VERÓNICA YEPES-MEDINA[a]
LUIS-MIGUEL GOMEZ-OSORIO [a*]

ENTERITIS NECRÓTICA Y SU IMPACTO EN LA PRODUCCIÓN AVÍCOLA

RESUMEN

La enteritis necrótica (EN) es una enfermedad entérica de las aves de corral ampliamente extendida por todo el mundo, con importantes consecuencias sobre el rendimiento de los lotes, causada *por Clostridium perfringens* un bacilo Gram positivo, anaerobio, formador de esporas, comúnmente encontrado en el ambiente y en el tracto gastrointestinal de los humanos y de las aves como microbiota normal. *Clostridium perfringens* es un microorganismo con alto grado de intercambio genético, esto le permite la transferencia de factores de virulencia y le otorga la capacidad de producir las diferentes toxinas como resultado de la pérdida o ganancia de genes específicos. En definitiva, la ubicuidad de *Clostridium perfringens* sumada a la independencia de los factores de virulencia, denota el potencial patogénico de esta bacteria. La enfermedad se desarrolla como resultado de la infección de cepas patogénicas positivas como la toxina NetB y la presencia de factores predisponentes que habitualmente son requeridos para precipitar un brote de la enfermedad tales como el daño en la integridad de la mucosa intestinal, cambios en el pH del lumen y de la viscosidad del contenido; aspectos que provocan cambios de la microbiota intestinal y que afectan el sistema inmune de las aves. El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión profunda sobre los mecanismos de patogenicidad de *Clostridium perfringens,* sus toxinas y la respuesta inmune del hospedero durante la EN en aves.

Palabras claves: factores genéticos, respuesta inmune, *Clostridium perfringens*, NetB, enteritis necrótica.

INTRODUCCIÓN

La enteritis necrótica (EN) es una enfermedad de las aves de corral causada por las toxinas producidas por cepas patógenas de *Clostridium perfringens* (CP) tipo A, tipo C y tipo G (Swayne, 2020) y es una de las enfermedades entéricas ampliamente extendida por todo el mundo, con importantes consecuencias sobre el rendimiento de los lotes (Hofacre et al, 2018). Globalmente, las pérdidas económicas estimadas de la EN varían entre

[a] Alura Animal Health and Nutrition, Carrera 129 # 22b-57 Int 23, Bogotá Colombia.
*Autor para correspondencia lgomez@alura-ahn.com
Dirección de E-mail: lgomez@alura-ahn.com (L-M Gómez Osorio), vyepes@alura-ahn.com (V Yepes Medina)

2 a 6 billones de dólares al año (Lee et al, 2011; Kheravii et al, 2018) las cuales se explican por la afectación en el desarrollo óptimo de las aves, la desuniformidad de los lotes, la pérdida de aves por mortalidad generada y el costo asociado con la prevención y los tratamientos por largos períodos de tiempo (Kheravii et al, 2018).

La EN es una enfermedad multifactorial cuyos aspectos más frecuentes asociados con la patología son: composición de la dieta, estrés, presencia de otras enfermedades intestinales como coccidiosis (*Eimeria* spp) y las características de patogenicidad de *Clostridium perfringens*. Los altos niveles de proteína (animal) o las fuentes de proteínas de alta digestibilidad están asociados con un mayor riesgo de EN, porque la proteína no digerida es un sustrato de crecimiento para las bacterias patógenas, como CP. Los cambios en la dieta y en la densidad de las aves ocasionan un aumento de estrés y una alteración del sistema inmune de las aves, haciéndolas más susceptibles a infecciones como la coccidiosis, lo anterior se debe al daño en la mucosa causado por *Eimeria* maxima, que ofrece un entorno favorable para la proliferación de CP (Tsiouris, 2016; Paap et al, 2016; Dierick et al, 2019)

Durante las últimas cuatro décadas, los antibióticos se han usado como promotores de crecimiento en dietas para pollo de engorde, ponedoras y reproductoras con el fin de incrementar su rendimiento, la eficiencia del crecimiento y el mejoramiento del biobalance intestinal. De acuerdo con el reporte epidemiológico del Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades (ECDC), en 2017 el promedio en consumo de antimicrobianos fue de 23.4 Dosis Diaria Definida (DDD) por cada 1000 habitantes día. Adicionalmente, en el reporte por la Federación de Sanidad Europea los animales de granja consumieron 4.7 millones de kg o el 35% de todos los antibióticos administrados en la Unión Europea tanto para humanos como para animales. Los antibióticos han sido objeto de un escrutinio creciente por parte de algunos científicos, consumidores y reguladores gubernamentales debido al desarrollo potencial de bacterias patógenas humanas resistentes a los antibióticos después de un uso prolongado (Dahiya et al, 2006). Por lo tanto, hay una urgente necesidad de desarrollar estrategias alternativas e integradas que permitan la prevención y el manejo de esta enfermedad (Kheravii et al, 2018).

