aislados de alta, mediana y baja capacidad de producción de Cp-PLC sobre las plaquetas, fueron determinados según la metodología descrita anteriormente (ver punto 3.4.3.).

3.5.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LETAL DE LOS AISLADOS DE *C. perfringens*

La actividad letal de los sobrenadantes bacterianos fue determinada de acuerdo a la metodología descrita por Fernández-Miyakawa *et al.* (2007b), con algunas modificaciones. En resumen, grupos de 2 ratones por cepa fueron inoculados vía intraperitoneal con 0.5 mL de cultivo filtrado. Los ratones fueron monitoreados durante 48 horas y consideró como punto final del tiempo de sobrevivencia el inicio de un desorden neurológico (incoordinación, ataxia, parálisis, temblores musculares o convulsiones).

3.5.10. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENTEROTÓXICA DE LOS AISLADOS DE *C. perfringens*

Para la evaluación de la actividad enterotóxica de los sobrenadantes bacterianos se empleó metodología descrita en el punto 3.4.5. Los inóculos consistieron de: i) 500 µL de sobrenadante bacteriano y ii) 500 µL de medio BHI estéril como control negativo.

IV. RESULTADOS

4.1 AISLADOS DE *C. perfringens* DE CASOS DE ENTEROTOXEMIA EN ALPACAS

Todos los aislados fueron reactivados mostrando tener diferentes estados bacterianos (ver Figura 4.1 y Cuadro 4.1). Así tenemos, 12 aislados en estado vegetativo (10 subtipo cpe^-cpb2^- y 02 subtipo cpe^-cpb2^+) y 12 aislados en estado esporulado (08 subtipo cpe^-cpb2^- y 04 subtipo cpe^-cpb2^+).

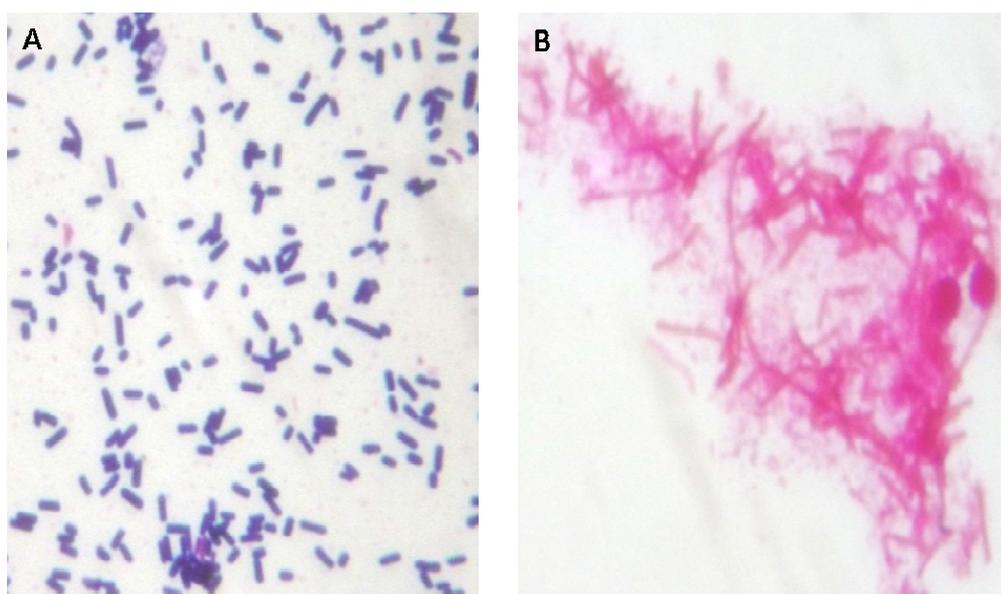


Figura 4.1. Estados bacterianos de *C. perfringens* aislados de casos de enterotoxemia en alpacas (Coloración Gram; 100X). A, bacterias en estado vegetativo. Nótese la coloración azul intensa y forma bacilar de las bacterias. B, bacterias en estado esporulado. Nótese la coloración rosácea y de formas alargadas e irregulares de las bacterias debido a que se encuentran esporulando.

Cuadro 4.1. Estado bacteriano de los aislados de *C. perfringens* provenientes de casos de enterotoxemia en alpacas

AISLADO	PROCEDENCIA	GENOTIPO	SUBTIPO	ESTADO BACTERIANO
19-2005	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁺	Vegetativo
41-2005	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	Esporulado
15-2005	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁺	Esporulado
18-2005	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁺	Esporulado
25-2005	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁺	Esporulado
A4-2006	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	Vegetativo
A17-2006	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁺	Vegetativo
A8-2006	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	Esporulado
P4b-2007	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	Esporulado
P9b-2007	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	Esporulado
PH1b-2007	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	Esporulado
A1a-2007	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	Esporulado
A12a-2007	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	Esporulado
C13b-2007	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	Esporulado
A13b-2007	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁺	Esporulado
L1-2008	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	Vegetativo
L10-2008	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	Vegetativo
L12-2008	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	Vegetativo
L21-2008	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	Vegetativo
L22-2008	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	Vegetativo
L24-2008	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	Vegetativo
L26-2008	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	Vegetativo
DA3-2008	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	Vegetativo
DA6-2008	Enterotoxemia	A	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	Vegetativo

4.2. CURVA DE CRECIMIENTO DE *C. perfringens* Y SÍNTESIS DE Cp-PLC

El análisis de la curva de crecimiento fue realizado con dos aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas (aislados L1-2008 y L21-2008), quienes muestran una corta curva de crecimiento constituida por: la Fase de latencia con una duración de 6 horas; seguida de la Fase exponencial con una duración de 11 horas, entre la 6ta y 17ma hora de crecimiento; finalizando con la Fase estacionaria a partir de la 17ma hora de crecimiento (Figura 4.2 y Anexo 1).

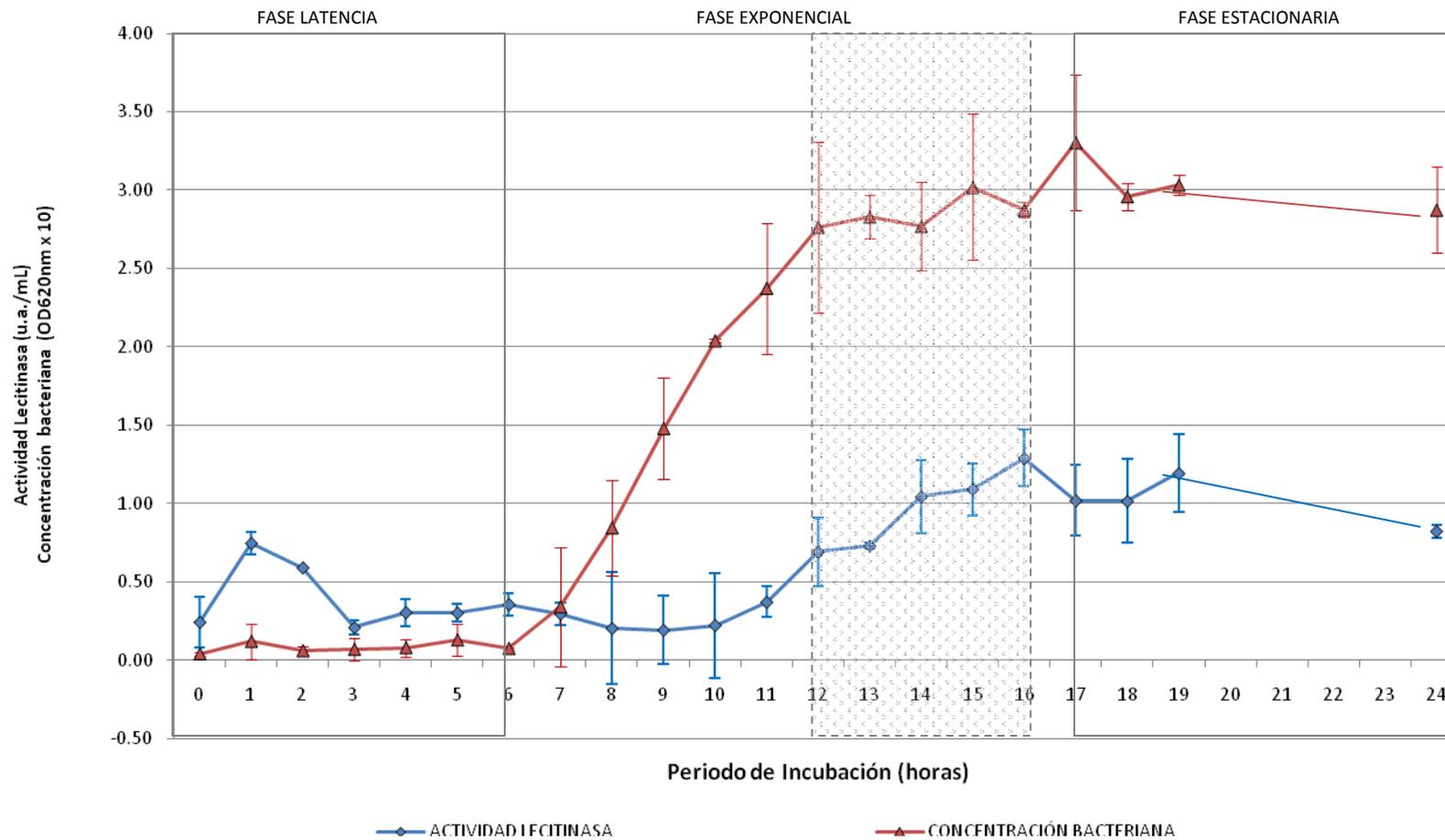


Figura 4.2. Curvas de crecimiento y de producción de Cp-PLC de aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas. La curva de crecimiento está dividida en tres fases de crecimiento: Latencia (0-6 hrs), Exponencial (6-17 hrs) y Estacionaria (17 -24 hrs). El área sombreada corresponde al periodo de producción exponencial de la Cp-PLC. Cada punto corresponde a la media del dato \pm desviación estándar (SD).

La producción de Cp-PLC comenzó a registrarse (valores superiores a 0.5 u.a./mL de actividad lecitinasa) a la 12va hora de crecimiento bacteriano incrementándose rápidamente hasta la 16va hora, periodo correspondiente a la segunda mitad de la fase de crecimiento exponencial. Seguidamente los niveles de Cp-PLC permanecieron constantes durante la fase de crecimiento estacionaria. De acuerdo a esto, se consideró un periodo de incubación para los cultivos de 17 horas para la purificación de la Cp-PLC y la caracterización toxigénica de los aislados, puesto que la bacteria ya alcanzó su máxima producción de Cp-PLC.

4.3. PURIFICACIÓN DE LA FOSFOLIPASA C DE *C. perfringens* (Cp-PLC)

El aislado DA6-2008 fue empleado para el proceso de purificación de Cp-PLC, por ser un aislado de alta capacidad de producción de Cp-PLC (Ver Anexo 2). En el proceso de purificación, las precipitaciones del extracto crudo con diferentes porcentajes de saturación con sulfato de amonio mostraron que una saturación con 50% (pSA50%) alcanzó un rendimiento de 86.4 % y una pureza de 7.4 veces mientras que con saturaciones con 85% (pSA85%) y 100% (pSA100%) se obtuvieron poco o nada de rendimiento y pureza (Cuadro 4.2).

El análisis de los perfiles electroforéticos SDS-PAGE (Figura 4.3) de pSA50% evidencian la presencia de las bandas 9 (F), 10 (D), 11 (F), 12 (F), 14 (N) y 15 (N) presentes en el perfil de *C. perfringens* (ver más adelante Capítulo 4.5.2. [Figura 4.13]), siendo las bandas 10 y 11 las más probables en corresponder a la Cp-PLC por poseer un tamaño de 43 KDa. Mientras que el pSA85% evidencia las bandas 8 (F), 9 (D), 10 (F), 11 (D), 13 (N) y 14 (N) y el pSA100% no evidencia ningún perfil debido a la baja concentración proteica (dato no mostrado).

El pSA50% fue seleccionado para la continuación del proceso de purificación, el cual fue concentrado por ultrafiltración con un Amicon 10 KDa (Amicon® Ultra-15[Millipore]) y filtrado a 0.20 µm. Este concentrado fue denominado Pp.Cp-PLC (parcialmente purificado de Cp-PLC) y mostró una actividad enzimática específica de 516 u.a.y./mg, y obteniendo con ello un rendimiento y una pureza de 96% y 16.6 veces, respectivamente.

Cuadro 4.2. Rendimiento y pureza del proceso de purificación de Cp-PLC con diferentes concentraciones de saturación de sulfato de amonio.

MUESTRAS	Volumen	Concentración proteica	Proteína total	Actividad enzimática	Actividad enzimática total	Rendimiento	Actividad enzimática específica	Pureza
	(mL)	(ug/mL)	(mg)	(u.a.y./mL)	(u.a.y.)	(%)	(u.a.y./mg)	veces
EXTRACTO CRUDO	3000	128.5	385.5	4	12000	100	31.1	1.0
pSA50% ¹	108	417.7	45.1	96	10368	86.4	229.8	7.4
pSA85% ²	20	315.3	6.3	2	40	0.3	6.3	0.2
pSA100% ³	35	60.2	2.1	0	0	0	0.0	0.0
Pp.Cp-PLC ⁴	45	496.1	22.3	256	11520	96	516.0	16.6

(1) pSA50%: precipitado obtenido de la saturación del extracto crudo con 50% de sulfato de amonio.

(2) pSA85%: precipitado obtenido de la saturación del extracto crudo con 85% de sulfato de amonio.

(3) pSA100%: precipitado obtenido de la saturación del extracto crudo con 100% de sulfato de amonio.

(4) Pp.Cp-PLC: Parcialmente purificado de la Cp-PLC obtenido de la saturación del extracto crudo con 50% de sulfato de amonio y concentrado por ultrafiltración.

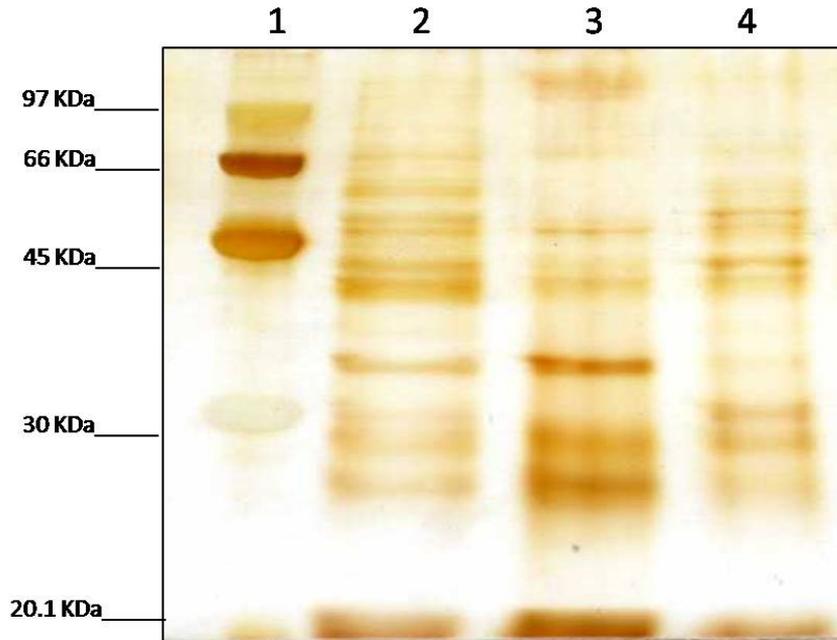


Figura 4.3. Perfiles electroforéticos de los precipitados del extracto crudo con diferentes porcentajes desaturaciones con sulfato de amonio. Línea 1, marcador de peso molecular; línea 2, extracto crudo concentrado 10X; línea 3, pSA50%; línea 4, pSA85%. Electroforesis mantenida a 60V durante 4.5 horas.

4.4. CARACTERIZACIÓN TOXIGÉNICA DE LA Cp-PLC PARCIALMENTE PURIFICADA (Pp.Cp-PLC)

4.4.1. ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE Pp.Cp-PLC

El Pp.Cp-PLC evidenció una actividad hemolítica de 512 u.a.h./mL ó 1030 u.a.h./mg.

4.4.2. ACTIVIDAD CITOPÁTICA EN CÉLULAS HEp-2 DE Pp.Cp-PLC

La actividad citopática del Pp.Cp-PLC en células HEp-2 fue evaluada a partir de una serie de diluciones del purificado (1/10 [25.6 u.a.y./mL.], 1/20 [12.8 u.a.y./mL.], 1/40 [6.4 u.a.y./mL], 1/80 [3.2 u.a.y./mL], 1/160 [1.6 u.a.y./mL], 1/320 [0.8 u.a.y./mL]) en PBS 1 X (pH 7.4). Los cambios evidenciados consistieron desde una severa despoblación celular (efecto citotóxico) a concentraciones superiores a 25.6 u.a.y./mL de Pp.Cp-PLC (Figura 4.4.A) hasta alteraciones en la morfología celular (efecto citopático), principalmente alargamiento celular como “agujillas”, a concentraciones de 12.8 a 0.8 u.a.y./mL. de Pp.Cp-PLC (Figura 4.4.B, C, D y E).

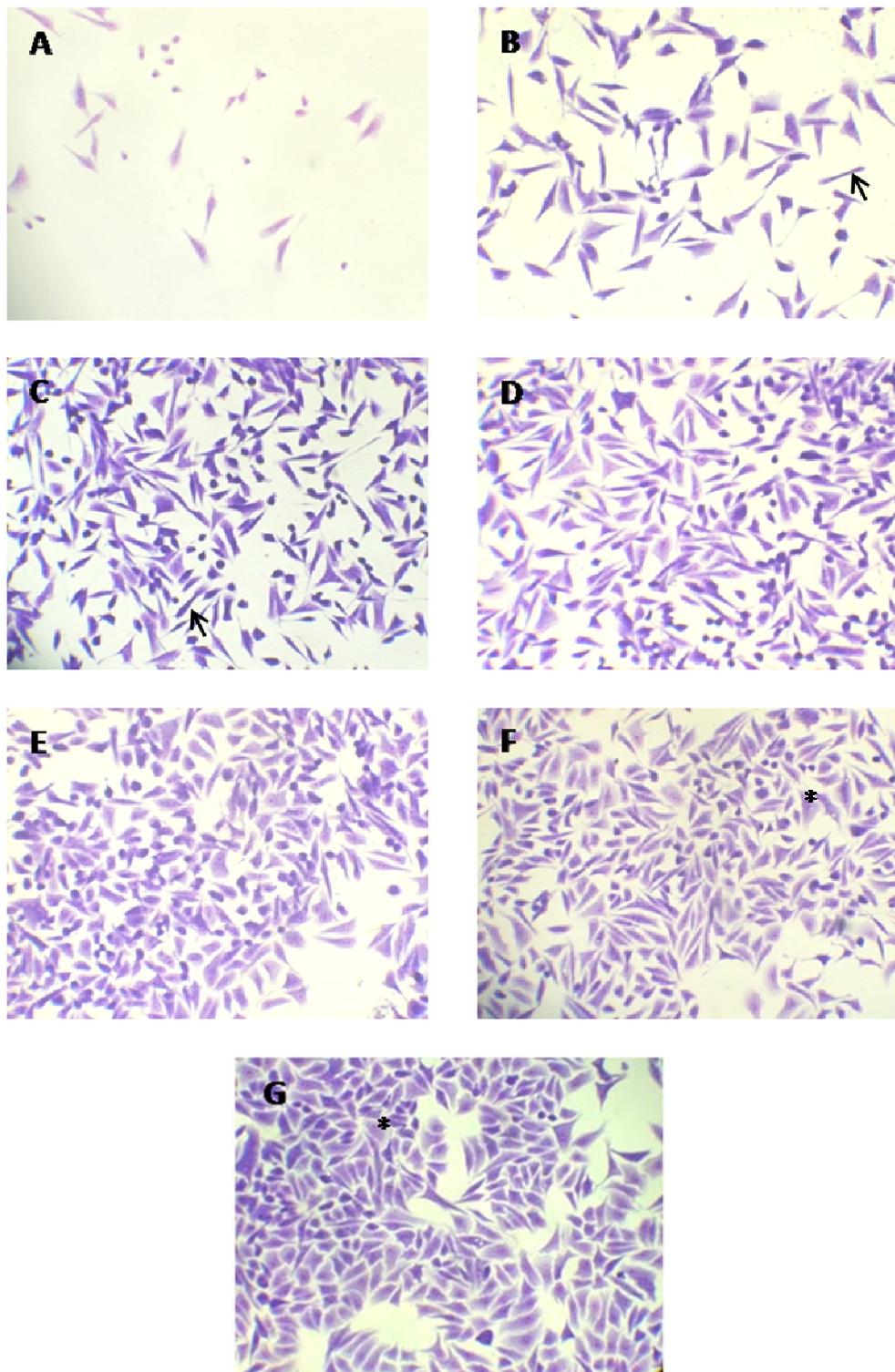


Figura 4.4. Cambios citopáticos en la línea de células HEp-2 desafiadas con distintas concentraciones de Pp.Cp-PLC. Células desafiadas con 25.6 (A), 12.8 (B), 6.4(C), 3.2 (D), 1.6 (E), 0.8 (F) y 0 (G) u.a./mL de Pp.Cp-PLC. Las puntas de las flechas señalan a las células en forma alargada “agujillas”, y los asteriscos (*) indican a las células normales en forma estrellada. Pp.Cp-PLC: Parcialmente purificado de la Cp-PLC obtenido de la saturación del extracto crudo con 50% de sulfato de amonio y concentrado por ultrafiltración.

Así, concentraciones de 25.6 u.a.y./mL tuvieron un claro efecto citotóxico (0.6% celularidad), los cuales conforme fueron reduciéndose también lo hacía el porcentaje de citopatogenicidad (de 62.4% a 17.9%) e incrementaba el porcentaje de celularidad (hasta cerca de 75%) (Cuadro 4.3 y Figura 4.5).

4.4.3. ACTIVIDAD DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA DE Pp.Cp-PLC

El Pp.Cp-PLC poseyó actividad de agregación plaquetaria en un valor del 80% en relación al producido por el ADP (Figura 4.6).

4.4.4. ACTIVIDAD LETAL DE Pp.Cp-PLC

La actividad letal en ratones del Pp.Cp-PLC fue evaluada empleando una serie de diluciones del purificado (1/5 [25.6 u.a.y.], 1/10 [12.8 u.a.y.], 1/15 [9.6 u.a.y.], 1/20 [6.4 u.a.y.], 1/40 [3.2 u.a.y.], 1/80 [1.6 u.a.y.], 1/160 [0.8 u.a.y.], 1/320 [0.4 u.a.y.]) en PBS 1 X (pH 7.4). Los resultados están resumidos en el Cuadro 4.4, mostrando que cantidades iguales o superiores a 9.6 u.a.y. de Pp.Cp-PLC provocaron la muerte de los animales dentro de las 24 horas post-inoculación. Mientras que los animales inoculados con cantidades entre 6.4 y 3.2 u.a.y de Pp.Cp-PLC no murieron pero si mostraron severos signos de depresión, ataxia de los miembros posteriores y disnea respiratoria dentro de las 24 horas post-inoculación. Los animales inoculados con cantidades inferiores a 3.2 u.a.y sólo evidenciaron ligeros signos clínicos. Por ello, la actividad letal del Pp.Cp-PLC fueron cantidades iguales ó superiores a 3.2 u.a.y. ó 6.2 µg de Pp.Cp-PLC.

Cuadro 4.3. Porcentaje de citopatogenicidad y celularidad en línea celular HEp-2 desafiadas con distintas concentraciones de Pp.Cp-PLC

DILUCIÓN DE Pp.Cp-PLC ¹	CONCENTRACIÓN DE Pp.Cp-PLC		CELULAS HEp-2 ³			PORCENTAJE CITOPATOGENICIDAD ⁴	PORCENTAJE CELULARIDAD ⁵
	u.a.y./mL ²	µg	N° Células normales	N° Células alargadas	N° Células totales		
PBS	-	-	19.14	0.4	19.54	2.0 %	100 %
1:10	25.6	49.6	0.09	0.02	0.11	18.2%	0.6 %
1:20	12.8	24.8	4.26	7.07	11.33	62.4%	58.0 %
1:40	6.4	12.4	2.68	10.2	12.88	79.2%	65.9 %
1:80	3.2	6.2	5.4	8.6	14	61.4%	71.7 %
1:160	1.6	3.1	9.01	5.75	14.76	39.0%	75.6 %
1:320	0.8	1.6	11.65	2.54	14.19	17.9%	72.7 %

(1) Pp.Cp-PLC: Parcialmente purificado de la Cp-PLC obtenido de la saturación del extracto crudo con 50% de sulfato de amonio y concentrado por ultrafiltración. Las diluciones fueron realizadas seriadamente en PBS.

(2) La actividad lecitinasas del Pp.Cp-PLC fue determinada según el método directo descrito por Karasawa *et al.* (2003) y expresado en unidades arbitrarias yema de huevo (u.a.y.) por mL.

(3) El número de células corresponde al número promedio de células normales, alargadas y totales encontrados por campo visual microscópico a 40X.

(4) El porcentaje de citopatogenicidad en línea celular HEp-2 desafiadas con distintas concentraciones de Pp.Cp-PLC fue obtenido de la razón entre el número de células alargadas y totales multiplicadas por 100.

