

Alexis de Matos Gomes

**ISOLAMENTO E TIPIFIÇÃO GENOTÍPICA DE  
*Clostridium perfringens* EM FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Francisco Carlos Faria Lobato

Belo Horizonte  
UFMG – Escola de Veterinária  
2007

G633i Gomes, Alexis de Matos, 1974-  
Isolamento e tipificação genotípica de *Clostridium perfringens* em  
frangos de corte) / Alexis de Matos Gomes. – 2007.  
38 p. : il.

Orientador: Francisco Carlos Faria Lobato  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,  
Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Frango de Corte – Doenças – Teses. 2. *Clostridium perfringens* -  
Teses. 3. Intestinos – Doenças – Teses. I. Lobato, Francisco Carlos  
Faria. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.  
III. Título.

CDD – 636.508 96

## **Assinaturas**



## Dedicatória

Às pessoas simples, sobretudo...

... aos meus avós paternos, Benedito Luiz Policarpo (*in memorian*) e Maria Pedra Policarpo (*in memorian*), e avós maternos José Xavier Matos (*in memorian*) e Maria do Divino Câmara.

---

## Epígrafe

“Se eu fosse jovem, e mesmo na minha idade, se eu fosse válido, me tornaria aluno de Veterinária: as leituras das obras veterinárias me deixam com a cabeça em fogo.”

Louis Pasteur

“Mesmo quando não se alcança êxito, é nobre e glorioso haver-se tentado qualquer realização grande, nobre e bela”.

George Clemenceau

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pelo ser que sou, pequena parte de sua grandiosa obra, e por ter me cercado de meios e pessoas necessárias para a realização deste trabalho.

À meus pais Jésus Arnaldo Gomes e Natália de Matos Gomes pela formação recebida e apoio em todos os momentos.

Aos meus irmãos Arnaldo de Matos Gomes, Anderson de Matos Gomes, Marcos Lapesquer Gomes e Maytê Lapesquer Gomes por me compreenderem como sou e me incentivarem nos estudos.

Ao amigo Paulo Augusto D'Angelo Porto, pelos anos de agradável convivência e por sempre me encorajar a transpor os obstáculos.

Ao prof. Francisco Carlos Faria Lobato, exemplo profissional, pela orientação e ensinamento de valores humanos.

Ao prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins, mestre por vocação, pela sabedoria e incentivo dado em todas as etapas.

Ao prof. Antônio Último de Carvalho, grande tutor, pelo sempre caloroso acolhimento em seu gabinete e preciosos conselhos, desde a graduação até o presente momento.

Ao parceiro de trabalho Nelson Éder Martins pelos conselhos certos, nas horas de maior dúvida e aflição.

Ao contemporâneo de graduação Ronnie Antunes de Assis pelo companheirismo e todo auxílio a mim dispensado.

Aos doutores Marcos Bryain Heinemann e Roberto Brecht Flatschart, pelas preciosas orientações em genética microbiana.

Ao funcionário da Elanco Saúde Animal, Sr. Nilo Machado Costa, pela gentil doação das amostras de campo.

Aos colegas Silvio Leite Monteiro da Silva, André Almeida Fernandes e Nádia Maria da Silva pela ajuda com a formatação, diagramação e fotos da dissertação.

Aos alunos de IC do Laboratório de Anaeróbios - Leonardo Rodrigues de Araújo, Rodrigo Otávio Silveira Silva e Prhicylla Sadanã Pires - futuros Médicos-Veterinários, pelo grande apoio e por entenderem pacientemente a minha ausência do laboratório durante a realização do experimento.

À todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, colegas de trabalho, técnicos e administrativos, cada qual na sua nobre função, sempre prontos para diagnóstico de rotina ou pesquisa científica, que me receberam como uma família, repletos de calor humano e solidariedade.

Aos 75 anos da escola de Escola de Veterinária da UFMG, berço de ensino e excelência em Ciências Veterinárias, pelo corpo docente e estrutura física, os quais permitiram a minha formação profissional.

## SUMÁRIO

	Pag.
<b>ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	09
<b>RESUMO</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1 <i>Clostridium perfringens</i> .....	13
2.1.1 Características morfológicas e físico-químicas .....	13
2.1.2 Isolamento e identificação .....	14
2.1.3 O genoma .....	14
2.1.4 Características das toxinas clostridiais .....	15
2.1.5 Enterotoxigenicidade .....	16
2.1.5.1 Toxina alfa .....	16
2.1.5.2 Toxina beta .....	16
2.1.5.3 Toxina épsilon .....	17
2.1.5.4 Toxina iota .....	17
2.1.5.5 Enterotoxina .....	17
2.1.5.6 Toxina beta2 .....	17
2.1.6 Susceptibilidade antimicrobiana .....	18
2.2 Morfofisiologia do intestino das aves .....	18
2.2.1 Aspectos embriológicos e anatomia .....	18
2.3 Enterite necrótica em frangos de corte .....	19
2.3.1 Epidemiologia .....	19
2.3.2 Patogenia e sinais clínicas .....	19
2.3.3 Patologia .....	20
2.3.4 Profilaxia .....	20
2.3.5 Antimicrobianos promotores de crescimento .....	21
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	21
3.1 Objetivo geral .....	21
3.2 Objetivos específicos .....	21
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
4.1 Local de realização do experimento .....	21
4.2 Processamento das amostras .....	22
4.2.1 Meios de cultura .....	22
4.2.2 Estirpes de referência .....	22
4.2.3 Cultivo e identificação das amostras de referência .....	22
4.2.4 Amostragem .....	22
4.2.5 Isolamento, cultivo e identificação das amostras de conteúdo luminal de jejuno e íleo .....	22
4.3 Técnica da PCR multiplex .....	23
4.3.1 Controles .....	23
4.3.2 Extração do DNA total .....	23
4.3.3 Amplificação das amostras .....	23
4.3.4 Fracionamento eletroforético do DNA amplificado .....	25
4.4 Análise estatística .....	25

5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	34
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	34

---

**LISTA DE TABELAS E QUADROS**

Tabela 1.	Toxinas produzidas por <i>Clostridium perfringens</i> , localização dos genes codificados e sua atividade biológica .....	15
Tabela 2.	Toxinas principais e doenças correlacionadas aos diferentes tipos toxigênicos de <i>Clostridium perfringens</i> .....	16
Quadro 1.	Protocolo de reagentes da PCR multiplex.....	24
Quadro 2.	Iniciadores da PCR multiplex dos genes <i>cpa</i> , <i>cpb</i> , <i>etx</i> , <i>ia</i> , <i>cpe</i> e <i>cpb2</i> nas estirpes de <i>Clostridium perfringens</i> .....	24
Tabela 3.	Tipos toxigênicos de <i>Clostridium perfringens</i> isolados de conteúdo luminal de jejuno e íleo de frangos de corte, Pará de Minas-MG, 2005 .....	32

---

**LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS**

Figura 1.	Esquema geral do sistema digestório do frango de corte .....	19
Figura 2.	Colônias de <i>Clostridium perfringens</i> com duplo halo de hemólise em ASA suplementado com 10% de sangue defibrinado de equino.....	25
Figura 3a.	Fermentação de açúcares por <i>Clostridium perfringens</i> (controle negativo).....	27
Figura 3b.	Fermentação de açúcares por <i>Clostridium perfringens</i> (amostra de campo positivo) .....	27
Figura 3c.	Coagulação do leite por <i>Clostridium perfringens</i> (controle negativo) .....	27
Figura 3d.	Coagulação do leite por <i>Clostridium perfringens</i> (amostra de campo positivo) .....	27
Figura 3e.	Hidrólise da gelatina por <i>Clostridium perfringens</i> (tubo esquerdo: controle negativo, tubo direito: amostra de campo – positivo).....	27
Figura 3f.	Produção de indol por <i>Clostridium perfringens</i> (controle negativo).....	27
Figura 3g.	Produção de indol por <i>Clostridium perfringens</i> (amostra de campo negativo).....	27
Figura 3h.	Redução do nitrato por <i>Clostridium perfringens</i> (controle negativo).....	27
Figura 3i.	Redução do nitrato por <i>Clostridium perfringens</i> (amostra de campo positivo) .....	27
Figura 3j.	Prova de urease por <i>Clostridium perfringens</i> (tubo esquerdo: amostra de campo negativo, tubo direito: controle negativo) .....	27
Figura 4.	Colônias de <i>Clostridium perfringens</i> com reação de lecitinase positiva em ágar TSC suplementado com 5% de gema de ovo .....	29
Figura 5a.	Fotodocumentação de gel de agarose da PCR multiplex extraído de material genético de <i>Clostridium perfringens</i> A-E (ATCC) .....	31
Figura 5b.	Fotodocumentação de gel de agarose da PCR multiplex extraído de material genético de <i>Clostridium perfringens</i> tipos A, C e D de conteúdo intestinal de frangos de corte do município de Pará de Minas-MG, 2005 .....	32

---



## ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP - Difosfato de adenosina

ATCC - American Type Culture Collection

C+G - Citosina e guanina

DMVP - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EV - Escola de Veterinária

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

g - grama

IC - Iniciação Científica

kDa - kilodalton

µg - micrograma

µL - microlitro

mL - mililitro

ng - nanograma

OMS - Organização Mundial da Saúde

Pb - Pares de base

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pmoles - picomoles

TGI - Trato gastrointestinal

TSC - Tiptose Sulfito-Cicoserina

UFC - Unidade Formadora de Colônias

v/v - volume/volume



## RESUMO

*Clostridium perfringens*, bactéria anaeróbica Gram positiva, além de causar gangrena gasosa e enterotoxemia em humanos e animais domésticos, constitui a principal causa de enterite necrótica em aves. Amostras de 171/250 (68.4%) *Clostridium perfringens* foram isolados de conteúdos intestinais de frangos de corte provenientes de um frigorífico da região de Pará de Minas-MG foram identificados pela coloração de Gram, reação de lecitinase em ágar TSC-gema de ovo, colônias com dupla hemólise em ágar sangue desfibrinado de equino e provas bioquímicas. As amostras de *Clostridium perfringens* podem ser classificadas em cinco tipos toxigênicos (A-E), pela detecção dos genes codificadores alfa (*cpa*), beta (*cpb*), épsilon (*etx*) e iota (*iA*), utilizando a técnica da PCR multiplex para tipificação genotípica das toxinas letais principais, da toxina *cpb2* (*cpb2*) e enterotoxina (*cpe*). *Clostridium perfringens* foi isolado em 62/125 (49.60%) amostras de conteúdo do jejuno e em 109/125 (87.20%) de amostras do íleo. Das 62 amostras de *Clostridium perfringens* isolados do jejuno foram obtidos 42/62 (67.74%) tipo A, 1/62 (1.61%) tipo A com produto de amplificação para o gene da toxina beta2, 0/62 (0%) tipo B, 17/62 (27.42%) tipo C, 1/62 (1.61%) tipo D. Das 109 amostras de *Clostridium perfringens* isolados do íleo foram obtidos 62/109 (56.88%) tipo A, 3/109 (2.75%) tipo A com produto de amplificação para o gene da toxina beta2, 1/62 (0.92%) tipo B, 38/109 (34.86%) tipo C, 1/109 (0.92%) tipo D. *Clostridium perfringens* A (60.82%) e *Clostridium perfringens* C (32.16%) foram os tipos toxigênicos predominantes em conteúdo intestinal de frango de corte. Cinco (2.92%), das 171 amostras de *Clostridium perfringens* isolados não foram tipificadas. Não foram identificados os genes codificadores das toxinas iota e enterotoxina.

Palavras chave: *Clostridium perfringens*, tipificação genotípica, enterite necrótica, frango de corte.