La prevención de EN se ha basado particularmente en el uso de anticoccidiales ionóforos y antibióticos promotores de crecimiento. En algunas regiones, incluyendo Estados Unidos y Asia se usan de manera combinada dichos productos. La enfermedad puede ocurrir de dos formas: clínica o subclínica. La forma clínica se caracteriza por aparición repentina, necrosis de la mucosa del intestino delgado y alta mortalidad, la cual puede variar entre el 2 al 10% y puede llegar hasta el 50% (Swayne, 2020). En ponedoras varía entre 0,54%

Figura 1: Lesiones en intestino delgado e hígado en pollo de engorde con enteritis necrótica. Mucosa del intestino delgado necrótica (Foto cortesía del Dr Chuck Hofacre y Dr. Matthew Jones, Southern Poultry Research Group)

a 1,98% y hasta en un 6,5% aproximadamente sin afectación de la postura (Dhillon et al, 2004; Lee et al, 2011). En la forma subclínica, los signos clínicos son bastante leves o a veces imperceptibles y no hay incrementos en la mortalidad. Los daños intestinales y en otros órganos (Figura 1, 2 y 3) llevan a pérdidas en la producción debido a disminución en la absorción, reducción de la tasa de crecimiento e incremento en la conversión (Timbermont et al, 2010). Ambas formas (clínica y subclínica) pueden ser responsables de tales pérdidas, pero es probable que los casos subclínicos representan la mayoría de las pérdidas económicas, ya que tales casos afectan

Figura 2: Lesiones en hígado e intestino delgado con focos necróticos y desprendimiento de mucosa (Foto cortesía del Dr Chuck Hofacre y Dr. Matthew Jones, Southern Poultry Research Group)

el desempeño y la eficiencia en ausencia de signos clínicos visibles (Wu et al, 2016)

AGENTE ETIOLÓGICO

El agente etiológico de EN corresponde a cepas patogénicas de CP tipo A, C y G (Swayne, 2020). En los últimos años se ha evidenciado que la cepa CP NetB positivo es probablemente una de las causas de la enfermedad. La importancia de NetB en EN se demostró cuando una cepa mutante netB no causó EN en un modelo experimental en pollo y la virulencia se restauró cuando el gen NetB funcional se introdujo de nuevo en la cepa de CP (Keyburn

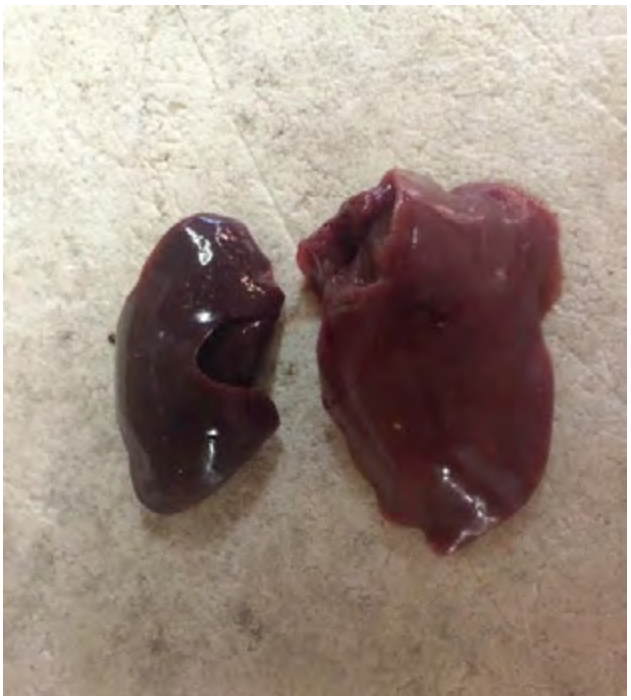

Figura 3: Lesiones en hígado de un pollo de engorde con enteritis necrótica. Nótese el hígado hemorrágico en la derecha, color rojo oscuro friable y con hepatomegalia (Foto cortesía del Dr Chuck Hofacre y Dr. Matthew Jones, Southern Poultry Research Group)

et al, 2009). La enfermedad se precipita cuando se genera una injuria intestinal como el daño de la integridad de la mucosa intestinal, cambios en el pH del lumen y de la viscosidad intestinal (Yu et al, 2017; Kiu et al, 2018).

CP es un bacilo Gram positivo (Figura 4), formador de esporas, anaerobio estricto. Sin embargo, esta bacteria también puede sobrevivir en la presencia de oxígeno y/o en bajas concentraciones de superóxido, lo que lo convierte en un anaerobio aero-tolerante (Kiu et al, 2018). Es comúnmente encontrado en el ambiente, particularmente en suelo y en plantas en descomposición (Bhunia, 2018) y en el tracto gastrointestinal de los humanos y de las aves como parte de la microbiota normal (Parent et al, 2016; Adhikari et al, 2020). No obstante, bajo ciertas condiciones predisponentes, CP puede actuar como un potente patógeno causando una serie de enfermedades histotóxicas y entéricas en humanos, cerdos, ovejas, vacas y aves (Wade et al, 2016).