(5) El porcentaje de celularidad en línea celular HEp-2 desafiadas con distintas concentraciones de Pp.Cp-PLC fue calculada en relación a la población control (PBS) como 100% de celularidad

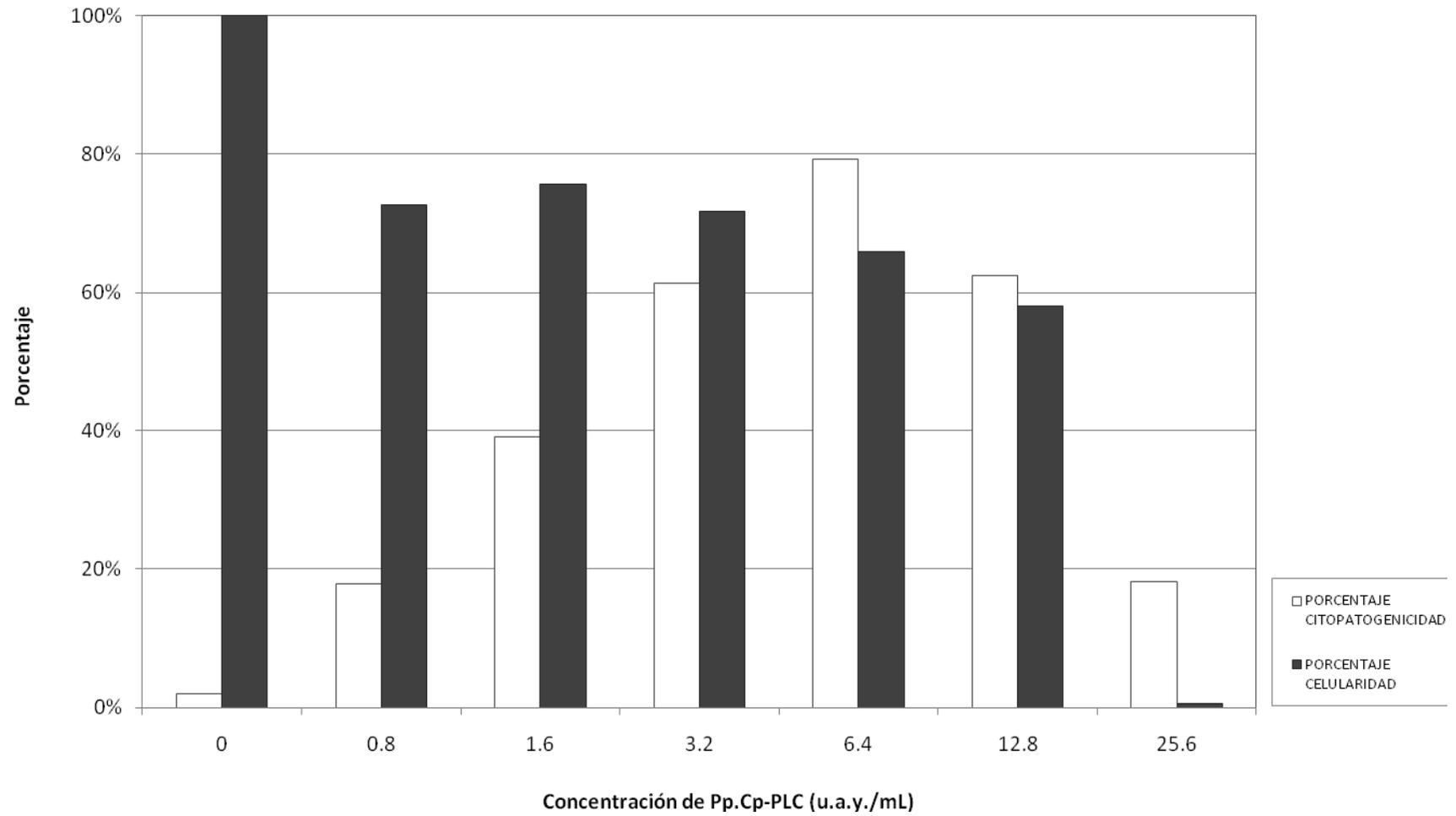


Figura 4.5. Porcentaje de citopatoxicidad y celularidad en línea celular HEp-2 desafiadas con distintas concentraciones de Pp.Cp-PLC

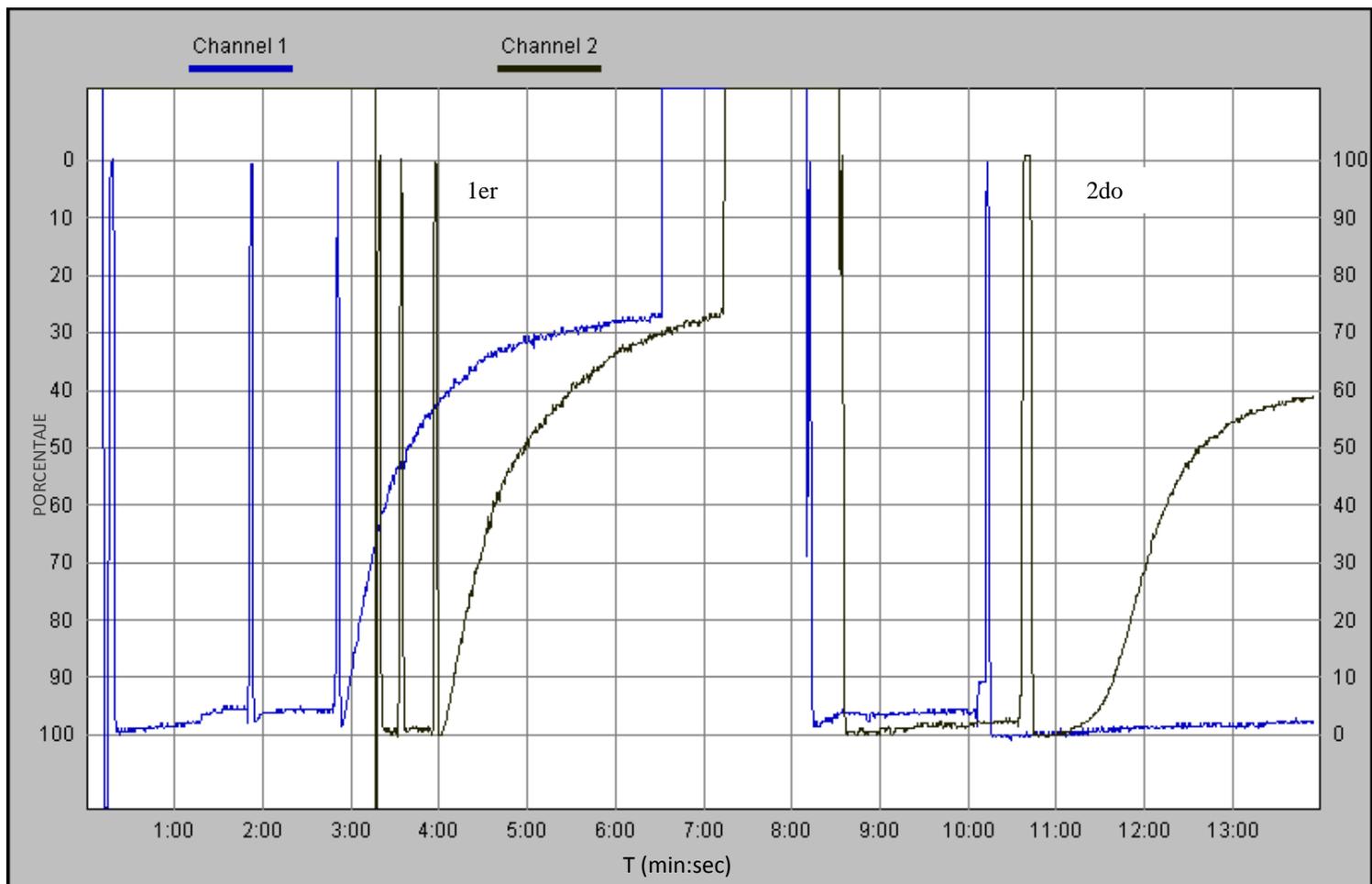


Figura 4.6. Actividad de agregación plaquetaria de Pp.Cp-PLC. 1er Canal azul y 1er Canal negro, Control positivo (ADP); 2do Canal azul, Control negativo (PBS); 2do Canal negro, Pp.Cp-PLC.

Cuadro 4.4. Actividad letal en ratones por diferentes concentraciones de Pp.Cp-PLC.

DILUCIÓN DE Pp.Cp-PLC ¹	CONCENTRACIÓN DE Pp.Cp-PLC		MUERTE ²	TIEMPO DE MUERTE POST-INOCULACION (Hrs)	SIGNOS ³
	u.a.y.	µg			
PBS	0	0	No	-	Ninguno
1:5	25.6	49.6	Si	3.5 (2.5-4.5)	Severo
1:10	12.8	24.8	Si	10 (8-12)	Severo
1:15	9.6	18.6	Si	18 (16 -20)	Severo
1:20	6.4	12.4	No	-	Severo
1:40	3.2	6.2	No	-	Severo
1:80	1.6	3.1	No	-	Moderado
1:160	0.8	1.6	No	-	Leve
1:320	0.4	0.8	No	-	Ninguno

- (1) Pp.Cp-PLC: Parcialmente purificado de la Cp-PLC obtenido de la saturación del extracto crudo con 50% de sulfato de amonio y concentrado por ultrafiltración. Las diluciones fueron realizadas seriadamente en PBS.
- (2) La actividad letal de los sobrenadantes bacterianos fue evaluada en ratones usando la vía intraperitoneal
- (3) Los signos o desordenes neurológicos fueron incoordinación, ataxia, parálisis temblores musculares o convulsiones, los cuales fueron clasificados de acuerdo a su severidad en leve, moderado y severo. Una reacción positiva a letalidad se consideró como punto final de sobrevivencia el inicio de un severo desorden neurológico.

4.4.5. ACTIVIDAD ENTEROTOXICA DE Pp.Cp-PLC

La actividad enterotóxica del Pp.Cp-PLC fue evaluada empleando una serie de diluciones del purificado (1/4 [32 u.a.y.], 1/8 [16 u.a.y.], 1/16 [8 u.a.y.], 1/32 [4 u.a.y.] y 1/64 [2 u.a.y.]) en BBI (pH 7.4). En todas ellas, el Pp.Cp-PLC mostró poseer capacidad de acumulación de fluido intestinal, el cual estuvo relacionado proporcionalmente a la concentración de la toxina (Figura 4.7, 4.8 y Cuadro 4.5).

Histológicamente, lesiones degenerativas y/o necróticas a nivel de la mucosa, submucosa y serosa intestinal no fueron evidenciadas en ninguna de las AIL desafiadas con diferentes concentraciones de Pp.Cp-PLC (Figura 4.9). En algunos casos (según el grado de concentración de Pp.Cp-PLC), las vellosidades intestinales fueron escasas y poco profundas debido básicamente al efecto de distensión intestinal. Por otra parte, a nivel de la submucosa y la serosa se encontró infiltración y migración de polimorfonucleares hacia serosa, posiblemente por las lesiones causadas por la manipulación y daño mecánico propia de la técnica empleada.

En resumen, las propiedades biológicas del la Cp-PLC obtenidas en el presente estudio (Pp.Cp-PLC), y graficados en la Figura 4.10, nos indican el éxito que tuvo la metodología de purificación empleada.



Figura 4.7. Imagen macroscópica de AILs inoculadas con diferentes concentraciones de Pp.Cp-PLC. Asas intestinales inoculadas con 32 u.a.y (AILs 1 y 2), 16 u.a.y. (AILs 3 y 4), 8 u.a.y. (AILs 5 y 6), 4 u.a.y. (AILs 7 y 8), 2 u.a.y. (AILs 9 y 10) y 0 u.a.y. (AILs 11, 12 y 13) de Pp.Cp-PLC. AIL: asas intestinales ligadas en conejo. Pp.Cp-PLC: Parcialmente purificado de la Cp-PLC obtenido de la saturación del extracto crudo con 50% de sulfato de amonio y concentrado por ultrafiltración. u.a.y.: Unidades arbitrarias yema de huevo

Cuadro 4.5. Actividad enterotóxica de diferentes concentraciones de Pp.Cp-PLC en asa intestinal ligada de conejos

DILUCIÓN DE Pp.Cp-PLC ¹	CONCENTRACION DE Pp.Cp-PLC		ACUMULACIÓN DE FLUIDO INTESTINAL (Volumen (mL)/Longitud (cm) de AIL) ²				SIGNOS CLINICOS ³	LESIONES EN AIL ⁴	
	u.a.y.	µg	A	B	Media	SD		Distensión	Integridad intestinal
BBI	0	0	0.09	0.00	0.05	0.063	Ninguno	Ninguna	Ninguna
1:4	32	62	0.34	0.60	0.47	0.183	Ninguno	Severa	Moderada
1:8	16	31	0.49	0.25	0.37	0.170	Ninguno	Severa	Leve
1:16	8	15.5	0.21	0.13	0.17	0.056	Ninguno	Moderada	Leve
1:32	4	7.8	0.25	0.16	0.21	0.064	Ninguno	Moderada	Leve
1:64	2	3.9	0.2	0.11	0.16	0.064	Ninguno	Leve	Leve

(1) Pp.Cp-PLC: Parcialmente purificado de la Cp-PLC obtenido de la saturación del extracto crudo con 50% de sulfato de amonio y concentrado por ultrafiltración. Las diluciones fueron realizadas seriadamente en Buffer Borato Isotonico (BBI).

(2) La acumulación de fluido intestinal de Pp.Cp-PLC fue determinada según la prueba de asa intestinal ligada en conejo descrito en el presente estudio. Se calculó en forma duplicada para cada dilución, obteniéndose la media ± la desviación estándar (SD).

(3) En los animales inoculados fue evaluado la presencia de signos clínicos para determinar si la Pp.Cp-PLC ha sido absorbido generando algún desorden sistémico.

(4) Las lesiones en AIL fueron evaluadas macroscópicamente por la distensión intestinal producto de la acumulación de fluido y microscópicamente por la composición e integridad celular de la mucosa intestinal

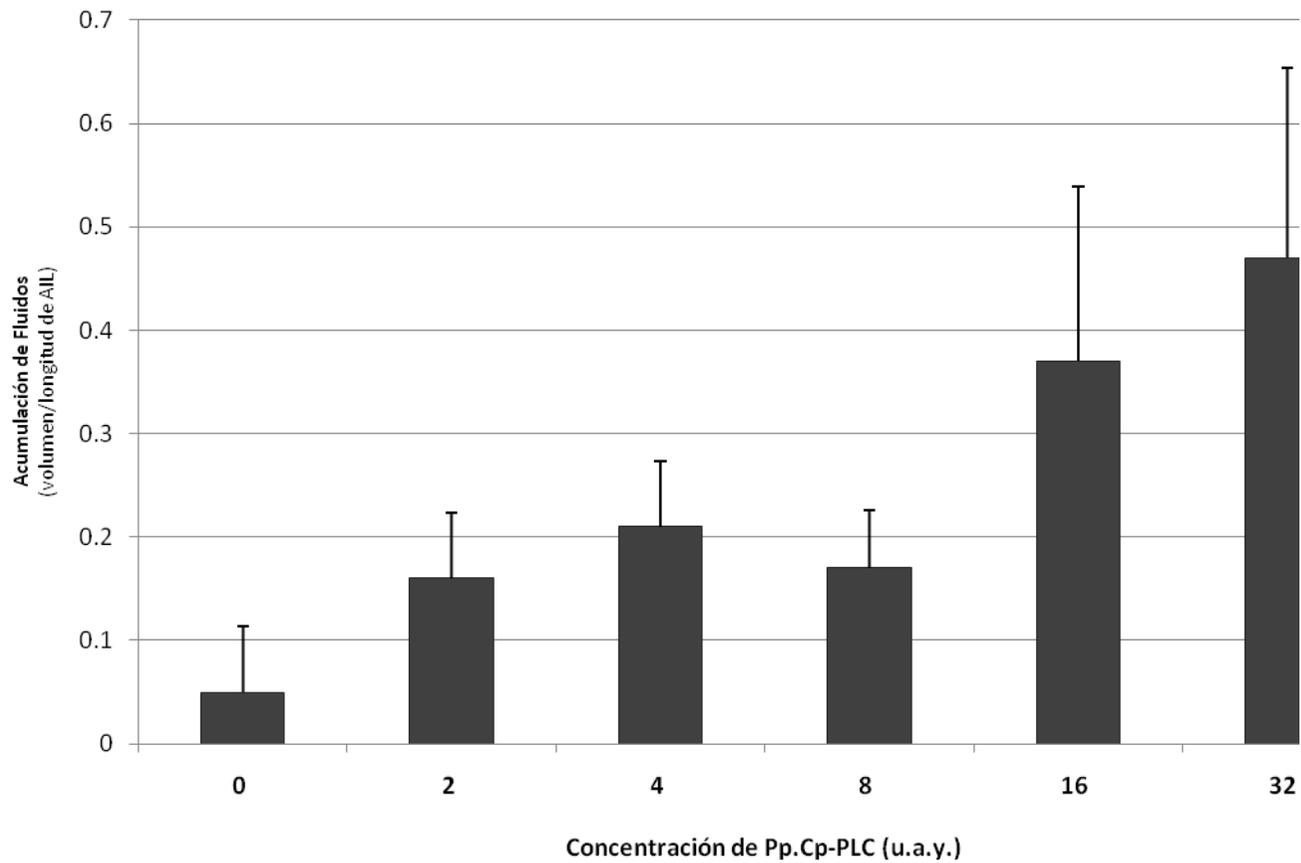


Figura 4.8. Actividad enterotóxica (acumulación de fluido intestinal) de diferentes concentraciones de Pp.Cp-PLC en asas intestinales ligadas de conejos. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar (SD). La concentración de la Pp.Cp-PLC es expresada en unidades arbitrarias yema de huevo (u.a.y.).

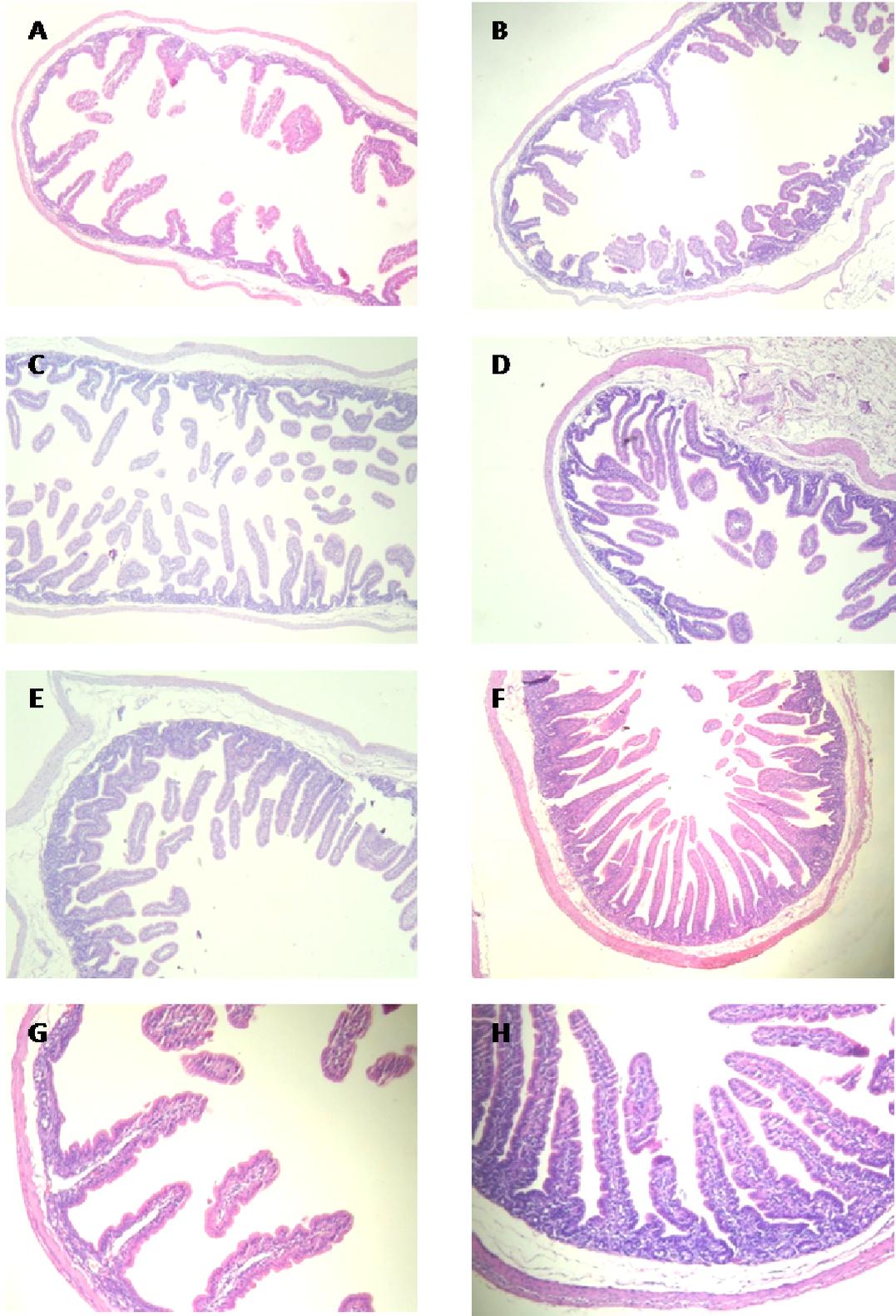


Figura 4.9. Imágenes histológicas de las AIL inoculadas con diferentes concentraciones de Pp.Cp-PLC. AIL inoculada con 32 (A), 16 (B), 8 (C), 4 (D), 2 (E) y 0 (F) u.a.y. de Pp.Cp-PLC (Coloración HE, 10 X). Nótese la reducción gradual de las vellosidades intestinales de acuerdo a la concentración de toxina inoculada, debido a la acumulación de fluido intestinal. Nótese la integridad de la mucosa intestinal de AIL inoculadas tanto con 32 (G) y 0 (H) u.a.y. de Pp.Cp-PLC (Coloración HE, 40X).

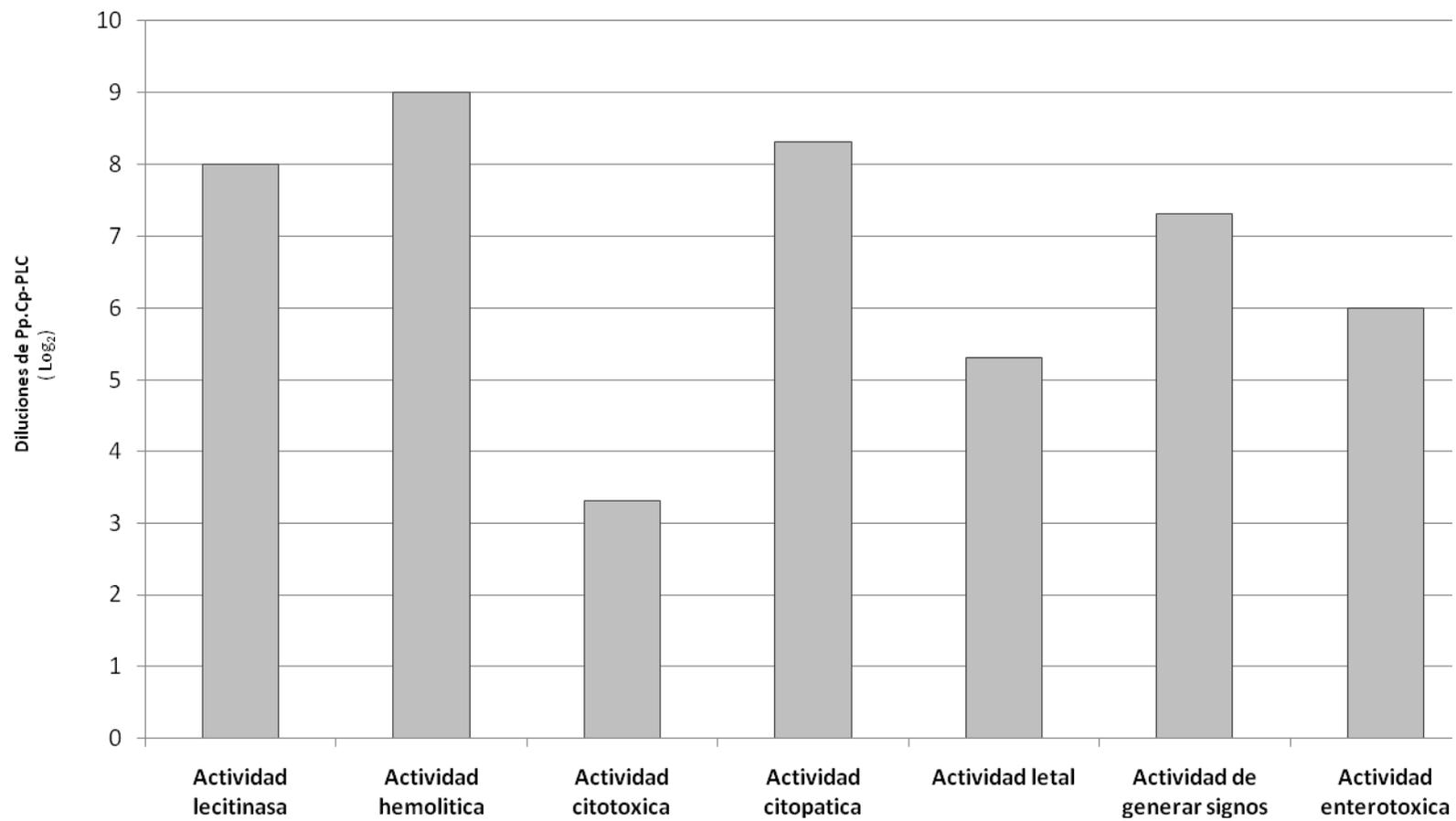


Figura 4.10. Limite de detección de las actividades biológicas del Pp.Cp-PLC.

4.5. CARACTERIZACIÓN TOXIGÉNICA DE AISLADOS DE *C. perfringens* DE CASOS DE ENTEROTOXEMIA EN ALPACAS ASOCIADOS A LA PRODUCCIÓN DE Cp-PLC

4.5.1. ACTIVIDAD LECITINASA DE LOS AISLADOS DE *C. perfringens*

La evaluación de la capacidad de producción de Cp-PLC (niveles de actividad lecitinasa) de los aislados nos muestra diferencias entre ellos, los cuales se encuentran descritos en el Anexo 2 y Figura 4.11. Para efectos más didácticos y comparativos del estudio, de aquí en adelante la codificación de los aislados será reemplazada por otro teniendo en consideración el estado bacteriano, el subtipo y la capacidad de producción de Cp-PLC (según Anexo 2). Así se iniciará con las siglas: **Ev-**, aislado en estado vegetativo genotipo A subtipo cpe^-cpb2^- ; **Ev(β 2)-**, aislado en estado vegetativo genotipo A subtipo cpe^-cpb2^+ , **Es-**, aislado en estado esporulado genotipo A subtipo subtipo cpe^-cpb2^- ; y **Es(β 2)-**, aislado en estado esporulado genotipo A subtipo cpe^-cpb2^+ . Y continuará con: -**N°a**, número de aislado de alta capacidad de producción de Cp-PLC; -**N°m**, número de aislado de mediana capacidad de producción de Cp-PLC; -**N°b** y número de aislado de baja capacidad de producción de Cp-PLC.

Así encontramos 5 aislados con alta, 4 aislados con mediana y 15 aislados con baja capacidad de producción de Cp-PLC. Analizándolos según su estado bacteriano (ver Cuadro 4.6 y Figura 4.12), tenemos que en el estado vegetativo el 41.6% (5/12 aislados) posee alta capacidad de producción de Cp-PLC, el 25% (3/12 aislados) posee mediana capacidad de producción de Cp-PLC y el 33.3% (4/12 aislados) posee baja capacidad. Mientras, que en el estado esporulado casi la totalidad (91.6%; 11/12 aislados) de aislados poseen baja capacidad de producción de Cp-PLC.

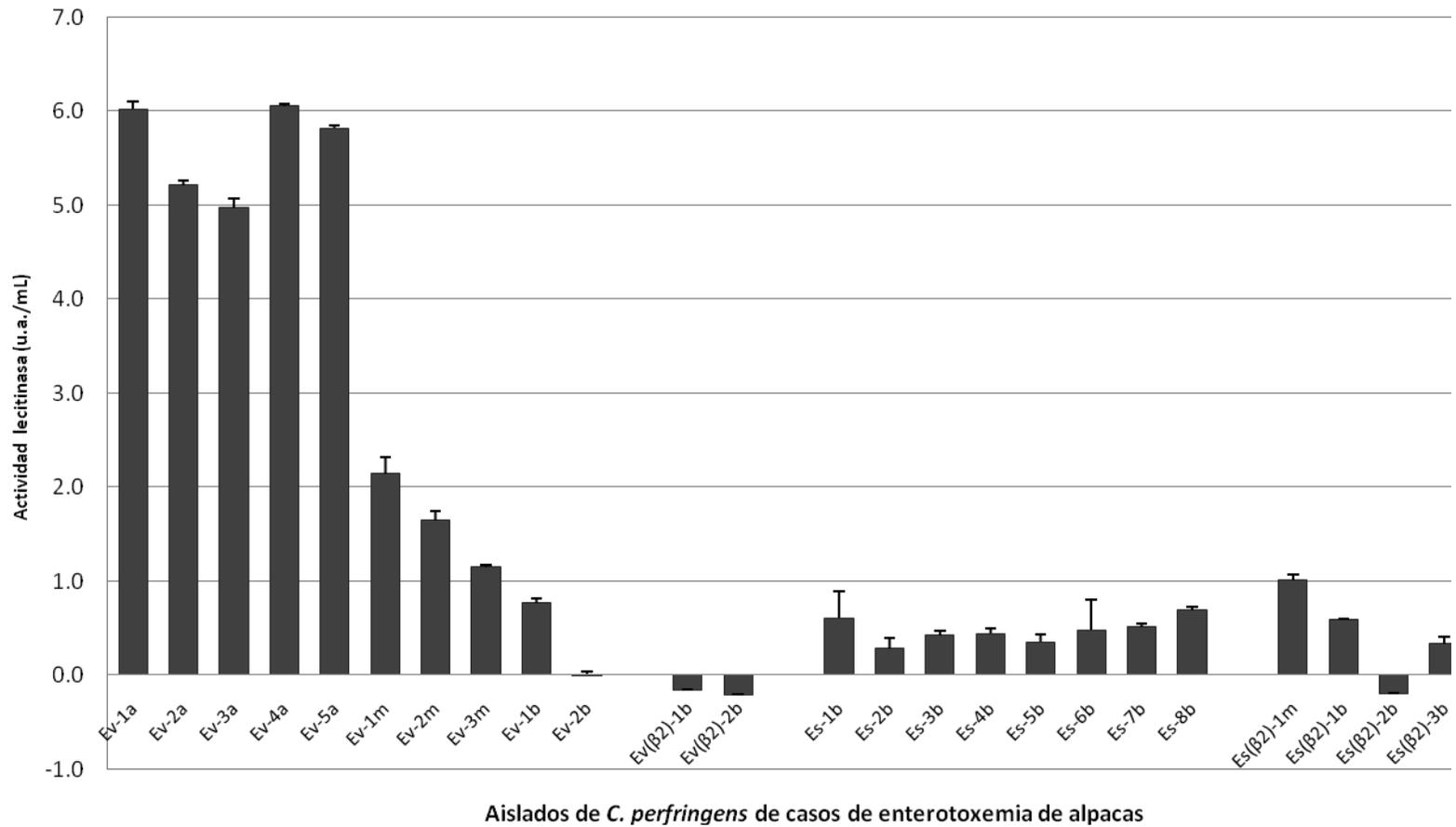


Figura 4.11. Actividad lecitinasa de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas. Cada barra corresponde a la media \pm desviación estándar (SD) de las actividades lecitinasas de cada uno de los aislados expresados en unidades arbitrarias (u.a.) por mL. Los aislados se clasificaron en base a su capacidad de producción de Cp-PLC en baja (< 1 u.a./mL), mediana (1-3 u.a./mL) y alta (> 3 u.a./mL) capacidad.