## ABSTRACT

*Clostridium perfringens* is an anaerobic Gram-positive bacterium which causes gaseous gangrene and enterotoxaemias in humans and domestic animals besides being the primary cause of necrotic enteritis in poultry. *Clostridium perfringens* strains were isolated 171/250 (68.4%) from the intestinal content of broiler chickens sampled in a slaughterhouse in Pará de Minas, MG. *Clostridium perfringens* were identified according to Gram staining, lecithinase test on agar TSC-egg yolk, haemolysis in defibrinated horse blood agar and biochemical tests. *Clostridium perfringens* strains were classified into five toxigenic types (A -E), which were based on the detection of codifying alfa (*cpa*), beta (*cpb*), epsilon (*etx*) e iota (*iA*) genes, using multiplex PCR assay for genotyping of the principal and lethal toxins, beta2 toxin (*cpb2*) and enterotoxin (*cpe*). *Clostridium perfringens* strains were isolated in 62/125 (49.60%) from jejunum content and 109/125 (87.20%) strains from ileum. From a total of 62 *Clostridium perfringens* jejunum isolates obtained 42/62 (67.74%) were type A, 1/62 (1.61%) type A with amplification of products for beta2 toxin gene, 0/62 (0%) type B, 17/62 (27.42%) type C and 1/62 (1.61%) type D. A total of 109 ileum *Clostridium perfringens* isolates were obtained being 62/109 (56.88%) type A, 3/109 (2.75%) type A with amplification of products for beta2 toxin gene, 1/62 (0.92%) type B, 38/109 (34.86%) type C, 1/109 (0.92%) type D. *Clostridium perfringens* A (60.82%) and *Clostridium perfringens* C (32.16%) toxigenic types were the most prevalent types in the analyzed parts of the intestinal content of broiler chickens. Five (2.92%) out of a total of 171 *Clostridium perfringens* strains were not typified. *Clostridium perfringens* codifying the iota toxin gene and enterotoxin gene were not detected.

Key words: *Clostridium perfringens*, toxinotyping, necrotic enteritis, broiler chickens.

## 1. INTRODUÇÃO

*C. perfringens* são classificados como tipos toxigênicos A, B, C, D ou E com base na produção de quatro toxinas principais: alfa, beta, épsilon e iota. Petit et al. (1999) demonstraram que os tipos A e C são responsáveis pelo quadro de infecção entérica, conhecida como enterite necrótica (EN), manifestando-se nas formas clínica ou subclínica, em aves domésticas e silvestres.

Algumas estirpes de *Clostridium perfringens* possuem propriedades de serem menos enterotoxigênicas. Além disso, cepas mutantes ou apatogênicas, de baixa virulência, podem fazer parte da microbiota normal do intestino. O isolamento de *Clostridium perfringens* em amostras de fezes de frango nem sempre esta relacionada com a ocorrência clínica e subclínica de EN (Ito, 2000). O diagnóstico da clostridiose enterotoxigênica requer, além dos sinais clínicos, achados anatomo-patológicos, o isolamento e identificação do agente, bem como a detecção das toxinas envolvidas pelo método de soroneutralização em camundongos.

Atualmente, drogas antimicrobianas adicionadas às formulações das rações constituem a principal escolha na prevenção da EN e, como promotores do crescimento, são amplamente utilizadas na avicultura intensiva de corte do Brasil com o objetivo do controle da microbiota aneróbia Gram positiva. Em 2006, os países importadores de carne passaram a exigir a retirada dos antibióticos das dietas dos frangos, com base nos estudos que apontam para os efeitos deletérios à saúde humana, advindos dos resíduos destas substâncias na carne. A presença de doses baixas de antimicrobianos pode estimular a seleção de bactérias multiresistentes nas aves e ainda causar sérios problemas para a saúde pública mundial (Souza, 2006).

Por outro lado, *Clostridium perfringens* pode multiplicar e colonizar o epitélio intestinal e causar EN em frangos de corte que não receberam antibioticoterapia profilática, principalmente quando as aves

são submetidas aos fatores predisponentes para o surgimento da doença. Ademais, o caráter disseminado do *Clostridium perfringens* pode constituir uma constante ameaça à sanidade dos criatórios comerciais de aves em todo o mundo.

Para que a exportação de frango corte do Brasil continue expressiva, principalmente para os países da União Européia, as medidas de prevenção da EN deverão ir ao encontro das recentes normas de comércio internacional para a retirada dos antimicrobianos das rações dos frangos (Vieira, 2001).

Dessa maneira, torna-se necessário determinar ocorrência dos tipos toxigênicos de *Clostridium perfringens* presentes na microbiota intestinal dos frangos de corte, tendo em vista a formação do conhecimento necessário à busca de novas estratégias de modificação da produção avícola.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Clostridium perfringens*

#### 2.1.1 Características morfológicas e físico-químicas

*Clostridium perfringens* é caracterizado como bastonete anaeróbio, Gram positivo, formador de esporo oval-subterminal, encapsulado e imóvel. Para o cultivo, a bactéria requer pH entre 5-8 e 13 aminoácidos essenciais para crescer (Cato et al., 1986).

A temperatura para o seu cultivo pode variar entre 12-50°C, com o crescimento lento na temperatura a 20°C. Em temperatura ótima de crescimento, 37-45°C, as colônias de *Clostridium perfringens* crescem rapidamente, atingindo tempo de geração de 8-10 min e apresentando vigorosa produção de gás. (Adams e Moss, 1995).

*Clostridium perfringens* pode sobreviver em condições físico-químicas adversas, formando esporos resistentes por diferenciação da célula bacteriana

vegetativa, que exigem maior resistência e baixo metabolismo da bactéria. Em geral, na forma esporulada, os clostrídios podem sobreviver às condições extremas como variações de temperatura, dissecação e acidez do meio. (Cato et al., 1986).

Apesar de ser classificado como microorganismo anaeróbio, o *Clostridium perfringens* pode sobreviver e crescer na presença de oxigênio. Em ágar sangue, as UFC's formam colônias arredondadas, umbilicadas e brilhantes. As colônias do *Clostridium perfringens* são circundadas por um halo interno de hemólise incompleta causada pela toxina theta e outra zona externa de hemólise completa causada pela toxina alfa (Quinn et al., 2005).

### 2.1.2 Isolamento e identificação

As amostras para o isolamento de bactérias do gênero *Clostridium* devem ser coletadas imediatamente após a morte dos animais. Frequentemente, os cultivos são contaminados com outras bactérias anaeróbias estritas ou facultativas. Entretanto, o transporte rápido e temperatura entre 4-6°C não são fatores cruciais para a sobrevivência do *Clostridium perfringens* (Quinn et al., 2005).

Österblad et al. (2003) relataram o isolamento de *Clostridium perfringens* em swabs anais congelados por períodos superiores a duas semanas. A habilidade de esporulação, que é uma característica de cultivo pertencente a todas as espécies do gênero *Clostridium*, pode explicar o potencial de sobrevivência do *Clostridium perfringens* às condições físico-químicas adversas.

Segundo Sebald e Petit (1997), *Clostridium perfringens* pode ser isolado em placas de ágar sangue desfibrinado de ovino e eqüino em atmosfera de anaerobiose a 37°C por 18-24 horas. Para a identificação morfológica e fenotípica do *Clostridium perfringens*, são utilizadas as colorações de Gram, provas bioquímicas e reação de lecitinase em ágar gema de ovo. Procedimentos de enriquecimento do caldo com pedaços de carne ou cérebro de bovino

podem funcionar como meio seletivo, bem como de manutenção de cultivos puros, favorecendo a esporulação do *Clostridium perfringens*. As toxinas do *Clostridium perfringens* podem ser detectadas por métodos imunológicos, como ELISA para detecção das toxinas principais, incluindo a enterotoxina, em fezes e outros espécimes clínicos. (Quinn et al., 2005).

A tipificação do *Clostridium perfringens* pode ser realizada através de testes laboratoriais, com base nas propriedades fenotípicas ou genotípicas do agente. Apesar das vantagens dos ELISAs, o método de soroneutralização em camundongos é ainda hoje amplamente utilizado para tipificação fenotípica do *Clostridium perfringens*. Porém, a tipificação fenotípica está condicionada à produção de toxinas, que podem não ser expressas em certas condições de cultivo. Além da manutenção dispendiosa de animais de laboratório e das recomendações dos comitês de bioética para a redução e substituição dos ensaios de laboratório *in vivo*.

Atualmente, a técnica de PCR multiplex proposta por Yoo et al. (1997) está sendo amplamente utilizada para tipificação genotípica através da amplificação dos gens das toxinas principais – *cpa* (toxina alfa), *cpb* (toxina beta), *etx* (toxina épsilon) e *iA* (toxina iota) - e de outros gens de virulência – *cpe* (enterotoxina) e *cpb2* (toxina beta2).

### 2.1.3 O genoma

O genoma do *Clostridium perfringens* consiste de 3.031.340 pares de base, com 2.660 genes codificadores de proteínas, 10 genes RNA ribossômicos e 28,6% de conteúdo C+G. Estudos da biologia molecular demonstraram que Cp apresenta homologia genotípica com as demais espécies do gênero *Clostridium* (Shimizu et al., 2002). Porém, Rood (1998) relatou diferenças fenotípicas marcantes com outras bactérias do mesmo gênero. Dentre são citadas a elevada taxa de crescimento bacteriano, tolerância moderada ao oxigênio e facilidade de manipulação gênica do *Clostridium perfringens*.

Quando o genoma do *Clostridium perfringens* é comparado ao do *Clostridium acetobutylicum*, bactéria não patogênica, a diferença mais marcante são os genes de virulência presentes no primeiro, mas ausentes no segundo. Nos cromossomos do *Clostridium perfringens* foram detectados dois tipos de genes codificadores de proteína ligadora à matriz extracelular e cinco genes para hemolisina, todos relacionados à virulência e também descritos em outras espécies de bactérias. (Shimizu et al., 2002).

O seqüenciamento do genoma do *Clostridium perfringens* revelou que os genes de virulência não estão agrupados em único locus. Apesar do *Clostridium perfringens* apresentar regiões altamente conservadas do seu material genético, os genes de uma bactéria podem ser perdidos e transmitidos horizontalmente a uma outra. Os genes codificadores da produção de toxina e dos fatores de virulência estão espalhados em vários sítios do cromossoma e nos elementos móveis (plasmídeos) da

bactéria (Instituto de Pesquisa Genômica; <http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html>; 20/04/2006).

A expressão das toxinas alfa e theta é regulada pelo sistema regulatório bacteriano duplo (VirR/VirS). A fração VirR representa o sensor da enzima histidina kinase e a VirS o elemento responsivo do sistema. A regulação ocorre na transcrição e mutação gênica e pode alterar a produção de ambas as toxinas (Rood e Cole, 1991).

#### 2.1.4 Características das toxinas clostridiais

Os genes codificadores das toxinas do *Clostridium perfringens* apresentam localização cromossomal ou plasmidial. Os genes codificadores das toxinas alfa (*cpa*) e theta (*pfoA*) são de localização cromossomal, porém o gene da enterotoxina (*cpe*) pode ser cromossomal ou plasmidial. Os genes das demais toxinas principais são exclusivamente plasmidiais (Tabela 1).

Tabela 1. Toxinas produzidas por *Clostridium perfringens*, localização dos genes codificados e sua atividade biológica

Toxina	Gene	Local	Atividade biológica
alfa	<i>cpa</i>	cromossomo	citólítica, hemolítica, dermonecrótica, letal
beta	<i>cpb</i>	plasmídeo	citólítica, dermonecrótica, letal
épsilon	<i>etx</i>	plasmídeo	edema em vários órgãos: fígado, rins e sistema nervoso central
iota	<i>iA</i>	plasmídeo	rompimento do citoesqueleto de actina e perda da integridade celular
beta2	<i>cpb2</i>	plasmídeo	citólítica, letal
enterotoxina	<i>cpe</i>	comossomo/ plasmídeo	citólítica, letal, causa diarreia pela perda de água e íons
theta	<i>pfoA</i>	cromossomo	hemólise e modulação da resposta inflamatória do hospedeiro

Fonte: Petit et al. (1999)

Segundo Songer (1997), Cp é um dos agentes com maior número de toxinas produzidas e um dos mais importantes em função do grau de toxicidade e atividade

letal. A Tabela 2 apresenta as principais toxinas produzidas e as doenças associadas a cada tipo toxigênicos de *Clostridium perfringens*.