CP produce al menos 20 toxinas diferentes (Rood, 2019) y su clasificación se basa en la

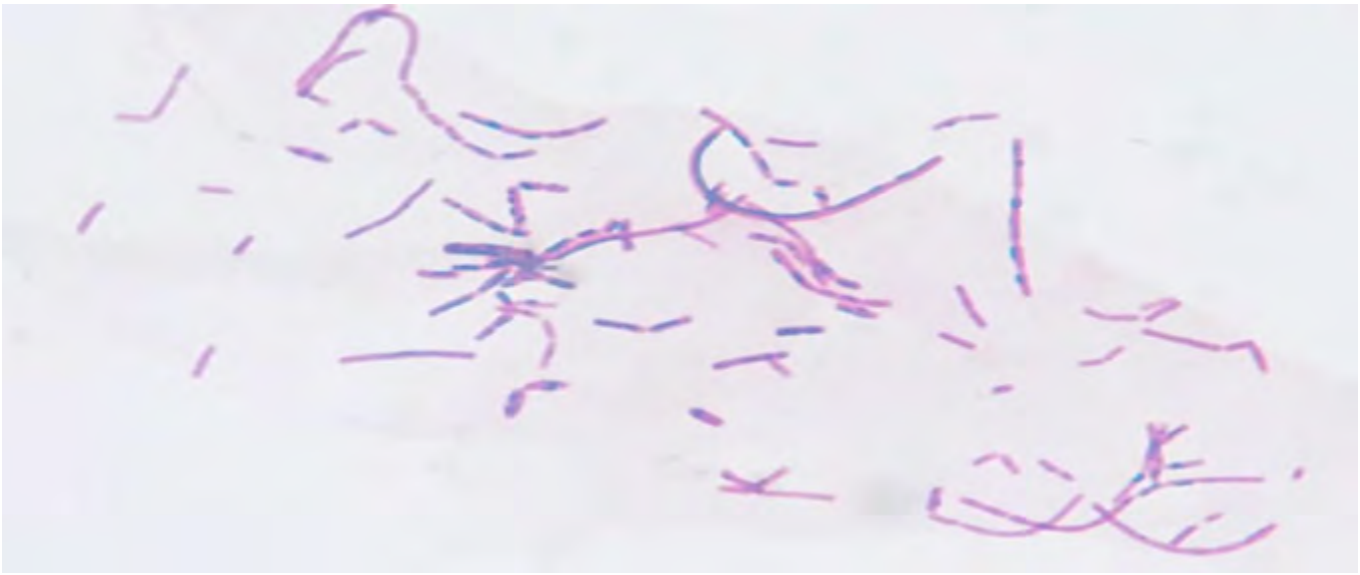

Figura 4: Coloración Gram *Clostridium perfringens.*

combinación de 6 toxinas extracelulares: alfa, beta, épsilon, iota, enterotoxina *Clostridium perfringes* (CPE) y toxina NetB (Swayne, 2020). Además de las anteriores toxinas produce varias enzimas hidrolíticas incluyendo lecitinasa, hialuronidasa, colagenasa, DNasas, sialidasas (afecta ácido siálico en la membrana celular del hospedero), amilasa, hemolisina (perfringolisina o PFO o toxina theta) (**Tabla 1**) (Bhunia, 2018).

CP es un microorganismo con alto grado de intercambio genético, esto le permite la transferencia de factores de virulencia y le otorga la capacidad de producir las diferentes toxinas como resultado de la pérdida o ganancia de los genes específicos (Morris et al, 2009). Es decir, no existen grandes diferencias entre los toxinotipos de CP porque algunos de estos factores de virulencia, codificados en plásmidos, pueden ser transferidos horizontalmente mediante transposones (Lepp et al, 2010). En definitiva, la ubicuidad de CP sumada a la independencia de los factores de virulencia denota el potencial patogénico de esta bacteria, especialmente si se tiene en cuenta que es parte de la microbiota normal del intestino (Morris et al, 2009).

Se han identificado tres loci asociados a EN altamente conservados que se designan como NEloc-1 (42 kb), NEloc-2 (11,2 kb) y NEloc-3 (5,6 kb). El gen NetB está ubicado en un locus

Tipo	**Toxinas**					
	alfa (α)	beta (β)	épsilon (ε)	Iota (ι)	CPE	NetB
A	+	-	-	-	+	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	+/-	-
D	+	-	+	-	+/-	-
E	+	-	-	+	+/-	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+
Gene	Plc	Cbp	Etx	Ia, Ib	Cpe	Neloc1
Localización gene	cromosoma	plásmido	plásmido	plásmido	plásmido/	
cromosoma	Plásmido					
Actividad biológica	Necrotizante					
Hemolítica						
Contracción del músculo liso	Dermonecrosis					
Edema						
Enterotóxica	Desconocido	Eritema				
Enterotóxica	Hemolítica					
Acciones	Fosfolipasa C					
Esfingomielinasa	Formador de poro		Formador de poro	Formador de poro		

Tabla 1: Adaptado. Clasificación de *C. perfringens* basada en la producción de toxinas (Bhunia, 2018, Rood, 2019; Swayne et al, 2020). *CPE: Enterotoxina