Cuadro 4.6. Distribución de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas según su capacidad de producción de Cp-PLC y estado bacteriano y subtipo

CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE Cp-PLC ¹	VEGETATIVO ²		TOTAL	ESPORULADO ³		TOTAL	AISLADOS TOTALES
	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻⁴	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁺⁵		<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁺		
	BAJA	2 (20%)		2 (100%)	4 (33.3%)		
MEDIANA	3 (30%)	-	3 (25%)	-	1 (25%)	1 (8.4%)	4 (16.6%)
ALTA	5 (50%)	-	5 (41.6%)	-	-	-	5 (20.8%)

- (1) La capacidad de producción de Cp-PLC por los aislados, clasificación realizada en base a su actividad lecitinasas: baja (< 1 u.a./mL), mediana (1-3 u.a./mL) y alta (> 3 u.a./mL).
- (2) El estado vegetativo fue considerado en base a su característica de crecimiento, morfología de la colonia y celular. A la coloración Gram se evidencian bacilos gruesos y cortos de color azul intenso, sin presencia de esporas.
- (3) El estado esporulado fue considerado en base a su característica de crecimiento, morfología de la colonia y celular. A la coloración Gram se evidencian bacilos delgados y largos de color rosáceo, se pueden evidenciar fácilmente las endosporas dentro de ellas.
- (4) Aislados del genotipo A (poseen el gen *plc* [Cp-PLC]), que poseen el gen *cpb2* (toxina β2) pero carecen del gen *cpe* (CPE).
- (5) Aislados del genotipo A (poseen el gen *plc* [Cp-PLC]), que carecen de los genes *cpb2* (toxina β2) y *cpe* (CPE).

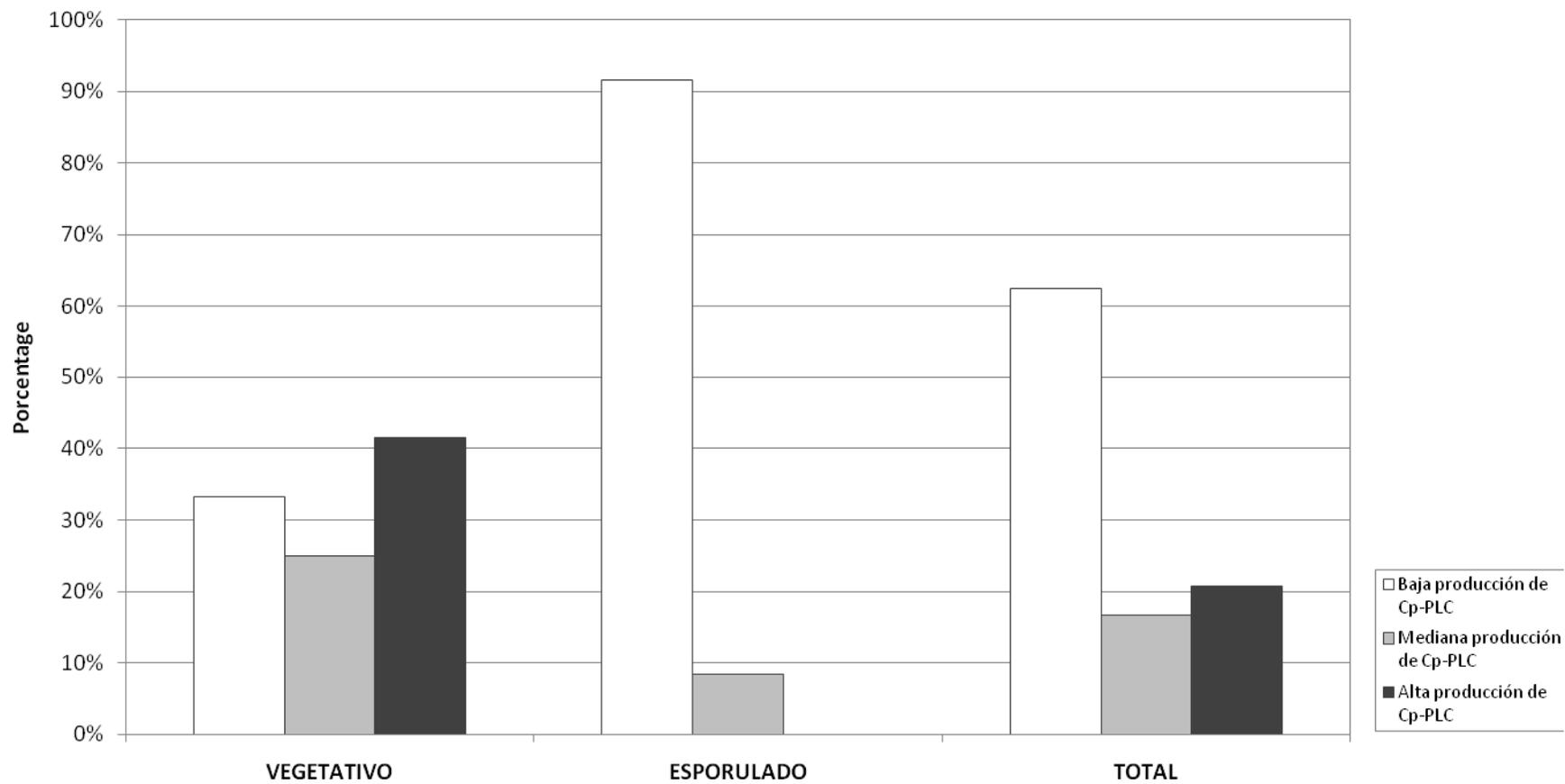


Figura 4.12. Porcentajes de aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas de baja, mediana y alta capacidad de producción de Cp-PLC distribuidos según su estado bacteriano.

Analizando los aislados en relación al subtipo (Cuadro 4.6), el 50% (5/10 aislados), 30% (3/10 aislados) y 20% (2/10 aislados) de aislados con subtipo *cpe⁻cpb2⁻* en estado vegetativo presentan alta, mediana y baja capacidad de producción de Cp-PLC, respectivamente; mientras que en su estado esporulado el 100% (8/8 aislados) presentó una baja capacidad.

Por otro lado, las cepas con subtipo *cpe⁻cpb2⁺* tanto en estado vegetativo como en estado esporulado tuvieron baja capacidad de producción de Cp-PLC con porcentajes de 100% (2/2 aislados) y 75% (3/4 aislados), respectivamente.

4.5.2. PERFILES ELECTROFORÉTICOS DE LOS AISLADOS DE C. perfringens

A partir de los diferentes perfiles electroforéticos SDS-PAGE de los sobrenadantes de los aislados de *C. perfringens* de casos en enterotoxemia (Ver Figuras 4.14, 4.15, 4.16) se pudo establecer un patrón electroforético. El patrón obtenido (Figura 4.13) es producto de la presencia de 16 o más diferentes exoproteínas bacterianas (presentes en cantidades suficientes para ser detectadas), las cuales son evidenciadas como 16 bandas proteicas: banda 1 (>97 KDa), banda 2 (~97 KDa), banda 3 (~85 KDa), banda 4 (~66 KDa), banda 5 (~60 KDa), banda 6 (~57 KDa), banda 7 (~55 KDa), banda 8 (~48 KDa), banda 9 (~46 KDa), banda 10 (~43 KDa), banda 11 (~40 KDa), banda 12 (~37 KDa), banda 13 (~33 KDa), banda 14 (~31 KDa), banda 15 (~29 KDa) y banda 16 (~27 KDa).

Los perfiles electroforéticos fueron evaluados y comparados entre ellos (ver Cuadro 4.7), logrando ser evidenciados adecuadamente en aquellos con concentraciones proteicas superiores a 40 µg/mL.

Cada uno de los aislados reveló un distinto perfil electroforético. Así de acuerdo al patrón electroforético establecido, las bandas 9, 10, 11, 12 y 14 estuvieron presentes en todos los perfiles (en diferente intensidad) tanto en su estado vegetativo como esporulado. Mientras que las bandas 3, 8, 13 y 16 estuvieron presentes sólo en los perfiles en estado vegetativo.



Figura 4.13. Patrón electroforético SDS-PAGE de los sobrenadante de *C. perfringens* aislados de casos de enterotoxemia en alpacas. El patrón esta constituido por 16 bandas proteica de diferentes pesos moleculares: banda 1 (>97 KDa), banda 2 (~97 KDa), banda 3 (~85 KDa), banda 4 (~66 KDa), banda 5 (~60 KDa), banda 6 (~57 KDa), banda 7 (~55 KDa), banda 8 (~48 KDa), banda 9 (~46 KDa), banda 10 (~43 KDa), banda 11 (~40 KDa), banda 12 (~37 KDa), banda 13 (~33 KDa), banda 14 (~31 KDa), banda 15 (~29 KDa) y banda16 (~27 KDa). MPM; Marcador de peso molecular.

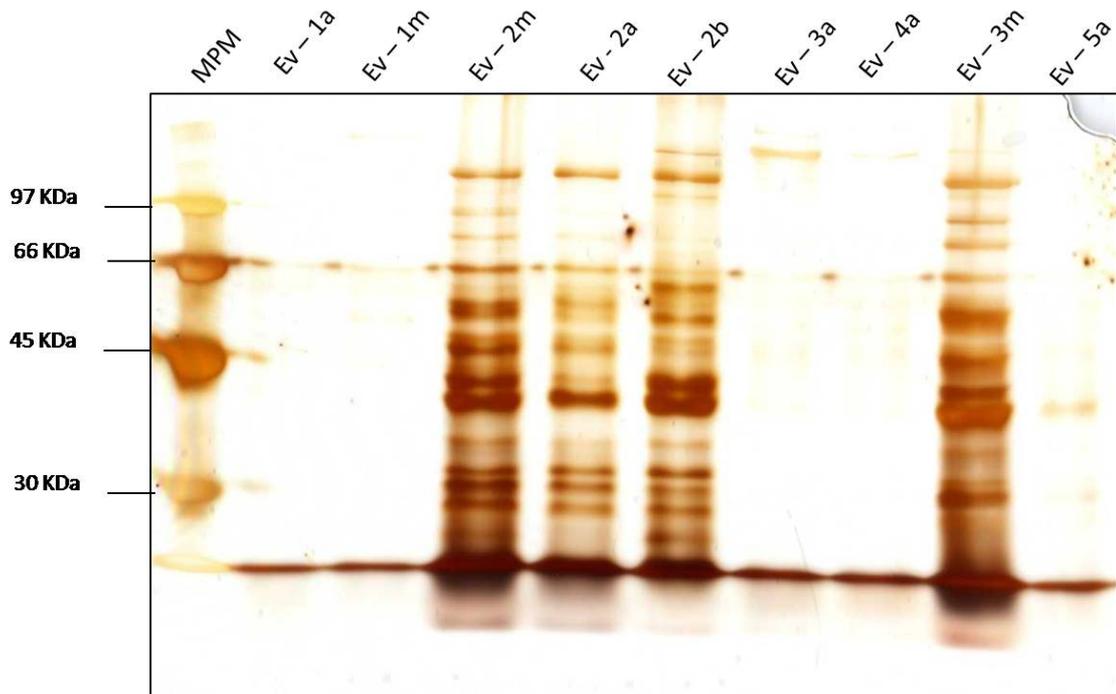


Figura 4.14. Perfiles electroforéticos SDS-PAGE de los sobrenadantes de aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas en estado vegetativo genotipo A subtipo *cpe⁻ cpb2⁻*. MPM, Marcador de peso molecular.

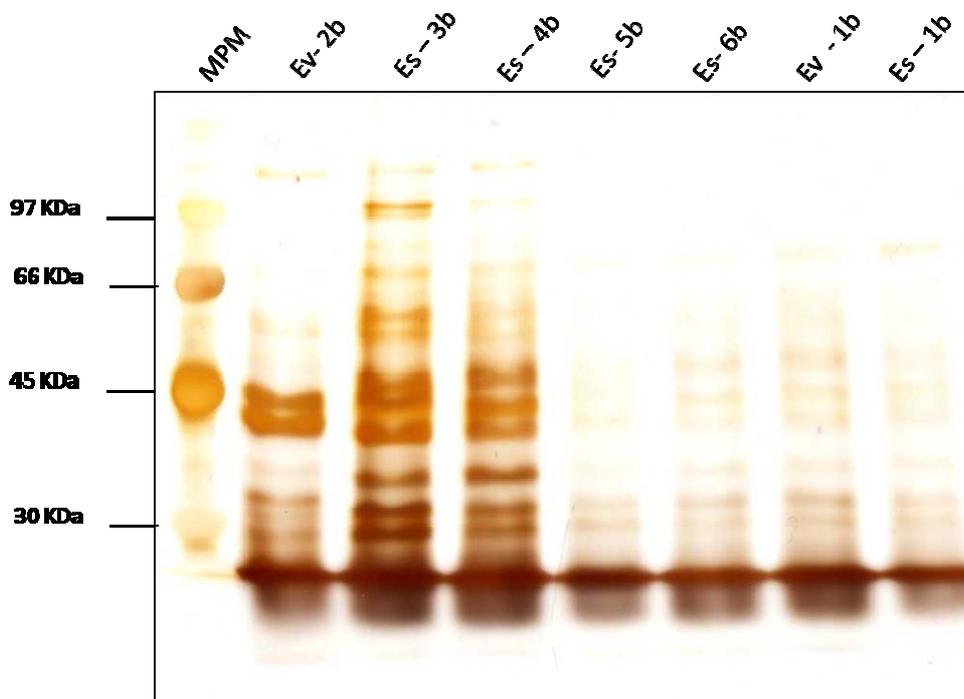


Figura 4.15. Perfiles electroforéticos SDS-PAGE de los sobrenadantes de aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas en estado esporulado genotipo A subtipo *cpe⁻ cpb2⁻*. MPM, Marcador de peso molecular.

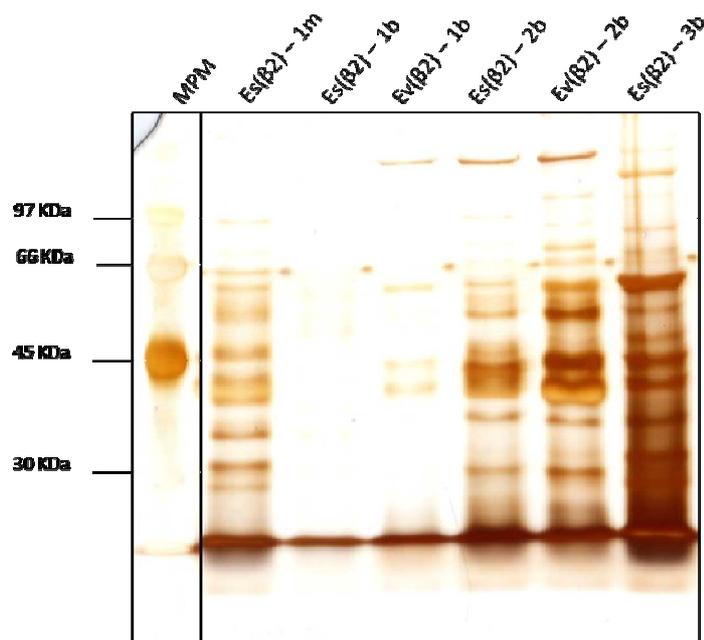


Figura 4.16. Perfiles electroforéticos SDS-PAGE de los sobrenadantes de aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas en estado vegetativo y esporulado genotipo A subtipo *cpe⁻cpb2⁺*. MPM, Marcador de peso molecular.

La presencia de la Cp-PLC no logró ser establecida puesto que los aislados con alta capacidad de producción de Cp-PLC no se evidenciaron bandas cercanas a 43 KDa correspondientes a Cp-PLC (debido a su baja concentración proteica) y mientras que si estuvieron presentes en aislados de baja capacidad de producción de Cp-PLC (banda 10 y 11). Lógicamente ninguna de estas bandas correspondió a la Cp-PLC.

4.5.3. ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE LOS AISLADOS DE *C. perfringens*

La actividad hemolítica de los diferentes aislados fue variable (ver Anexo 3 y Figura 4.17). Así, los aislados en estado vegetativo tuvieron una actividad hemolítica promedio (26.25 ± 29.1 u.a.h./mL) superior a la obtenida en los aislados esporulados (1.2 ± 1.64 u.a.h./mL) (Cuadro 4.8 y Figura 4.18)

Cuadro 4.7. Patrón electroforético SDS-PAGE de aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas.

AISLADO	Concentración proteica (µg/mL) ¹	BANDAS ELECTROFORETICAS															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
		> 97 KDa	~ 97 KDa	~ 85 KDa	~ 66 KDa	~ 60 KDa	~ 57 KDa	~ 55 KDa	~ 48 KDa	~ 46 KDa	~ 43 KDa	~ 40 KDa	~ 37 KDa	~ 33 KDa	~ 31 KDa	~ 29 KDa	~ 27 KDa
Ev-1a	15.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ev-2a	93.8	N	-	D	N	D	N	D	D	N	D	F	D	N	N	N	-
Ev-3a	17.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ev-4a	3.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ev-5a	31.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	D	-	-
Ev-1m	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ev-2m	222.9	N	D	D	N	D	N	N	N	N	F	F	N	N	N	N	N
Ev-3m	88.5	N	N	N	N	-	N	N	N	N	N	F	N	N	F	-	N
Ev-1b	33.6	NO REALIZADO															
Ev-2b	58.4	N	-	-	D	N	D	N	D	D	F	F	N	N	N	N	N
Ev(β2)-1b	14.2	-	-	-	-	D	-	-	-	-	D	D	-	-	-	-	-
Ev(β2)-2b	56.6	N	N	N	N	F	D	F	-	-	F	F	N	D	N	-	N
Es-1b	23.0	-	-	-	D	-	-	-	-	D	D	D	D	-	D	N	-
Es-2b	15.9	NO REALIZADO															
Es-3b	116.8	N	N	N	N	-	N	N	-	F	F	F	F	-	F	F	-
Es-4b	38.9	N	N	-	N	-	N	N	-	F	F	F	F	-	N	N	-
Es-5b	56.6	-	-	-	-	-	-	-	-	D	D	D	D	-	D	D	-
Es-6b	31.8	-	-	-	-	-	-	-	-	D	D	D	D	-	D	D	-
Es-7b	3.5	NO REALIZADO															
Es-8b	44.2	NO REALIZADO															
Es(β2)-1m	61.9	-	D	-	N	N	D	D	-	N	N	N	N	-	N	N	-
Es(β2)-1b	19.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Es(β2)-2b	44.2	-	N	-	D	N	D	N	-	F	F	N	N	-	N	N	-
Es(β2)-3b	123.8	D	D	D	D	F	-	N	-	N	F	F	N	N	N	N	N

(1) La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford según la metodología descrita en el presente estudio. D = Banda de intensidad débil, N = Banda de intensidad normal, F = Banda de intensidad fuerte, (-) = No se observó ninguna banda.

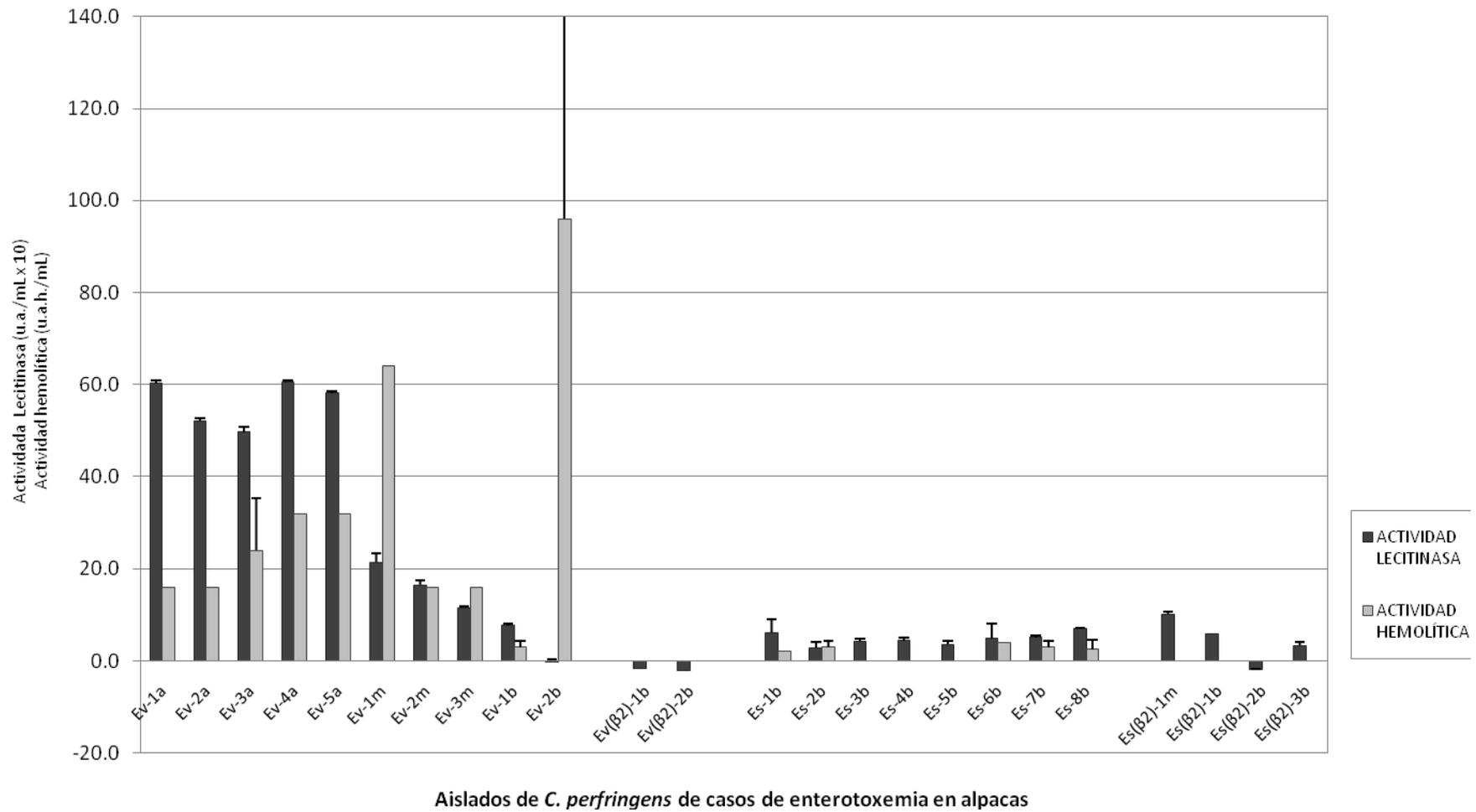


Figura 4.17. Actividades hemolítica y lecitinasa de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas.

Cuadro 4.8. Actividades hemolíticas¹ de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas analizados según capacidad de producción de Cp-PLC y estado bacteriano y subtipo.

CAPACIDAD DE PRODUCCION DE Cp-PLC ²	VEGETATIVO ³			ESPORULADO ⁴			TOTAL
	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻⁵	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁺⁶	TOTAL	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁺	TOTAL	
ALTA	24 ± 8.4	-	24 ± 8.4	-	-	-	24 ± 8.4
MEDIANA	32 ± 24.8	-	32 ± 24.8	-	0 ± 00	0 ± 0	24 ± 25.7
BAJA	49.5 ± 59.7	0 ± 0	24.75 ± 47.2	1.8 ± 1.7	0 ± 0	1.31 ± 1.7	7.6 ± 25.5
TOTAL	31.5 ± 29.3	0 ± 0	26.25 ± 29.1	1.8 ± 1.7	0 ± 0	1.2 ± 1.64	13.7 ± 24.0

(1) La actividad hemolítica de los sobrenadantes bacterianos fue determinada según la metodología descrita por Titball *et al.* (1989) y expresada en unidades arbitrarias hemolíticas (u.a.h.) por mL. Se calculó en forma duplicada para cada aislado, obteniéndose la media y la desviación estándar de las medias (SD).

(2) La capacidad de producción de Cp-PLC por los aislados, clasificación realizada en base a su actividad lecitinasas: baja (< 1 u.a./mL), mediana (1-3 u.a./mL) y alta (> 3 u.a./mL).

(3) El estado vegetativo fue considerado en base a su característica de crecimiento, morfología de la colonia y celular. A la coloración Gram se evidencian bacilos gruesos y cortos de color azul intenso, sin presencia de esporas.

(4) El estado esporulado fue considerado en base a su característica de crecimiento, morfología de la colonia y celular. A la coloración Gram se evidencian bacilos delgados y largos de color rosáceo, se pueden evidenciar fácilmente las endosporas dentro de ellas.

(5) Aislados del genotipo A (poseen el gen *plc* [Cp-PLC]), que poseen el gen *cpb2* (toxina β2) pero carecen del gen *cpe* (CPE).

(6) Aislados del genotipo A (poseen el gen *plc* [Cp-PLC]), que carecen de los genes *cpb2* (toxina β2) y *cpe* (CPE).

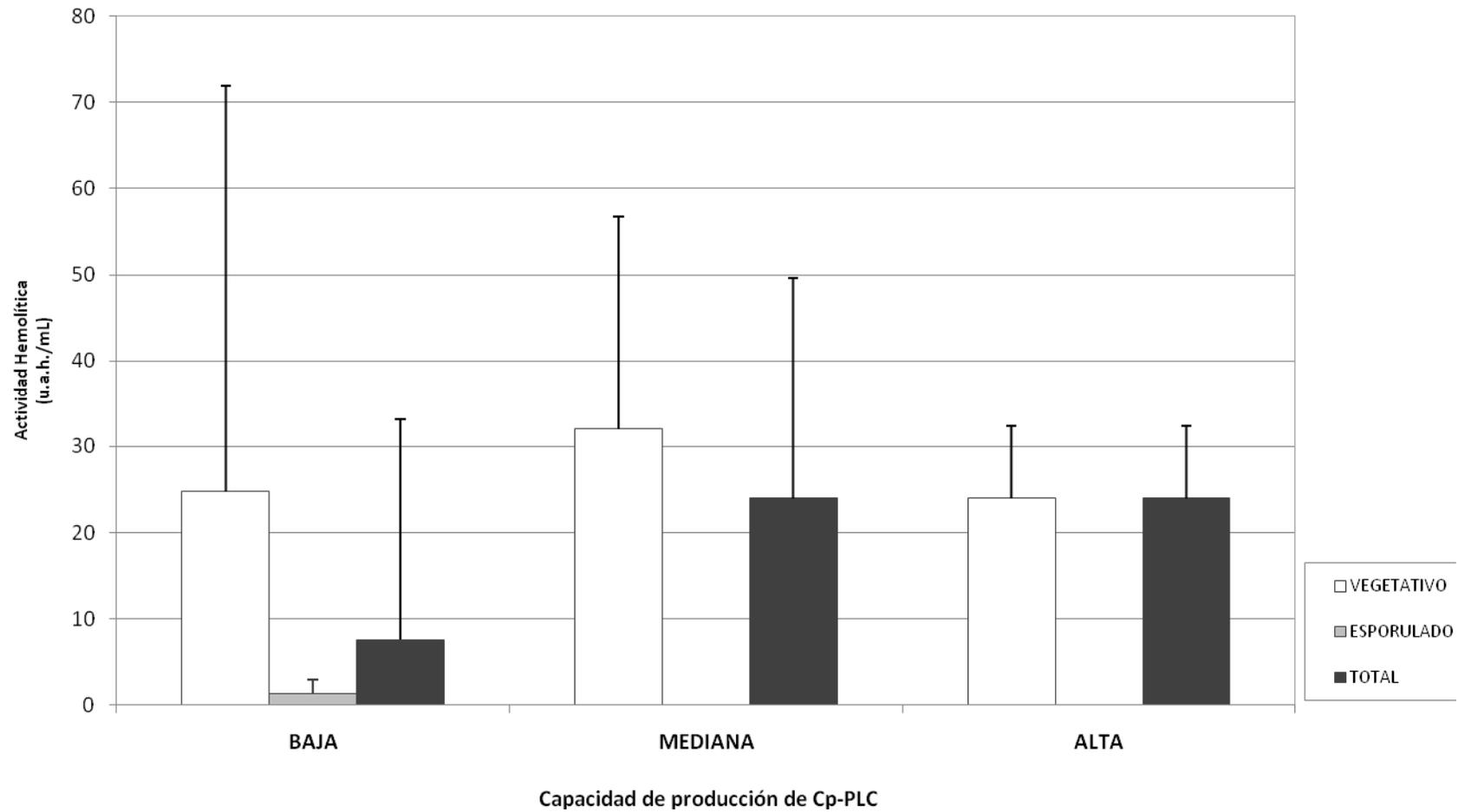


Figura 4.18. Actividad hemolítica de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas relacionados según su capacidad de producción de Cp-PLC y su estado bacteriano. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar (SD) de la actividad hemolítica de los sobrenadantes

Analizando los aislados en estado vegetativo no se observa una predominancia de la actividad hemolítica en los grupos de alta capacidad de producción de Cp-PLC, obteniéndose valores de actividades hemolíticas de 24 ± 8.4 u.a.h./mL, 32 ± 24.8 u.a.h./mL y 24.75 ± 47.2 para aislados de alta, mediana y baja capacidad de producción de Cp-PLC, respectivamente (Figura 4.18). Siendo por el contrario, los aislados de baja capacidad de producción de Cp-PLC aislados subtipo *cpe⁻cpb2⁻* los que poseyeron la mayor actividad hemolítica (49.5 ± 59.7 u.a.h./mL) (Cuadro 4.8). Al parecer, otras hemolisinas diferentes a la Cp-PLC serían las responsables de estos resultados.