Tabela 2. Toxinas principais e doenças correlacionadas aos diferentes tipos toxigênicos de *Clostridium perfringens*

Tipo toxigênico	Toxinas	Doença associada a <i>Clostridium perfringens</i>
A	alfa	gangrena e gastroenterite em humanos. Enterite necrótica em aves e leitões, enterite em eqüinos e enterotoxemia em cordeiros.
B	alfa, beta, épsilon	desintéria e enterite crônica em cordeiros.
C	alfa, beta	enterites necrótica e hemorrágica em leitões, cordeiros, bezerros, caprinos e potros. Enterite necrótica em aves e humnos.
D	alfa, épsilon	enterotoxemia em ovinos (doença do rim polposo)
E	alfa, iota	enterotoxemia em cordeiros, bezerros e coelhos.
A / <i>cpb2</i>	Alfa	enterocolite em cavalos, enterite necrótica em leitões.
A / <i>cpe</i>	Alfa	intoxicação alimentar em humanos.

Fonte: Petit et al. (1999)

*Clostridium perfringens* é comumente encontrado na microbiota intestinal dos humanos e animais sadios. Portanto, o aparecimento de patologias provocadas por esse microrganismo é dependente de circunstâncias que favoreçam o crescimento e produção em doses elevadas das toxinas clostridiais (Niilo, 1993).

## 2.1.5 Enterotoxigenicidade

### 2.1.5.1 Toxina alfa

A toxina alfa é produzida em quantidades variáveis por todos os tipos de *Clostridium perfringens*. Ela é composta de cadeia única de polipeptídeo de 370 aminoácidos e apresenta peso molecular de 42,5 kDa. As propriedades enzimáticas da toxina alfa são semelhantes a da fosfolipase C. Ela é a principal toxina letal do *Clostridium perfringens* e tem como ação biológica a capacidade de hidrolisar a lecitina em fosforilcolina e diglicerídeo (Yoo et al., 1997).

Pelo fato da membrana das células dos animais serem compostas de complexos de lipoproteínas contendo lecitina, a alfa toxina é responsável pela hidrólise da porção fosfolipídica da membrana, lise celular e por outras formas de efeito. A ação da alfa-toxina depende do tecido atingido e é caracterizada por hemólise, ação necrosante, aumento da permeabilidade vascular e da agregação plaquetária. (Justin et al., 2002).

### 2.1.5.2 Toxina beta

A toxina beta é produzida por *Clostridium perfringens* tipos B e C, tem peso molecular de 40 kDa e é sensível ao calor e à tripsina. Apesar do seu mecanismo de ação ser pouco conhecido, acredita-se que a toxina beta tenha natureza química semelhante a multímeros de citolisina. A citolisina age na formação de poros na membrana celular, apresenta importante papel na necrose do epitélio das mucosas na EN e no surgimento



de sintomas neurológicos em humanos e animais (Yoo et al., 1997).

Doses baixas de toxina beta, próximas a 2ng, são capazes de produzir dermonecrose em cobaias. Em indivíduos saudáveis, a toxina beta é rapidamente inativada pela tripsina no intestino delgado. Na presença de fatores anti-tripsínicos na dieta e em indivíduos com deficiência de absorção ou ingestão de proteínas, que acarretam baixa produção de tripsina, a toxina beta causa necrose transmural coagulativa. Dentre os efeitos descritos incluem-se necrose hemorrágica de alças intestinais, casos de dermonecrose e morte em animais de laboratório (Rood e Cole, 1991).

#### 2.1.5.3 Toxina épsilon

A toxina épsilon é uma potente toxina produzida por *Clostridium perfringens* tipos B e D, secretada na forma de protoxina inativa, sendo composta de 311 aminoácidos com peso molecular de 32,7 KDa. A sua ativação ocorre pela perda de peptídeo N-terminal devido a ação de enzimas proteolíticas produzidas pelo organismo, como tripsina e quimiotripsina (Yoo et al., 1997).

A toxina épsilon é terceira toxina clostridial mais potente, quando comparadas às toxinas botulínicas e tetânicas. Ela é responsável pela enterotoxemia em humanos e animais. Esta toxina na forma ativada provoca aumento da permeabilidade intestinal, dermonecrose, edema, lesões cerebrais e morte (Tamai et al., 2003).

#### 2.1.5.4 Toxina iota

Apenas as estirpes de *Clostridium perfringens* E são produtoras de toxina iota, produzida primariamente como protoxina. Todas as toxinas do *Clostridium perfringens* agem na membrana das células eucariotas, com exceção da toxina iota que age especificamente no citosol (Petit et al, 1999).

Após ativação proteolítica, a toxina na forma ativa é constituída de dois polipeptídeos "Ia"

e "Ib". O polipeptídeo "Ia", classificado como enzima ADP transferase, é o componente quimicamente ativo da molécula. A fração "Ib", caracterizada como proteína de ligação, está envolvida na ligação e internalização da toxina pela célula. As características bioquímicas e imunológicas do conjunto destes dois peptídeos estão relacionadas ao aumento da permeabilidade vascular, dermonecrose e letalidade (Perelle et al., 1993).

#### 2.1.5.5 Enterotoxina

A enterotoxina pode ser produzida pelos cinco tipos toxigênicos de *Clostridium perfringens*, sendo responsável pelos surtos de intoxicação alimentar em humanos. Ela caracteriza-se por ser uma proteína de 35 Kda de peso molecular, que é produzida durante o processo da formação do esporo do Cp (Yoo et al., 1997).

Brynstad e Granum (1999) determinaram ser a enterotoxina a mais importante e bem estudada das toxinas produzidas pelas bactérias do gênero *Clostridium*, quanto à importância epidemiológica, natureza química e ação biológica. Ela representa a segunda causa de intoxicação alimentar nos Estados Unidos e Reino Unido.

O gene codificador da enterotoxina pode ser de localização cromossomal ou plasmidial. Cornillot et al (1995) demonstraram os genes de amostras isolados de surtos de intoxicação alimentar estarem localizados no cromossoma bacteriano. Os mesmos autores detectaram os genes de multiresistência aos antibióticos no plasmídeo. A principal alteração patológica causada pela enterotoxina advém da sua ligação às vilosidades intestinais, que vem seguida pela descamação do epitélio do intestino, aumento da permeabilidade e morte celular (Yoo et al., 1997).

#### 2.1.5.6 Toxina beta2

A toxina beta2 é produzida pelos *Clostridium perfringens* dos tipos A e B e não apresenta homologia com a toxina beta. Ela é caracterizada como protoxina contendo 265

aminoácidos e inclui sinal de secreção na porção N-terminal de 30 aminoácidos. Após a secreção, esta toxina apresenta peso molecular de 27,7 kDa. Esta toxina é altamente susceptível à clivagem proteolítica pela tripsina. A tripsina cliva a toxina beta2 em duas espécies inativas, de pesos moleculares de 13,0 kDa e 14,7 kDa (Songer, 1997).

A toxina beta2 está associada com doença entérica em animais domésticos, surtos de EN em leitões e enterocolite em eqüinos (Herholz et al., 1999). Fisher et al. (2005) demonstraram a toxina beta2 ser fator de potencialização da virulência das diarreias nosocomiais associadas com a seleção de estirpes multiresistentes do *Clostridium perfringens* pelo uso indiscriminado de antibióticos e nos casos em que estirpes produtoras de enterotoxina também estão presentes.

#### 2.1.6 Susceptibilidade antimicrobiana

Estudos *in vitro* da susceptibilidade do *Clostridium perfringens* aos diversos antibióticos são numerosos. *Clostridium perfringens* demonstraram elevada sensibilidade à penicilina e a narasina - ionóforo cocidiostático - amplamente utilizado no controle da EN clínica e subclínica no continente americano e nos países europeus (Martel et al., 2004).

Grau de sensibilidade intermediária à ampicilina foi relatada por Watkins et al. (1997). A resistência do *Clostridium perfringens* ao cloranfenicol é rara, embora varias estirpes isoladas terem mostrado resistência (Bannam e Rood, 1991).

Dos agentes antimicrobianos testados, a resistência à tetraciclina é comum, segundo Lyras e Rood (1996), *Clostridium perfringens* carrega em seu genoma os genes *tetA(P)*, *tetB(P)*, *tetA408(P)*, *tetM*, *tetQ*, que estão relacionados com a resistência à tetraciclina.

A resistência do *Clostridium perfringens* às associações de macrolídeos (eritromicina), lincosamidas (clindamicina) e

estreptograminas (virginiamicina ou quinopristina ou dalfopristina) também são observadas. Tal fato, deve-se ao mecanismo de resistência mutacional pela metilação do gene 23S do RNA ribossômico (Berryman et al., 1994).

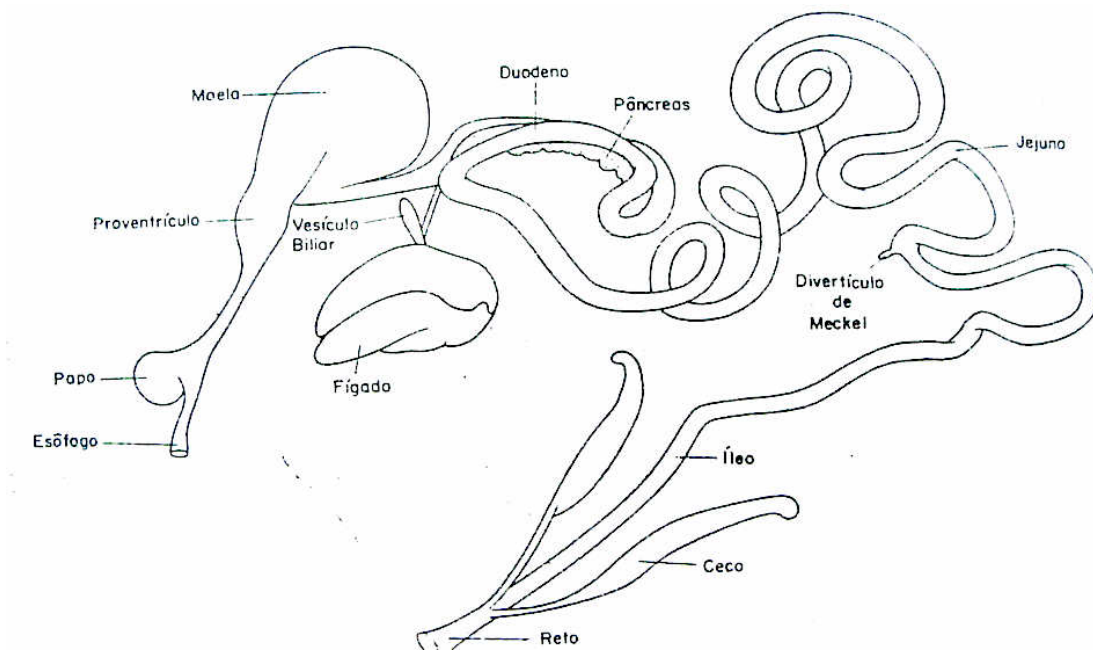
## 2.2. Morfologia do intestino das aves

### 2.2.1 Aspectos embriológicos e anatomia

Nas aves (*Gallus gallus domesticus*) recém nascidas, a absorção do vitelo termina ao redor do 6º ou 7º dia de vida e o jejuno e o íleo tornam-se colonizados por microorganismos aeróbios e anaeróbios como *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterobacter*, *Fusobacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus* e *Streptococcus* e bactérias do gênero *Clostridium*. Antes da eclosão, as bactérias podem colonizar o TGI das aves devido à porosidade da casca e pela contaminação do líquido amniótico do ovo (Boleti et al., 2002).

A mucosa do intestino delgado é composta de células especializadas em secretar muco, absorver nutrientes, secretar enzimas e hormônios. A mucosa intestinal apresenta grande quantidade de células linfóides e o intestino é repleto de anexos de folículos linfóides. Após o nascimento e durante toda vida da ave, o lúmen do intestino é exposto a várias substâncias e agentes imunogênicos, incluindo microrganismos colonizadores como *Clostridium perfringens* (Ito, 2000).

O duodeno é curto e associado ao pâncreas. O jejuno é a região mais longa do intestino delgado das aves, segue-se ao duodeno até o divertículo de Meckel e corresponde ao terço médio do intestino. O íleo, contínuo ao jejuno (Figura 1), é delimitado cranialmente pelo divertículo de Meckel e termina na desembocadura dos cecos, correspondendo ao terço final do intestino delgado (Boleti et al., 2002).