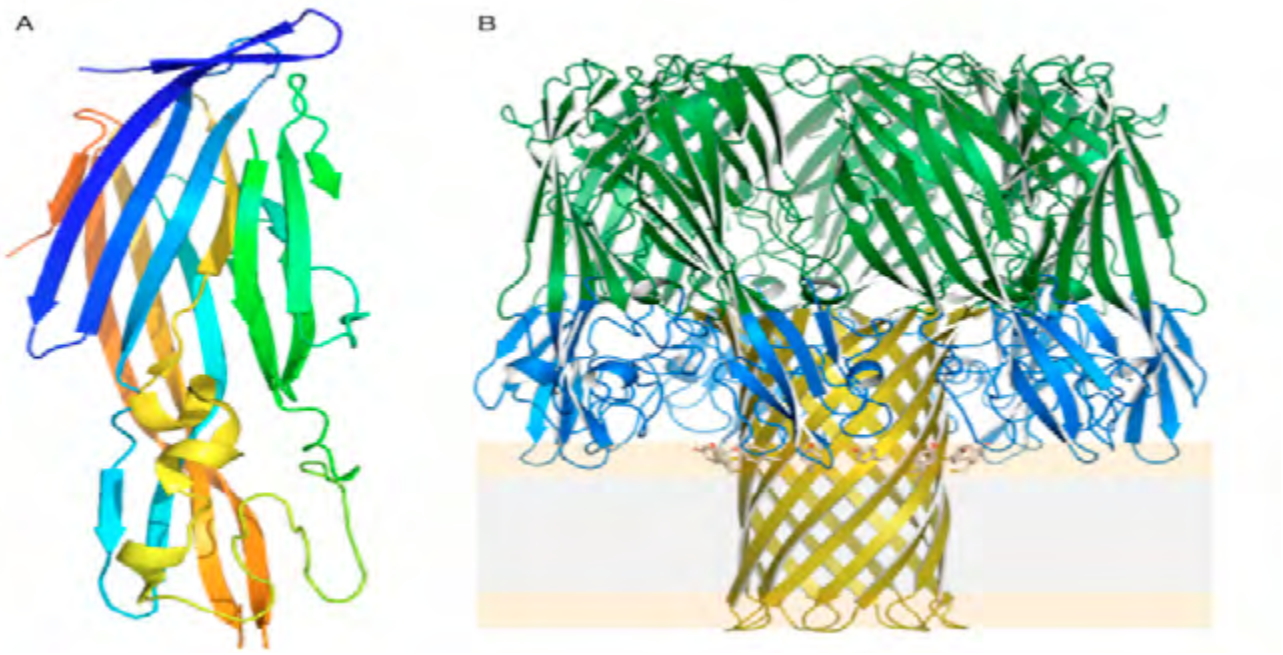

Figura 5: Estructura monomérica (A) y de poro de NetB (B) (adaptado de Rood et al, 2016)

de patogenicidad de 42 Kb NEloc1, presente en grandes cantidades en plásmidos conjugativos y comparte similitudes en su secuencia con la toxina beta y con la hemolisina alfa de *Staphylococcus aureus* (Lepp et al, 2010). La NetB es una toxina de tipo formadora de poro β de 33 kDa que causa lisis celular. La producción de la toxina NetB está controlada por dos componentes VirS y el sistema regulador ViR (Bhunia, 2018). (figura 5)

PATOGENICIDAD

La EN ocurre cuando CP prolifera en un alto número de unidades formadoras de colonia (ufc) en el tracto gastrointestinal. La población de CP en aves sanas varía entre 10^2-10^4 ufc/g de contenido intestinal comparado con 10^7-10^9 ufc/g en aves enfermas (Swayne, 2020). CP es una de las bacterias con mayor crecimiento establecido en 8-12 minutos a 43ºC y de 12-17 minutos a 37ºC. El rápido crecimiento predispone a la infección de los tejidos del hospedero, la cual podría darse en menos de 5 horas,

al tener un tiempo de generación menor al de bacterias comensales como *Escherichia coli* que es de 20 minutos a 37°C (Kiu et al, 2018).

La virulencia en CP es compleja y puede diferir entre las cepas. La producción de varias toxinas de CP es positivamente regulada por el sistema VirR/VirS, el cual incluye la toxina NetB, α-toxina, perfringolisina O (PFO) y la β-toxina y recientemente se incluyó al quorum sensing (QS) en la regulación de la expresión de las proteínas involucradas en la virulencia de CP (Yu et al, 2017). Los sistemas QS coordinan comportamientos colectivos en respuesta a la densidad de la población celular a través de la producción y detección de pequeñas moléculas extracelulares llamadas autoinductores (AIs). CP codifica al menos dos sistemas QS: LuxS y Agr-Like. El sistema QS LuxS es común en bacterias gram positivas y gram negativas y Agr-Like se encuentra solamente en bacterias gram positivas, este sistema está representado por el gen regulador (Agr) de *Staphylococcus aureus* y se compone de cuatro genes transcritos: *Agrb, Agrd, Agrc y Agra.* Recientemente fueron identificados genes ortólogos (genes o secuencias genéticas similares entre sí) de *Agrd* y *Agrb* en el genoma de CP y se encontró que regulan positivamente la producción de varias toxinas incluyendo α-toxina, perfringolisina O (PFO), β-toxina, ε-toxina y la enterotoxina CPE. Además, se demostró que Agr-like regula positivamente la producción de NetB y la citotoxicidad celular asociada con EN (Yu et al, 2017; Kiu et al, 2018)

La principal acción de las toxinas de CP involucra la unión inicial a un receptor localizado en la membrana plasmática de los enterocitos seguido de la activación de vías extracelulares y una variedad de efectos citopáticos que llevan a la muerte celular (Navarro et al, 2018). La vía intracelular para la acción de la enterotoxina CPE involucra receptores celulares denominados claudinas, estas son una familia de polipéptidos únicos de 21 a 27 kDa que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de las propiedades normales de las uniones estrechas en los enterocitos (Shrestha et al, 2019). Se conocen como proteínas de unión estrecha (tight junctions) y forman un sello similar a una crema-