Por otro lado, la presencia del gen *cpb2* podría estar asociada a la ausencia de expresión de Cp-PLC, puesto que aislados con subtipos *cpe⁻cpb2⁺* tanto en su estado esporulado como vegetativo no evidenciaron actividad hemolítica alguna (0 u.a.h./mL) mientras que el subtipo *cpe⁻cpb2⁻* sí registró actividades de 31.5 ± 29.26 u.a.h./mL y 1.8 ± 1.72 u.a.h./mL para el estado vegetativo y esporulado, respectivamente (Cuadro 4.8).

4.5.4 ACTIVIDAD PERFRINGOLISINA DE LOS AISLADOS DE *C. perfringens*

La determinación de la actividad perfringolisina de los diferentes aislados (Anexo 4 y Figura 4.19) fue realizada para evaluar la expresión de la perfringolisina, la cual pueda explicar las diferencias de actividad hemolítica de los aislados descritos en el capítulo anterior.

Como fue esperado los aislados en estado vegetativo tuvieron una actividad perfringolisina promedio ($> 96 \pm 56.32$ u.a.h./mL [promedio obtenido asumiendo valores de >128 u.a.h./mL como 128 u.a.h./mL]) muy superior a la encontrada en los aislados en estado esporulado (0.92 ± 0.97 u.a.h./mL) (ver Cuadro 4.9 y Figura 4.20).

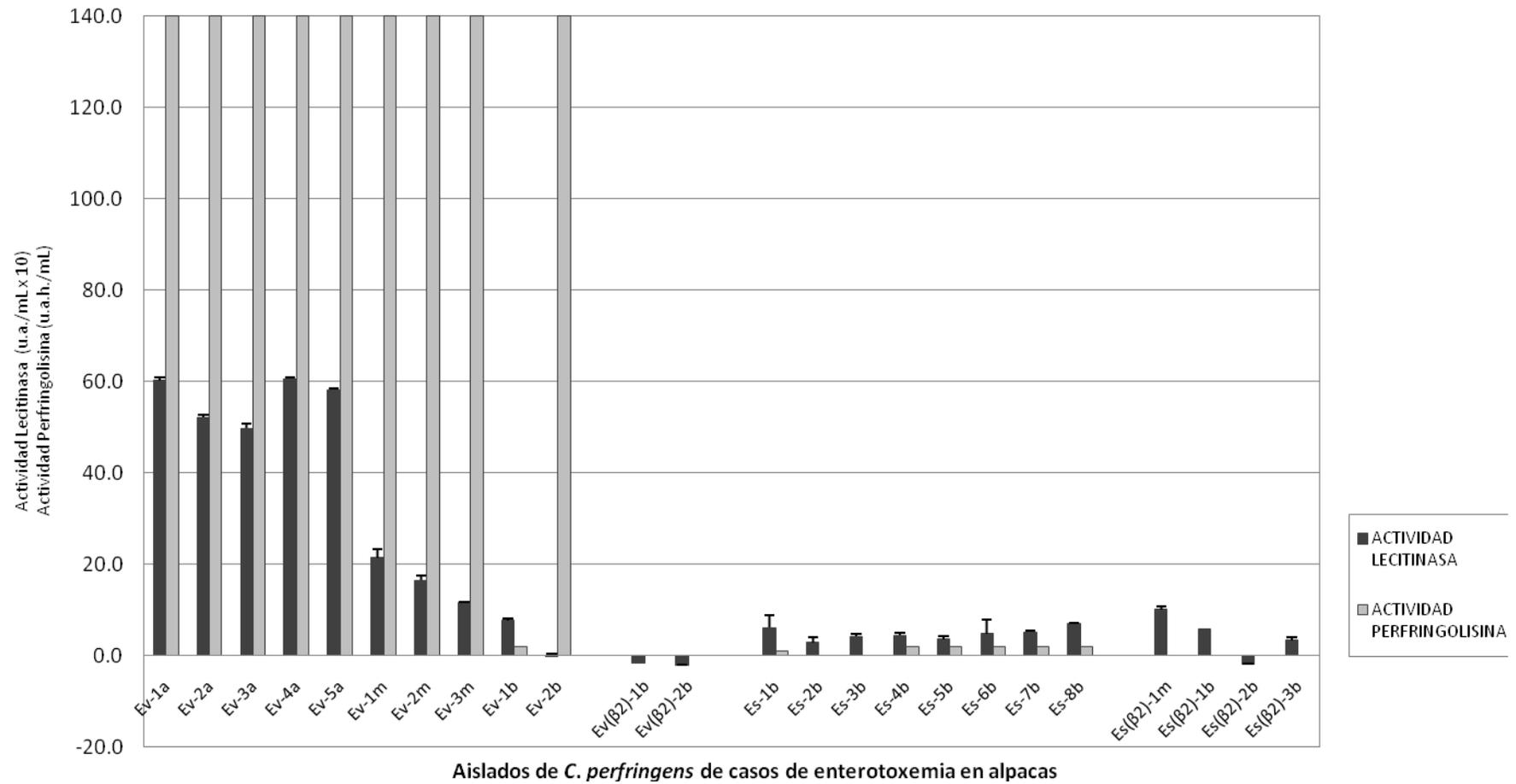


Figura 4.19: Actividades perfringolisina y lecitinasa de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas.

Cuadro 4.9: Actividades perfringolisina¹ de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas analizados según capacidad de producción de Cp-PLC y estado bacteriano y subtipo.

CAPACIDAD DE PRODUCCION DE Cp-PLC ²	VEGETATIVO ³			ESPORULADO ⁴			TOTAL
	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻⁵	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁺⁶	TOTAL	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁺	TOTAL	
ALTA	>128 ± 0	-	>128 ± 0	-	-	0 ± 0	>128 ± 0
MEDIANA	>128 ± 0	-	>128 ± 0	-	0 ± 0	0 ± 0	96 ± 59.25
BAJA	65 ± 72.4	0 ± 0	32.5 ± 58.95	1.38 ± 0.88	0 ± 0	1 ± 0.98	9.4 ± 32.25
TOTAL	>115.4 ± 38.78	0 ± 0	>96 ± 56.32	1.38 ± 0.88	0 ± 0	0.92 ± 0.97	48.54 ± 62.2

- (1) La actividad perfringolisina de los sobrenadantes bacterianos fue determinada según la metodología descrita por Fisher *et al.* (2006) y expresada en unidades arbitrarias hemolíticas (u.a.h.) por mL. Se calculó en forma duplicada para cada aislado, obteniéndose la media y la desviación estándar de las medias (SD). Valores obtenidos asumiendo el valor >128 u.a.h./mL como 128 u.a.h./mL.
- (2) La capacidad de producción de Cp-PLC por los aislados, clasificación realizada en base a su actividad lecitinasas: baja (< 1 u.a./mL), mediana (1-3 u.a./mL) y alta (> 3 u.a./mL).
- (3) El estado vegetativo fue considerado en base a su característica de crecimiento, morfología de la colonia y celular. A la coloración Gram se evidencian bacilos gruesos y cortos de color azul intenso, sin presencia de esporas.
- (4) El estado esporulado fue considerado en base a su característica de crecimiento, morfología de la colonia y celular. A la coloración Gram se evidencian bacilos delgados y largos de color rosáceo, se pueden evidenciar fácilmente las endosporas dentro de ellas.
- (5) Aislados del genotipo A (poseen el gen *plc* [Cp-PLC]), que poseen el gen *cpb2* (toxina β2) pero carecen del gen *cpe* (CPE).
- (6) Aislados del genotipo A (poseen el gen *plc* [Cp-PLC]), que carecen de los genes *cpb2* (toxina β2) y *cpe* (CPE).

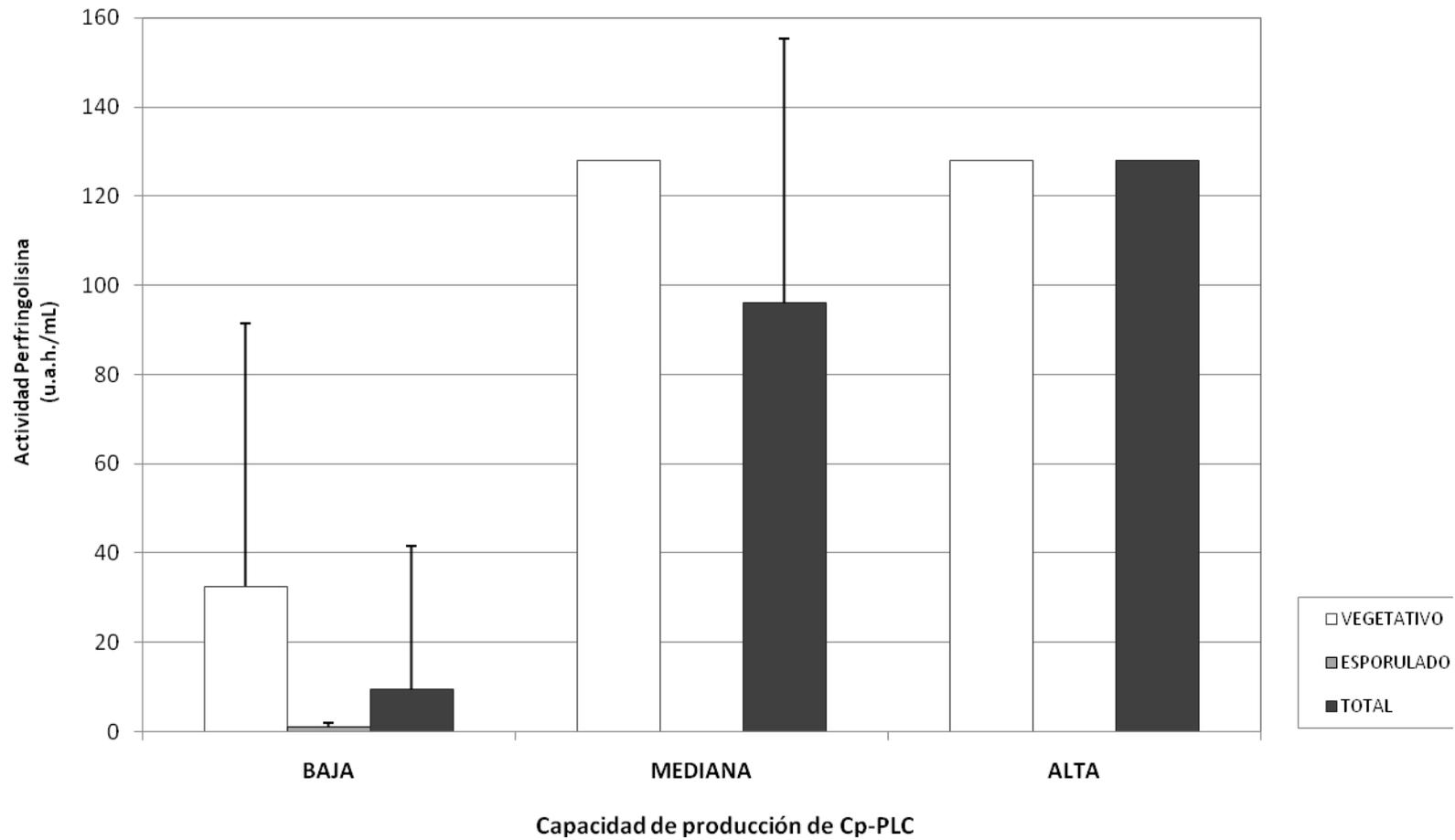


Figura 4.20. Actividad perfringolisina de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas relacionados según su capacidad de producción de Cp-PLC y su estado bacteriano. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar (SD) de la actividad perfringolisina de los sobrenadantes

El análisis de los aislados según estado bacteriano (Figura 4.20 y Cuadro 4.9) revela una marcada producción de la perfringolisina por los aislados en estado vegetativo con promedios de actividad de $>128 \pm 0$ u.a.h./mL, $>128 \pm 0$ u.a.h./mL y 32 ± 58.95 u.a.h./mL para aislados de alta, mediana y baja capacidad de producción de Cp-PLC, respectivamente; mientras que los aislados en estado esporulado mostraron casi una ausente producción de perfringolisina (0.95 ± 0.97 u.a.h./mL). Estos resultados evidencian una clara relación entre los niveles de producción de perfringolisina y la Cp-PLC.

Interesantemente los aislados con subtipos cpe^-cpb2^+ no evidenciaron la producción de perfringolisina (0 u.a.h./mL) ni en su estado vegetativo ni esporulado, mientras que el subtipo cpe^-cpb2^- si registro actividades de 115.4 ± 38.8 u.a.h./mL y 1.4 ± 0.9 u.a.h./mL para los estado vegetativo y esporulado, respectivamente (Cuadro 4.9). Al parecer, la presencia del gen *cpb2* también podría estar asociada a la ausencia de expresión de la perfringolisina como se vio anteriormente con la Cp-PLC.

Analizando los resultados del presente capítulo y del capítulo anterior (Figura 4.21), observamos que la actividad perfringolisina de los aislados fue decreciendo conforme fue reduciéndose su capacidad de producción de Cp-PLC; mientras que la actividad hemolítica de los aislados fue variable encontrando curiosamente mayores actividades en los aislados de baja y mediana capacidad de producción de Cp-PLC. La actividad hemolítica determinada en el presente estudio fue diseñada para la detección específica de Cp-PLC, puesto que emplea eritrocitos de ovino cuya composición de membrana celular es rica en fosfolípidos blanco y, además, incluye una etapa de incubación hot-cold específica para la toxina. Al parecer, estos aislados (mediana y baja capacidad de producción de Cp-PLC) estarían expresando otras toxinas con actividad hemolítica similar a Cp-PLC.

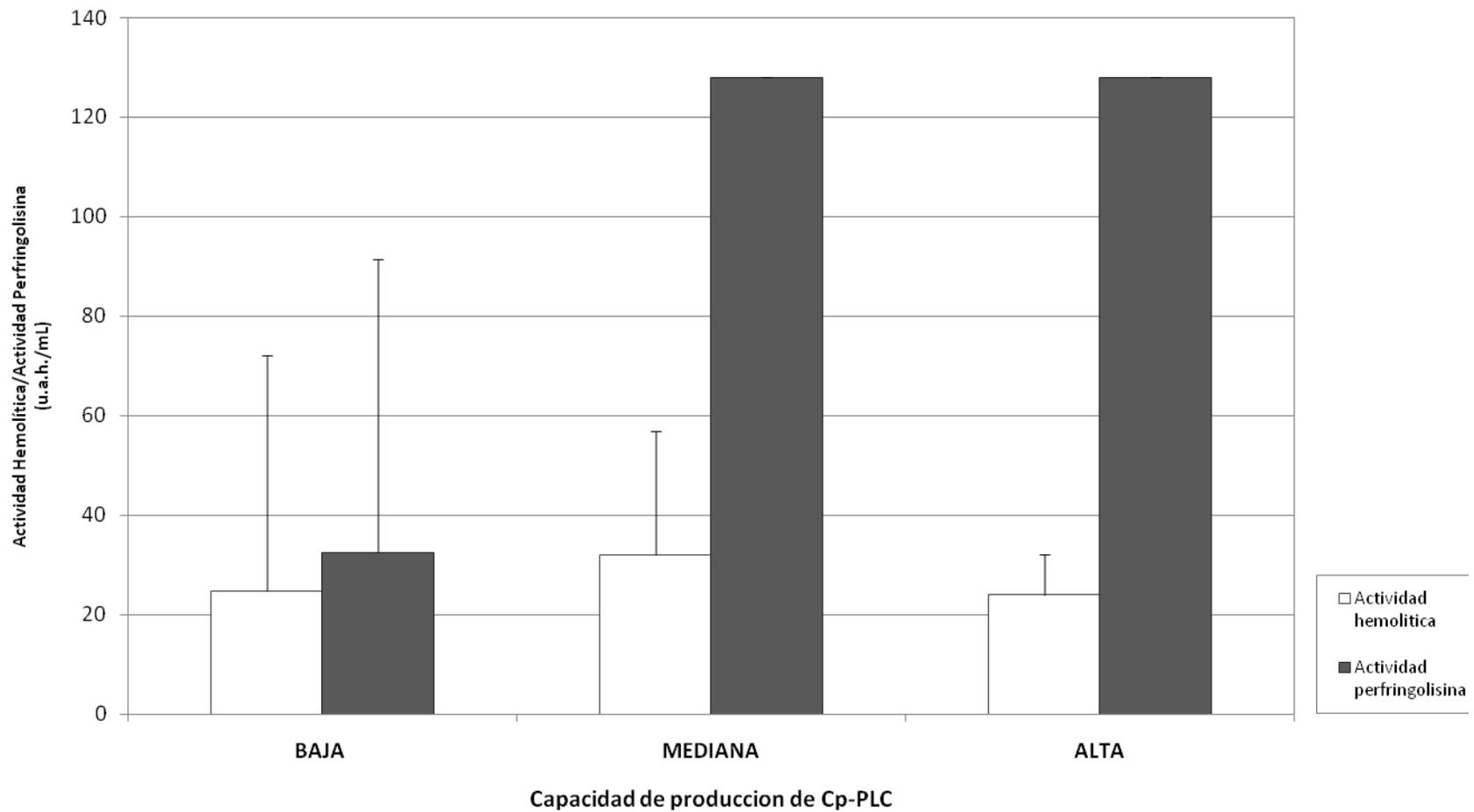


Figura 4.21. Actividades hemolítica y perfringolisina de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas en estado vegetativo relacionados a su capacidad de producción de Cp-PLC. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar (SD) de la actividad hemolítica ó perfringolisina de los aislados.

4.5.5 ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS AISLADOS DE *C. perfringens*

La actividad citotóxica de los aislados en línea de células HEp-2 fue evidenciada por el despoblamiento celular y alteraciones en su morfología (Figura 4.22). Esta actividad fue variable en los diferentes aislados y estuvo relacionada al estado bacteriano, subtipo y capacidad de producción de Cp-PLC (ver Anexo 5 y Figura 4.23). Así, el 75% de aislados en estado vegetativo presentó actividad citotóxica contrastando con el 0.1% presentado por los aislados en estado esporulado (Cuadro 4.10 y Figura 4.24).

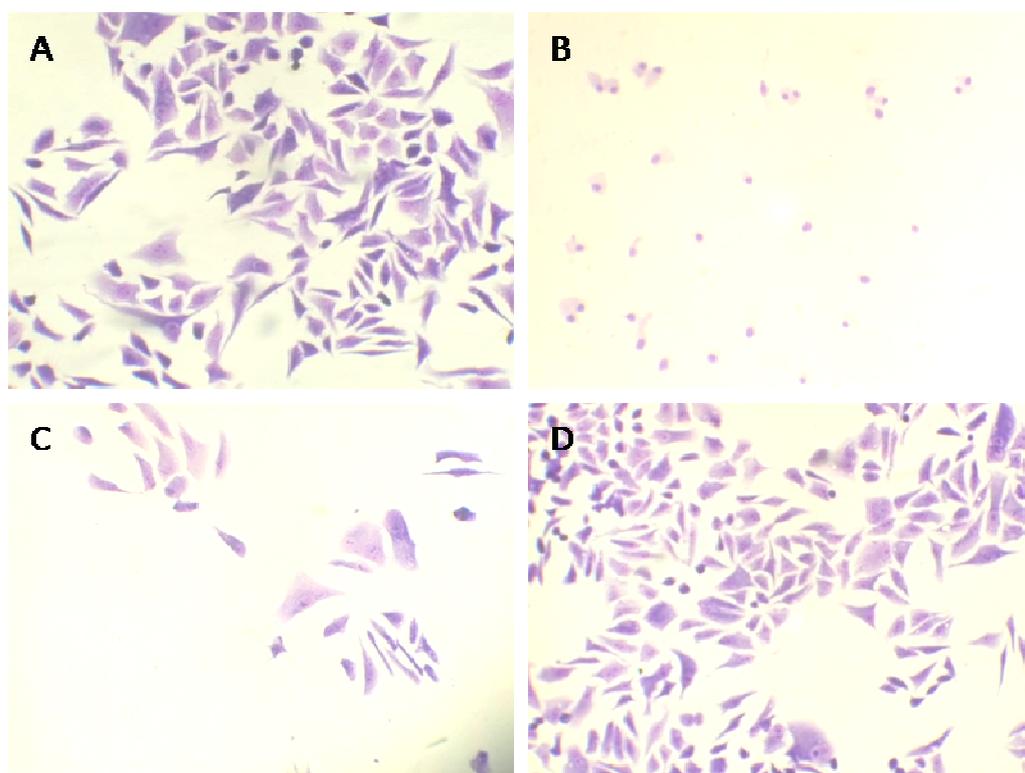


Figura 4.22. Actividad citotóxica en línea células HEp-2 por los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas. (A) Células no desafiadas con sobrenadante de aislado bacteriano; (B y C) células desafiadas con sobrenadantes de aislado bacteriano con actividad citotóxica, nótese el despoblamiento celular y alteración de la morfología celular; (D) células desafiadas con sobrenadante de aislado bacteriano sin actividad citotóxica.

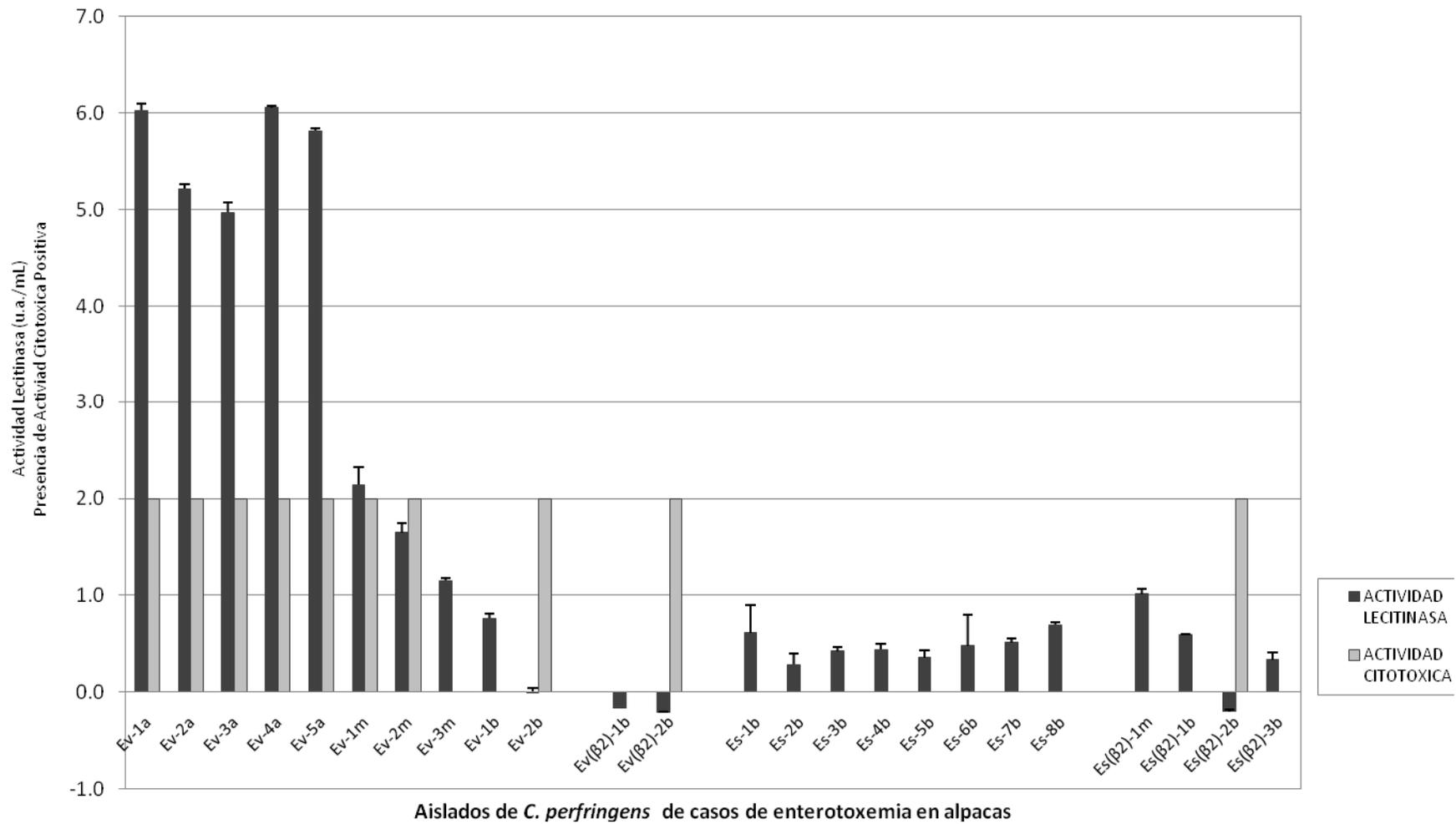


Figura 4.23. Actividades citotóxica y lecitinasa de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas

Cuadro 4.10. Porcentaje de actividad citotóxica¹ de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas según su capacidad de producción de Cp-PLC y estado bacteriano y subtipo.

CAPACIDAD DE PRODUCCION DE Cp-PLC ²	VEGETATIVO ³			ESPORULADO ⁴			TOTAL
	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻⁵	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁺⁶	TOTAL	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁺	TOTAL	
ALTA	100% (5/5)	0% (0/0)	100% (5/5)	0% (0/0)	0% (0/0)	0% (0/0)	100% (5/5)
MEDIANA	66.7% (2/3)	0% (0/0)	66.7% (2/3)	0% (0/0)	0% (0/1)	0% (0/1)	50% (2/4)
BAJA	50% (1/2)	50% (1/2)	50% (2/4)	0% (0/8)	33.3% (1/3)	0.09% (1/11)	0.2% (3/15)
TOTAL	80% (8/10)	50% (1/2)	75% (9/12)	0% (0/8)	25% (1/4)	0.08% (1/12)	41.7% (10/24)

- (1) La actividad citotóxica de los sobrenadantes bacterianos fue determinada según la metodología descrita en el presente estudio en la línea celular HEp-2. El desdoblamiento celular (muerte celular) fue considerado como una reacción positiva a citotoxicidad.
- (2) La capacidad de producción de Cp-PLC por los aislados, clasificación realizada en base a su actividad lecitinasas: baja (< 1 u.a./mL), mediana (1-3 u.a./mL) y alta (> 3 u.a./mL).
- (3) El estado vegetativo fue considerado en base a su característica de crecimiento, morfología de la colonia y celular. A la coloración Gram se evidencian bacilos gruesos y cortos de color azul intenso, sin presencia de esporas.
- (4) El estado esporulado fue considerado en base a su característica de crecimiento, morfología de la colonia y celular. A la coloración Gram se evidencian bacilos delgados y largos de color rosáceo, se pueden evidenciar fácilmente las endosporas dentro de ellas.
- (5) Aislados del genotipo A (poseen el gen *plc* [Cp-PLC]), que poseen el gen *cpb2* (toxina β2) pero carecen del gen *cpe* (CPE).
- (6) Aislados del genotipo A (poseen el gen *plc* [Cp-PLC]), que carecen de los genes *cpb2* (toxina β2) y *cpe* (CPE).

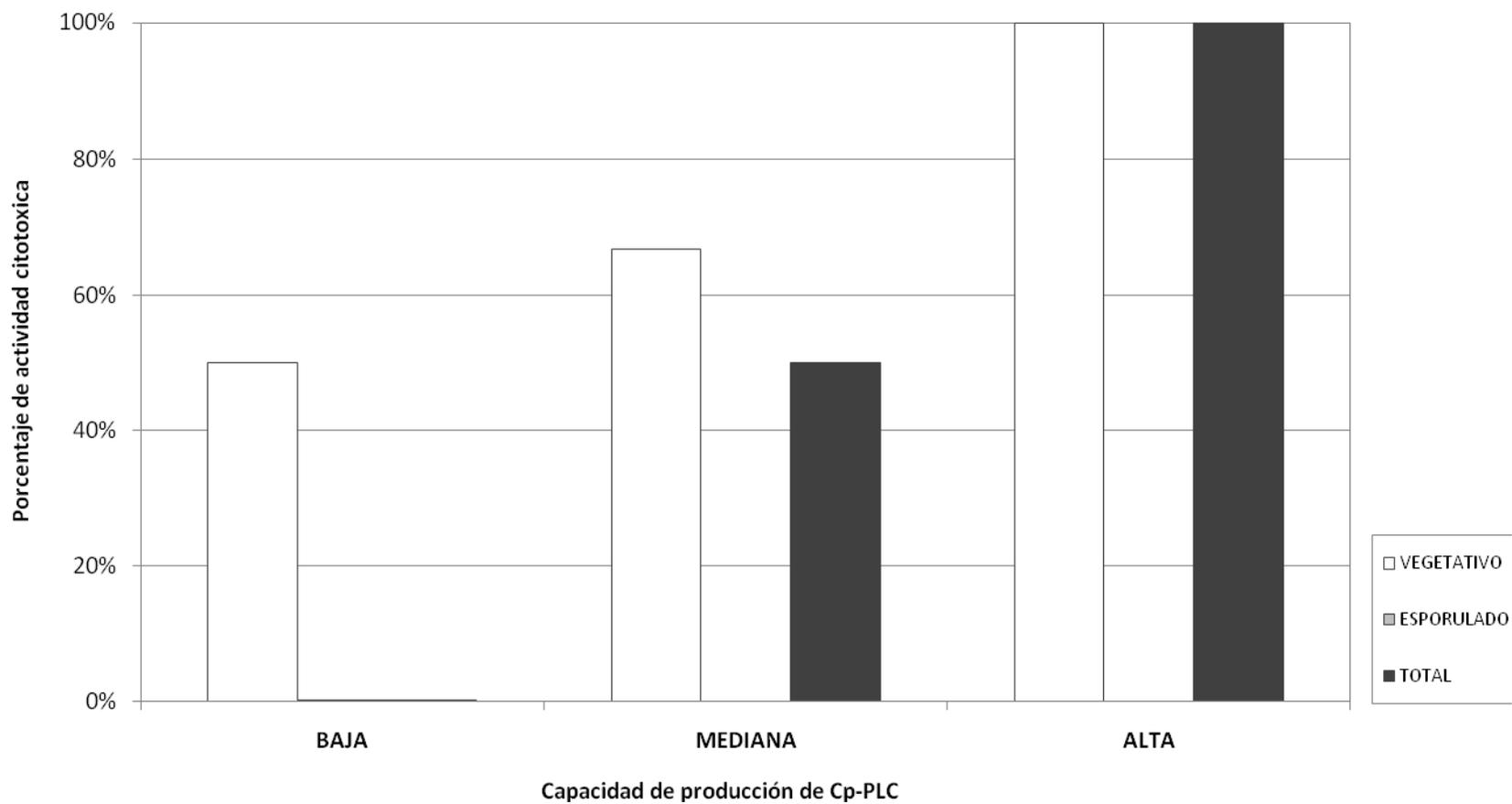


Figura 4.24. Porcentaje de actividad citotóxica de aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas distribuidos según su capacidad de producción de Cp-PLC y su estado bacteriano. .