Fonte: Boleti et al.(2002)

Figura 1. Esquema geral do sistema digestório do frango de corte )

## 2.3 Enterite necrótica em frangos de corte

### 2.3.1 Epidemiologia

Embora *Clostridium perfringens* possa fazer parte da microbiota intestinal de aves domésticas saudáveis, surtos de EN podem ocorrer principalmente em frangos de cortes, perus e gansos (Wobeser e Rainnie, 1987), galos (Asaoka et al., 2004) e avestruzes (Know et al., 2004).

Segundo Ficken e Wages (1997), esses surtos têm ocorrido em vários países, causando sérios problemas sanitários e têm maior prevalência na criação intensiva dos frangos. A EN acomete principalmente aves de 2-4 semanas de idade, com taxa de mortalidade diária que pode exceder a 1% e, normalmente, o curso clínico da doença pode durar uma semana.

Geralmente, a colonização do trato intestinal da ave por *Clostridium perfringens* é um evento que ocorre nos primeiros dias do desenvolvimento do pintinho. Entretanto, a carga bacteriana de *Clostridium perfringens* do solo, poeira, cama do frango, água e alimentos, além de serem fontes contaminação, parecem influenciar positivamente na transmissão de *Clostridium perfringens* pelo hábito de coprofagia das aves (Craven et al., 2001).

### 2.3.2 Patogenia e sinais clínicos

A ocorrência de EN está associada à proliferação do *Clostridium perfringens* no intestino e aumento na produção de toxina. Em aves doentes, elevadas contagens microbianas ( $10^8$  UFC/g) são encontradas. Em contrapartida, para aves saudáveis, contagens baixas ( $0$  a  $10^5$  UFC/g) são consideradas normais (Broussard et al., 1986).

A reprodução experimental da EN pela administração oral de estirpes de *Clostridium perfringens* tem produzido diversos resultados e torna complexo o conhecimento da patogênese da doença. Dentre os principais problemas observados

na reprodução da doença, tem-se o fato das amostras isoladas de campo produzirem as lesões de EN nos intestinos das aves, enquanto que estirpes de referência não demonstram potencial patogênico, sugerindo que o cultivo *in vitro* resulta na perda de fatores de virulência (Olkowski et al., 2006).

As manifestações clínicas das aves doentes incluem: depressão, perda de apetite, apatia, prostração, penas arrepiadas, cabeça e asas caídas. Em alguns casos, as aves demonstram índices altos de desidratação e possuem odor desagradável (Niilo, 1993).

### 2.3.3 Patologia

A doença clínica é de caráter agudo e tem como alteração anatomo-patológica a EN. Na forma subclínica da doença, os intestinos das aves doentes apresentam como lesão primária uma necrose focal. Os achados de necropsia mais consistentes estão concentrados no intestino delgado, mas as lesões podem ocorrer nos cecos, rins e fígado. Frequentemente, o duodeno, jejuno e íleo aparecem com o lúmen repleto de gás e apresentam parede adelgada. Em casos severos de EN, as lesões no intestino delgado podem incluir a coloração amarronzada da mucosa, a impregnação pela bile das vilosidades intestinais e a necrose difusa em grande extensão do duodeno, jejuno e íleo (Broussard et al., 1986).

Além das formas severas de EN, a doença pode se manifestar na forma subclínica, acarretando queda no ganho de peso dos frangos de corte, através de lesões microscópicas caracterizadas por depressões ulcerativas discretas das vilosidades intestinais e presença de material amorfo aderido à superfície da mucosa do intestino delgado (Kaldhusdal et al., 2001). Esta é a principal forma de infecção, cuja depressão no desempenho é combatida com administração de antimicrobianos promotores de crescimento nas rações dos frangos.

*Clostridium perfringens* pode colonizar o fígado e acarretar em colangio-hepatite, fibrose ou necrose do órgão. No fígado, duas formas de lesões mais comuns são descritas, como nódulos focais subcapsulares com necrose fibrinóide e lesões focais simétricas de coloração brancacenta na superfície do parênquima. A colangio-hepatite nos frangos de corte, na presença da forma subclínica da EN, é um achado freqüente na inspeção em abatedouros de aves de vários países do mundo, como Canadá e Grã-Bretanha. As formas subclínicas podem gerar elevadas perdas econômicas pela alta disseminação do agente (Lovland e Kaldhusdal, 1999).

#### 2.3.4 Profilaxia

A EN em outras espécies domésticas é prevenida através da vacinação dos animais, porém as vacinas para prevenção da EN nas aves ainda se encontram em estudos preliminares.

Os pintinhos portadoras de altos títulos de anticorpos maternos anti-alfa toxina têm baixa mortalidade, quando comparados aos pintinhos que não obtiveram transmissão vertical de imunidade passiva. (Heier et al., 2001). Lovland et al (2004) utilizaram vacina tipo toxóides contra *Clostridium perfringens* do tipo A e C nas matrizes e observaram a imunidade em pintinhos mediada pelos anticorpos maternos transmitidos.

Entretanto, Thompson et al. (2006), em condições experimentais, demonstraram que a utilização de formulações de vacinas contendo toxóides produzidos por estirpes mutantes de *Clostridium perfringens*, que não continham gens codificadores para toxina alfa em seu genoma, devido ao mecanismo de variação clonal do gene *cpa* (Ginter et al., 1996) resultaria na produção de títulos de anticorpos vacinais, e portanto protegeriam as aves desafiadas. Isso indicaria a importância de outros imunógenos, diferentes da alfa toxina na imunização profilática dos plantéis avícolas.

A suplementação dos pintinhos com microbiota intestinal viva pode afetar beneficemente o equilíbrio do ambiente intestinal pelo mecanismo de exclusão competitiva. A exclusão competitiva pela administração oral de probióticos preparados a partir da microbiota intestinal de aves adultas tem sido proposta para deprimir a multiplicação de *Clostridium perfringens* e redução da incidência de EN nos plantéis (Kaldhusdal et al., 2001).

As dietas compostas de ingredientes de alta digestibilidade, como o milho e a associação de polissacarídeos insolúveis com as enzimas proteolíticas podem diminuir a freqüência dos surtos de EN, bem como a severidade da manifestação clínica da doença ( Riddell e Kong, 1992).

#### 2.3.5 Antimicrobianos promotores do crescimento

Os antibióticos, bacitracina de zinco, avoparcina, tilosina e virginiamicina são amplamente utilizados como promotores de crescimento na dieta das aves a fim de promover a melhora da eficiência dos processos digestivos, aumento do ganho de peso e na prevenção das doenças. A EN é controlada pela associação desses antibióticos com os ionóforos coccidiostáticos. Ambos apresentam efeito contra bactérias Gram positivas e protozoários do gênero *Eimeria* sp. (Elwinger et al., 1994).

Na União Européia, de acordo com o *Codex Alimentarius* FAO/OMS, já está em vigor a proibição do uso de antibióticos e ionóforos nas rações de engorda dos frangos de corte. Nos seus países pertencentes, onde já não mais se utilizam esses aditivos, a incidência da EN associada ao *Clostridium perfringens* tem se tornado emergente (Craven et al., 2001). O Brasil tem acompanhado as decisões do *Codex*, à exceção da atitude adotada em relação à avoparcina. De fato neste caso, o Brasil optou por adotar o princípio de precaução, seguindo a legislação da União Européia (Revista Avicultura Industrial; <http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp>; 15/03/2007).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Determinar a prevalência dos diferentes tipos toxigênicos de *Clostridium perfringens* em amostras de conteúdo intestinal do jejuno e íleo de frangos de corte obtidos de abatedouro, no município de Pará de Minas-MG, através do isolamento, tipificação fenotípica do agente e da detecção dos genes das toxinas alfa, beta, beta2, épsilon, iota e enterotoxina.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a aplicabilidade de uma técnica de PCR multiplex para a tipificação genotípica de *Clostridium perfringens* em conteúdo intestinal de frango de corte com finalidades de vigilância epidemiológica e diagnóstico;
- Determinar a distribuição da frequência dos tipos toxigênicos de *Clostridium perfringens* em amostras de conteúdos intestinal de jejuno e íleo de frangos de corte;
- Classificar os isolados de *Clostridium perfringens* pelas características morfotintoriais e bioquímicas do agente (tipificação fenotípica);
- Caracterizar os isolados de *Clostridium perfringens* por análise dos produtos da PCR multiplex para os genes codificadores das toxinas alfa, beta, épsilon e iota e para genes de virulência codificadores das toxinas beta2 e enterotoxina.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Local de realização do experimento**

O experimento foi realizado no Laboratório de Anaeróbios do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

## 4.2 Processamento das amostras

### 4.2.1 Meios de cultura

Para cultivo, isolamento e identificação das estirpes de *Clostridium perfringens* foram empregados os seguintes meios bacteriológicos sólidos e líquidos: Tioglicolato<sup>1</sup>, ágar sangue (ASA) preparado com meio sólido de Mueller Hinton<sup>2</sup> suplementado com 10% de sangue desfibrinado de equino (v/v) para obtenção de dupla hemólise e meio sólido seletivo-indicador de Triptose-Sulfito-Cicloserina (TSC)<sup>3</sup> contendo 400 µg/ mL de cicloserina suplementado com 5% de gema de ovo (v/v) para prova de verificação da hidrólise da lecitina. Os caldos para provas bioquímicas de fermentação dos açúcares (glicose, salicina, sacarose, maltose e lactose), leite-ferro, indol, nitrito, urease e hidrólise da gelatina foram preparados segundo metodologia proposta por Cato et al., 1986.

### 4.2.2 Estirpes de referência

Como estirpes de referências foram utilizados líofilos obtidos do American Type Culture Collection (ATCC), dos Estados Unidos da América: *Clostridium perfringens* tipo A - ATCC 3624; *Clostridium perfringens* tipo B - ATCC 3626; *Clostridium perfringens* tipo C - ATCC 3628; *Clostridium perfringens* tipo D - ATCC 3629; *Clostridium perfringens* tipo E - ATCC 27324.

### 4.2.3 Cultivo e identificação das amostras de referência

As estirpes liofilizadas foram reconstituídas pela adição de 1mL de Tioglicolato. Em ambiente estéril, alíquota de 100µL de amostra foi semeada em 15mL Tioglicolato contido em um tubo de rosca e duas placas de ASA. O tubo de Tioglicolato e uma das placas de ASA foram incubados a 37°C durante 48 horas em atmosfera de

anaerobiose (CO<sub>2</sub> : 9,8%; H<sub>2</sub> : 10,4%; N<sub>2</sub> : 79,8%). A outra placa de ASA foi mantida em cultivo aeróbio na estufa a 37°C por 24 horas. As amostras de referência cultivadas foram posteriormente avaliadas morfológicamente e quanto à pureza através de coloração de Gram (Sebald e Petit, 1997).

### 4.2.4 Amostragem

Foram utilizadas 250 unidades experimentais, sendo 125 amostras de conteúdo intestinal de jejuno e igual número de amostras de íleo, com um coeficiente de variação ( $\Delta$ ) de 10% entre as amostras, segundo Sampaio, 1998. Os frangos (*Gallus gallus domesticus*) de 5-6 semanas de idade, de linhagens comerciais de corte não identificadas, foram cedidas com a colaboração dos técnicos da ELANCO<sup>4</sup>, todas provenientes de um abatedouro de aves da região de Pará de Minas-MG. Como critério para o recebimento de amostra foi estabelecido que os lotes de frangos tivessem sido abatidos após período de sete dias de restrição de antimicrobianos promotores de crescimento e ionóforos coccidiostáticos na ração de terminação.

No abatedouro, os frangos foram abatidos por eletronarcose e eviscerados, conforme a rotina de abate. As alças intestinais foram retiradas da carcaças e ligadas imediatamente, com fio de algodão, cranial ao duodeno e caudal à junção ceco-cólica. O material foi acondicionado em temperatura de 4°C, transportado até o local do experimento e processado em período máximo de duas horas (Uzal et al., 1996).