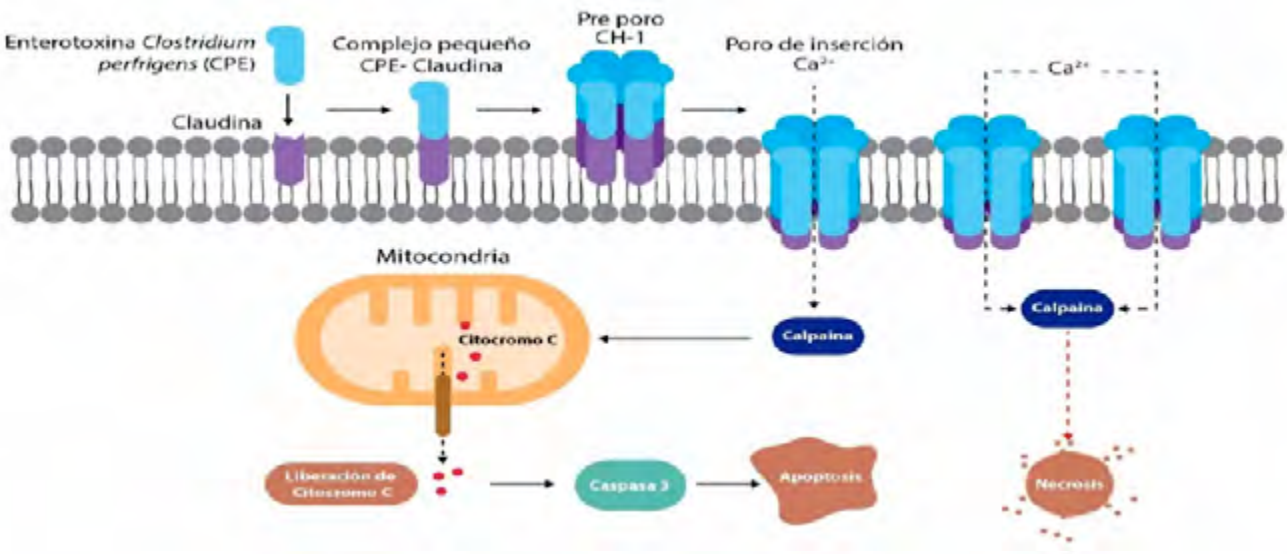

Figura 6: Mecanismo de muerte celular activado por enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE). (Navarro et al, 2018)

llera que limita y regula la permeabilidad celular y que es esencial para las barreras tisulares (Veshnyakova et al, 2010). La unión inicial de la enterotoxina CPE a las claudinas resulta en la formación de un pequeño complejo claudina-CPE compuesto por 6 estructuras las cuales dirigen la oligomerización de la enterotoxina y la formación de un pre-poro en la membrana plasmática, denominado CH-1 (Uzal et al, 2015). La formación del poro comienza con el ensamblaje de una parte de la proteína de la enterotoxina CPE en la membrana plasmática del enterocito, dando lugar al incremento en el flujo de Ca^{+2}, el cual estimula la actividad de las calpaínas que a su vez conducen a la activación de la caspasa 3 y por ende de la apoptosis (Figura 6). (Uzal et al, 2015; Shrestha et al, 2019)

La muerte de enterocitos en la EN aviar se produce como consecuencia de una destrucción de la lámina propia, la matriz extracelular y las uniones estrechas. La lámina propia está infiltrada e hiperémica con presencia de células inflamatorias, especialmente en la interfaz del dominio basal de los enterocitos y la lámina propia. Estas áreas se vuelven edematosas, lo que ocasiona cambios en la integridad estructural entre los enterocitos y la lámina propia (M`Sadeq et al. 2015)

RESPUESTA INMUNE CONTRA *Clostridium perfringens*

El mecanismo por el cual los patógenos bacterianos como CP se unen a las células epiteliales comienza con el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y receptores de reconocimiento de inmunidad innata como los receptores tipo Toll (TLR). Se ha esta-

El programa más innovador y eficaz
para el **CONTROL DE INTOXICACIONES Y MICOTOXINAS**

¡La respuesta inmediata contra el desafío tóxico!

1. **Fitobiótico (compuesto poli-fenólico)**
   Acción anti-inflamatoria & anti-oxidante
   Estrés oxidativo ⇥Glucocorticoides ⇥ insulina
2. **Protege órganos de alta demanda metabólica.**
   Hígado, Pancreas, Riñon, intestino.
3. ↑↑ **Absorción intestinal & Biodisponibilidad**
   Composición única: Complejo de **silimarina fosfátido.**
4. **Regenerador celular**
   Estimula síntesis de **ARN Polimerasa**
   ➥ Promoviendo la síntesis protéica
5. **Previene la peroxidación lipídica** y destrucción de membranas plasmáticas de las células.