El análisis de los aislados en estado vegetativo (Cuadro 4.10 y Figura 4.24) muestra que el 100%, 66.7% y 50% de los aislados de alta, mediana y baja capacidad de producción de Cp-PLC, respectivamente, poseen actividad citotóxica, mientras los aislados en estado esporulado (96.7% de aislados con baja capacidad de producción de Cp-PLC) muestran poco o nada de actividad citotóxica. Notándose que la actividad citotóxica de los aislados va reduciéndose progresivamente conforme va decreciendo la capacidad de producción de Cp-PLC.

Analizando los aislados según subtipos (Cuadro 4. 10), el 44.4% (8/18) de aislados subtipo cpe^-cpb2^- y el 33.3% (2/6) de aislados subtipo cpe^-cpb2^+ evidenciaron actividad citotóxica: Interesantemente, el 50% (2/4) de aislados en estado vegetativo con baja capacidad de producción de Cp-PLC poseyeron actividad citotóxica y de estos el 50% (1/2) correspondieron al subtipo cpe^-cpb2^+ . Asimismo, el 33.3% (1/3) de aislados subtipo cpe^-cpb2^+ en estado esporulado con baja capacidad de producción de Cp-PLC también poseyeron actividad citotóxica. Probablemente, en estos aislados la toxina $\beta 2$ estaría siendo expresada.

4.5.6. ACTIVIDAD DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA DE LOS AISLADOS DE *C. perfringens*

Para el ensayo se empleó sobrenadantes de aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas de alta (Ev-1a), mediana (Ev-2m) y baja (Ev-1b) capacidad de producción de Cp-PLC. En ninguno de ellos se encontró capacidad de agregación plaquetaria (Figura 4.25). Al parecer los niveles de Cp-PLC no fueron los suficientes para desencadenar esta reacción.

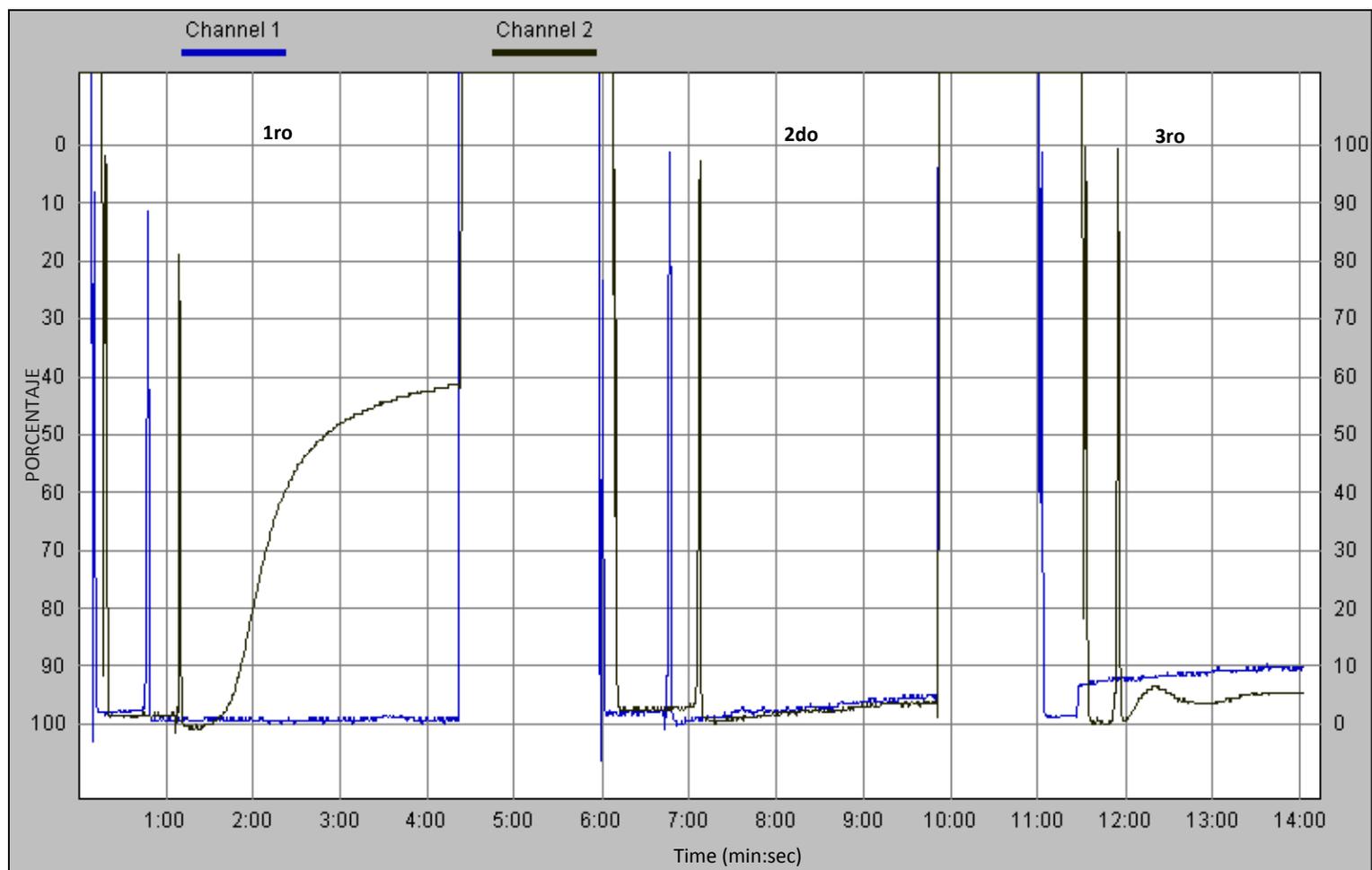


Figura 4.25. Actividad de agregación plaquetaria de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas con diferentes capacidad de producción de Cp-PLC. 1er Canal azul, control negativo (PBS); 1er Canal negro, Control positivo (ADP); 2do Canal azul, Medio BHI; 2do Canal negro, sobrenadante de aislado de baja capacidad de producción de Cp-PLC (Ev-1b); 3er Canal azul, sobrenadante de aislado de mediana capacidad de producción de Cp-PLC (Ev-2m); 3er Canal negro, sobrenadante de aislado de alta capacidad de producción de Cp-PLC (Ev-1a).

4.5.7. ACTIVIDAD LETAL DE AISLADOS DE *C. perfringens*

Ninguno de los aislados evaluados mostró tener actividad letal en ratones (Anexo 6). No obstante, los animales inoculados con aislados en estado vegetativo con alta capacidad de producción de Cp-PLC evidenciaron moderada depresión y disnea respiratoria (no suficientes como para ser considerados como actividad letal). El resto de animales no presentaron signo alguno.

4.5.8. ACTIVIDAD ENTEROTOXICA DE LOS AISLADOS DE *C. perfringens*

La capacidad de acumulación de fluido en los diferentes aislados fue muy variable (ver Anexo 7 y Figura 4.26). Así, aislados en estado vegetativo tuvieron una capacidad de acumulación de fluido promedio (0.18 ± 0.13 mL/cm) similar a la obtenida en aislados esporulados (0.15 ± 0.13 mL/cm) (Cuadro 4.11)

Analizando los aislados en estado vegetativo según la capacidad de producción de Cp-PLC notamos que no existe una predominancia de la capacidad de acumulación de fluido intestinal en los aislados de alta capacidad de producción de Cp-PLC, encontrándose valores de 0.16 ± 0.09 mL/cm, 0.22 ± 0.2 mL/cm y 0.13 ± 0.12 mL/cm para los aislados de alta, mediana y baja capacidad de producción de Cp-PLC, respectivamente (Figura 4.27 y Cuadro 4.11). Por el contrario, los aislados en estado vegetativo de mediana capacidad de producción de Cp-PLC fueron los que mostraron mayor capacidad de acumulación de fluidos (0.29 ± 0.13 mL/cm).

Analizando los aislados según subtipos (Cuadro 4.11), el subtipo *cpe⁻cpb2⁻* mostro valores de 0.21 ± 0.12 mL/cm y 0.20 ± 0.08 mL/cm en su estado vegetativo y esporulado, respectivamente, mientras que los aislados con subtipo *cpe⁻cpb2⁺* no evidenciaron capacidad de acumulación de fluido intestinal. Interesantemente, tanto los aislados en estado vegetativo como esporulado con baja capacidad de producción de Cp-PLC presentaron capacidad de acumulación de fluido intestinal con valores promedios de 0.10 ± 0.12 mL/cm y 0.14 ± 0.12 mL/cm, respectivamente.

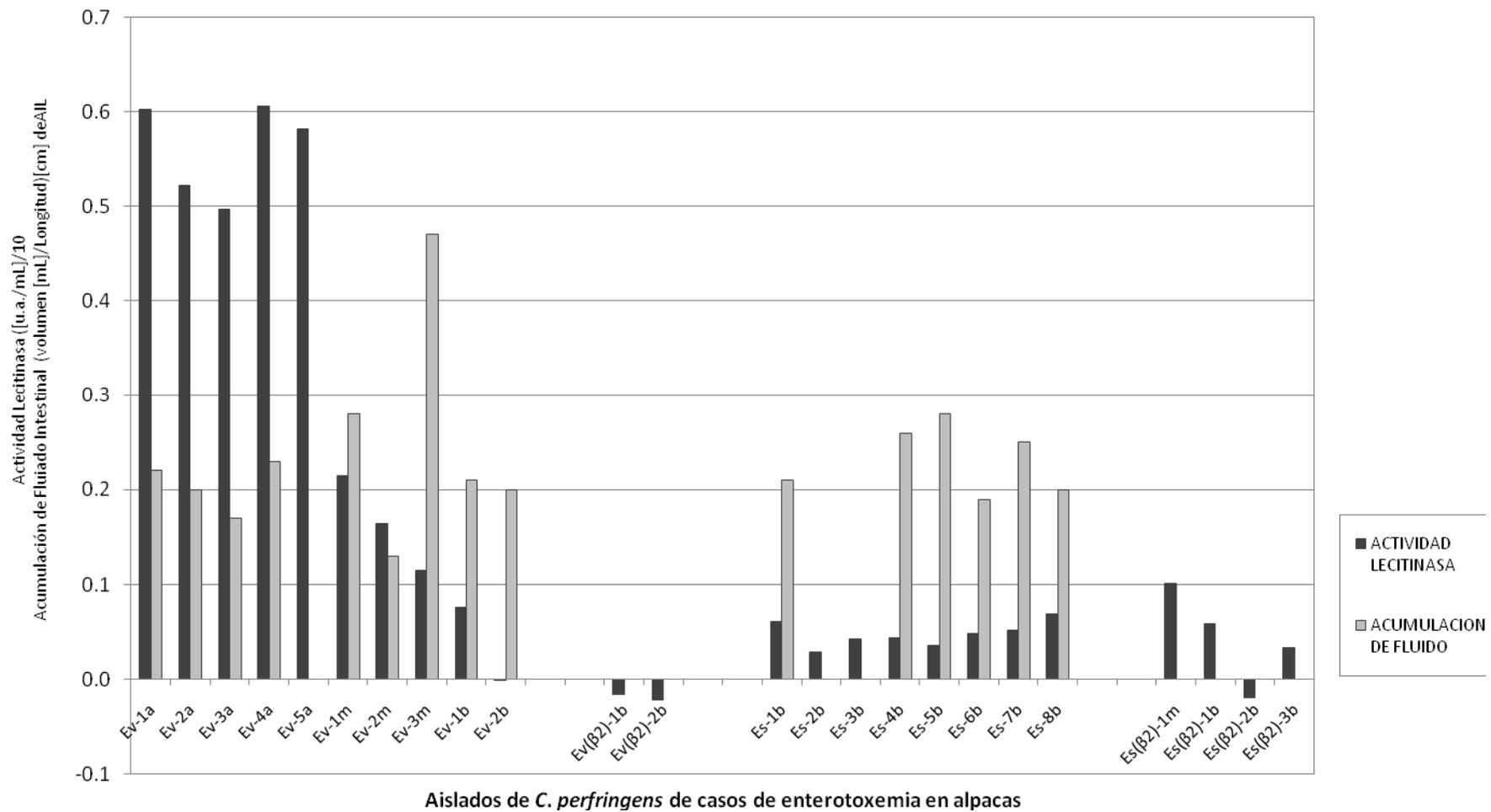


Figura4.26. Actividades enterotóxica (evidenciada en la capacidad de acumulación de fluido intestinal) y actividad lecitinasa de aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas

Cuadro 4.11: Promedios de acumulación de fluido intestinal¹ (relación volumen/longitud de AIL) de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas según su capacidad de producción de Cp-PLC y estado bacteriano y subtipo.

CAPACIDAD DE PRODUCCION DE Cp-PLC ²	VEGETATIVO ³			ESPORULADO ⁴			TOTAL
	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻⁵	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁺⁶	TOTAL	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁻	<i>cpe</i> ⁻ <i>cpb2</i> ⁺	TOTAL	
ALTA	0.16 ± 0.09	-	0.16 ± 0.09	-	-	-	0.16 ± 0.09
MEDIANA	0.29 ± 0.17	-	0.29 ± 0.17	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.22 ± 0.20
BAJA	0.21 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.12	0.20 ± 0.09	0.00 ± 0.00	0.14 ± 0.12	0.13 ± 0.12
TOTAL	0.21 ± 0.12	0.00 ± 0.00	0.18 ± 0.13	0.20 ± 0.09	0.00 ± 0.00	0.15 ± 0.13	0.12 ± 0.13

- (1) La acumulación de fluido intestinal de los sobrenadantes bacterianos fue determinada según la metodología descrita en el presente estudio usando la prueba de asa intestinal ligada en conejos. El valores expresados corresponden a las medias de la razón entre el volumen (mL) de fluido intestinal en el asa intestinal ligado y la longitud (cm) del asa intestinal ligado acompañados de su respectiva desviación estándar de las medias (SD).
- (2) La capacidad de producción de Cp-PLC por los aislados, clasificación realizada en base a su actividad lecitinasas: baja (< 1 u.a./mL), mediana (1-3 u.a./mL) y alta (> 3 u.a./mL).
- (3) El estado vegetativo fue considerado en base a su característica de crecimiento, morfología de la colonia y celular. A la coloración Gram se evidencian bacilos gruesos y cortos de color azul intenso, sin presencia de esporas.
- (4) El estado esporulado fue considerado en base a su característica de crecimiento, morfología de la colonia y celular. A la coloración Gram se evidencian bacilos delgados y largos de color rosáceo, se pueden evidenciar fácilmente las endosporas dentro de ellas.
- (5) Aislados del genotipo A (poseen el gen *plc* [Cp-PLC]), que poseen el gen *cpb2* (toxina β2) pero carecen del gen *cpe* (CPE).
- (6) Aislados del genotipo A (poseen el gen *plc* [Cp-PLC]), que carecen de los genes *cpb2* (toxina β2) y *cpe* (CPE).

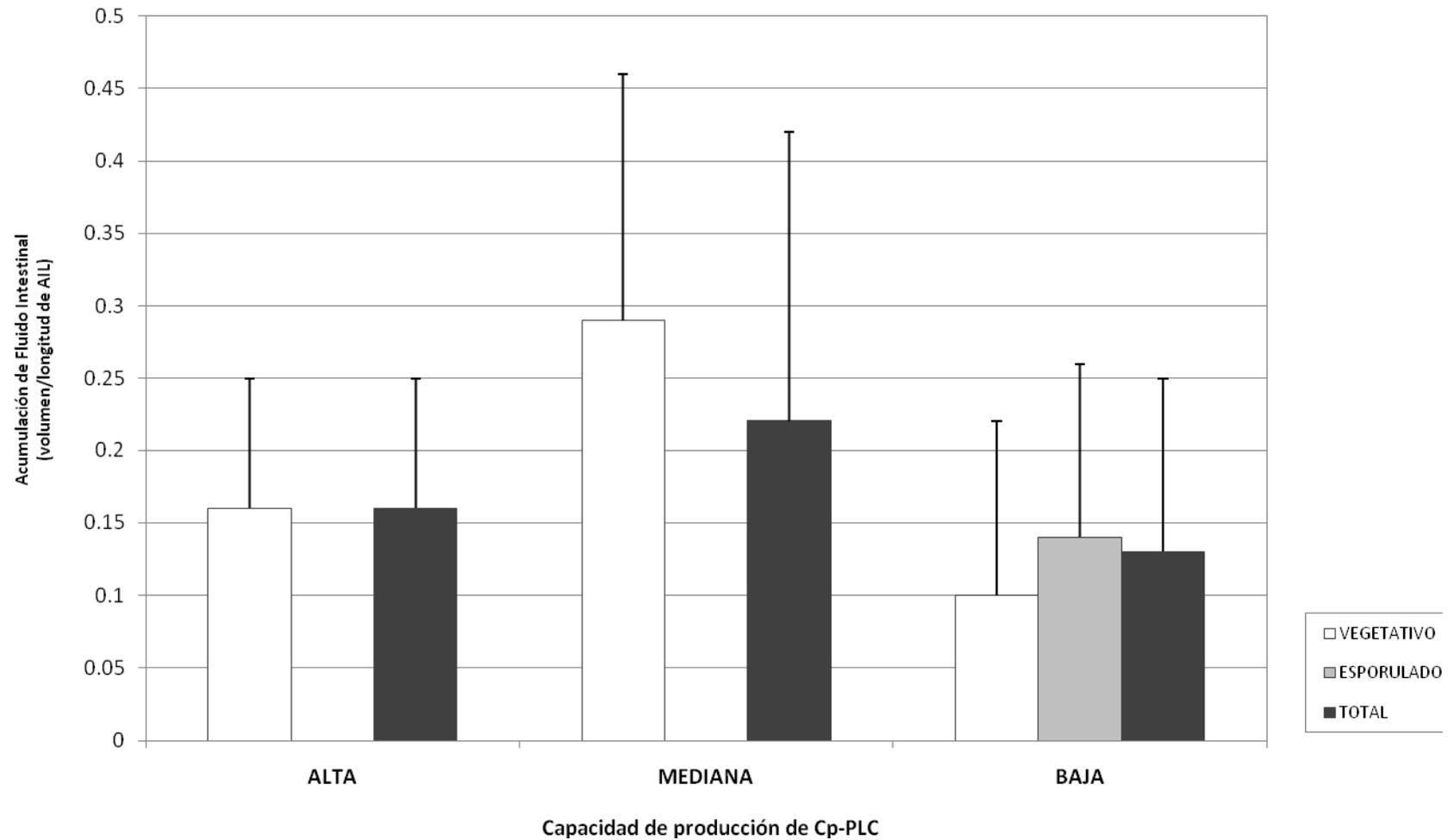


Figura 4.27. Capacidad de acumulación de fluido intestinal de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas distribuidos según su capacidad de producción de Cp-PLC y estado bacteriano.

Histológicamente, en ninguna de las AILs inoculadas con sobrenadante bacteriano se encontraron lesiones degenerativas, necróticas y/o hemorrágicas en la mucosa, submucosa o serosa intestinal (Figura 4.28). En las AIL en donde se evidenció alta capacidad de acumulación de fluido intestinal, las vellosidades intestinales se presentaron escasas y poco profundas debido al efecto de distensión intestinal. Por otra parte, en muchas AIL, a nivel de submucosa y serosa, presentaron infiltración y migración de polimorfonucleares hacia serosa, como consecuencia de las lesiones por la manipulación y daño mecánico propias de la técnica empleada.

La actividad enterotóxica encontrada de los aislados no fue proporcional a la capacidad de producción de Cp-PLC. Por el contrario, los aislados con mediana y baja capacidad de producción de Cp-PLC presentaron mayor capacidad de acumulación de fluidos que los de alta capacidad. Esta capacidad de acumulación de fluidos en dichos aislados estaría dada por otras enterotoxinas presentes en dichos aislados.

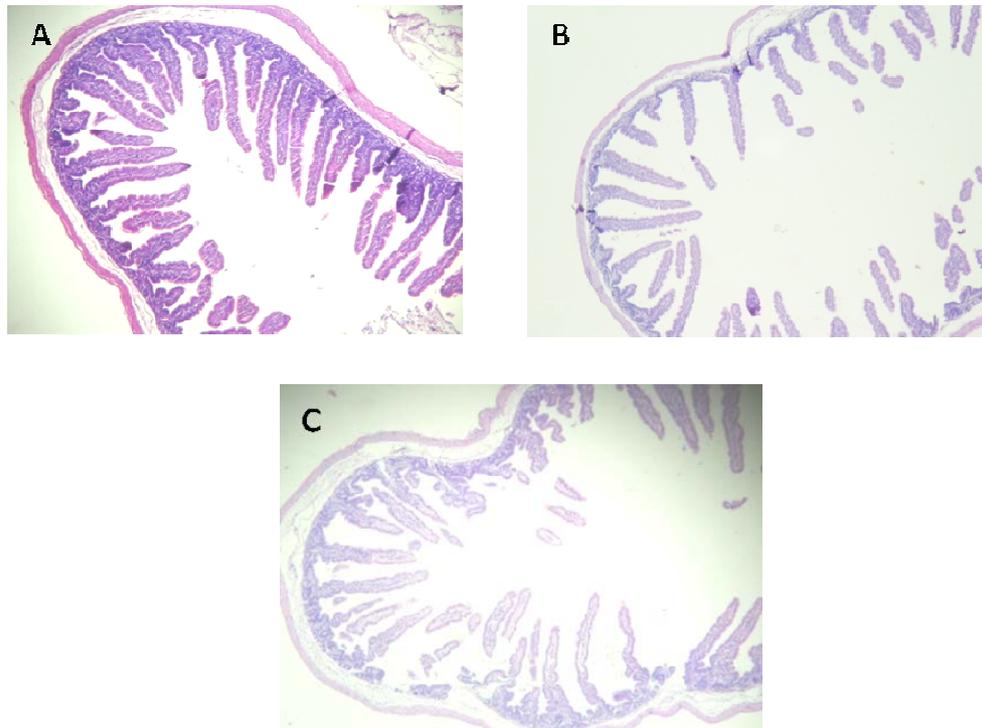


Figura 4.28: Imágenes histológicas de las asas intestinales ligadas (AIL) inoculadas con sobrenadante de aislado de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas (HE, 10X). AIL no desafiada (A), AIL desafiada con aislado con capacidad de acumulación de fluido intestinal, nótese escasas y poco alargadas vellosidades intestinales debido a la acción mecánica de la distensión intestinal, AIL desafiada con aislado sin capacidad de acumulación de fluido intestinal (C).

V. DISCUSIÓN

La enterotoxemia es la enfermedad más devastadora que afecta a la población de alpacas en nuestro país, provocando tasas de mortalidad de hasta 70% en crías alpacas (Ramírez, 1991). La principal lesión evidenciada es un proceso necrótico y/o hemorrágico a nivel de yeyuno e íleon, que desencadena un proceso toxémico seguido de una muerte súbita en la mayoría de los casos (Moro, 1987; Ameghino y DeMartini, 1991). Recientes estudios moleculares del agente causal (*C. perfringens*) descartan la participación de la CPE, la toxina β , la toxina ϵ y la toxina ι en la patogénesis de la enterotoxemia en alpacas pero si sugieren la participación de la Cp-PLC y, en algunos casos, la toxina β 2 (Pérez, 2006).

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la participación de la Cp-PLC en la inducción de lesiones entéricas relacionadas a la enterotoxemia de las alpacas. Para ello, se evaluó las características toxigénicas de la Cp-PLC tanto en su forma purificada (Pp.Cp-PLC) como en su forma nativa (sobrenadante) a partir de diferentes aislados de *C. perfringens* genotipo A obtenidos de casos de enterotoxemia en alpacas.

Los aislados evaluados fueron 24, obtenidos a partir de muestras intestinales de crías de alpacas muertas por enterotoxemia en diferentes hatos alpaqueros de la sierra Sur del Perú (Puno, Cusco y Arequipa) durante los años 2005-2008. De estos aislados, ninguno (20/20) poseyó el gen codificante de la CPE y una baja proporción (6/20) poseyó el gen codificante de la toxina β 2 (subtipo *cpe-cpb2+*). Asimismo, los aislados fueron agrupados de acuerdo a su estado bacteriano: 12 en estado vegetativo y 12 en estado esporulado. Estos últimos evidenciaron dicho estado debido al prolongado tiempo de almacenamiento a 4° C (aislados pertenecientes a muestreos del año 2005, 2006, 2007). Nosotros decidimos incluir en el estudio al estado esporulado pues existe

referencia de la síntesis de enterotoxinas por *C. perfringens* durante su estado esporulado (Smedley *et al.*, 2004), además de tener antecedentes de hallazgos de lesiones entéricas en alpacas por células bacterianas esporuladas (Ramírez, 1987).

Entonces para establecer nuestro protocolo de purificación de Cp-PLC y la caracterización toxigénica de los aislados de *C. perfringens* según su capacidad de producción de Cp-PLC (medidos en base a su actividad lecitinasa) fue necesario primero conocer el comportamiento (curva de crecimiento y síntesis de producción de Cp-PLC) de los aislados bajo condiciones *in vitro* en nuestro laboratorio. Para ello, la metodología descrita por Fernandez-Miyakawa *et al.* (2007a) empleando medio BHI como medio de crecimiento bacteriano para la mayor síntesis de Cp-PLC mostró ser la más eficiente en comparación con los medios de caldo carne y caldo Lurea Bertani (Datos no mostrados), como lo encontrado también por el autor.

El periodo de producción de Cp-PLC en nuestra curva de crecimiento bacteriano comenzó durante la segunda mitad de la fase exponencial de crecimiento y decreció durante la etapa final de la fase estacionaria, similar a lo encontrado por Katayama *et al.* (1993), Saayed *et al.* (2005), Fisher *et al.* (2006), Fernandez-Miyakawa *et al.* (2007b). Así, nosotros determinamos un periodo de 17 horas como periodo óptimo de incubación de la *C. perfringens* para los ensayos subsiguientes.

La purificación de Cp-PLC fue establecida a partir del aislado de *C. perfringens* de caso de enterotoxemia en alpaca con la más alta capacidad de producción de Cp-PLC (aislado DA6-2008 ó Ev-5a) y empleando la metodología estandarizada en nuestro laboratorio. La metodología implicó una precipitación por punto isoeléctrico y por saturación con sulfato de amonio al 50% seguida de un proceso de ultrafiltración (Amicon 10 KDa), mostrando ser económica, rápida y fácil, y consiguiendo purificar la Cp-PLC hasta 17 veces y con un rendimiento del 96%. Similares metodologías han sido empleadas obteniendo hasta 47 veces de pureza y rendimientos del 97% (Hirata *et al.*, 1995; Komoriya *et al.*, 2007).

La caracterización toxicológica de nuestro purificado (Pp.Cp-PLC) muestra que la metodología de purificación empleada no dañó estructuralmente a la Cp-PLC, manteniendo sus actividades lecitinasa (256 u.a.y./mL), hemolítica (512 u.a.h./mL), citotóxica (concentraciones superiores a 25.6 u.a.y./mL), de agregación plaquetaria y

letal (concentraciones superiores de 3.2 u.a.y.). Estas propiedades están dadas por la configuración de su dominio N-terminal formando los sitios activos (actividad lecitinasa [Guillouard *et al.*, 1996, Alape-Girón *et al.*, 2000]), por la configuración de su dominio C-terminal en donde están presentes residuos necesarios para la interacción con las membranas celulares (actividad citotóxica y hemolítica [Jepson *et al.*, 1999; Nagahama *et al.*, 2002]), y por la capacidad de la Cp-PLC de desencadenar diversas señales de rutas de transducción en varios tipos celulares, conduciendo a la incontrolada producción de mediadores intercelulares que desencadenan en un estado fatal (actividad de agregación plaquetaria y actividad letal [Titball *et al.*, 1991; Stevens, 2000]).