### 4.2.5 Isolamento, cultivo e identificação das amostras de conteúdo luminal de jejuno e íleo

As alças intestinais foram abertas longitudinalmente, em região cranial e caudal ao divertículo de *Meckel*, com *bisturi* e pinças estéreis, em condições assépticas,

<sup>1</sup> Meio Líquido Tioglicolato – Biobrás, Montes Claros, Brasil

<sup>2</sup> Ágar Mueller Hinton – Acumedia, Michigan., USA

<sup>3</sup> Ágar Triptose-Sulfito-Cicloserina – Himmedia, Curitiba, Brasil

<sup>4</sup> Divisão de Saúde Animal da Eli Lilly LDTA – São Paulo, Brasil

dentro de capela de fluxo laminar<sup>5</sup>. Para cultivo e isolamento, 1g de conteúdo luminal foi inoculado em 20 mL de Tioglicolato. Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 80°C durante 15 minutos, resfriados em água corrente e incubados à temperatura de 37°C por 24 horas em atmosfera de anaerobiose, segundo a metodologia para cultivo de *Clostridium perfringens* de amostras fecais, descrita pelo manual do “Center for Diseases Control”, Atlanta, Georgia (Dowell e Hawkins, 1981).

Após verificação da morfologia pela método de Gram, foram feitos repiques pela técnica de esgotamento em placas ASA e ágar TSC, para demonstração da zona de dupla hemólise e reação de lecitinase, respectivamente.

Após 24 horas de incubação a 37°C, as colônias do ASA e ágar TSC foram coradas pelo Gram para caracterização morfotintorial e pureza. Após o resultado do teste respiratório em ASA, alíquotas de 200µL de Tioglicolato foram semeadas em tubos para provas bioquímicas e mantidas em atmosfera de anaerobiose durante 24 horas a 37°C, para identificação das amostras. A interpretação dos resultados das provas bioquímicas foi baseada em chave de classificação das espécies de bactérias do gênero *Clostridium*, segundo Sebald e Petit, (1997).

### 4.3 Técnica da PCR multiplex

#### 4.3.1 Controles

Como controles positivos foram utilizadas estirpes de *Clostridium perfringens* descritas no item 4.2.2 e tipificadas conforme metodologia desenvolvida por Vieira (2006). Como controles negativos foram utilizados os reagentes da técnica e quantidade suficiente de água estéril<sup>6</sup> para completar o volume final de 50 µL da reação. Como

<sup>5</sup> Trox Technik® - modelo FLV – São Paulo, Brasil

<sup>6</sup> Sistema de ultrapurificação de água - Milli-Q, Millipore Indústria e Comércio LTDA - São Paulo, Brasil

padrão de comparação foi utilizado marcador de peso molecular de 100 pares de base<sup>7</sup>.

#### 4.3.2 Extração do DNA total

O material genético de *Clostridium perfringens* das estirpes de referência e dos isolados de jejuno e íleo foram obtidos a partir dos cultivos em ASA, utilizando-se a extração sem purificação do DNA através do método térmico. Após as placas de ASA terem sido incubadas em jarra de anaerobiose a 37°C durante 18 horas, três a cinco UFC's características foram raspadas com ponteiros estéreis e transferidas para *Eppendorfs* com 23,2 µL de água estéril. Foram adicionados 35 µL de óleo mineral<sup>8</sup> para evitar a evaporação (Uzal et al., 1996).

Após a adição da água, da “massa bacteriana” e óleo, os *Eppendorfs* foram hermeticamente fechados e colocados em aparelho termociclador<sup>9</sup> a 99°C durante 10 minutos. As amostras foram centrifugadas em microcentrífuga<sup>10</sup> a 10.000 x g por cinco minutos e o sobrenadante utilizado como molde de DNA (Heikinheimo e Korkeala, 2005).

#### 4.3.3 Amplificação das amostras

Para a obtenção do volume final de 50µL, a concentração de cada iniciador específico<sup>11</sup> foi de 25 pmoles e o DNA molde obtido foram utilizados no seguinte protocolo de reagentes para PCR multiplex, segundo Meer e Songer (1997); Vieira (2006), conforme o Quadro 1. A concentração do oligonucleotídeo, tamanho do fragmento, a seqüência e posição de cada iniciador utilizados são demonstrados no Quadro 2.

<sup>7</sup> Molecular Weight Marker 100 pb DNA Ladder - Invitrogen - United States of America

<sup>8</sup> Ideal® - São Paulo, Brasil

<sup>9</sup> Thermal Cycler - modelo Px2 - Thermo Electron Corporation - Milford, United States of America

<sup>10</sup> Aparelho - modelo MCD 2000 - São Paulo, Brasil

<sup>11</sup> Iniciadores para amplificação dos genes *cpa*, *cpb*, *etx*, *ia*, *cpe* e *cpb 2* do *C. perfringens* - Intergrad DNA Technologies - Minesota, United States of America



REAGENTES	VOLUME ( $\mu\text{L}$ )
DNA molde diluído em água esteril q.s. p. 50 $\mu\text{L}$	23,2
Tampão da enzima Taq DNA polimerase 10 x <sup>12</sup>	5,0
MgCl <sub>2</sub> (1,5 mM) <sup>13</sup>	1,5
dNTP's (0,2 mM) <sup>14</sup>	1,0
Iniciador senso <i>cpa</i>	1,6
Iniciador reverso <i>cpa</i>	1,6
Iniciador senso <i>cpb</i>	1,6
Iniciador reverso <i>cpb</i>	1,6
Iniciador senso <i>etx</i>	1,5
Iniciador reverso <i>etx</i>	1,5
Iniciador senso <i>ia</i>	1,5
Iniciador reverso <i>ia</i>	1,4
Iniciador senso <i>cpe</i>	1,7
Iniciador reverso <i>cpe</i>	1,5
Iniciador senso <i>cpb2</i>	1,3
Iniciador reverso <i>cpb2</i>	2,0
Enzima Taq DNA polimerase ( 2,5 U) <sup>15</sup>	0,5
<b>VOLUME FINAL DA PCR</b>	<b>50,0</b>

Quadro 1. Protocolo de reagentes da PCR multiplex

Gene	Seqüência dos iniciadores "senso" e "reverso" (5'→3')	Posição do iniciador	Concentração do oligonucleotídeo (nmoles)	Tamanho do fragmento (bp)	Referência
<i>cpa</i>	GCTAATGTTACTGCCGTTGA	1438-457	79.68	324	Meer et al., 1997
	CCTCTGATACATCGTGTAAG	1762-743	81.04		
<i>cpb</i>	GCGAATATGCTGAATCATCTA	871-891	79.64	196	Meer et al., 1997
	GCAGGAACATTAGTATATCTTC	1067-046	80.98		
<i>etx</i>	GCGGTGATATCCATCTATTC	227-246	84.04	655	Meer et al., 1997
	CCACTTACTTGTCTACTAAC	882-862	81.12		
<i>ia</i>	TTTTAACTAGTTCATTTCTAGTTA	275-294	81.47	298	Perelle et al., 1993
	TTTTTGATTCTTTTTCTCTAGATT	721-701	87.83		
<i>cpe</i>	GGAGATGGTTGGATATTAGG	439-458	83.21	233	Meer et al., 1997
	GGACCAGCAGTTGTAGATA	672-650	73.21		
<i>cpb2</i>	GAAAGGTAATGGAGAA	377-392	46.51	573	Herholtz et al., 1999
	GCAGAATCAGGATTTT	950-935	78.37		

Quadro 2. Iniciadores da PCR multiplex dos genes *cpa*, *cpb*, *etx*, *ia*, *cpe* e *cpb2* nas estirpes de *Clostridium perfringens*

<sup>12</sup> Phoneutria Biotecnologia e Serviços - Belo Horizonte, Brasil

<sup>13</sup> Phoneutria Biotecnologia e Serviços - Belo Horizonte, Brasil

<sup>14</sup> Deoxinucleotídeos - Invitrogen Life Technologies - Carlsbad, United States of America

<sup>15</sup> Phoneutria Biotecnologia e Serviços - Belo Horizonte, Brasil

Os segmentos dos genes foram amplificados na PCR Multiplex em aparelho termociclador<sup>9</sup>, utilizando-se do seguinte programa: 35 ciclos para desnaturação do molde de DNA, sendo um ciclo inicial a 94°C durante cinco minutos e os demais 34 ciclos para desnaturação a 94°C por um minuto. Foi utilizada a temperatura de 48°C durante 1 minuto para anelamento dos iniciadores e dois ciclos para extensão da cadeia a 72°C, sendo o primeiro ciclo de um minuto e o segundo ciclo durante sete minutos.

#### 4.3.4 Fracionamento eletroforético do DNA amplificado

Alíquotas de 2µL dos produtos amplificados, após o término da PCR, foram misturadas em 10µL de tampão para amostra não desnaturado 6X<sup>16</sup> para serem separadas em gel de agarose a 1,5%, preparado em TAE<sup>17</sup> 1X e acrescido de 2µL de solução aquosa de brometo de etídeo (C<sub>2</sub>H<sub>20</sub>BrN) a 1%. A corrida foi realizada em cuba eletroforética<sup>18</sup> utilizando-se 100V e 300mA, durante 40 minutos

Após o término da eletroforese, os fragmentos de DNA amplificados nos géis foram visualizados em aparelho transluminador<sup>19</sup> e as imagens geradas foram compiladas em aparelho de fotodocumentação<sup>20</sup>.

#### 4.4 Análise estatística

Os dados referentes ao número de amostras isoladas de jejuno e íleo dos frangos de corte e os resultados da tipificação genotípica de *Clostridium perfringens* foram submetidas às análises estatísticas descritivas e não paramétricas

<sup>16</sup> Phoneutria Biotecnologia e Serviços - Belo Horizonte, Brasil

<sup>17</sup> Tampão TAE 50 x - 100 mL de EDTA a 0,5 M (pH 8,0); 57,1 mL de ácido acético glacial; 242 g de Tris acetato; q.s.p. de H<sub>2</sub>O deionizada - Lab. de Pesquisa em Virologia Animal, DMVP/EV-UFGM

<sup>18</sup> Eletrophoresis Power Supply - modelo EPS 200 - Pharmacia Biotec, São Paulo, Brasil

<sup>19</sup> Macro Vue VV-25 - Hoefer - São Paulo, Brasil

<sup>20</sup> Thermal Imaging - modelo FTI 500 - Pharmacia Biotec, São Paulo, Brasil

pelo teste do Qui-quadrado, para  $p > 5$ , e teste Exato de Fisher, para  $p < 5$ , através do programa computacional StatCalc, módulo Epi-Info, versão 3.3 (Baja, 2004).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 250 amostras de conteúdo luminal de intestino delgado de frangos de corte, foram obtidos 171 (68,4 %) isolados de *Clostridium perfringens* que apresentaram características morfo-tintoriais de bastonetes Gram positivos curtos, colônias arredondadas, umbilicadas, brilhantes, com zona de dupla hemólise (Figura 2) e negativos no testes respiratório. Schocken et al., (1999) analisaram 560 amostras de intestino de frangos de corte, ao abate, suplementados com antibióticos e isolou *Clostridium perfringens* em 94 (16,78%) das amostras, demonstrando influência positiva causada pelos antibióticos fornecidos nas rações para a prevenção da EN.

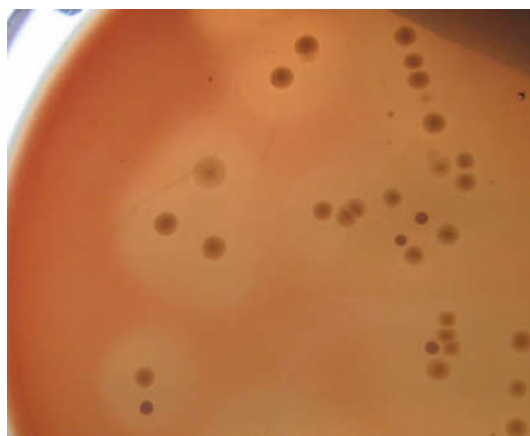


Foto: André A. Fernandes (2006)

Figura 2. Colônias de *Clostridium perfringens* com duplo halo de hemólise em ASA suplementado com 10% de sangue desfibrinado de equino.