Realiza la detoxificación de las micotoxinas ***a través de mecanismos enzimáticos innovadores.***

@VetancoColombia

vetanco

blecido que los pollos tienen al menos 10 TLR que se expresan en la superficie celular y en el retículo endoplásmico. El TLR2 reconoce peptidoglicanos de bacterias gram positivas como CP (Zaytsoff et al, 2020). Las interacciones entre los PAMPs y los TLR desencadenan una cascada de eventos de señalización celular que dan como resultado la estimulación de genes que codifican para citoquinas proinflamatorias y por ende la activación de células del sistema inmune innato y adquirido. Entre las células activadas más importantes se puede mencionar los linfocitos T ayudadores Th1, Th2, Th17 y Treg (Oh and Lillehoj, 2016). Estos eventos de señalización culminan en la secreción de varias citoquinas, como la interleuquina proinflamatoria (IL)-1, el interferón- γ (IFN- γ), la IL-13, la IL-17 por las células y el factor de crecimiento transformante (TGF)- β e IL -10 (Zaytsoff et al, 2020). Los mecanismos de señalización de la respuesta inflamatoria asociada con la infección por CP están modulados por las linfocitos Th2 y Th17, por lo que cualquier estrategia futura para reducir los efectos negativos de la EN debe seleccionarse en función de su potencial para inducir la secreción de citoquinas tipo Th2 y Th17 (Fascina and Lillehoj, 2019; Zaytsoff et al, 2020)

RELACIÓN INFECCIÓN POR *Eimeria maxima* Y EN

La coccidiosis es una enfermedad entérica causada en las aves por numerosas especies de Eimeria. Algunas especies (*Eimeria praecox, Eimeria mitis o Eimeria acervulina*) producen coccidiosis clínica menos grave que otras (*Eimeria brunetti, Eimeria maxima, Eimeria necatrix y Eimeria tenella*) (M`Sadeq et al. 2015; López et al, 2020). Eimeria coloniza el intestino delgado y destruye las células epiteliales como consecuencia de las etapas intracelulares de su ciclo de vida, el daño en el lumen intestinal permite la filtración de proteínas plasmáticas las cuales son usadas como sustrato de crecimiento por cepas de CP. Además, la infección por coccidiosis, induce una respuesta inflamatoria mediada por células T que potencia la mucogénesis intestinal y esto tiene un efecto secundario negativo de intensificar la tasa de proliferación de CP, potentes bacterias mucolíticas que usan el moco como fuente de energía (Timbermont et al, 2011). Así se obtiene el máximo beneficio por parte de la bacteria, derivado de una mayor disponibilidad de nutrientes liberados por la infección de las Eimerias, especialmente

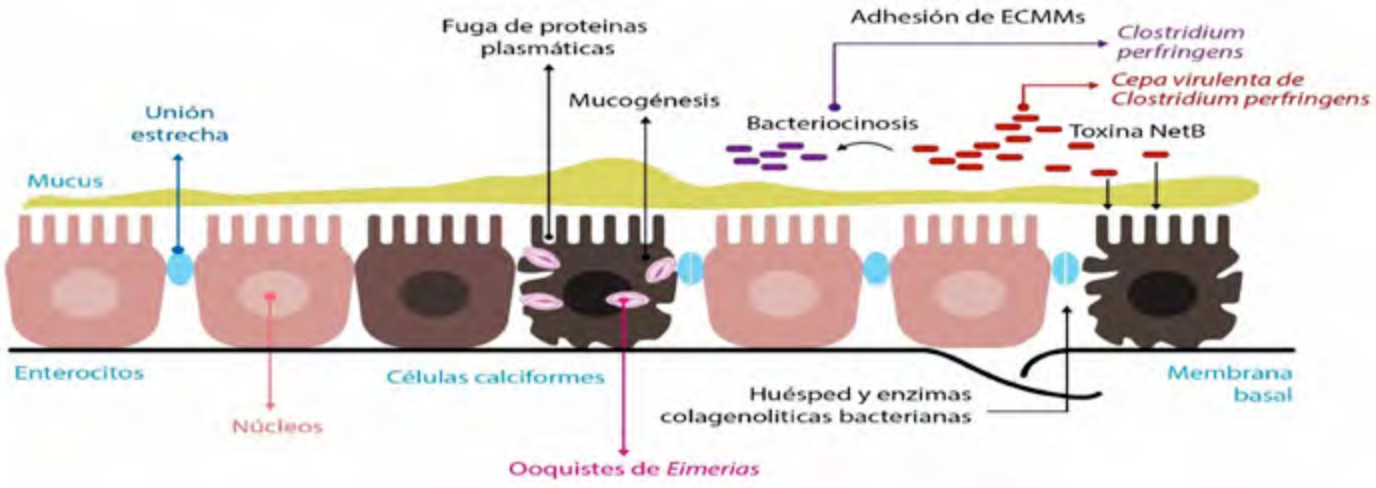

Figura 7 Interacción *Eimeria- C. perfringens* para causar daño en intestino (Adaptado de Timbermont et, al 2011). ECMMs*: Moléculas de matriz extracelular.

por *Eimeria maxima* (Liu et al, 2019). Debido al daño intestinal inducido por *Eimeria maxima*, a las toxinas y enzimas colagenolíticas NetB, CP puede colonizar el tracto digestivo y dar lugar a la EN. (Figura 7) (Paap et al, 2016).