Es importante mencionar, que nosotros sometimos adicionalmente el Pp.Cp-PLC a subsiguientes etapas de purificación con métodos de cromatografías de afinidad a Níquel y de intercambio aniónico (Datos no mostrados) encontrando una reducción de sus actividades toxigénicas. Esto posiblemente debido a la alteración de la configuración de sus dominios C y N terminal por el empleo de bufferes con altas concentración de sales (Imidazol y NaCl).

Demostrada la completa actividad biológica de Pp.Cp-PLC se procedió a la evaluación de su actividad enterotóxica mediante la prueba de asa intestinal ligada de conejo estandarizada en nuestro laboratorio. Los resultados muestran que la Cp-PLC presentó una capacidad de acumulación de fluido intestinal proporcional a la concentración de Pp.Cp-PLC. Al análisis histológico, las AIL desafiadas evidenciaron un acortamiento de vellosidades y reducción de criptas intestinales, también proporcionales a la concentración de toxina, debido probablemente al efecto mecánico de distensión ocasionado por la acumulación de fluido intestinal. Interesantemente, en ninguna de ellas se logró evidenciar lesiones de necrosis y/o hemorragia en la mucosa y submucosa intestinal como las descritas en los casos de enterotoxemia en alpacas, a pesar de haber desafiado con concentraciones de purificado capaces de matar a 10 ratones. Similares resultados también han sido descritos en prueba de asa intestinal en ovinos (Miyakawa y Uzal, 2005), conejos (Duncan *et al.*, 1968) y ratas (Otamiri *et al.*, 1989; Sakurai *et al.*, 1990) desafiados con Cp-PLC purificada.

Sear y Kaper (1996) clasifican a las toxinas entéricas bacterianas en enterotoxinas, citotoxinas y toxinas con actividad neural. Así una enterotoxina es capaz de estimular un flujo de secreción intestinal en uno o más modelos intestinales sin

necesidad de tener evidencia histológica de daño intestinal o evidencia de injuria a células no-eritrocíticas en pruebas *in vitro*. En base a esto, nosotros evidenciamos que la Cp-PLC (Pp.Cp-PLC), además de sus actividades lecitinasa, hemolítica, citotóxica, de agregación plaquetaria y letal, se comporta como una enterotoxina.

No obstante, nosotros esperamos encontrar una actividad enterotóxica de Cp-PLC más severas. Así Ginter *et al.* (1996) evaluando actividades enzimáticas y tóxicas de Cp-PLC purificadas a partir de cepas tipo A aisladas de casos de gangrena gaseosa (NCTC82387) y de intestino de bovino muerto por enterotoxemia (CER89L43) encontró que ambos fueron similares, pero la Cp-PLC de CER89L43 fue más resistente a la degradación con quimiotripsina. Posiblemente esta resistencia refleje diferentes sitios de producción y acción de Cp-PLC en tejidos suaves o en intestino (Ginter *et al.*, 1996).

La absorción de agua en el tracto digestivo ocurre como consecuencia de gradientes osmóticos generados por la absorción activa de iones y otros solutos y también por hidrostasis pasiva o fuerzas osmóticas (Ganong, 1989). La habilidad de una toxina para reducir la absorción activa de iones puede además reducir la absorción de agua, conduciendo a un flujo de secreción intestinal (Sear y Kaper, 1996). Experimentos empleando un sistema *in vitro* de actividad enterotóxica (Cámaras de Ussing Chamber) para medir la red de flujo de agua transepitelial en intestino de ovino revelan que la Cp-PLC provoca una inhibición significativa de la absorción intestinal de agua (Miyakawa y Uzal, 2005). Asimismo, otro estudio, indica que la Cp-PLC no solo provoca secreción electrogénica de aniones, probablemente debida a la estimulación de secreción de cloruros, sino que también disminuye el cotransporte electrogénico Na^+ /glucosa de la mucosa hacia la serosa en intestino delgado de pollos (Rehman *et al.*, 2006). Aunque estos parámetros no fueron evaluados en nuestro estudio esto también estaría sucediendo en el íleon de conejo.

Otros estudios, en íleon de ratas indican que la Cp-PLC deteriora la función de la barrera mucosa e incrementa la permeabilidad del intestino a indeseables moléculas o patógenos por activación de fosfolipasa A_2 (Otamiri, 1989). Así, esta activación del metabolismo fosfolipídico también sería evidenciado por el incremento de la concentración de Ca^{2+} por Cp-PLC desencadenando contracciones del íleon (Sakurai *et al.*, 1990).

Demostrado que la Cp-PLC purificada *per se* no es capaz de producir lesiones entéricas asociadas a las encontradas en casos de enterotoxemia en alpacas; la caracterización toxigénica de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas asociadas a su capacidad de producción de Cp-PLC permitió evidenciar si la interacción entre la Cp-PLC y otros factores de virulencia sintetizados por los aislados en su forma nativa podrían ser capaces de generar lesiones entéricas. Para ello, los aislados primero fueron analizados en relación a su capacidad de producción de Cp-PLC.

La capacidad de producción de Cp-PLC fue establecido en base a sus niveles de actividad lecitinasa, pues el análisis de las secuencias del gen *plc* (Cp-PLC) muestra alta homología y similitud entre los diferentes tipos (A-E) de *C. perfringens*, así como aislados de animales con o sin enfermedad, sugiriendo que la variación en la actividad fosfolipasa entre las diferentes cepas no es debida a una mutación en la región codificante de *plc* sino en una región extragénica (Katayama *et al.*, 1993; Tsutsui *et al.*, 1995; Sheedy *et al.*, 2004; Effat, 2008; Abildgaard *et al.*, 2008). En todos los cinco tipos toxigenicos de *C. perfringens*, el gen *plc* es situado en el mismo locus, cerca al origen de replicación y entre dos operones de rRNA. Esta localización es importante pues no solo es el primero en ser replicado sino que también es el segmento mejor conservado del genoma (Rood y Cole, 1991).

Nosotros describimos y reportamos por primera vez, la presencia de aislados de *C. perfringens* de alta, mediana y baja capacidad de producción de Cp-PLC de muestras provenientes de casos de enterotoxemia en alpacas. Similares hallazgos han sido reportados también en aislados de otras enfermedades en donde la participación de la Cp-PLC jugaría un rol muy importante (Tsutsui *et al.*, 1995; Bullifent *et al.*, 1996, Timbermont *et al.*, 2009).

La capacidad de producción de Cp-PLC de nuestros aislados varió de acuerdo al estado bacteriano, subtipo de la bacteria y fuente de muestra. En relación al estado bacteriano, los aislados en estado esporulado, como era esperado, mostraron baja capacidad de producción de Cp-PLC. Esto debido a que la toxina es sintetizada principalmente durante la etapa final de la fase logarítmica de crecimiento bacteriano en su estado vegetativo (Rood y Cole, 1991). En contraste, los aislados en estado vegetativo mostraron diferentes niveles de producción de Cp-PLC. Así, en el subtipo aislado más frecuentemente reportados en casos de campo (Genotipo A subtipo *cpe-*

cpb2-) el porcentaje de aislados de baja capacidad de producción de Cp-PLC fue sólo del 20%, mientras que en los de alta y mediana capacidad fueron del 50% y 30%, respectivamente.

Nosotros también analizamos aislados en estado vegetativo de *C. perfringens* (genotipo A subtipo *cpe-cpb2*-) provenientes de crías de alpacas sanas y de muestras medio ambientales (dormideros de hatos alpaqueros y bofedales cercanos) encontrando que cerca del 90% (9/10) de los aislados presentaron baja capacidad de producción de Cp-PLC (Datos no mostrados). Lo cual indicaría que son sólo algunas las cepas (de alta a mediana capacidad de producción de Cp-PLC) implicadas en la presentación de la enfermedad y que la Cp-PLC tendría participación en la patogénesis. No obstante, estudios en enteritis causada por *C. perfringens* tipo A en otras especies con presentación de lesiones entéricas similares a las descritas en enterotoxemia de mamíferos, muestran que la producción de Cp-PLC de *C. perfringens* aislados de animales enfermos no fue más alta que la producción de Cp-PLC de aislados de animales sanos (Gholamiandekhordi *et al.*, 2006).

Por otro lado, los aislados que transportaron el gen *cpb2* (genotipo A subtipo *cpe-cpb2*+) mostraron tener baja capacidad de producción de Cp-PLC, similar a lo encontrado en aislados genotipo C *cpb2*+ por Fisher *et al.* (2006). Este resultado llama mucho la atención, pues este subtipo recientemente ha sido reportado en un 13.7% de los aislados de casos de enterotoxemia de alpacas y ha sugerido la interacción de la toxina β_2 con la Cp-PLC para desencadenar la enfermedad en las alpacas con mayor severidad (Pérez, 2006). No obstante, al parecer en este grupo de aislados no sería necesaria la participación de Cp-PLC para desencadenar la enfermedad, pero si de la toxina β_2 u otros factores de virulencia asociados o no al gen *cpb2* (Jost *et al.*, 2006).

La caracterización toxigénica de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpaca brindó información no sólo del comportamiento de la Cp-PLC sino también de la asociación con otros factores de virulencia. Así, los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes de dichos aislados mostraron ser diferentes entre ellos no encontrándose alguna relación con su capacidad de producción de Cp-PLC. En muchos aislados fue encontrada una banda de aproximadamente 43 KDa (banda 10) compatible con la Cp-PLC. No obstante, esta banda estuvo presente de manera intensa en la mayoría de aislados de baja capacidad de producción de Cp-PLC y no en las de

alta capacidad, como sería lo esperado, las cuales por el contrario mostraron un perfil muy débil. Al parecer, a pesar de que los sobrenadantes fueron concentrados 10 veces, la cantidad de Cp-PLC no fue la suficiente para ser evidenciada en ellos.

Nosotros logramos establecer un patrón perfil para los aislados de *C. perfringens* (ver cuadro 4.9) constituido por 16 bandas proteicas, alguna de las cuales podrían corresponder a las siguientes toxinas y/o enzimas metabólicas: banda 2 a la hialuronidasa (97 KDa) (Rood y Cole, 1991), banda 4 a la neuraminidasa de 64 KDa (Hatheway, 1990), banda 7 a la perfringolisina de 54 KDa (Hatheway, 1990), banda 10 a la toxina delta (42 KDa) ó a la neuraminidasa H (42.8 KDa) (Hatheway, 1990); banda 12 a la gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH, enzima glicolítica de 37 KDa) (Kullkarni *et al.*, 2006) ó a la toxina lambda (Jin *et al.*, 1996), banda 16 a la toxina β 2 (27 KDa) (Gibert *et al.*, 1997).

Es importante mencionar que el presente estudio no tuvo como objetivo evaluar la participación de la toxina β 2 en la presentación de la enfermedad, pero si creemos conveniente brindar algún aporte o sugerencia que nos permita su comprensión en la patogénesis de la enfermedad. La toxina β 2 ha demostrado ser un factor de virulencia importante en muchos problemas entéricos como enterotoxemia de terneros (Manteca *et al.*, 2002) y enteritis necrótica en cerdos (Schotte *et al.*, 2004). Sin embargo, el gen *cpb2* no siempre es expresado, dependiendo del medio de cultivo empleado (medios específicos suplementados con antibióticos) (Vilei *et al.*, 2005) y el alelo involucrado: *consensus* (casi siempre expresado) ó *atípico* (pocas veces expresado correctamente) (Lebrun *et al.*, 2007). Nosotros pudimos evidenciar en pocos aislados *cpb2*⁺ (2/6) una proteína de aproximadamente 27 KDa (banda 16), que podría corresponder a la toxina β 2. De confirmarse por inmunobloting, esta posible baja expresión sería debida a razones ya mencionadas párrafos arriba. No obstante, van Asten *et al.* (2008) menciona que los primers empleados en el presente estudio para la amplificación del gen *cpb2* (Baums *et al.*, 2004) son sólo capaces de detectar menos del 50% de aislados que transportan el gen *cpb2*. Siendo lógico sospechar que algunos aislados subtipo *cpe-cpb2*⁻ (3/14) que evidenciaron también la banda de ~27 KDa podrían ser realmente subtipo *cpe-cpb2*⁺, enmascarándose su verdadera frecuencia de este subtipo.

La actividad hemolítica de los aislados fue variable y curiosamente los aislados de mediana y algunos de baja capacidad de producción de Cp-PLC (aislados vegetativos

subtipo *cpe-cpb2*-) presentaron mayor actividad hemolítica que los de alta capacidad. Esta diferencia estaría dada por la producción de otras hemolisinas capaces también de provocar hemolisis de eritrocitos de ovino (p.e. perfringolisina) (Hatheway, 1990). El análisis de la actividad perfringolisina, la cual emplea eritrocitos de caballo cuya composición de membrana lo hace sensible exclusivamente a la perfringolisina (Hatheway, 1990), nos muestra que dicha actividad fue proporcional a la capacidad de producción de Cp-PLC, descartando lo inicialmente mencionado. Al parecer, en estos aislados (de mediana y baja capacidad de producción de Cp-PLC) se estaría expresando otra(s) hemolisina(s) tan potente(s) como la Cp-PLC.

Fue interesante encontrar que los aislados que poseyeron el gen *cpb2* mostraron incapacidad de hemolisis, ni actividad hemolítica ni actividad perfringolisina, indicando la ausencia o escasa expresión de la Cp-PLC y la perfringolisina, respectivamente. Quizás la presencia del gen *cpb2* ejerza un efecto pleiotrópico sobre la expresión de la Cp-PLC y la perfringolisina.

La actividad citotóxica en células HEp-2 fue positiva en el 100% (5/5) y 66.7% (2/3) de los aislados con alta y mediana capacidad de producción de Cp-PLC, respectivamente, mientras que los aislados de baja capacidad fueron negativos no mostrando ningún efecto (0/8); sugiriendo claramente la participación de la Cp-PLC en dicha actividad. Interesantemente, aislados que transportaron el gen *cpb2* (subtipos *cpe*⁻ *cpb2*⁺), tanto en su estado vegetativo como esporulado, evidenciaron actividad citotóxica en el 50% (1/2) y 33.3% (1/3) de los casos, respectivamente. Esto sugiere la expresión de otras citotoxinas (toxina β 2), pues estos aislados poseyeron baja capacidad de producción de Cp-PLC.

En relación a la capacidad de agregación plaquetaria, ninguno de los aislados (incluidos los de alta capacidad de producción de Cp-PLC) fue capaz de producir este efecto. Similarmente, la actividad letal en ratones no pudo ser evidenciada en ninguno de los aislados. No obstante, los aislados de alta capacidad de producción de Cp-PLC si produjeron algunos signos clínicos en ratones como depresión y disnea respiratoria más no los suficientes para desencadenar el cuadro fatal. Es importante mencionar, que la vía de inoculación empleada, la intraperitoneal, es la que produce menor tiempo de sobrevivencia y requiere menor concentración de Cp-PLC para su efecto letal en ratones en relación a las vías endovenosa y subcutánea (Lynch y Moskovitz, 1968).

Al parecer, las condiciones de crecimiento *in vitro* no ofrecieron una gran síntesis de Cp-PLC por los aislados mostrando solo sus actividades hemolíticas y citotóxica, mas no de agregación ni letal. Quizás se necesiten realizar estudios *in vivo* para ver si estos resultados son reproducibles y así descartar la hipótesis de que todas las cepas aisladas de casos de enterotoxemia en alpacas son de baja capacidad de producción de Cp-PLC en comparación con los aislados de otras especies y se descarte por completo su participación en la enfermedad.

Finalmente, la actividad enterotóxica fue muy variable. Todos los aislados en estado vegetativo y esporulado, a excepción de los de subtipo *cpe-cpb2+*, mostraron capacidad de acumulación de fluidos, en mayor o menor grado. Los aislados de alta capacidad de producción de Cp-PLC no mostraron el mayor índice de acumulación de fluidos. Al parecer, la acumulación de fluidos en los aislados podría deberse a otra(s) enterotoxina(s) ó metabolitos(s) bacterianos secretados, además de la Cp-PLC. Interesantemente ninguno de los aislados fue capaz de provocar lesiones histológicas compatibles a las encontradas en casos de enterotoxemia de alpaca como enteritis necrótica y/o hemorrágica difusa aguda, solo evidenciándose una reducción de las vellosidades y criptas intestinales, producto del efecto mecánico de distensión por acumulación de fluidos en intestino. Resultados similares han sido descritos en desafíos experimentales inoculando sobrenadante de cultivos de *C. perfringens* tipo A *cpe-cpb2-* en asas intestinales de terneros (Manteca *et al.*, 2002), corderos (Hauschild *et al.*, 1968) y pollos (Timbermont *et al.*, 2009).

Hauschild *et al.* (1968) no pudo prevenir la acumulación de fluidos provocada por la inoculación de cultivo de *C. perfringens* tipo A *cpe-cpb2-* en las asas intestinales ligadas mediante la inyección con anti-Cp-PLC, poniendo en cuestión la participación de la Cp-PLC en la producción de lesiones. Similarmente Timbermont *et al.* (2009) evaluaron la capacidad de producir lesiones entéricas en asa intestinal de pollos por cepas de *C. perfringens* con diferentes capacidades de producción de Cp-PLC y cepas aisladas de pollos enfermos y sanos encontrando que solo las cepas aisladas de pollos enfermos, independiente de la capacidad de producción de Cp-PLC, fueron capaces de generar lesiones entéricas, concluyendo que la Cp-PLC no jugaría un rol principal en la producción de lesiones entéricas por *C. perfringens* tipo A.

Timbermont *et al.* (2009) también inocularon sobrenadantes de cultivos de *C. perfringens* aislados de enterotoxemia de terneros, con alta capacidad de producción de Cp-PLC, en asas intestinales de pollo no encontrando lesiones entéricas en éstas. Solamente encontraron lesiones en asas intestinales desafiadas con cepas de *C. perfringens* aisladas de pollos enfermos. Sugiriendo la presencia de factores de virulencia específicas a huésped en cepas de *C. perfringens*. Estos hallazgos proporcionan una explicación a la ausencia de lesiones entéricas (características a enterotoxemia de alpacas) provocadas por nuestros aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas en el modelo de asa intestinal ligada en conejos.

A continuación exponemos un ejemplo de etiopatogénesis de enfermedad entérica producida por *C. perfringens* tipo A, la enteritis necrótica de pollos, que podría ser semejante a lo que estaría sucediendo en la enterotoxemia de alpacas. Estudios en enteritis necrótica en pollos sugirieron que el principal factor de virulencia envuelto en la enfermedad fue secretado por la bacteria (Al-Sheikhly y Truscott, 1977a), el cual condujo a la propuesta de que la Cp-PLC era el principal factor de virulencia en la patogénesis. Esta hipótesis fue basada en las observaciones que Cp-PLC es una de las principales toxinas secretadas y que cultivos conteniendo células, y libres de ellas, fueron capaces de provocar lesiones típicas de enteritis necrótica en tracto gastrointestinal de pollos (Al-Sheikhly y Truscott, 1977a,b,c). Además de existir una correlación entre la proliferación de *C. perfringens*, la producción de Cp-PLC y la presentación de lesiones necróticas en pollos (Si *et al.*, 2007). No obstante, la construcción de mutantes *knock out* del gen *plc* de un aislado virulento de enteritis necrótica, mostró que aun podía causar la enfermedad en pollos, evidenciando que la Cp-PLC no es un factor de virulencia esencial y cuestionando su rol en la participación en el proceso de la enfermedad (Keyburn *et al.*, 2006). Este hallazgo, condujo a la búsqueda de nuevos factores de virulencia, encontrando así una nueva toxina, la toxina NetB, en cepas aisladas de pollos que padecieron de enteritis necrótica (Keyburn *et al.*, 2008). Para determinar el rol de NetB en la enfermedad fue construido por recombinación un mutante *knock out* al gen *netB* de un aislado virulento de pollo, y su virulencia fue calculada en modelo animal. El mutante *netB* fue incapaz de causar enfermedad mientras que el aislado salvaje y el mutante *netB* complementado con un gen *netB* de tipo salvaje causó significativos niveles de enteritis necrótica. Estos datos muestran que efectivamente en estos aislados la toxina NetB es crítica para la habilidad

de *C. perfringens* de causar enteritis necrótica en pollos (Keyburn *et al.*, 2008). Similarmente, otros estudios realizados en inmunización de pollos con ciertas proteínas secretadas, además de Cp-PLC, indicarían estar envueltas en la protección de la enteritis necrótica en pollos (Thompson *et al.*, 2006; Kulkarni *et al.*, 2007).

Interesantemente, los aislados que transportaron el gen *cpb2* no mostraron capacidad de acumulación de fluido, ni mucho menos lesiones de tipo hemorrágico como los descritos para la toxina $\beta 2$. Por lo tanto, nos indicaría que esta toxina no fue secretada o si lo estuvo, fue biológicamente inactiva. Hallazgos similares han sido encontrados en inoculación con cultivos de *C. perfringens* tipo A *cpb2+* en yeyuno de vacas adultas, donde no indujo lesión alguna (Ewoldt y Anderson, 2005).

Al parecer, después de todo lo mostrado, la Cp-PLC *per se* no sería el factor de virulencia responsable de las lesiones entéricas encontradas en casos de enterotoxemia de alpacas, ni su interacción con otros factores de virulencia. No obstante, no se descarta su participación a nivel sistémico, en donde su actividad toxica es mas compatible y sugerida con el cuadro descrito de desordenes multiorgánicos en enterotoxemia de alpacas. Asimismo, no se descarta la participación de la Cp-PLC en la exacerbación de las lesiones entéricas posteriores a los daños iniciales provocados por *E. macusaniensis* (Rosadio y Ameghino, 1994, Palacios *et al.*, 2006; Rosadio *et al.*, 2009) o shigatoxinas de *E. coli* (Luna, 2009) reportados ya en alpacas con cuadros de enterotoxemia en alpacas.

VI. CONCLUSIÓN

1. La Cp-PLC se comporta como una enterotoxina.
2. La Cp-PLC no participaría de manera exclusiva y directa en la producción de lesiones entéricas compatibles con las descritas en enterotoxemia de alpacas.
3. Los *C. perfringens* genotipo A aislados de casos de enterotoxemia en alpacas presentan diferentes capacidades de producción de Cp-PLC *in vitro*.
4. Los *C. perfringens* genotipo A aislados de casos de enterotoxemia en alpacas evidencian la presencia de otros factores de virulencia tipo hemolisinas, citotoxinas y enterotoxinas además de la Cp-PLC y la perfringolisina.

VII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la actividad enterotóxica de la Cp-PLC y de los sobrenadantes de los aislados de *C. perfringens* genotipo A de casos de enterotoxemia en alpacas empleando la prueba de asa intestinal ligada en alpaca.
2. Evaluar la real participación de la toxina $\beta 2$ en la producción de lesiones entéricas en alpacas.
3. Determinar la participación de la Cp-PLC en el cuadro sistémico de la enterotoxemia en alpacas.
4. Analisar otros factores de virulencia del *C. perfringens* responsables de las lesiones entéricas y sistémicas en los casos de enterotoxemia en alpacas.

VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Guillouard I; Titball RW, Naylor CE, Rucavado A, Lomonte B, Basak AK, Gutiérrez JM, Cole S, Thelestam M.** Mapping critical residues for the toxic activities of *Clostridium perfringens* phospholipase C. Eur J Biochem 2000; 267:5191-5197.
- Al-Khaldi SF, Myers KM, Rasooly A, Chizhikov V.** Genotyping of *Clostridium perfringens* toxins using multiple oligonucleotide microarray hybridization. Mol Cell Probes 2004b; 18:359-367.
- Al-Khaldi SF, Villanueva D, Chizhikov V.** Identification and characterization of *Clostridium perfringens* using single target DNA microarray chip. Int J Food Microbiol 2004a; 91:289-296.
- Al-Sheikhly F, Truscott RB.** The interaction of *Clostridium perfringens* and its toxins in the production of necrotic enteritis of chickens. Avian Dis 1977c; 21:256-263.
- Al-Sheikhly F, Truscott RB.** The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of broth cultures of *Clostridium perfringens* into duodenum. Avian Dis 1977a; 21:230-240.
- Al-Sheikhly F, Truscott RB.** The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of crude toxins of *Clostridium perfringens* into duodenum. Avian Dis 1977b; 21:241-255.
- Ameghino E, De Martíni J.** Mortalidad de crías de alpacas. Boletín de Divulgación del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA). UNMSM. Lima, 1991; p 71-80.

- Arce MA, Rosas TA, Rodríguez TL.** Prácticas de inmunología general aplicada y veterinaria. Mexico: Editorial Manual Moderno, 2007.
- Archambault M, Bell-Rogers P, Cai H.** *Clostridium perfringens* genotyping, a valuable component of the diagnosis!. AHL Newsletter 2002; 6: 26-27.
- Asmuth DM, Olson RD, Hackett SP, Bryant AE, Tweten RK, Tso JY, Zollman T, Stevens DL.** Effects of *Clostridium perfringens* recombinant and crude phospholipase C and theta-toxin on rabbit hemodynamic parameters. J Infect Dis 1995; 172:1317-1323.
- Awad MM, Bryant AE, Stevens DL, Rood JL.** Virulence studies on chromosomal α -toxin and θ -toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential role of α -toxin in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene. Mol Microbiol 1995; 15:191-202.
- Awad MM, Ellemor DM, Boyd RL, Emmins JJ, Rood JL.** Synergistic effects of alpha-toxin and perfringolysin O in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene. Infect Immun 2001; 69:7905-7910.
- Barach JT, Adams DM, Speck ML.** Recovery of heat *Clostridium perfringens* type A spores on selective media. Appl Microbiol 1974; 28:793-797.
- Ba-Thein W, Lyrstis M, Ohtani K, Inisbet IT, Hayashi H, Rood JL, Shimizu T.** The virR/virS locus regulates the transcription of genes encoding extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. J Bacteriol 1996; 178: 2514-2520.
- Baums CG, Schotte U, Amtsberg G, Goethe R.** Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. Vet Microbiol 2004; 100:11-16.
- Boujon P, Henzi M, Penseyres JH, Belloy L.** Enterotoxaemia involving β 2-toxigenic *Clostridium perfringens* in a white stork (*Ciconia ciconia*). Vet Record 2005; 156:746-747.
- Bramley AJ, Patel AH, O'Reilly M, Foster R, Foster TJ.** Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* for the mouse mammary gland. Infect Immun 1989; 57:2489-2494
- Brügge H.** Genomics of clostridial pathogens: implication of extrachromosomal elements in pathogenicity. Current Opinion in Microbiology 2005; 8:601-605.
- Bruner D, Gillespie J.** Hagan's infectious diseases of domestic animals. 5 ed. London: Imprenta Vail-bollou, 1966.

- Bryant AE, Bayer CR, Bayes-Schoer SM, Stevens DL.** Activation of platelet gpIIb/IIIa by phospholipase C from *Clostridium perfringens* involves store-operated calcium entry. *J Infect Dis* 2003; 187:408-417.
- Bryant AE, Che RYZ, Nagata CY, Wang Y, Lee CH, Fingold S, Guth PH, Stevens DL.** Clostridial gas gangrene. I. Cellular and molecular mechanisms of microvascular dysfunction induced by exotoxins of *Clostridium perfringens*. *J Infect Dis* 2000a; 182:799-807.
- Bryant AE, Che RYZ, Nagata CY, Wang Y, Lee CH, Fingold S, Guth PH, Stevens DL.** Clostridial gas gangrene. II. Phospholipase C-induced activation of platelet gpIIb/IIIa mediates vascular occlusion and myonecrosis in *Clostridium perfringens* gas gangrene. *J Infect Dis* 2000b; 182:808-815.
- Bryant AE, Stevens DL.** Phospholipase C and perfringolisin O from *Clostridium perfringens* upregulate endothelial cell-leukocyte adherence molecule 1 expression and induce interleukin 8 synthesis in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Infect Immun* 1996; 64:358-362.
- Brynstad S, Sarker M, McClane B, Granum P, Rood J.** Enterotoxin plasmid from *Clostridium perfringens* is conjugative. *Infect Immun* 2001; 69:3483-3487.
- Brynstad S, Synstad B, Granum P.** The *Clostridium perfringens* enterotoxin gene is on transposable element in type A human food poisoning strains. *Microbiology* 1997; 143:2109-2115.
- Bueschel DM, Jost BH, Billington, SJ, Trinh HT, Songer JG.** Prevalence of *cpb2*, encoding beta 2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet Microbiol* 2003; 94:121-129.
- Bullifent HL, Moir A, Awad MM, Scott PT, Rood JI, Titball RW.** The level of expression of β -toxin by different strains of *Clostridium perfringens* is dependent on differences in promoter structure and genetic background. *Anaerobe* 1996; 2:365-371.
- Bunting M, Lorant DE, Bryant AE, Zimmerman GA, McIntyre TM, Stevens DL, Prescott SM.** Alpha toxin from *Clostridium perfringens* induces proinflammatory changes in endothelial cells. *J Clin Invest* 1997; 100:565-574.
- Bustinza JA.** Enfermedades de la alpaca. 2 ed Arequipa: Impreso por la Universidad Nacional del Altiplano, 2000.

