LUIS ANTONIO LLANCO ALBORNOZ

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS PRINCIPAIS FATORES DE VIRULÊNCIA
E GENÓTIPOS DE *Clostridium perfringens* ISOLADOS DE FRANGOS COM
ENTERITE NECRÓTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

LUIS ANTONIO LLANCO ALBORNOZ

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS PRINCIPAIS FATORES DE VIRULÊNCIA
E GENÓTIPOS DE *Clostridium perfringens* ISOLADOS DE FRANGOS COM
ENTERITE NECRÓTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos

Co-orientadora: Profa. Dra. Viviane Nakano

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Albornoz, Luis Antonio Llanco.

Caracterização molecular dos principais fatores de virulência e genótipos de *Clostridium perfringens* isolados de frangos com enterite necrótica / Luis Antonio Llanco Albornoz. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Mario Júlio Ávila Campos.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Bacteriologia de anaeróbios.

Versão do título para o inglês: Molecular characterization of virulence factors and genotypes of *Clostridium perfringens* isolated from chickens suffering necrotic enteritis.

1. Enterite necrótica 2. *Clostridium perfringens* 3. Fatores de virulência 4. Toxina TpeL 5. Susceptibilidade aos antimicrobianos 6. Diversidade genética I. Ávila Campos, Prof. Dr. Mario Julio II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0206/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Barros Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 3418 - CEP 04308-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7732 - telefax: (55) (011) 3091.7438
e-mail: resp@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 104 nas fls. 61 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Mario Júlio Ávila Campos, Coordenador(a) da Linha de pesquisa *"Caracterização molecular dos principais fatores de virulência e genótipos de clostridium perfringens isolados de frangos com enterite necrótica"* do qual participou(aram) o(s) **Luis Antonio Llanco Alborno**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **25.11.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 26 de novembro de 2008.

Prof. Dr. WOTIAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

A mi Mamá Carmencita, el gran amor de mi vida;

Al único hombre al que me quiero parecer cuando sea grande,
mi Papá Anqui, mi mejor ejemplo;

A mi hermano Goyito, a tu lado todo crecerá fuerte, honesto y
feliz

A Nena y Katyka, mis amadas y engreídas hermanitas, sus
esfuerzos son mi gran inspiración, y sus sonrisas el lugar más
bonito del universo;

A Pepito y Alessa, sus travesuras y sonrisas son el mejor
regalo que Dios me pudo dar;

A mis tíos Víctor, Lichi, Malenita, Paquita, Yuri, Mauro, Gabino,
Juanita, Walter, Mauricio y José; en los momentos más felices
de mi vida siempre están ustedes;

A Mechita, Feliciano, Emilio y Antonio, mis amados abuelitos,
mi vida se originó gracias a ustedes, en mis pensamientos y
oraciones siempre están presentes;

A Marcelo, Cecilia y Alan, hermanos más recientes de mi
familia;

A Cesar, Dante, Luis y Marcel, mis grandes amigos;

A ti Denise, que desde hace poco velas mis sueños y estas a
mi lado para completarme y hacerme feliz.

AGRADECIMENTOS

Ao supremo criador de tudo, que apesar de minhas dúvidas e defeitos, me sabe perdoar, compreender e ver o melhor de mim, que me guia em cada passo e protege.

Ao professor Mario Julio Avila-Campos, pelos conselhos, paciência, e conhecimentos transmitidos. Muito obrigado pela oportunidade e por ter contribuído enormemente com sua experiência na minha formação.

À professora Viviane Nakano, minha chefita, pela amizade, orientação, idéias e interesse no desenvolvimento desta pesquisa, que sem sua participação e apoio não teria sido possível.

Ao professor Antônio Piantino e os membros do Laboratório de Patologia Aviar da FMVZ-USP, pelas facilidades nas coletas das amostras utilizadas neste estudo.