As 171 estirpes de *Clostridium perfringens* foram positivas para fermentação de glicose, lactose, sacarose, maltose, salicina, hidrólise da gelatina, coagulação do leite-ferro e redução do nitrito; sendo negativas para produção de indol e urease, demonstrando características bioquímicas compatíveis com *Clostridium perfringens* (Figura 3a - 3j):





**3a**

**3b**

**3c**

**3d**

**3e**

Foto: André A. Fernandes (2006)

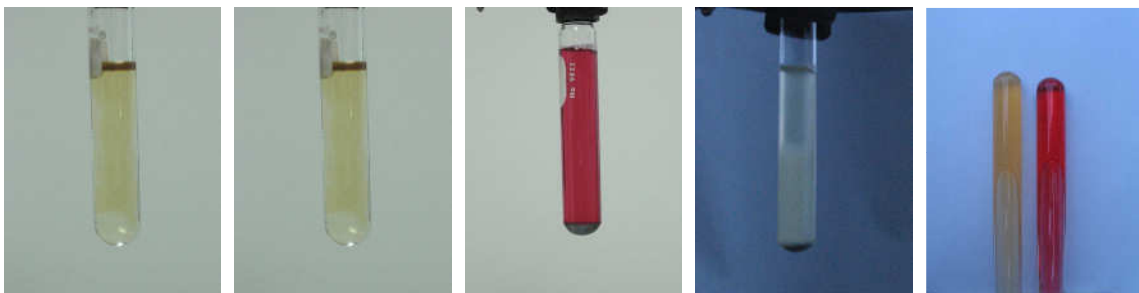
Figura 3a. Fermentação de açúcares por *Clostridium perfringens* (controle negativo ⇒ ausência de crescimento bacteriano no tioglicolato);

Figura 3b. Fermentação de açúcares por *Clostridium perfringens* (amostra de campo positivo ⇒ presença de crescimento bacteriano no fundo do tubo de tioglicolato);

Figura 3c. Coagulação do leite por *Clostridium perfringens* (controle negativo ⇒ ausência de crescimento bacteriano e não coagulação da caseína do leite);

Figura 3d. Coagulação do leite por *Clostridium perfringens* (amostra de campo positivo ⇒ presença de crescimento bacteriano e coagulação da caseína do leite);

Figura 3e. Hidrólise da gelatina por *Clostridium perfringens* (tubo esquerdo: controle negativo ⇒ ausência de crescimento bacteriano, gelatina não hidrolisada e não solidificação da gelatina a 4°C, tubo direito: amostra de campo positivo ⇒ presença de crescimento bacteriano, hidrólise da gelatina e não solidificação da gelatina a 4°C).



**3f**

**3g**

**3h**

**3i**

**3j**

Foto: André A. Fernandes (2006)

Figura 3f. Produção de indol por *Clostridium perfringens* (controle negativo ⇒ ausência de crescimento bacteriano, esterilidade do caldo nitrito triptcase e não formação de anel na parte superior);

Figura 3g. Produção de indol por *Clostridium perfringens* (amostra de campo negativo ⇒ crescimento bacteriano no fundo do tubo, não produção de indol no caldo nitrito triptcase e formação de anel na parte superior do menisco);

Figura 3h. Redução do nitrato por *Clostridium perfringens* (controle negativo ⇒ ausência de crescimento bacteriano, não redução do nitrato em nitrito e viragem do caldo nitrito triptcase para coloração vermelha);

Figura 3i. Redução do nitrato por *Clostridium perfringens* (amostra de campo positivo ⇒ crescimento bacteriano, redução do nitrato em nitrito e não viragem do caldo nitrito triptcase para a coloração vermelha);

Figura 3j. Prova de urease por *Clostridium perfringens* (tubo esquerdo: amostra de campo negativo ⇒ crescimento bacteriano, ausência da urease, acidez do meio, viragem do indicador vermelho de fenol para amarelo, tubo direito: controle negativo ⇒ ausência de crescimento bacteriano, ausência da urease, neutralidade do meio, não viragem do indicador vermelho de fenol).



Em 80 (32,0%) das estirpes obtidas de conteúdo luminal de intestino delgado não foi obtido o isolamento do *Clostridium perfringens*. O percentual de não isolamento encontrado por Tschirdewahn (1991) em amostras de conteúdo intestinal de aves suplementadas com antibiótico mostrou-se inferior (20%), quando comparado à amostragem de frango de corte estudada. Entretanto, o percentual de amostras que apresentaram crescimento de outras espécies de bactérias (33,22%), citado por Schocken et al. (1999), foi semelhante ao aqui encontrado. Segundo McFarland (2000), a ocorrência de *Clostridium perfringens* na microbiota do TGI pode variar com a idade da ave, alimentação, ambiente de criação, utilização de antibióticos, estresse e localização geográfica, justificando as diferenças de resultados.

A reação de lecitinase em ágar TSC suplementados com 5% de gema de ovo demonstrou ser um método adequado e prático para identificação fenotípica das estirpes de *Clostridium perfringens*, revelando a presença da toxina alfa pela hidrólise da lecitina. As colônias lecitinase positivas de *Clostridium perfringens* foram identificadas através do halo brancacento em volta das colônias cremosas (Figura 4).



Foto: André A. Fernandes (2006)

Figura 4. Colônias de *Clostridium perfringens* com reação de lecitinase positiva em ágar TSC suplementado com 5% de gema de ovo.

Da amostragem de 125 conteúdos lumenais de jejuno e igual número de íleos, processados durante o experimento, obteve-se 62 (49.60%) das estirpes de jejuno e 109 (87.20%) de íleos, classificadas como *Clostridium perfringens*. Em 63 amostras de jejuno (50,40%) e 16 (12,80%) de íleo não foram obtidos isolamentos de colônias de *Clostridium perfringens*. Do total de 171 isolados, 62 estirpes de jejuno e 109 de íleo foram destinadas à tipificadas pela PCR multiplex

O elevado percentual de isolamento de *Clostridium perfringens* do íleo (87,2 %) pode sugerir o efeito inibitório dos antibióticos utilizados como promotores do crescimento sobre algumas bactérias Gram positivas da microbiota saudável. Os frangos usado neste experimento estiveram alimentados com ração que continha antimicrobianos promotores de crescimento até uma semana antes do abate. Isto poderia denotar o favorecimento de estirpes de *Clostridium perfringens* por eliminação da competição de outros anaeróbios e atuação dos antimicrobianos no mecanismo de pressão de seleção sobre ecossistema do TGI. (Rana et al., 1993).

Apesar de haver efeito prático de melhor desempenho zootécnico, há total desconhecimento sobre a diminuição do grau de patogenicidade ou agressão do *Clostridium perfringens* frente aos antibióticos utilizados de forma contínua. Porém, o percentual de isolamento de *Clostridium perfringens* da amostragem de íleo (87,2%), quando comparado à ocorrência de isolamento de *Clostridium* spp. de 11% em íleos de aves "caipiras", criadas extensivamente, descrito por Lu et al. (2003), sugere a ação dos antibióticos na dinâmica populacional da microbiota do jejuno.



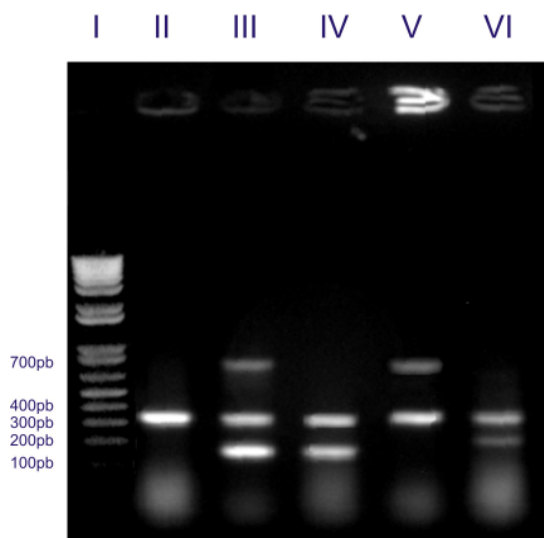
A elevada prevalência de *Clostridium perfringens* (68,4%) na amostragem de conteúdo intestinal de frangos de corte mantidos por sete dias sem o consumo de antimicrobianos promotores de crescimento na ração, sugere que a retirada destes aditivos da dieta das aves poderia elevar sobremaneira a incidência da EN clínica nos plantéis, como já esta sendo relatado nos países europeus (Craven et al., 2001), além de poder resultar na diminuição do ganho de peso e piorar a conversão alimentar das aves devido à forma subclínica da doença (Schocken et al., 1999).

A diferença entre o jejuno (49.60%) e íleo (87.20%) foi estatisticamente significativa, podendo esta variação estar relacionada aos fatores intrínsecos e extrínsecos atuantes no microambiente do jejuno e íleo (Ito, 2000). Macari e Furlan (2005) determinaram o microambiente do intestino das aves ser de vital importância para o crescimento do *Clostridium perfringens*. Os fatores intrínsecos, tais como alterações de pH, oxigênio e ecologia da microbiota indígena do TGI, são capazes de gerar desequilíbrio na dinâmica da população microbiana, podendo desencadear a proliferação do agente e predisposição à EN. O jejuno e íleo de frangos hígidos, quando comparados aos demais órgãos do sistema digestório, devido ao seu pH neutro, já fornece condições fisiológicas mais favoráveis para o crescimento. Riddell e Kong (1992), ao estudarem a influência da dieta na EN, demonstraram o tipo de alimento utilizado na composição da ração ser um fator extrínseco correlacionado à incidência de EN e ao índice de mortalidade em frangos de corte. As lesões de EN são mais frequentes com dietas compostas de ingredientes de baixa digestibilidade e ricas em polissacarídeos insolúveis, como centeio, trigo e cevada. O estímulo à secreção de muco, desencadeado por estes tipos de alimentos, favorece a colonização do *Clostridium perfringens* pela sua atividade mucolítica intensa (Collier et al., 2003).

Na avicultura intensiva de corte, o estresse ambiental advindo do manejo pode

desencadear mudanças na competência imunológica e no microambiente intestinal das aves, resultando na colonização da mucosa ou epitélio do intestino por coccídeos, os quais são importantes na patogênese da EN. Dessa maneira, as lesões prévias na parede do intestino das aves causadas pelos esporozoários do gênero *Eimeria* (Sporozoa) favorecem a proliferação do *Clostridium perfringens* (Williams et al., 2003).

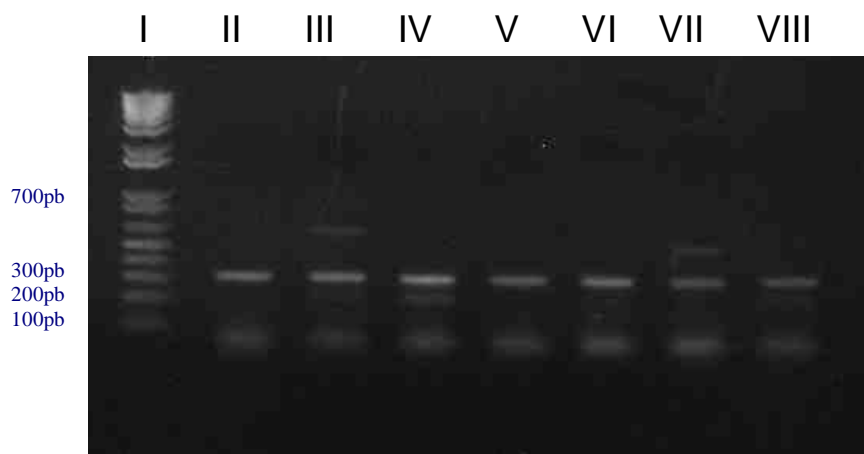
As figuras 5a e 5b apresentam os resultados da amplificação dos fragmentos na PCR multiplex de *cpb* (196pb), *cpe* (233pb), *iA* (298pb), *cpa* (324pb) e *etx* (655pb) das estirpes ATCC de *Clostridium perfringens* A-E utilizadas como controles positivos e das linhagens de *Clostridium perfringens* isoladas de conteúdo intestinal de frango de corte.