- Camilli A, Goldfine H, Portnoy DA.** *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J Exp Med* 1991; 173:751-754.
- Campos D de F S, Baccaro MR, Moreno AM, Ferreira AJP, Doto DS, Murakami DF, Shinya LT.** *Clostridium perfringens* tipo A portadores do gene *cpb2* associados à lesões em íleo de coelhos. *Arq Inst Biol São Paulo* 2004; 71:287-292.
- Carbajal Zegarra JM.** Determinación de las causas de mortalidad en crías de alpaca en el departamento de Puno en las campañas ganaderas de 1972 y 1973 [Tesis para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista]. 1974 Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Puno.
- Cavalcanti MTH, Porto T, Porto ALF, Brandi IV, Filho JLL, Junior AP.** Large scale purification of *Clostridium perfringens* toxins: a review. *Braz J Pharm Scienc* 2004; 40:151-164.
- Collins JE, Bergeland ME, Bouley D, Ducommun AL, Francis DH, Yeske P.** Diarrhea associated with *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in neonatal pigs. *J Vet Diagn Invest* 1989; 1:351-353.
- Cowan ST.** Manual for the identification of medical bacterial. 2 ed. Cambridge: University Press, 1974.
- Cruickshank R.** Medical microbiology. 11 ed. Great Britain: E. & S. Livingstone Limited, 1965.
- Daube G, Simon P, Limbourg B, Renier K, Kaeckenbeeck A.** Molecular typing of *Clostridium perfringens*. *Ann Med Vet* 1994; 138:183-191.
- Dennison AC, Van Metre DC, Morley PS, Callan RJ, Plamplin EC, Ellis RP.** 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 tract of dairy cows with hemorrhagic bowel syndrome or left-displaced abomasum. *JAVMA* 2005; 227:132-138.
- Dosoky RM.** The role of environment in the occurrence of clostridial infection among fowl. *Assiut Vet Med J* 1989; 24:165:171.
- Dray T.** *Clostridium perfringens* type A and β_2 toxin associated with enterotoxemia in a 5-week-old goat. *Can Vet J* 2004; 45:251-253.
- Duncan CL, Sugiyama H, Strong DH.** Rabbit ileal loop response to strains of *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* 1968; 95:1560-1566.

- Dushesnes C, Mainil J.** Genus *Clostridium*. Scientific Booklets European Concerted Action, 2005 QLK2-CT2001-01267. disponible en: <http://www.genusclostridium.net>.
- Eaton JT, Naylor CE, Howells AM, Moss DS, Titball RW, Basak AK.** Crystal structure of the *C. perfringens* alpha-toxin with the active site closed by a flexible loop region. *J Mol Biol* 2002; 319:275-281.
- Effat MM.** Restriction enzyme analysis and DNA sequencing comparison for toxin gene among different types of *Clostridium perfringens*. *Pak J Biol Sci* 2008; 11:380-385.
- Ellemor DM, Baird RN, Awad MM, Boyd RL, Rood JL, Emmins JJ.** Use of genetically manipulated strains of *Clostridium perfringens* reveals that both alpha-toxin and theta-toxin are required for vascular leukostasis to occur in experimental gas gangrene. *Infect Immun* 1999; 67:4902-4907.
- Ellis RP.** *Clostridium perfringens* enteritis. En: The complete alpaca book. 2 ed. California: Bonny Doun Press, 2006: 464-467.
- El-Seedy FR.** Studies on necrotic enteritis in chickens. *Vet Med J Giza* 1990; 38:407-417.
- Embury-Hyatt CK, Wobeser G, Simko E, Woodbury MR.** Investigation of a syndrome of sudden death, splenomegaly, and small intestinal hemorrhage in farmed deer. *Can Vet J* 2005; 46:702-708.
- Engström BE, Fermér C, Lindberg A, Saarinen E, Baverud V, Gunnarsson A.** Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Vet Microbiol* 2003; 94:225-235.
- Exton JH.** Signalling through phosphatidylcholine breakdown. *J Biol Chem* 1990; 265:1-4.
- Fernández-Miyakawa ME, Fisher J, Poon R, Sayeed S, Adams V, Rood JI, McClane BA, Uzal FA.** Both epsilon-toxin and beta-toxin are important for the lethal properties of *Clostridium perfringens* type B isolates in the mouse intravenous injection model. *Infect Immun* 2007b; 75:1443-1452.
- Fernández-Miyakawa ME, Marcellino R, Uzal FA.** *Clostridium perfringens* type A toxin production in 3 commonly used culture media. *J Vet Diagn Invest* 2007a; 19:184-186.

- Fiore AE, Michalski JM, Russell RG, Sears CL, Kaper JB.** Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a phospholipase (lecitinase) produced by *Vibrio cholera*. *Infect Immun* 1997; 65:3112-3117.
- Fisher DJ, Fernandez-Miyakawa ME, Sayeed S, Poon R, Adams V, Uzal FA, McClane BA.** Dissecting the contributions of *Clostridium perfringens* type C toxins to lethality in the mouse intravenous injection model. *Infect Immun* 2006; 74:5200-5210.
- Flores-Díaz M, Alape-Girón A, Titball RW, Moos M, Guillouard I, Cole S, Von Eichel-Streiber C, Florin I, Thelestam M.** UDP-glucose deficiency causes hypersensitivity to the cytotoxic effect of *Clostridium perfringens* phospholipase C. *J Biol Chem* 1998; 273:24433-24438.
- Flores-Díaz M, Alape-Girón A, Titball RW, Moos M, Guillouard I, Cole S, von Eichel-Streiber C, Florin I, Thelestam M.** UDPG-glucose deficiency causes hypersensitivity to the cytotoxic effect of *Clostridium perfringens* phospholipase C. *J Biol Chem* 1998; 273:24433-24438.
- Flores-Díaz M, Alape-Girón A.** Role of *Clostridium perfringens* phospholipase C in the pathogenesis of gas gangrene. *Toxicon* 2003; 42:979-86.
- Flores-Díaz M, Thelestam M, Clarck GC, Titball RW, Alape-Girón A.** Effects of *Clostridium perfringens* phospholipase C in mammalian cells. *Anaerobe* 2004; 10:115-23.
- Fowler ME.** *Medicine and surgery of South American camelids*. 2 ed. Iowa: Iowa State University Press, 1998.
- Fukata T, Hadate Y, Baba E, Uemura T, Arakawa A.** Influence of *Clostridium perfringens* and its toxin in germ-free chickens. *Res Vet Sci* 1988; 44:68-70.
- Ganong WF.** *Fisiología médica*. 11 ed. Mexico: Editorial Manual Moderno S.A, 1987.
- Garmory HS, Chanter N, French NP, Bueschel D, Songer JG, Titball RW.** Occurrence of *Clostridium perfringens* β 2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol Infect* 2000; 124:61-67.
- Garrity GM, Winters M, Searles DB.** Taxonomic outline of the prokaryotic genera. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2 ed. U.S.A.: Bergey's Editorial Office, 2001.
- Gholamiandekhordi AR, Ducatelle R, Heyndrickx M, Haesebrouck F, Immerseel FV.** Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium*

- perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. Vet Microbiol 2006; 113:143-152.
- Gibert M, Jolivet-Reynaud C, Popoff MR.** Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. Gene 1997; 203:65-73.
- Gillespie J, Timoney J.** Hagan and Bruner's infectious diseases of domestic animals. 7 ed. U.S.A.: International Standart. 1981.
- Ginter A, Williamson ED, Dessy F, Coppe P, Fearn A, Titball RW.** Molecular variation between the α -toxins from the type strain (NCTC8237) and clinical isolates of *Clostridium perfringens* associated with disease in man and animals. Microbiology 1996; 142:191-198.
- Gkiourtzidis K, Frey J, Bourtzi-Hatzopoulou E, Iliadis N, Sarris K.** PCR detection and prevalence of α -, β -, β 2-, ϵ -, ι - and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery. Vet. Microbiol 2001; 82:39-43.
- Gonzales Zorn B.** Caracterización genética y papel en la patogénesis de SmcL, una esfingomielinasa C de *Listeria ivanovii* [Memoria para optar el grado de Doctor]. 2001. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de Patología Animal, Madrid.
- Guillouard I, Alzari PM, Saliou B, Cole ST.** The carboxy-terminal C2-like domain of α -toxin from *Clostridium perfringens* mediates calcium dependent membrane recognition. Mol Microbiol 1997; 26:867-139.
- Guillouard I, Alzari PM, Saliou B, Cole ST.** Use of site directed mutagenesis to probe structure-function relationships of alpha toxin from *Clostridium perfringens*. Infect Immun 1996; 64:2440-2444.
- Hatheway C.** Toxigenic clostridia. Clin Microbiol Rev 1990; 3:66-98.
- Hauschild AHW, Niilo L, Dorward WJ.** *Clostridium perfringens* type A infection of ligated loops in lambs. Appl Microbiol 1968; 16:1235-1239.
- Helmboldt CF, Bryant ES.** The pathology of necrotic enteritis in domestic fowl. Avian Dis 1971; 15:775-780.
- Herholz C, Miserez R, Nicolet J, Frey J, Popoff M, Gubert M, Gerber H, Straub R.** Prevalence of β 2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. J Clin Microbiol 1999; 37:358-361.
- Hirata Y, Minami J, Koyama M, Matsushita O, Katayama S, Jin F, Maeta H, Okabe A.** A method for purification of *Clostridium perfringens* phospholipase C

from recombinant *Bacillus subtilis* cells. Appl Environ Microbiol 1995; 61:4114-4115.

- Hummel R, Witte W, Kemmer G.** Zur Frage der wechselseitigen Übertragung von *Staphylococcus aureus* zwischen Mensch und Rind und der Milieuadaptation der Hämolyse und Fibrinolysebildung. Arch Exp Vet Med Leipzig 1976; 32:287-298
- Jepson M, Bullifent HL, Crane D, Flores-Díaz M, Alape-Girón A, Jayasekera P, Lingard B, Moss D, Titball RW.** Tyrosine 331 and phenylalanine 334 in *Clostridium perfringens* alpha-toxin are essential for cytotoxic activity. FEBS Lett 2001; 495:172-177.
- Jepson M, Howells A, Bullifent HI, Bolgiano B, Crane D, Miller J, Holley J, Jayasekera P, Titball RW.** Differences in the carboxy-terminal (putative phospholipid binding) domains of *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifermentans* phospholipases C influence the hemolytic and lethal properties of these enzymes. Infect Immun 1999; 67:3297-3301.
- Jin F, Matsushita O, Katayama S, Jin S, Matsushita C, Minami J, Okabe A.** Purification, characterization, and primary structure of *Clostridium perfringens* lambda-toxin, a thermolysin-like metalloprotease. Infect Immun 1996; 64: 230-237.
- Joclik WK, Willett HP.** Zinsser Microbiología. 20 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Veterinaria, 1991.
- Johannsen U, Menger S, Arnold P, Köhler B, Selbitz HJ.** Experimental *Clostridium perfringens* type A enterotoxaemia in unweaned piglets, Monatsh Veterinaermed, 1993; 48: 267-273.
- Jost BH, Billington CJ, Trinh HT, Buesschel DM, Songer JG.** Atypical *cpb2* genes, encoding beta2-toxin in *Clostridium perfringens* isolates of nonporcine origin. Infect Immun 2005; 73:652-656.
- Jost HB, Billington SJ, Trinh HT, Songer JG.** Association of genes encoding beta2 toxin and a collagen binding protein in *Clostridium perfringens* isolates of porcine origin. Vet Microbiol 2006; 115:173-182.
- Kalender H, Ertas HB, Ceninkaya B, Muz A, Aislan N, Kilic A.** Typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased sheep by multiplex PCR. Vet. Med-Czech 2005; 50:439-442.

- Kanakaraj R, Harris DL, Songer JG, Bosworth B.** Multiplex PCR assay for detection of *Clostridium perfringens* in feces and intestinal contents of pigs and swine feed. *Vet Microbiol* 1998; 63: 29-38.
- Karasawa T, Wang X, Maegawa T, Michiwa Y, Kita H, Miwa K, Nakamura S.** *Clostridium sordellii* phospholipase C: gene cloning and comparison of enzymatic and biological activities with those of *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifermentans* phospholipase C. *Infect Immun* 2003; 71: 641-646.
- Karpati G, Carpenter S, Melmed C, Eisen A.** Experimental ischemic myopathy. *J Neurol Sci* 1974; 23:129-161.
- Katayama S, Matsushita O, Jung CM, Minami J, Okabe A.** Promotor upstream bent DNA activates the transcription of the *Clostridium perfringens* phospholipase C gene in a low temperature-dependent manner. *EMBO J*. 1999; 18: 3442-3450.
- Katayama S, Matsushita O, Minami J, Mizobuchi S, Okabe A.** Comparison of the alpha-toxin genes of *Clostridium perfringens* type A and C strains: evidence for extragenic regulation of transcription. *Infect Immun* 1993; 61:457-463.
- Keyburn AL, Boyce JD, Vaz P, Bannam TL, Ford ME, Parker D, Di Rubbo A, Rood JI, Moore RJ.** NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathogens* 2008; 4:1-11.
- Keyburn AL, Sheedy SA, Ford ME, Williamson MM, Awad MM, Rood JI, Moore RJ.** Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect Immun* 2006; 74:6496-6500
- Komoriya T, Hashimoto A, Shinozaki A, Inoue M, Kohno H.** Study on partial purification of α -toxin produced from obligate anaerobe *Clostridium perfringens*. *Report Res Inst Ind Tech, Nihon University* 2007, 88:1-11.
- Kristensen SR.** Importance of various types of metabolic inhibition for cell damage caused by direct membrane damage. *Mol Cell Biochem* 1994; 140:81-84.
- Krug EL, Kent C.** Phospholipase C from *Clostridium perfringens*: preparation and characterization of homogenous enzyme. *Arch Biochem Biophys* 1984; 231:400-410.
- Kulkarni RR, Parreira VR, Sharif S, Prescott JF.** *Clostridium perfringens* antigens recognized by broiler chickens immune to necrotic enteritis. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13:1358-1362.

- Kulkarni RR, Parreira VR, Sharif S, Prescott JF.** Immunization of broiler chickens against *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. Clin Vaccine Immunol 2007; 14:1070-1077.
- Lebrun M, Filée P, Mousset B, Desmecht D, Galleni M, Mainil JG, Linden A.** The expression of *Clostridium perfringens* consensus beta2 toxin is associated with bovine enterotoxaemia syndrome. Vet Microbiol 2007; 120:151-157.
- Long JR, Pettit JR, Barnum DA.** Necrotic enteritis chickens. II. Pathology and proposed pathogenesis. Can J Comp Med 1974; 38:467-474.
- Luna Espinoza LR.** Genotipificación de cepas de *Escherichia coli* aislados de crías de alpacas con diarrea [Tesis para optar el título de Médico Veterinario]. 2009. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Lima.
- Lynch KL, Moskowitz M.** Relationship of route of inoculation and nature of toxin preparation to bioassay of *Clostridium perfringens* α -toxin in mice. J Bacteriol 1968; 96(6):1920-4.
- Macarie I, Cure C, Pop A.** Histopathology of natural *Clostridium perfringens* type A infection in mink. Lucr Stiint Inst Agron "Nicolae Balcescu" Med Vet 1980; 23:23-27.
- MacFarlane MG, Knight BCJG.** The biochemistry of bacterial toxins. I. lecithinase activity of *Cl.welchii* toxins. Biochem J 1941; 35:884-902.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J.** Biología de los microorganismos.8 ed. España: Editoreal Prentice Hall, 2001.
- Manteca C, Daube G, Jauniaux T, Linden A, Pirson V, Detilleux J, Ginter A, Coppe P, Kaeckenbeeck A, Mainil JG.** A role for the *Clostridium perfringens* β 2 toxin in bovine enterotoxaemia?. Vet. Microbiol 2002; 86:191-202.
- Marquis H, Doshi V, Portnoy DA.** The broad-range phospholipase C and metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. Infect Immun 1995; 63:4531-4534.
- Matsushita C, Matsushita O, Katayama S, Minami J, Takai K, Okabe A.** An upstream activating sequence containing curve DNA involved in activation of the *Clostridium perfringens* *plc* promoter. Microbiology 1996; 142: 2561-2566.
- McClane BA.** *Clostridium perfringens* enterotoxin and intestinal tight junctions. Trends Microbiol 2000; 8:145-146.

- Melo M, Medina G, Sánchez C, Condemayta Z, Soto A.** Influencia del manejo de un brote de enterotoxemia en crías de alpacas del CE La Raya-UNA-Puno. Res. II Cong. Mun. sobre Camélidos. 1999, Cusco p 138.
- Merchant IA, Packer RA.** Veterinary bacteriology and virology. 6ta ed. p 492-493, 505-509. Library of Congress Catalog Card. Iowa. 1961
- Miyakawa MEF, Uzal FA.** Morphologic and physiologic changes induced by *Clostridium perfringens* type A toxin in the intestine of sheep. Amer J Vet Reser 2005; 66:251-255.
- Miyamoto K, Chakrabarti G, Morino Y, McClane B.** Organization of the plasmid *cpe* locus in *Clostridium perfringens* type A isolates. Infect Immun 2002; 70:4261-4272.
- Miyamoto K, Wen Q, McClane B.** Multiplex PCR genotyping assay that distinguishes between isolates of *Clostridium perfringens* type A carrying a chromosomal enterotoxina gene (*cpe*) locus, a plasmid *cpe* with an IS1470-like sequence, or a plasmid *cpe* locus with an IS1151 sequence. J Clin Microbiol 2004; 42:1552-1558.
- Moro M.** Enfermedades infecciosas de las alpacas. Diarrea bacilar o enterotoxemia de las crías de las alpacas. Rev Camélidos Sudamericanos 1987; 4:8-13.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW.** Bioquímica de Harper. Mexico: El Manual Moderno, 2001.
- Nadas UG, Berkoglu A, Alp R.** Detection of *Clostridium perfringens* alpha antitoxin in the serum of healthy fowls and determination of its relationship with enterotoxaemia. Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Arastirma Enstisusu Dergisi 1991; 22:94-106.
- Nagahama M, Lida H, Nishioka E, Okamoto K, Sakurai J.** Roles of the carboxy-terminal region of *Clostridium perfringens* alpha-toxin. FEMS Microbiol Lett 1994; 120:297-302.
- Nagahama M, Michiue K, Mukai M, Ochi S, Sakurai J.** Mechanism of membrane damage by *Clostridium perfringens* alpha-toxin. Microbiol Immunol 1998; 42:533-538.
- Nagahama M, Michiue K, Sakurai J.** Membrane-damaging action of *Clostridium perfringens* alpha-toxin on phospholipid liposomes. Biochim Biophys Acta-Biomembr 1996; 1280:120-126.

- Nagahama M, Mukai M, Morimitsu S, Ochi S, Sakurai J.** Role of the C-domain in the biological activities of *Clostridium perfringens* alpha toxin. *Microbiol Immunol* 2002; 6: 647-655.
- Nagahama M, Mukai, M.; Ochi, S.; Sakurai, J.** Role of tryptophan-1 in hemolytic and phospholipase activities of *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Microbiol Immunol* 2000; 44:585-589.
- Nagahama M, Nakayama T, Michiue K, Sakurai J.** Site-specific mutagenesis of *Clostridium perfringens* alpha-toxin: replacement of Asp-56, Asp-130, or Glu-152 causes loss of enzymatic and haemolytic activities. *Infect Immun* 1997; 65:3489-3492.
- Nagahama M, Okagawa Y, Nakayama T, Nishioka E, Sakurai J.** Site directed mutagenesis of histidine residues in *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *J Bact* 1995; 177:1179-1185.
- Nauerby B, Pedersen K, Madsen M.** Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Vet Microbiol* 2003; 94: 257-266.
- Naylor CE, Eaton JT, Howells A, Justin N, Moss DS, Titball RW, Basak AK.** Structure of the key toxin in gas gangrene. *Nat Struct Biol* 1998; 5:738-46.
- Naylor CE, Jepson M, Crane DT, Titball RW, Miller J, Basak AK, Bolgiano B.** Characterisation of the calcium-binding C-terminal domain of *Clostridium perfringens* alpha toxin. *J Mol Biol* 1999; 294:757-770.
- Nicolet J.** Compendio de bacteriología médica veterinaria. 1 ed. España: Editorial Acribia S.A, 1986.
- Niilo L.** Enterotoxemic *Clostridium perfringens*. En: Pathogenesis of bacterial infections in animals. 1 ed Iowa: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 1986: 80-86.
- Novagen.** pET System Manual. 11 ed. Alemania. EMD Biosciences Inc, 2005.
- O`Callaghan RJ, Callegan MC, Moreau JM, Green L, Foster TJ, Hartford OM, Engel LS, Hill JM.** Specific roles of alpha-toxin and beta-toxin during *Staphylococcus aureus* corneal infection. *Infect Immun* 1997; 65:1571-1578.
- Ochi S, Miyawaki T, Matsuda H, Oda M, Nagahama M, Sakurai J.** *Clostridium perfringens* α -toxin induces rabbit neutrophil adhesion. *Microbiology* 2002; 148:237-245.

- Oha Umiña R.** Anatomía patológica de las diarreas infecciosas en crías de alpaca (*Lama pacos*) en la SAIS Aricoma Ltda.57 [Tesis para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista]. 1994. Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Puno.
- Oloubunmi PA, Taylor DJ.** *Clostridium perfringens* type A in enteric disease of pigs. Trop Vet 1985; 328-33.
- Ostroff RM, Vasil AI, Vasil ML.** Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 1990; 172:5915-5923.
- Ostroff RM, Wretlind B, Vasil ML.** Mutation in the haemolytic phospholipase C operon result in decreased virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 grown under phosphate-limiting conditions. Infect Immun 1989; 57:1369-1373.
- Otamiri T.** Phospholipase C-mediated intestinal mucosal damage is ameliorated by quinacrine. Fd Chem Toxic 1989; 27:399-409.
- Palacios C.** Caracterización anatomopatológica de enteropatías causantes de mortalidad en crías de alpaca. [Tesis para optar el título de Médico Veterinario]. 2004. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Lima.
- Palacios CA, Perales RA, Chavera AE, Lopez MT, Braga WU, Moro M.** *Eimeria macusaniensis* and *Eimeria ivitaensis* co-infection in fatal cases of diarrhoea in young alpacas (*Lama pacos*) in Perú. Vet Rec 2006; 158:344-345.
- Parish WE.** Necrotic enteritis of the fowl. III. The experimental disease. J Comp Pathol 1961; 71:377-393.
- Pelech SL, Vance DE.** Signal transduction via phosphatidylcholine cycles. Trends Biochem Sci 1989; 4:28-30.
- Pérez Janampa DR.** Genotipificación y subtipificación de *Clostridium perfringens* aisladas de crías de alpacas muertas por enterotoxemia [Tesis para optar el título de Médico Veterinario]. 2006. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Lima.
- Petit L, Gibert M, Popoff M.** *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends Microbiol 1999; 7:104-110.
- Pezo D, Franco E, García W, Leyva V.** Evaluación de una solución de antibióticos (ampicilina + sulfato de colistina) y consumo de calostro en la prevención

- neonatales en crías de alpacas. Res. II Cong. Mun. sobre Camélidos, Cusco 1999: 139.
- Popoff MR, Jestin A.** Enteropathogenicity of purified *Clostridium perfringens* enterotoxin in the pig. Am J Vet Res 1985; 46:2147-2148.
- Prehn N, Saez S, Arraigada M.** Estudios microbiológicos y clínicos de enterotoxemia por *Clostridium perfringens* en camélidos sudamericanos. Res. II Cong. Mun. sobre Camélidos. Cusco 1999: 140.
- Radostis OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW.** Medicina Veterinaria. 9 ed. London: Editorial Bailliere Tindbal, 2002.
- Ramírez A, Ellis R.** Nuevos conceptos sobre la enterotoxemia y colibacilosis en alpacas. Rev Camélidos Sudamericanos 1988; 6:9-17.
- Ramírez A.** Enfermedades infecciosas. En: Avances y Perspectivas del Conocimiento de los Camélidos Sudamericanos. 1 ed. Santiago de Chile: FAO. 1991: 265-89.
- Ramírez, A.** Alpaca *Clostridium perfringens* type A enterotoxemia: Purification and assays of the enterotoxin [In partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy]. 1987. Colorado State University, Colorado.
- Ramírez, A.** Aplicación de la enterotoxina de *Clostridium perfringens* tipo A en el diagnóstico y control de la enterotoxemia en camélidos sudamericanos. Avances sobre investigación en salud animal CSA. Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Bol. Div 1990; 33:11-24.
- Ramírez, A.** Avances de la Investigación sobre enteritis e inmunidad neonatal en la alpaca. Curso taller “Resultados de investigación del programa de rumiantes menores (1980-1989). Programa colaborativo de apoyo a la investigación en rumiantes menores. Arequipa, 1988:153-163.
- Ramírez, A.** Avances de la Investigación sobre enteritis e inmunidad neonatal en la alpaca. Curso taller “Resultados de investigación del programa de rumiantes menores (1980-1989). Programa colaborativo de apoyo a la investigación en rumiantes menores. Riobamba, 1989: 183-191.
- Ramírez, A.; D. Huamán; R. P. Ellis.** Enterotoxemia de la alpaca. Programa colaborativo de apoyo a la investigación en rumiantes menores. Serie reporte técnico, Lima 1985; 63:1-17.
- Ratz F, Szabo E, Szentmiklossy E.** Observations on the pathomorphology of necrotic enteritis in chickens. Magy Allatorv Lpaja 1989; 44:133-140.

- Rehman H, Awad WA, Lindner I, Hess M, Zentek J.** *Clostridium perfringens* alpha toxin affects electrophysiological properties of isolated jejuna mucosa of laying hens. *Poultry Science* 2006; 85:1298-1302.
- Rood J, Cole S.** Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol Rev* 1991; 55:621-648.
- Rood J.** Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annu. Rev. Microbiol* 1998; 52:333-360.
- Rosadio R, Londoño P, Pérez D, Castillo H, Véliz A, Llanco L, Yaya K, Maturrano L.** *Eimeria macusaniensis* associated lesions in neonate alpacas dying from enterotoxemia. *Vet Parasitol* 2009; (En prensa). doi:10.1016/j.vetpar.2009.10.010.
- Rosadio RH, Ameghino EF.** Coccidial infection in neonatal peruvian alpacas. *Vet Rec* 1994; 135:459-460.
- Saiman L, Carcalano G, Gruenert D, Prince A.** Comparison of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cell from cystic fibrosis patients and healthy subjects. *Infect Immun* 1992; 60:2808-2814.
- Sakurai J, Fuji Y, Shirotani M.** Contraction induced by *Clostridium perfringens* alpha toxin in the isolated rat ileum. *Toxicon* 1990; 28:411-418.
- Sakurai J, Nagahama M, Oda M.** *Clostridium perfringens* alpha-toxin: Characterization and mode of action. *J Biochem* 2004; 136:569-574.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 ed. U.S.A.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Satterlee LD, Walker HW.** Response of white mice to cells and culture constituents of *Clostridium perfringens*. *Appl Microbiol* 1969; 18(2): 240-244.
- Sawires SY, Songer JG.** Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for strain typing of *Clostridium perfringens*. *Anaerobe* 2005; 11:262-272.
- Sayed S, Fernandez-Miyakawa ME, Fisher DJ, Adams V, Poon R, Rood JI, Uzal FA, McClane BA.** Epsilon-toxin is required for most *Clostridium perfringens* type D vegetative culture supernatants to cause lethality in the mouse intravenous injection model. *Infect Immun* 2005; 73:7413-7421.
- Schalch B, Bader L, Schau H, Bergmann R, Rometsch A, Maydl A, Kebler S.** Molecular typing of *Clostridium perfringens* from a food-borne disease outbreak in a nursing home: ribotyping versus pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2003; 41:892-895.

- Schmiel DH, Miller VL.** Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microb Infect* 1999; 1(13):1103-1112.
- Schotte U, Truyen U, Neubauer H.** Significance of β 2-toxigenic *Clostridium perfringens* infections in animals and their predisposing factors. *J Vet Med* 2004; 51:423-426.
- Schulman FY, Montall RJ, Hauer PJ.** Gastroenteritis associated with *Clostridium perfringens* type A in black-footed ferrets (*Mustela nigripes*). *Vet Pathol* 1993; 30:308-310.
- Sear CL, Kaper JB.** Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev* 1996; 60:167-215.
- Shane SM, Koetting DG, Harrington KS.** The occurrence of *Clostridium perfringens* in the intestine of chicks. *Avian Dis* 1984; 28:1120-1124.
- Sheedy SA, Ingham AB, Rood JI, Moore RJ.** Highly conserved alpha-toxin sequences of avian isolates of *Clostridium perfringens*. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1345-1347.
- Shimizu T, Obtani K, Hirakawa H, Ohshima K, Yamashita A, Shiba T, Ogasawara N, Hattori M, Kuhara S, Hayashi H.** Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:996-1001.
- Shimizu T, Yamaguchi H, Otan K, Banu S, Hayashi H.** Clostridial VirR/VirS regulon involves a regulatory RNA molecule for expression of toxins. *Mol Microbiol* 2002b; 43:257-265.
- Si W, Gong J, Han Y, Yu H, Brennan J, Zhou H, Chen S.** Quantification of cell proliferation and alpha-toxin gene expression of *Clostridium perfringens* in the development of necrotic enteritis in broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73:7110-7113.
- Smedley JG, Fisher DJ, Sayeed S, Chakrabarti G, McClane BA.** The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2004; 152:183-204.
- Songer JG, Meer RR.** Genotyping of *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals. *Anaerobe* 1996; 2:197-203.
- Songer JG.** Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol* 1997; 5:156-161.