À Aline Ignacio e Miriam Rodriguez, sua alegria, inteligência e dedicação me fazem sentir orgulho de poder chamá-las de amigas. Alinita e Miriamzinha, muito obrigado pelas conversas microbiológicas e pelos bons momentos compartilhados.

Os meus caros amigos do Laboratório de Anaeróbios, Zulmira Alves, Rafael Castillo, Thais Wahasugui, Elerson Gaetti, Sheila Belini, Viviane Arenas, Marília Alves, Naiane Cardoso, Gisela de Souza, Tânia Alem, e Bruna Bizerril. Fizeram-me sentir em casa e me deixaram grandes lembranças.

À Márcia Harumi, Marcita, quando mais precisei de apoio você me cuidou sem pedir nada em troca. A vida toda serei sempre grato.

A meus professores e amigos da Faculdade de Medicina Veterinária da UNMSM, Dr. Rosadio, Dr. Lenin Maturrano, Dra. Wheeler, Hugo Castillo, Álvaro Veliz, David Perez, Pablo Londoño, Jesús Chavez e Luis Luna.

Aos novos grandes amigos que fiz aqui em São Paulo, em especial Paola, Liege, Leonardo, Amanda, Lucas, Guilherme, Tássia, Aline, Verena, Denise, Luis, Silvana, Claudia, César, João, Leandro, Breno e outros mais, que guardo bem no coração.

Aos professores do Departamento de Microbiologia do ICB/USP pelos valiosos conhecimentos transmitidos que contribuíram na minha formação acadêmica, que me marcarão pela vida toda. Meu muito obrigado.

Às secretárias do Departamento de Microbiologia Gisele da Graça Santana, Naíde Rodrigues, e Elizabete dos Santos, pelo apoio constante.

Aos funcionários e pessoal técnico do Departamento de Microbiologia pelo profissionalismo e facilidades cedidas ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do serviço da Biblioteca, em especial Renata Santos, pelo apoio e disposição nas pesquisas bibliográficas e na formatação desta tese.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido durante a elaboração desta pesquisa.

“A ignorância afirma ou nega veementemente. A ciência duvida”. Voltaire.

“Grandes mentes discutem idéias, mentes medianas discutem eventos, mentes pequenas só discutem pessoas”. Eleanor Roosevelt.

RESUMO

LLANCO, L. A. A. **Caracterização molecular dos principais fatores de virulência e genótipos de *Clostridium perfringens* isolados de frangos com enterite necrótica**. 2013. 109 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Clostridium perfringens é a bactéria responsável pela enterite necrótica (EN), que afeta a produção avícola mundial. Esta bactéria se caracteriza pela produção de diversas toxinas que causam lesões no intestino provocando elevada mortalidade, e perdas econômicas pela queda na produtividade. Este estudo avaliou os principais fatores de virulência, a susceptibilidade aos antimicrobianos e a diversidade genética de *C. perfringens* isolados de frangos com EN. Foram obtidos 22 isolados de nove das 94 amostras analisadas. Todos, menos um isolado, possuíram um ou dois genes *nanI* (95%) e *nanJ* (81%) que codificam a produção de neuraminidases, e (19/22), mostraram atividade de neuraminidase em hemácias de frango. Nenhum isolado abrigou o gene *nanH*. A atividade hemaglutinante foi observada em poucos isolados (26%). Todos os isolados foram positivos para o gene *p/c* (toxina α), sendo classificados como tipo A. Sete isolados (31,8%) abrigaram o gene *tpeL* que codifica a toxina TpeL, sendo este o primeiro relato da presença desta toxina no Brasil associado a quadros de EN em frangos. Isolados *tpeL*+ mostraram efeito citotóxico característico da ação da toxina TpeL. Alguns isolados mostraram capacidade de aderir e invadir as células epiteliais testadas. A maioria dos isolados foi resistente à sulfaquinoxalina (100%), cefalexina (95%), eritromicina (95%), bacitracina (50%), com valores de CIM₉₀ variando entre 32 μ g/mL a $\geq$ 512 μ g/mL. Cefoxitina, amoxicilina, enrofloxacina, amoxicilina-ácido clavulânico, penicilina-estreptomicina, cloranfenicol e metronidazol se mostraram ativos contra os *C. perfringens* avaliados. Pela técnica de AP-PCR e empregando o coeficiente UN1, todos os isolados foram agrupados em sete clusters, apresentando-se como um grupo heterogêneo.