Canaleta da esquerda para direita: I. marcador de peso molecular (100 kb), II. genótipo A positivo para *cpa*, III. genótipo B positivo para *cpa*, *cpb* e *etx*, IV. genótipo C positivo para *cpa* e *cpb*, V. genótipo D positivo para *cpa* e *etx*, VI. genótipo E positivo para *cpa* e *iA* (Foto: Arquivo pessoal).

Figura 5a. Fotodocumentação de gel de agarose da PCR multiplex de material genético de *Clostridium perfringens* A-E (ATCC)





Canaleta da esquerda para a direita: I. marcador de peso molecular (100 kb); II., V.,VI., VIII. genótipo A positivo para *cpa*; III. genótipo D positivo para *cpa* e *etx*; IV. genótipo C positivo para *cpa* e *cpb*; VII. genótipo A/cpb2 positivo para *cpa* e *cpb2*.(Foto: Arquivo pessoal).

Figura 5b. Fotodocumentação de gel de agarose da PCR multiplex extraído de material genético de *Clostridium perfringens* tipos A, C e D de conteúdo intestinal de frangos de corte do município de Pará de Minas-MG, 2005.

Os resultados da tipificação genotípica dos 171 isolados de *Clostridium perfringens* são apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Tipos toxigênicos de *Clostridium perfringens* isolados de conteúdo luminal de jejuno e íleo de frangos de corte, Pará de Minas-MG, 2005.

Tipo toxigênico	Jejuno	Íleo	Total Geral	$\chi^2$	F
<i>C. perfringens</i> A	42 (67,74%) <sup>a</sup>	62 (56,88%) <sup>a</sup>	104 (60,82%)	1,97	-
<i>C. perfringens</i> A/beta2	1 (1,61%) <sup>b</sup>	3 (2,75%) <sup>b</sup>	4 (2,34%)	-	p = 1
<i>C. perfringens</i> B	0 (0%) <sup>c</sup>	1 (0,92%) <sup>c</sup>	1 (0,58%)	-	p < 1
<i>C. perfringens</i> C	17 (27,42%) <sup>d</sup>	38 (34,86%) <sup>d</sup>	55 (32,16%)	1,57	-
<i>C. perfringens</i> D	1 (1,61%) <sup>bd</sup>	1 (0,92%) <sup>cd</sup>	2 (1,17%)	-	p = 1
<i>C. perfringens</i> E	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NA	NA
Não tipificados	1 (1,61%)	4 (3,67)	5 (2,92%)	NA	NA
Total	62 (49,60%)	109 (87,20%)	171 (100%)	-	-

Legenda:  $\chi^2$  (Qui-quadrado); F (teste Exato de Fisher); NA = não aplicável. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa (p < 0,05).

Os isolados foram classificados nos cinco tipos toxigênicos, pela PCR multiplex, a partir da identificação dos gens codificadores da produção das quatro toxinas principais (*cpa*, *cpb*, *etx*, *iA*) e um tipo classificado como *Clostridium perfringens* A/ *cpb2* que apresenta o gen *cpa* e o gen de virulência *cpb2* da toxina beta2, simultaneamente. Em nenhuma das estirpes, tanto de referência quanto de campo, foi identificado o gen *cpe*, codificador da enterotoxina.

Os desvios encontrados não foram significativos e não há diferença entre os tipos toxigênicos de *Clostridium perfringens* A-E e A/beta2 para jejuno e íleo. Dessa maneira, pode-se inferir a ausência de variação qualitativa com relação aos tipos toxigênicos de *Clostridium perfringens*, para o jejuno e íleo, seriam um reflexo da semelhança dos microambientes nestas porções do intestino delgado.

Kalender e Ertas (2005), na Turquia, apontaram *Clostridium perfringens* A como principal causa de EN nos frangos de corte, como consequência, acarretando elevadas perdas econômica para o comércio avícola. Entretanto, em uma menor prevalência, *Clostridium perfringens* tipos C e D são também associados às causas de surtos de EN na Turquia. Estes achados justificam a importância do levantamento epidemiológico dos tipos toxigênicos de *Clostridium perfringens* em frangos de corte hígidos e corroboram com distribuição de frequência de *Clostridium perfringens* tipos A e C encontradas na microbiota dos conteúdos lumenais do presente estudo, o qual demonstrou maior prevalência de *Clostridium perfringens* A sobre tipo C.

Das 171 amostras de *Clostridium perfringens* isoladas dos conteúdos lumenais de jejuno e íleo dos frangos de corte, não foi encontrado resultado positivo para a amplificação do gene *cpe*. Engström et al. (2003), na Suécia, estimaram a prevalência de 5% na amplificação do gene *cpe* de amostras isoladas. Miwa et al. (1997) demonstraram o gene *cpe* pode ocorrer em baixo número de amostras de *Clostridium perfringens* isolados dos conteúdos

intestinais de humanos e animais em meios para isolamento utilizados na rotina.

Apesar do gene *cpe* poder estar presente em todos os tipos toxigênicos de *Clostridium perfringens*, os esporos “*cpe*-positivo” coexistem com os “*cpe*-negativo” no conteúdo intestinal de humanos e animais. Segundo Heikinheimo et al. (2004), a detecção do gene *cpe* esperada seria superior à 40% no isolados de *C. perfringens* em conteúdo luminal de frangos de corte, quando utilizada a membrana hidrofóbica de filtração associada ao ágar TSC para hibridização das colônias “*cpe*-positivo”, o que não foi utilizado no presente estudo, justificando a não amplificação do gene *cpe*.

Para a PCR multiplex utilizada neste estudo, o método de extração térmica do DNA da bactéria através das colônias cultivadas em ASA foi satisfatório. Provavelmente, as colônias de *Clostridium perfringens* do ASA representaram a população de dominante do conteúdo luminal dos frangos de corte, embora a metodologia de cultivo não foi a mais eficiente para o isolamento e enumeração das cepas de *Clostridium perfringens* “*cpe*-positivo”.

Cinco (2,94%) das 171 amostras isoladas de ambas seções do intestino delgado dos frangos de corte, uma (1,61%) de jejuno e quatro (3,67%) de íleo, não puderam ser tipificadas pela PCR multiplex. Percentual semelhante foi relatado, por Heikinheimo et al (2005), podendo indicar possível interação de mecanismo de variação clonal do gene *cpa* (Ginter et al; 1996) ou perda de genes de localização plasmidial durante o repique de algumas amostras.

*Clostridium perfringens* A tem sido relatado como o tipo toxigênico dominante na microbiota intestinal de frangos de corte, corroborando com os resultados encontrados por Meer e Songer (1997), Yoo et al. (1997), Engström et al. (2003) e Nauerby et al. (2003). Ainda, os mesmos autores atentam para o potencial impacto para a saúde pública, advindo da ingestão de carne de frangos contaminados com *Clostridium perfringens* do tipo A durante o

abate. Craven et al. (2001) isolaram *Clostridium perfringens* em 13 carcaças de frangos e obteve percentual de 81% de positivos em único plantel de 16 aves, evidenciando a importância desse achado no conteúdo intestinal.

O estudo epidemiológico da tipificação toxigênica de *Clostridium perfringens* em amostragem de conteúdo luminal de jejuno e íleo associado ao achado de lesões intestinais e hepáticas, podem evidenciar as manifestações subclínicas da EN, e esta poderão afetar de forma negativa os índices zootécnicos de conversão alimentar e ganho de peso dos frangos de corte (Lovland e Kaldhusdal, 1999; Kaldhusdal et al., 2001).

Atualmente, o modelo da avicultura intensiva brasileira depende de associação de antibióticos para prevenir a EN. Na Suécia desde 1986, (SOU, 1997), a Noruega em 1995 (Kruse et al., 2003), Dinamarca no ano de 1998, (Emborg et al., 2001) aboliram o uso de antimicrobianos promotores do crescimento das rações. Pela norma sanitária vigente, nestes países a EN pelo *Clostridium perfringens* é controlada pelo uso da narasina, boas práticas de higiene e modificações nas dietas das aves. Boa capacidade inibitória do *Clostridium perfringens* à narasina tem sido relatada em outros países (Martel et al, 2004)

Devido às mudanças futuras das ações preventivas para o controle da EN no Brasil e em vista ao recente aumento da incidência da doença com a retirada dos antimicrobianos promotores de crescimento em algumas partes do mundo, o efeito desses antibióticos na inibição do *Clostridium perfringens* no TGI deve ser melhor pesquisado (Nakajima, 2006). A distribuição da sensibilidade desta amostragem isolada em frangos de corte, pela Concentração Inibitória Mínima (MIC), constitui boa perspectiva para a avaliação do grau de susceptibilidade dos tipos toxigênicos de *Clostridium perfringens* às drogas de uso corrente na avicultura comercial do país.

## 6. CONCLUSÕES

*Clostridium perfringens* dos tipos toxigênicos A e C são predominantes na amostragem de conteúdo luminal de jejuno e íleo de frangos de corte.

Não foram encontrados isolados de *Clostridium perfringens* tipo E e estirpes “cpe-positivo”.

Quanto à escolha do sítio para o isolamento de *Clostridium perfringens*, o íleo foi superior ao jejuno e houve variação quantitativa entre as amostras.

Quanto à composição da microbiota intestinal, os tipos toxigênicos de *Clostridium perfringens* foram semelhantes para as amostras jejuno e íleo e não houve variação qualitativa entre elas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. *Bacterial agents of foodborne illness*. Guildford: The Royal Society of Chemistry, 1995, 364 pp.

BAJA, R. *Programa StatCalc 3.3, módulo Epi-Info :manual do usuário*. Viçosa: Fundação Artur Bernardes, 2004, 114 pp.

BANNAM, T. L.; ROOD, J. I. Relationship between the *Clostridium perfringens* catQ gene product and chloramphenicol acetyltransferases from other bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 35, n.3, p. 471-476, 1991.

BERRYMAN, D. I.; LYRISTIS, M.; ROOD, J. I. Cloning and sequence analysis of *ermQ*, the predominant macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene in *Clostridium perfringens*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 38, n.5, p. 1041-1046, 1994.

BOLETI, I. C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório In: Macari, M.; Furlan, R. L.; Gonzales, E. (ed), *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*, 2ed., São Paulo: Facta, 2002. p. 75-95.

- BROUSSARD, C. T.; HOFACRE, C. L.; PAGE, R. K.; FLETCHER, O. J. Necrotic enteritis in cage-reared commercial layer pullets. *Avian Dis.* v. 30, n. 3, p. 617-619, 1986.
- BRYNESTAD, S.; GRANUM, P. E. Evidence that Tn 5565, which includes the enterotoxin gene in *Clostridium perfringens*, can have a circular form which may be a transposition intermediate. *Microbiol. Letters*, v. 170, p. 281-286, 1999.
- CATO, E. P.; GEORGE, W. L.; FINEGOLD, S.M. Genus *Clostridium*. In: Sneath, P. (ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams e Wilkins. v. 2, p. 1179-1182, 1986.
- COLLIER, C. T.; VANDERKLIS, J. D. ; DEPLANCKE, B.; ANDERSON, D. B.; GASKIN, H. R. Effects of tylosin on bacterial mucolysis. *Clostridium perfringens* colonization, and intestinal barrier function in a chick model of necrotic enteritis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 47, n. 10, p. 311-3317, 2003.
- CORNILLOT, E.; SAINT-JOANIS, B.; DAUBE, G.; KATAYAMA, S.; GRANUM, P. E.; CANARD, B.; COLE, S. T. The enterotoxin gene (*cpε*) of *Clostridium perfringens* can be chromosomal or plasmid-borne. *Mol. Microbiol.*, v. 15, n. 4, p. 639-647, 1995.
- CRAVEN, S. E.; STERN, N. J.; BARLEY, J. S.; COX, N. A. Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during production and processing. *Avian Dis.*, v. 45, n. 4, p. 887-896, 2001.
- DOWELL, V. R. J.; HAWKINS, T. M. VII. Examination of foods and feces for *Clostridium perfringens*. In: *Laboratory methods in anaerobic bacteriology : centers for disease control laboratory manual*. Atlanta: CDC, p. 45-47, 1981.
- LWINGER, K.; ENGSTRÖM, B.; FOSSUM, O.; HASSAN, S.; TEGLÖF, B. Effect of coccidiostats on necrotic enteritis and performance in broiler chickens. *Swedish J. Agric. Res.*, p. 39-44, 1994.
- EMBORG, H.; ERSBOLL, A. K.; HEUER, O. E.; WEGENER, H. C. The effect of discontinuing the use of antimicrobial growth promoters on the productivity in the Danish broiler production. *Prev. Vet. Med.*, v. 50, n. 1-2, p. 53-70, 2001.
- ENGSTRÖM, B. E.; FERMER, C.; LINDBERG, A.; SAARINEN, E.; BÅVERUD, V.; GUNNARSSON, A. Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Vet. Microbiol.* v. 94, n. 3, p. 225-235, 2003.
- FICKEN, M. D.; WAGES, D. P. Necrotic Enteritis. In: Calnek, B. W. (ed). *Diseases of Poultry*. Ames: Iowa State University, 1997.p. 261-264.
- FISHER, M. D.; MIYAMOTO, K.; HARRISON, B.; AKIMOTO, S.; SARKER, M. R.; CCLANE, B. A. Association of beta2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. *Mol. Microbiol.*, v. 56, n.3, p. 747-762, 2005.
- GINTER, A.; WILLIAMSON, E. D.; DESSY, F.; COPPE, P.; BULLIFENT, H. HOWELLS, A.; TITBALL, R. W. Molecular variation between the  $\alpha$ -toxins from the type strain (NCTC8237) and clinical isolates of *Clostridium perfringens* associated with disease in man and animals. *Microbiol.*, v. 142, n.1, p. 191-198, 1996.
- HEIER, B. T.; LOVLAND, A.; SOLEIM, K. B.; KALDHUSDAL, M.; JARP, J. A field study of naturally occurring specific antibodies against *Clostridium perfringens* alpha toxin in Norwegian broiler flocks. *Avian Dis.*, v. 45, n. 3, p. 724-732, 2001.
- HEIKINHEIMO, A.; KORKEALA, H. Multiplex PCR assay for toxinotyping isolates obtained from finnish broiler chickens. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 40, n. 6, p. 407-411, 2005.