CONCLUSIONES

Las enfermedades entéricas, principalmente la EN son una preocupación importante en la industria avícola, debido a las pérdidas de producción, aumento de la mortalidad, reducción del bienestar de las aves y mayor riesgo de contaminación de productos avícolas para consumo humano.

La EN, en pollos se desarrolla como resultado de la infección de cepas patogénicas de *Clostridium perfringens NetB positivo* y la presencia de factores predisponentes. Los elementos predisponentes incluyen elementos que cambian directamente las propiedades físicas y químicas del intestino, como daño de la superficie epitelial, inducción de la producción de moco o cambios en los tiempos de tránsito intestinal; factores que provocan disrupción de la microbiota intestinal y aspectos que afectan el estado inmunitario de las aves.

La infección por CP está modulada por linfocitos Th2 y Th17, por lo que cualquier estrategia futura para reducir los efectos negativos de la EN debe seleccionarse en función de su potencial para inducir la secreción de dicho perfil de citoquinas

REFERENCIAS

Adhikari, P. Kiess, A. Adhikari, R and Jha, R. 2020. An approach to alternative strategies to control avian coccidiosis and necrotic enteritis. 2020 J. Appl. Poult. Res. 29:515–534 https://doi.org/10.1016/j.japr.2019.11.005

Abdelqader, A and Al- Fataftah, A.R. 2016. Effect of dietary butyric acid on performance, intestinal morphology, microflora composition and intestinal recovery of heat-stressed broilers. Livestock Science, http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2015.11.026

Bannam, T.L. Xan, Y.Y. Harrison, P.F. Seeman, T. Keyburn, A.L. Stubenrauch, C. Weeramantri, L.H. Cheung, J.K. McClane, B.A. Boyce, J.D. Moore, R.J. Rood, J.L. 2011. Necrotic Enteritis-Derived *Clostridium perfringens* strain with three closely related independently conjugative toxin and antibiotic resistance plasmids. American Society of Microbiology, doi: 10.1128/mBio.00190-11

Bhunia, A.K. 2018. *Clostridium botulinum, Clostridium perfringens, Clostridium difficile*. Foodborne Microbial Pathogens, Food Science Text Series, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7349-1_12

Cooper, K.K. Songer, J.G. 2010. Virulence of Clostridium perfringens in experimental model poultry necrotic enteritis. Veterinary Microbiology 142, 323-328.

Dahiya, J.P. Wilkie, D.C. Van Kessel, A.G. Drew, M.D. 2006. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. Animal Feed Science and Technology 129, 60-88.

Dierick, E. Hirvonen, O.P. Haesebrouck, F. Ducatelle, R. Van Inmerseel, F. Goossens, E. 2019. Rapid growth predisposes broilers to necrotic enteritis. Avian Pathology, doi: 10.1080/03079457.2019.1614147.

Dhillon, A.S. Roy, P. Lauerman, L. Schaberg, D. Weber, S. Bandli, D and Wier, F. 2004. Hight mortality in eggs layers as a result of necrotic enteritis. Avian Diaseases,

https: //doi.org/10.1637/7113

Domínguez, I.2015. Fisiopatología de la coccidios y enteritis bacteriana. Elanco Animal Health. aviNews,83-89.

European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2018.

Fasina, Y.O and Lillehol, H.S. 2019. Characterization of intestinal immune response to *Clostridium perfringens* infection in broiler chickens. Poultry Science 98:188-198, http://dx.doi.org/103382/ps/pey390

Hofacre C.L, Smith J.A and Mathis G.F 2018. An optimist's view on limiting necrotic enteritis and maintaining broiler gut health and performance in today's marketing, food safety, and regulatory climate. Poultry Science. Jun 1;97(6):1929-1933. doi: 10.3382/ps/pey082.

Keyburn, A.L. Yan, X.X. Bannam, T.L. Van Immerseel, F. Rood, J.L and Moore, R.J. 2009. Association between avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* strains expressing NetB toxin. Vet. Res. (2010). 41:21, doi: 10.1051/vetres/2009069

Kheravii, S.K, Swick R.A, Choct, M and Wu, S-B. 2018. Effect of oat hulls as a free choice feeding on broiler performance, short chain fatty acids and microflora under a mild necrotic enteritis challenge, *Animal Nutrition Journal*, doi: 10.1016/j.aninu.2017.11.003.

Kiu, R and Hall, L.J.2018. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. Emerging Microbes & infections, doi: 10.1038/s41426-018-0144-8

Lee, K.W. Lillehoj, H.S. Jeong, W. Jeoung, H.Y. and An, D.J. 2011. Avian necrotic enteritis: Experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. Poultry Science 90:1381-1390.

Lepp, D. Roxas, B. Parreira, V.R. Marri, P.R. Rosey, E.L. Gong, J. Glenn Songer, J. Vedantam, G and Prescott, J.F. 2010. Identification of Novel Pathogenicity Loci in *Clostridium perfringens* strains that cause avian necrotic enteritis. Plos one, doi: 10.1371/journal.pone.0010795.

López-Osorio. S, Chaparro-Gutiérrez J.J and Gómez-Osorio L.M.2020. Overview of Poultry Eimeria Life Cycle and Host-Parasite Interactions. Front. Vet. Sci. 7:384. doi: 10.3389/fvets.2020.00384

Moore, R.J. 2016. Necrotic enteritis predisposing factors in broiler chickens. Avian Pathology, doi: 10.1080/03079457.2016.1150587.