- Songer JG.** Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:216-234.
- Sparks SG, Carman RJ, Sarker MR, McClane BA.** Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. *J Clin Microbiol* 2001; 39:883-888.
- Stagnitta PV, Micalizzi B, Stefanini de Guzmán MA.** Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meats in San Luis, Argentina. *Anaerobe* 2002; 8:253-258.
- Stevens DL, Bryant AE.** Pathogenesis of *Clostridium perfringens* infection: mechanisms and mediators of shock. *Clin Infect Dis* 1997; 25 (suppl2), S160-S164.
- Stevens DL, Bryant AE.** The role of clostridial toxins in the pathogenesis of gas gangrene. *CID* 2000; 35:S93-100.
- Stevens DL, Mitten J, Henry C.** Effects of α and θ toxins from *Clostridium perfringens* on human polymorphonuclear leukocytes. *J Infect Dis* 1987; 156:324-333.
- Stevens DL, Troyer BE, Merrick DT, Mitten JE, Olson RD.** Lethal effects and cardiovascular effects of purified α and θ toxins from *Clostridium perfringens*. *Infect Dis* 1988; 157:272-279.
- Stevens DL.** The pathogenesis of clostridial myonecrosis. *Int J Med Microbiol* 2000; 290:497-502.
- Strunk SW, Smith CW, Blumberg JM.** Ultrastructural studies on the lesion produced in skeletal muscle fibers by crude type A *Clostridium perfringens* toxin and its purified alpha fraction. *Am J Pathol* 1967; 50:89-107.
- Sugahara T, Takahashi T, Yamya S, Ohsaka A.** Vascular permeability increase by α -toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. *Toxicon* 1977; 15:81-87.
- Takahashi A, Kondoh M, Masuyama A, Fujii M, Mizuguchi H, Horiguchi Y, Watanabe Y.** Role of C-terminal regions of the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxigenin in its interaction with claudin-4. *J Controlled Release* 2005; 108:56-62.
- Thelestam M, Flores-Díaz M, Alape-Girón A, Titball R, Pollesello P, Persson B, Moos M, Chaves OE, Lofrumento D, Cortés BX, Bergman T, von Eichel SC, Florin I.** A UDP-Glucose deficient cell mutant as a model to study the

molecular mechanism of cytotoxicity induced by *C. perfringens* phospholipase C in ischemic tissue. Zent bl Bakteriologie 1998; 52:184-191.

Thompson DR, Parreira VR, Kulkarni RR, Prescott JF. Live attenuated vaccine-based control of necrotic enteritis of broiler chickens. Vet Microbiol 2006; 113:25-34.

Timbermont L, Lanckriet A, Gholamiandehkordi AR, Pasmans F, Martel A, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. Origin of *Clostridium perfringens* isolates determines the ability to induce necrotic enteritis in broilers. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2009; 32:503-512.

Titball RW, Hunter SEC, Martin KL, Morris BC, Shuttleworth AD, Rubidge T, Anderson DW, Kelly DC. Molecular Cloning and nucleotide sequence of the alpha-toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. Infect Immun 1989; 57:367-76.

Titball RW, Leslie DL, Harvey S, Kelly D. Hemolytic and sphingomyelinase activities of *Clostridium perfringens* alpha-toxin are dependent on a domain homologous to that of an enzyme from the human arachidonic acid pathway. Infect Immun 1991; 59:1872-1874.

Titball RW, Naylor CE, Basak AK. The *Clostridium perfringens* α -toxin. Anaerobe 1999; 5:51-64.

Titball RW. Bacterial phospholipases C. Microbiol Rev 1993; 57:347-366.

Titball RW. Gas gangrene: an open and closed case. Microbiology 2005; 151: 2821-8.

Truscott RB, Al-Sheikhly F. Reproduction and treatment of necrotic enteritis in broilers. Am J Vet Res 1977; 38:857-861.

Tso JY, Siebel C. Cloning and expression of the phospholipase C gene from *Clostridium perfringens* and *Clostridium bifermentans*. Infect Immun 1989; 57:468-76.

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

Van Asten AJAM, Allaart J, Meeles AD, Gloudemans PWJM, Houwers DJ, Gröne A. A new PCR followed by MboI digestion for the detection of all

- variants of the *Clostridium perfringens cpb2* gene. *Vet Microbiol* 2008; 127:412-416.
- Vilei EM, Schlatter Y, Perreten V, Strau R, Popoff MR, Gibert M, Gönem A, Frey J.** Antibiotic-induced expression of a cryptic *cpb2* gene in equine β 2-toxicogenic *Clostridium perfringens*. *Mol Microbiol* 2005; 57:1570-1581.
- Walev I, Weller U, Strauch S, Foster T, Bhakdi S.** Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1996; 64:2974-2979.
- Walker N, Holley J, Naylor CE, Flores-Díaz M, Alape-Girón A, Carter G, Carr FJ, Thelestam M, Titball RW.** Identification of residues in the carboxy-terminal domain of *Clostridium perfringens* alpha toxin (phospholipase C) which affect its biological activities. *Arch Biochem Biophys* 2000; 384:24-30.
- Waters M, Savoie A, Garmory HS, Bueschel D, Popoff MR, Songer JG, Titball RW, McClane BA, Sarker MR.** Genotyping and phenotyping of beta2-toxicogenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal disease in piglets. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3584-3591.
- Whitehead C, Anderson DE.** Neonatal diarrhea in llamas and alpacas. *Small Ruminant Research* 2005; 61:207-215.
- Wierup M.** Equine intestinal clostridiosis, an acute disease in horses associated with high intestinal counts of *Clostridium perfringens* type A. *Acta Vet Scand Suppl* 1977; 62:1-182.
- Williamson ED, Titball RW.** A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. *Vaccine* 1993; 11:1253-1258.
- Worrall EE, Natalia L, Ronohardjo P, Tarmudjil P, Partoutomo S.** Enterotoxaemia in water buffaloes caused by *Clostridium perfringens* type A. *Penyakit-Hewan* 1987; 19:17-19.
- Yaya K, Rosadio R.** Ensayo de tres programas de vacunación anticlostridial en alpacas. *Rev Inv Vet Perú* 2005; 16:49-55.
- Yoo HS, Lee SU, Park KY, Park YH.** Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 35:228-232.

Zhao H, Miller M, Pfeiffer K, Buras JA, Stahl GL. Anoxia and reoxygenation of human endothelial cells decrease ceramide glucosyltransferase expression and activate caspases. *FASEB J* 2003; 17:723-734.

Zhao Y, Melville SB. Identification and characterization of sporulation-dependent promoters upstream of the enterotoxin gene (*cpe*) of *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* 1998; 180:136-142.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Evaluación de la curva de crecimiento y actividad lecitinasas de los aislados de *C. perfringens*

HORA	CONCENTRACIÓN BACTERIANA ¹ (OD _{620nm})				ACTIVIDAD LECITINASA ² (u.a./mL)			
	Aislado L1-2008	Aislado L21-2008	Media	SD	Aislado L1-2008	Aislado L21-2008	Media	SD
0	0.005	0.003	0.004	0.001	0.13	0.36	0.24	0.16
1	0.02	0.004	0.012	0.011	0.80	0.70	0.75	0.07
2	0.004	0.008	0.006	0.002	0.59	0.59	0.59	0.00
3	0.002	0.012	0.007	0.007	0.18	0.24	0.21	0.04
4	0.004	0.012	0.008	0.005	0.37	0.24	0.31	0.09
5	0.006	0.02	0.013	0.009	0.26	0.34	0.30	0.05
6	0.007	0.008	0.0075	0.001	0.41	0.31	0.36	0.07
7	0.061	0.007	0.034	0.038	0.25	0.35	0.30	0.07
8	0.106	0.063	0.0845	0.030	-0.05	0.46	0.20	0.36
9	0.171	0.125	0.148	0.032	0.04	0.35	0.19	0.22
10	0.205	0.203	0.204	0.001	-0.01	0.46	0.22	0.33
11	0.267	0.208	0.2375	0.041	0.30	0.44	0.37	0.10
12	0.315	0.238	0.2765	0.054	0.85	0.54	0.69	0.22
13	0.293	0.273	0.283	0.014	0.74	0.72	0.73	0.02
14	0.297	0.257	0.277	0.028	0.88	1.21	1.04	0.23
15	0.335	0.269	0.302	0.046	0.97	1.21	1.09	0.17
16	0.284	0.291	0.2875	0.004	1.42	1.16	1.29	0.18
17	0.3	0.361	0.3305	0.043	0.86	1.18	1.02	0.23
18	0.302	0.29	0.296	0.008	0.83	1.21	1.02	0.27
19	0.308	0.2988	0.3034	0.006	1.02	1.37	1.19	0.25
24	0.268	0.307	0.2875	0.027	0.85	0.79	0.82	0.04

(1) La concentración bacteriana fue expresada en valores absorbancia correspondientes a una longitud de onda de 620nm (OD_{620nm})

(2) La actividad lecitinasas de los sobrenadantes fue determinada según el método directo descrito en el presente trabajo y expresado en unidades arbitrarias (u.a.) por mL.
SD: Desviación estándar de las medias.

Anexo 2. Actividad lecitinasas de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas.

NUEVA CODIFICACIÓN AISLADO ¹	AISLADO	ESTADO BACTERIANO	GENOTIPO	SUBTIPO	ACTIVIDAD LECITINASA (u.a./mL) ²					CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE Cp-PLC ³
					A	B	C	Media	SD	
Ev-1a	L1-2008	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	6.0	6.0	6.1	6.0	0.071	ALTA
Ev-2a	L21-2008	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	5.2	5.3	5.2	5.2	0.050	ALTA
Ev-3a	L24-2008	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	5.1	5.0	4.9	5.0	0.099	ALTA
Ev-4a	L26-2008	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	6.1	6.0	6.1	6.1	0.025	ALTA
Ev-5a	DA6-2008	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	5.8	5.8	5.8	5.8	0.031	ALTA
Ev-1m	L10-2008	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	2.3	2.1	2.0	2.1	0.179	MEDIANA
Ev-2m	L12-2008	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	1.8	1.6	1.6	1.6	0.100	MEDIANA
Ev-3m	DA3-2008	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	1.2	1.1	1.2	1.2	0.024	MEDIANA
Ev-1b	A4-2006	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.7	0.8	0.8	0.8	0.048	BAJA
Ev-2b	L22-2008	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	-0.1	0.0	0.0	0.0	0.044	BAJA
Ev(β2)-1b	19-2005	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	-0.2	-0.2	-0.2	-0.2	0.005	BAJA
Ev(β2)-2b	A17-2006	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	-0.2	-0.2	-0.2	-0.2	0.007	BAJA
Es-1b	41-2005	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.7	0.9	0.3	0.6	0.285	BAJA
Es-2b	A8-2005	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.2	0.2	0.4	0.3	0.114	BAJA
Es-3b	P4b-2007	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.4	0.4	0.5	0.4	0.048	BAJA
Es-4b	P9b-2007	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.5	0.5	0.4	0.4	0.052	BAJA
Es-5b	PH1b-2007	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.4	0.3	0.3	0.4	0.077	BAJA
Es-6b	A1a-2007	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.8	0.6	0.1	0.5	0.317	BAJA
Es-7b	A12a-2007	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.5	0.5	0.6	0.5	0.040	BAJA
Es-8b	C13b-2007	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.7	0.7	0.7	0.7	0.027	BAJA
Es(β2)-1m	15-2005	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	1.0	1.0	0.9	1.0	0.059	MEDIANA
Es(β2)-1b	18-2005	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	0.6	0.6	0.6	0.6	0.013	BAJA
Es(β2)-2b	25-2005	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	-0.2	-0.2	-0.2	-0.2	0.013	BAJA
Es(β2)-3b	A13b-2007	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	0.4	0.4	0.3	0.3	0.076	BAJA

(1) Nueva codificación de los aislados con fines didácticos y comparativos en el presente estudio, elaborado de acuerdo a su estado bacteriano, subtipo y capacidad de producción de Cp-PLC.

(2) La actividad lecitinasas de los sobrenadantes bacterianos fue determinada según el método directo descrito en el presente estudio y expresada en unidades arbitrarias (u.a.) por mL. Se calculó en forma triplicada (A, B y C) para cada aislado, obteniéndose la media y la desviación estándar de las medias (SD).

(3) Capacidad de producción de Cp-PLC por los aislados, clasificación realizada en base a su actividad lecitinasas: baja (< 1 u.a./mL), mediana (1-3 u.a./mL) y alta (> 3 u.a./mL)

Anexo 3: Actividad hemolítica de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas

AISLADO	ESTADO BACTERIANO	GENOTIPO	SUBTIPO	ACTIVIDAD LECITINASA ¹		CAPACIDAD DE PRODUCCION DE Cp-PLC ²	ACTIVIDAD HEMOLITICA (u.a.h./mL) ³			
				u.a./mL	SD		A	B	Media	SD
Ev-1a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	6.0	0.071	ALTA	16	16	16	0.00
Ev-2a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	5.2	0.050	ALTA	16	16	16	0.00
Ev-3a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	5.0	0.099	ALTA	16	32	24	11.31
Ev-4a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	6.1	0.025	ALTA	32	32	32	0.00
Ev-5a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	5.8	0.031	ALTA	32	32	32	0.00
Ev-1m	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	2.1	0.179	MEDIANA	64	64	64	0.00
Ev-2m	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	1.6	0.100	MEDIANA	16	16	16	0.00
Ev-3m	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	1.2	0.024	MEDIANA	16	16	16	0.00
Ev-1b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.8	0.048	BAJA	4	2	3	1.41
Ev-2b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.0	0.044	BAJA	128	64	96	45.25
Ev(β2)-1b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	-0.2	0.005	BAJA	0	0	0	0.00
Ev(β2)-2b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	-0.2	0.007	BAJA	0	0	0	0.00
Es-1b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.6	0.285	BAJA	2	2	2	0.00
Es-2b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.3	0.114	BAJA	4	2	3	1.41
Es-3b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.4	0.048	BAJA	0	0	0	0.00
Es-4b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.4	0.052	BAJA	0	0	0	0.00
Es-5b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.4	0.077	BAJA	0	0	0	0.00
Es-6b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.5	0.317	BAJA	4	4	4	0.00
Es-7b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.5	0.040	BAJA	4	2	3	1.41
Es-8b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.7	0.027	BAJA	1	4	2.5	2.12
Es(β2)-1m	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	1.0	0.059	MEDIANA	0	0	0	0.00
Es(β2)-1b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	0.6	0.013	BAJA	0	0	0	0.00
Es(β2)-2b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	-0.2	0.013	BAJA	0	0	0	0.00
Es(β2)-3b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	0.3	0.076	BAJA	0	0	0	0.00
Medio BHI				0.0	0.000	BAJA	0	0	0	0.00

(1) La actividad lecitinasas de los sobrenadantes bacterianos fue determinada según el método directo descrito en el presente estudio y expresada en unidades arbitrarias (u.a.) por mL. Se calculó en forma triplicada para cada aislado, obteniéndose la media y la desviación estándar de las medias (SD).

(2) Capacidad de producción de Cp-PLC por los aislados, clasificación realizada en base a su actividad lecitinasas: baja (< 1 u.a./mL), mediana (1-3 u.a./mL) y alta (> 3 u.a./mL)

(3) La actividad hemolítica de los sobrenadantes bacterianos fue determinada según la metodología descrita por Titball *et al.* (1989) y expresada en unidades arbitrarias hemolíticas (u.a.h.) por mL. Se calculó en forma duplicada (A y B) para cada aislado, obteniéndose la media y la desviación estándar de las medias (SD).

Anexo 4. Actividad perfringolisina de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas

AISLADO	ESTADO BACTERIANO	GENOTIPO	SUBTIPO	ACTIVIDAD LECITINASA ¹		CAPACIDAD DE PRODUCCION DE Cp-PLC ²	ACTIVIDAD PERFRINGOLISINA ³ (u.a.h./mL)			
				(u.a./mL)	SD		A	B	Media	SD
Ev-1a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	6.0	0.071	ALTA	>128	>128	>128	0
Ev-2a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	5.2	0.050	ALTA	>128	>128	>128	0
Ev-3a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	5.0	0.099	ALTA	>128	>128	>128	0
Ev-4a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	6.1	0.025	ALTA	>128	>128	>128	0
Ev-5a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	5.8	0.031	ALTA	>128	>128	>128	0
Ev-1m	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	2.1	0.179	MEDIANA	>128	>128	>128	0
Ev-2m	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	1.6	0.100	MEDIANA	>128	>128	>128	0
Ev-3m	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	1.2	0.024	MEDIANA	>128	>128	>128	0
Ev-1b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.8	0.048	BAJA	2	2	2	0
Ev-2b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.0	0.044	BAJA	>128	>128	>128	0
Ev(β2)-1b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	-0.2	0.005	BAJA	0	0	0	0
Ev(β2)-2b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	-0.2	0.007	BAJA	0	0	0	0
Es-1b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.6	0.285	BAJA	1	1	1	0
Es-2b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.3	0.114	BAJA	0	0	0	0
Es-3b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.4	0.048	BAJA	0	0	0	0
Es-4b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.4	0.052	BAJA	2	2	2	0
Es-5b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.4	0.077	BAJA	2	2	2	0
Es-6b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.5	0.317	BAJA	2	2	2	0
Es-7b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.5	0.040	BAJA	2	2	2	0
Es-8b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.7	0.027	BAJA	2	2	2	0
Es(β2)-1m	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	1.0	0.059	MEDIANA	0	0	0	0
Es(β2)-1b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	0.6	0.013	BAJA	0	0	0	0
Es(β2)-2b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	-0.2	0.013	BAJA	0	0	0	0
Es(β2)-3b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	0.3	0.076	BAJA	0	0	0	0
BHI				0.0	0.000	BAJA	0	0	0	0

(1) La actividad lecitinasas de los sobrenadantes bacterianos fue determinada según el método directo descrito en el presente estudio y expresada en unidades arbitrarias (u.a.) por mL. Se calculó en forma triplicada para cada aislado, obteniéndose la media y la desviación estándar de las medias (SD).

(2) Capacidad de producción de Cp-PLC por los aislados, clasificación realizada en base a su actividad lecitinasas: baja (< 1 u.a./mL), mediana (1-3 u.a./mL) y alta (> 3 u.a./mL)

(3) La actividad perfringolisina de los sobrenadantes bacterianos fue determinada según la metodología descrita por Fisher *et al.* (2006) y expresada en unidades arbitrarias hemolíticas (u.a.h.) por mL. Se calculó en forma duplicada (A y B) para cada aislado, obteniéndose la media y la desviación estándar de las medias (SD).

Anexo 5. Actividad citotóxica de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas

AISLADO	ESTADO BACTERIANO	GENOTIPO	SUBTIPO	ACTIVIDAD LECITINASA ¹		CAPACIDAD DE PRODUCCION DE Cp-PLC ²	ACTIVIDAD CITOTOXICA ³
				u.a./mL	SD		
Ev-1a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	6.0	0.071	ALTA	POSITIVA
Ev-2a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	5.2	0.050	ALTA	POSITIVA
Ev-3a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	5.0	0.099	ALTA	POSITIVA
Ev-4a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	6.1	0.025	ALTA	POSITIVA
Ev-5a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	5.8	0.031	ALTA	POSITIVA
Ev-1m	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	2.1	0.179	MEDIANA	POSITIVA
Ev-2m	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	1.6	0.100	MEDIANA	POSITIVA
Ev-3m	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	1.2	0.024	MEDIANA	NEGATIVA
Ev-1b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.8	0.048	BAJA	NEGATIVA
Ev-2b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.0	0.044	BAJA	POSITIVA
Ev(β2)-1b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	-0.2	0.005	BAJA	NEGATIVA
Ev(β2)-2b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	-0.2	0.007	BAJA	POSITIVA
Es-1b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.6	0.285	BAJA	NEGATIVA
Es-2b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.3	0.114	BAJA	NEGATIVA
Es-3b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.4	0.048	BAJA	NEGATIVA
Es-4b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.4	0.052	BAJA	NEGATIVA
Es-5b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.4	0.077	BAJA	NEGATIVA
Es-6b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.5	0.317	BAJA	NEGATIVA
Es-7b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.5	0.040	BAJA	NEGATIVA
Es-8b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.7	0.027	BAJA	NEGATIVA
Es(β2)-1m	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	1.0	0.059	MEDIANA	NEGATIVA
Es(β2)-1b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	0.6	0.013	BAJA	NEGATIVA
Es(β2)-2b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	-0.2	0.013	BAJA	POSITIVA
Es(β2)-3b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	0.3	0.076	BAJA	NEGATIVA
BHI				0.0	0.000	BAJA	NEGATIVA

(1) La actividad lecitinasas de los sobrenadantes bacterianos fue determinada según el método directo descrito en el presente estudio y expresada en unidades arbitrarias (u.a.) por mL. Se calculó en forma triplicada para cada aislado, obteniéndose la media y la desviación estándar de las medias (SD).

(2) Capacidad de producción de Cp-PLC por los aislados, clasificación realizada en base a su actividad lecitinasas: baja (< 1 u.a./mL), mediana (1-3 u.a./mL) y alta (> 3 u.a./mL)

(3) La actividad citotóxica de los sobrenadantes bacterianos fue evaluada en línea celular HEp-2, el desdoblamiento celular (muerte celular) fue considerado como una reacción positiva a citotoxicidad.

Anexo 6. Actividad letal de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas

AISLADO	ESTADO BACTERIANO	GENOTIPO	SUBTIPO	ESTADO BACTERIANO	ACTIVIDAD LECITINASA ¹		CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE Cp-PLC ²	ACTIVIDAD LETAL ³	SIGNOS CLÍNICOS ³
					u.a./mL	SD			
Ev-1a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	Vegetativo	6.0	0.071	ALTA	NEGATIVO	MODERADO
Ev-2a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	Vegetativo	5.2	0.050	ALTA	NEGATIVO	MODERADO
Ev-3a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	Vegetativo	5.0	0.099	ALTA	NEGATIVO	MODERADO
Ev-4a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	Vegetativo	6.1	0.025	ALTA	NEGATIVO	MODERADO
Ev-5a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	Vegetativo	5.8	0.031	ALTA	NEGATIVO	MODERADO
Ev-1m	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	Vegetativo	2.1	0.179	MEDIANA	NEGATIVO	NINGUNA
Ev-2m	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	Vegetativo	1.6	0.100	MEDIANA	NEGATIVO	NINGUNA
Ev-3m	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	Vegetativo	1.2	0.024	MEDIANA	NEGATIVO	NINGUNA
Ev-1b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	Vegetativo	0.8	0.048	BAJA	NEGATIVO	NINGUNA
Ev-2b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	Vegetativo	0.0	0.044	BAJA	NEGATIVO	NINGUNA
Ev(β2)-1b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	Vegetativo	-0.2	0.005	BAJA	NEGATIVO	NINGUNA
Ev(β2)-2b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	Vegetativo	-0.2	0.007	BAJA	NEGATIVO	NINGUNA
Es-1b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	Esporulado	0.6	0.285	BAJA	NEGATIVO	NINGUNA
Es-2b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	Esporulado	0.3	0.114	BAJA	NEGATIVO	NINGUNA
Es-3b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	Esporulado	0.4	0.048	BAJA	NEGATIVO	NINGUNA
Es-4b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	Esporulado	0.4	0.052	BAJA	NEGATIVO	NINGUNA
Es-5b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	Esporulado	0.4	0.077	BAJA	NEGATIVO	NINGUNA
Es-6b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	Esporulado	0.5	0.317	BAJA	NEGATIVO	NINGUNA
Es-7b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	Esporulado	0.5	0.040	BAJA	NEGATIVO	NINGUNA
Es-8b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	Esporulado	0.7	0.027	BAJA	NEGATIVO	NINGUNA
Es(β2)-1m	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	Esporulado	1.0	0.059	MEDIANA	NEGATIVO	NINGUNA
Es(β2)-1b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	Esporulado	0.6	0.013	BAJA	NEGATIVO	NINGUNA
Es(β2)-2b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	Esporulado	-0.2	0.013	BAJA	NEGATIVO	NINGUNA
Es(β2)-3b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	Esporulado	0.3	0.076	BAJA	NEGATIVO	NINGUNA
BHI					0.0	0.000	BAJA	NEGATIVO	NINGUNA

(1) La actividad lecitinasas de los sobrenadantes bacterianos fue determinada según el método directo descrito en el presente estudio y expresada en unidades arbitrarias (u.a.) por mL. Se calculó en forma triplicada para cada aislado, obteniéndose la media y la desviación estándar de las medias (SD).

(2) Capacidad de producción de Cp-PLC por los aislados, clasificación realizada en base a su actividad lecitinasas: baja (< 1 u.a./mL), mediana (1-3 u.a./mL) y alta (> 3 u.a./mL)

(3) La actividad letal de los sobrenadantes bacterianos fue evaluada en ratones usando la vía intraperitoneal, en donde para una reacción positiva a letalidad se consideró como punto final de sobrevivencia el inicio de un severo desorden neurológico (incoordinación, ataxia, parálisis temblores musculares o convulsiones).

Anexo 7. Actividad enterotóxica de los aislados de *C. perfringens* de casos de enterotoxemia en alpacas

AISLADO	ESTADO BACTERIANO	GENOTIPO	SUBTIPO	ACTIVIDAD LECITINASA ¹		CAPACIDAD DE PRODUCCION DE Cp-PLC ²	ACTIVIDAD ENTEROTOXICA ³	
				u.a./mL	SD		Acumulación de fluido	Lesión de mucosa intestinal
Ev-1a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	6.0	0.071	ALTA	0.21	LEVE
Ev-2a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	5.2	0.050	ALTA	0.2	LEVE
Ev-3a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	5.0	0.099	ALTA	0.17	LEVE
Ev-4a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	6.1	0.025	ALTA	0.23	LEVE
Ev-5a	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	5.8	0.031	ALTA	0.00	LEVE
Ev-1m	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	2.1	0.179	MEDIANA	0.28	LEVE
Ev-2m	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	1.6	0.100	MEDIANA	0.13	LEVE
Ev-3m	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	1.2	0.024	MEDIANA	0.47	LEVE
Ev-1b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.8	0.048	BAJA	0.21	LEVE
Ev-2b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.0	0.044	BAJA	0.20	LEVE
Ev(β2)-1b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	-0.2	0.005	BAJA	0.00	LEVE
Ev(β2)-2b	Vegetativo	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	-0.2	0.007	BAJA	0.00	LEVE
Es-1b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.6	0.285	BAJA	0.21	LEVE
Es-2b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.3	0.114	BAJA	ND	LEVE
Es-3b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.4	0.048	BAJA	0.26	LEVE
Es-4b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.4	0.052	BAJA	0.00	LEVE
Es-5b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.4	0.077	BAJA	0.28	LEVE
Es-6b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.5	0.317	BAJA	0.19	LEVE
Es-7b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.5	0.040	BAJA	0.25	LEVE
Es-8b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁻</i>	0.7	0.027	BAJA	0.2	LEVE
Es(β2)-1m	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	1.0	0.059	MEDIANA	0.00	LEVE
Es(β2)-1b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	0.6	0.013	BAJA	0.00	LEVE
Es(β2)-2b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	-0.2	0.013	BAJA	0.00	LEVE
Es(β2)-3b	Esporulado	A	<i>cpe⁻cpb2⁺</i>	0.3	0.076	BAJA	0.00	LEVE
BHI				0.0	0.000	BAJA	0.12	

(1) La actividad lecitinasas de los sobrenadantes bacterianos fue determinada según el método directo descrito en el presente estudio y expresada en unidades arbitrarias (u.a.) por mL. Se calculó en forma triplicada para cada aislado, obteniéndose la media y la desviación estándar de las medias (SD).

(2) Capacidad de producción de Cp-PLC por los aislados, clasificación realizada en base a su actividad lecitinasas: baja (< 1 u.a./mL), mediana (1-3 u.a./mL) y alta (> 3 u.a./mL)

(3) La actividad enterotóxica de los sobrenadantes bacterianos fue evaluada según la prueba de asa intestinal ligada en conejo descrita en el presente estudio. Para ello se evaluó: (i) la acumulación de fluido intestinal obtenida de la razón entre el volumen (mL) y la longitud del asa intestinal ligada y (ii) las lesiones macro y microscópicas en la mucosa intestinal.