HEIKINHEIMO, A.; LINDSTRÖM, M.; KORKEALA, H. Enumeration and isolation of *cpe*-positive *Clostridium perfringens* spore from feces. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, n. 9, p. 3992-3997, 2004.

HERHOLZ, C.; MISEREZ, R.; NICOLT, J.; FREY, J.; POPOFF, M.; GILBERT, M.; GERBER, H.; STRAUB, R. Prevalence of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *J. Clin. Microbiol.*, v. 37, n. 2, p. 358-361, 1999.

INSTITUTO DE PESQUISA GENÔMICA. Disponível em: <<http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html>>. Acesso em 20/04/2006.

ITO, N. M. K. *Morfofisiologia do intestino*. São Paulo: ELANCO, 2000. 44 pp.

JUSTIN, N.; WALKER, N.; BULLIFENT, H. L.; SONGER, G.; BUESCHEL, D. M.; JOST, H.; NAYLOR, C.; MILLER, J.; MOSS, D. S.; TITBALL, R. W.; BASAK, A. K. The first strain of *Clostridium perfringens* isolated from avian source has an alpha-toxin with divergent structural and kinetic properties. *Biochemistry*, v. 41, n. 20, p. 6253-6262, 2002.

KALDHUSDAL, M.; SCHNEITZ, C.; HOFSHAGEN, M.; SKJERVE, E. Reduced incidence of *Clostridium perfringens*-associated lesions and improved performance in broiler chickens treated with normal intestinal bacteria from adult fowl. *Avian Dis.* v. 45, n. 1, p. 149-156, 2001.

KALENDER, H.; ERTAS, H. B. Isolation de *Clostridium perfringens* from chickens and detection of the alpha toxin gene by polymerase chain reaction (PCR). *Turkey J. Vet. Animal Sci.*, v.29, p. 847-850, 2005.

KNOW, Y. K.; LEE, Y. J.; MO, I. P. An outbreak of necrotic enteritis in the ostrich farm in Korea. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 66, n. 12, p. 1613-1615, 2004.

KRUSE, H.; SIMONSEN, G. NORM/NORM-VET. Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway. Norwegian Zoonosis Centre, 2003.

LOVLAND, A.; KALDHUSDAL, M. Liver lesions seen at slaughter as an indicator of necrotic enteritis in broiler flocks. *Immunol. Med. Microbiol.*, v. 24, n. 3, p. 345-351, 1999.

LOVLAND, A.; KALDHUSDAL, M. REDHEAD, K.; SKJERVE, E.; LILLEHAUG, A. Maternal vaccination against subclinical necrotic enteritis in broilers. *Avian Pathol.*, v. 33, n. 1, p. 83-92, 2004.

LYRAS, D.; ROOD, J. I. Genetic organization and distribution of tetracycline resistance determinants in of *Clostridium perfringens*. *Antimicrobiol. Agents Chemo.*, v. 40, p. 2500-2504, 1996.

LU, J.; IDRIS, U.; HARMON, B.; HOFACRE, C.; MAURER, J.J.; LEE, M. D. Diversity and succession of the intestinal bacteria community of the maturing broiler chicken. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 69, n. 11, p. 6816-6824, 2003.

MACARI, M.; FURLAN, R. L. Probióticos. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2005, Campinas. ANAIS...Campinas: FACTA, 2005. p. 53-77.

MARTEL, A.; DEVRIESE, L. A.; CAUWERTS, K.; DEGUSSEM, K.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F. Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathol.*, v. 33, n. 1, p. 3-7, 2004.

MEER, R.R.; SONGER, J. G. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 58, n.7, p. 702-705, 1997.

McFARLAND, L. V. Normal flora: diversity and functions. *Microbiol. Ecol. in Health and Dis.*, v. 12, p. 193-207, 2000.

- MIWA, N.; NISHINA, T.; KUBO, S.; HONDA, H. Most probable numbers of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of domestic livestock detected by nested PCR. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 59, n. 7, p. 557-560, 1997.
- NAKAJIMA, T. Estudo comparativo demonstrando o efeito inibitório de enramicina e avilamicina sobre o *Clostridium perfringens* no intestino. *Schering-Plough Animal Health*, p. 11-12, 2006.
- NAUERBY, B.; PEDERSEN, K.; MADSEN, M. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Vet. Microbiol.*, v. 94, n. 3, p. 257-266, 2003.
- NIILLO, L. Enterotoxemic *Clostridium perfringens*. In: Gyles, C. L.; Thoen, C. O. (ed). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Ames: Iowa State University, 1993. p. 114-123.
- OLKOWSKI, A. A.; WOJNAROWICS, C.; CHIRINO-TREJO, M.; DREW, M. D. Responses of broiler chickens orally challenged with *Clostridium perfringens* isoated from field cases of necrotic enteritis. *Res. Vet. Sci.*, v. 81, n. 1, p. 99-108, 2006.
- ÖSTERBLAD, M.; JARVINEN, H.; LONNQVIST, K.; HUIKKO, S.; LAIPPALA, P.; VILJANTO, J.; ARVILOMMI, H; HUOVINEN, P. Evaluation of a new cellulose sponge-tipped swab for microbiological sampling: a laboratory and clinical investigation. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, n. 5, p. 1894-1900, 2003.
- PERELLE, S.; GILBERT, M.; BOQUET, P; POPOFF, M. R. Characterization of *Clostridium perfringens* iota-toxin genes and expression in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, v. 63, n. 12, p. 5147-5156, 1995.
- PETIT, L.; GILBERT, M.; POPOFF, M. R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.*, v. 7, n. 3, p.104-110, 1999.
- QUINN, P. J.; CARTER, M. J.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Gênero *Clostridium*. In: *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe Publishing. 2005. p. 94-105.
- RANA, R.; AKHTAR, M. S.; NAWAZ, M. Residues of sulfaquinoxaline in poultry products. *Pakistan Vet. J.*, v. 45, p. 161-166, 1993.
- REVISTA AVICULTURA INDUSTRIAL. Disponível em: <<http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp>>. Acesso em 15/03/2007.
- RIDDELL, C.; KONG, X. M. The influence of diet on necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Dis.*, v. 36, n. 3, p. 499-503, 1992.
- ROOD, J. I. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 52, p. 333-360, 1998.
- ROOD, J. I.; COLE S. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Rev.* v. 55, n.4, p. 621-648, 1991.
- SEBALD, M.; PETIT, J. C. Identification des *Clostridium* species. In: *Méthodes de laboratoire bactéries anaérobies et leur identification*. 2 ed., Paris: Institut Pasteur. 1997. p. 262-263.
- SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; GAMA, L. F. S. A. M.; CRUZ, F.; SORBARA, J. O. B. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. XXXVI, ANAIS...Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999. p. 149-151.
- SHIMIZU, T.; OHTANI, K.; HIRAKAWA, H; OHSHIMA, K.; YAMASHITA, A.; SHIBA, T.; ORGASAWARA, N.; HATTORI, M.; KUHARA, S.; HAYASHI, H. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 99, n. 2, p. 996-1001, 2002.

SONGER, J. G. Clostridial enteric diseases of animals. In: *The clostridia - molecular biology and pathogenesis*. San Diego: Academic Press, 1997. p. 153-182.

SOU (1997): Antimicrobial feed additives. Report from the commission on antimicrobial feed additives, 1997.

SOUZA, M. R. *Identificação molecular e propriedades probióticas de bactérias ácido lácticas isoladas de cecos de Gallus gallus domesticus "caipira" e de granja*. 2006. 147f. Dissertação. (Doutorado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

STACKEBRANDT, E.; KRAMER, I.; SWIDERSKI, J.; HIPPE, H. Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 24, n. 3, p.253-258,1999.

TAMAI, E.; ISHIDA, T.; MIYATA, S.; MATSUSHITA, O.; SUDA, H.; KOBAYASHI, S.; SONOBE, H.; OKABE, A. Accumulation of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the mouse kidney and its possible biological significance. *Infec. Immun.*, v. 71, n. 9, p. 5371-5375, 2003.

THOMPSON, D. R.; PARREIRA, V. R.; KULKARNI, R.R.; PRESCOTT, J. F. Live attenuated vaccine-based control of necrotic enteritis of broiler chickens. *Vet. Microbiol.*, v.113, n. 1-2, p. 25-34, 2006.

TSCHIRDEWAHN, B.; NOTERMANS, S.; WERNARS, K.; UNTERMANN, F. The presence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in faeces of various animals. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 14, n. 2, p. 175-178, 1991.

UZAL, F. A.; PLUMB, J. J.; BLACKALL, L. L.; O'BOYLE, D.; KELLY, W. R. Detection by polymerase chain reaction of *Clostridium perfringens* producing epsilon toxin in faeces and in gastrointestinal contents of goats. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 23, n. 1, p. 13-17, 1996.

VIEIRA, A. A. S. *Padronização e aplicação da técnica de PCR de amplificação múltipla (PCR multiplex) na tipificação de Clostridium perfringens isolados de suínos*. 2006. 43f. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) Escola de Veterinária da UFMG.

VIEIRA, S. L. Exigências do mercado comum europeu na importação de frangos. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. 2, 2001, Chapecó-SC. ANAIS...Chapecó: Sociedade Catarinense de Medicina Veterinária, 2001. p. 9-16.

WATKINS, K. L.; SHRYOCK, T. R.; DEARTH, R. N.; SAIF, Y. M. In-vitro antimicrobial susceptibility of from commercial turkey and broiler chicken origin. *Vet. Microbiol.*, v. 54, n. 2, p. 195-200, 1997.

WILLIAMS, R. B.; MARSHALL, R. N.; LARAGIONE, R. M.; CATCHPOLE, J. A new method for the experimental production of necrotic enteritis and its use for studies on the relationships between necrotic enteritis, coccidiosis and anticoccidial vaccination of chickens. *Parasitol. Res.*, v.90, n. 1, p. 19-26, 2003.

WOBESER, G.; RAINNIE, D. J. Epizootic necrotic enteritis in wild geese. *J. Wildl. Dis.*, v. 23, n. 3, p. 367-385, 1987.

YOO, H. S.; LEE, S. U.; PARK, K. Y.; PARK, Y. H. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 35, 228-232, 1997.