Morris, W. E and Fernández-Miyakawa, M. E. 2009. Toxinas de *Clostridium perfringens*, Revista Argentina de Microbiología, vol 41, No 4, 251-260.

M`Sadeq, S.A, Wu, S. Swick, R.A and Choct, M. 2015. Towards the control of necrotic enteritis in broiler chickens with in feed antibiotics phasing-out worldwide. Animal nutrition. http://www.keaipublishing.com/en/journals/aninu.

Navarro, M.A, McClane, B.A and Uzal, F.A. 2018. Mechanisms of action and cell death associated with *Clostridium perfringens* toxins. Journal Toxins, 10, 212; doi:10.3390/toxins10050212.

Oh, S.T and Lillehoj, H.S. 2016. The role of host genetic factors and host immunity in necrotic enteritis. Avian Pathology, http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2016.1154503.

Paap, P and Gutiérrez, M.P. 2016. Enteritis necrótica y coccidiosis, papel multifactorial del butirato en la salud intestinal. NutriNews 9-10.

Parent, E. Archambault, M. Charleboys, A. Bernier-Lachance, J and Boulianne, M. 2016. A chicken intestinal ligated loop model to study the virulence of *Clostridium perfringens* isolates recovered from antibiotic-free chicken flocks. Avian Pathology, doi: 10.1080/03079457.2016.1228825

Rood, J.L. Keyburn, A.L and Moore, R.J. 2016. NetB and necrotic enteritis: the hole movable story. Avian Pathology, doi: 10.1080/03079457.2016.1158781

Rood, J.L. Adams, V. Lacey, J. Lyras, D. McClane, B.A. Melville, S.B. Moore, R.J. Popoff, M.R. Sarker, M.R. Songer, J.G. Uzal, F.A and Van Immerseel, F.2019. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. Anaerobe 53: 5-10. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.04.011

Shrestha, A. Uzal, F.A and McClane, B.A. 2019. Enterotoxic Clostridia: *Clostridium perfringens* enteric diseases. Microbiol Spectr. 2018 Sep; 6(5): 10.1128/microbiolspec.GPP3-0003-2017. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0003-2017

Skrivanová, E. Marounek, M. Dlouha, G. and Kanka, J. 2005. Susceptibility of *Clostridium perfringens* to C2-C8 fatty acids. Letters in Applied Microbiology 41, 71-87.

Skinner, J.T. Bauer, S. Young, V. Pauling, G and Wilson, J. 2010. An Economic Analysis of the impact of subclinical (mild) Necrotic enteritis in broilers chickens. American Association of Avian Pathologists. Avian Diseases, Vol 54, No 4, 1237-1240.

Swayne, D.E. 2020. Diseases of Poultry. 14th Edition. Page: 972-976

Timbermont, L. Lanckiet, A. Dewulf, J. Nollet, N. Schwarzer, K. Haesebrouck, F. Ducatelle, R and Van Immerseel, F. 2010. Control of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils. Avian Pathology 39:2, 117-121.

Timbermont, L. Haesebrouck, F. Ducatelle, R and Van Immerseel, F. 2011. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. Avian Pathology 40 (4), 341-347.

Tsiouris, V.V. 2016. Poultry management: a useful tool for the control necrotic enteritis in poultry. Avian Pathology, doi:10.1080/3079457.2016.1154502

Uzal, F.A. McClane, B.A. Cheung, J.K. Theoret, J. Garcia, J.P. Moore, R.J and Rood, J.I. 2015. Animal models to study the pathogenesis of human and animal *Clostridium perfringens* infections. Vet Microbiol, 179(1-2): 23-33, doi: 10.1016/j.vetmic.2015.02.013.

Veshnyakova, A. Protze, J. Rossa, J. Blasig, I.E. Krause, G and Piontek, J. 2010. On the interaction of *Clostridium perfringens* enterotoxin with claudins. Toxins, 2, 1336-1356; doi: 10.3390/toxins2061336.

Wade, B. Keyburn, A.L. Haring, V. Ford, M. Rood, J.I and Moore, R.J. 2016. The adherent abilities of *Clostridium perfringens* strains are critical for pathogenesis of avian necrotic enteritis. Veterinary Microbiology 197 (53-61). http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.10.028

Wu, S.B. Rodgers, N.J. Cui, G. Sun, Y and Choct, M. 2016. Dynamics of Intestinal metabolites and morphology in response to necrotic enteritis challenge in broilers chickens. Avian Pathology, doi: 10.1080/03079457.2016.1140896.

Yu, Q. Lepp, D. Gohari, I.M. Wu, T. Zhou, H. Yin, X. Prescott, J.F. Nie, S.P. Xie, M.Y. Gong, J. (2017). The Agr-like quorum sensing system is required for necrotic enteritis pathogenesis in poultry caused by *Clostridium perfringens*. Infection and Immunity, doi: 10.1128/IAI.00975-16.

Zaytsoff, J.M.S, Lyons, S.M. Garner, A.M. Uwiera, R.R. Zandberg, W.F. Abbott, D.W and Inglis, G.D. 2020. Host responses to *Clostridium perfringens* challenge in a chicken model of chronic stress.