Palavras-chave: Enterite necrótica. Frangos. *Clostridium perfringens*. Fatores de virulência. Toxina TpeL. Susceptibilidade aos antimicrobianos. Diversidade genética.

ABSTRACT

LLANCO, L. A. A. **Molecular characterization of the virulence factors and genotypes of *Clostridium perfringens* isolated from chickens with necrotic enteritis.** 2013. 109 p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Clostridium perfringens cause necrotic enteritis (EN) affecting the poultry production worldwide. This bacterium produces various toxins and causes lesions in the intestine producing high mortality and economic loss due to the low productivity. In this study, the major virulence factors, antimicrobial susceptibility and genetic diversity of *C. perfringens* isolated from chickens with EN were evaluated. 22 isolates were obtained from nine out of 94 intestinal samples analyzed. All the isolates with exception of one harbored one or two genes *nanI* (95 %) and *nanJ* (81%) codifying the neuraminidase production, and 19/22 showed neuraminidase activity on chicken's erythrocytes. No isolates harbored the gene *nanH*. Haemagglutination was observed in 26% of the isolates. All isolates were positive for the gene *plc* (α toxin) being classified as type A. Seven isolates (31.8%) harbored *tpeL* gene that encodes the toxin TpeL, and this appear to be the first report of the presence of this toxin associated to chickens with EN in Brazil. Isolates *tpeL*⁺ showed characteristic cytotoxic effect. Some isolates showed the ability of adhere to and invade to epithelial cells. Most of the isolates were resistant to sulphaquinoxaline (100%), cephalexin (95%), erythromycin (95%), bacitracin (50%) with MIC₉₀ values ranging from 32 μ g /mL to $\geq$ 512 μ g /mL. Cefoxitin, amoxicillin, enrofloxacin, amoxicillin-clavulanic acid, penicillin-streptomycin, chloramphenicol, and metronidazole showed activity against *C. perfringens*. By AP-PCR and by using the coefficient UN1, isolates were grouped into seven clusters, showing to be a heterogeneous group.

Keywords: Necrotic enteritis. Chicken. *Clostridium perfringens*. Virulence factors. Toxin TpeL. Antimicrobial susceptibility. Genetic diversity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Mecanismo de ação das principais toxinas de <i>C. perfringens</i>	27
Figura 2 -	Lesões características da Enterite necrótica.....	35
Figura 3 -	Fatores críticos para o desenvolvimento da EN.....	37
Figura 4 -	Característica fenotípica dos <i>C. perfringens</i> isolados.....	53
Figura 5 -	Efeito citopático de <i>C. perfringens</i> em células Vero.....	55
Figura 6 -	Adesão de <i>C. perfringens</i> em células HEp-2.....	56
Figura 7A -	Detecção do gene <i>plc</i>	59
Figura 7B -	Detecção do gene <i>tpeL</i>	59
Figura 8 -	Detecção dos genes <i>nanI</i> e <i>nanJ</i>	60
Figura 9 -	Dendrograma de 22 <i>C. perfringens</i> isolados de frangos com EN.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Genes e oligonucleotídeos utilizados na toxinotipagem por Multiplex-PCR de <i>C. perfringens</i> isolados de frangos com enterite necrótica.....	48
Tabela 2 -	Oligonucleotídeos utilizados na detecção dos genes que codificam a produção de neuraminidase por PCR em <i>Clostridium perfringens</i> isolados de frangos com enterite necrótica.....	50
Tabela 3 -	Características fenotípicas e genotípicas dos 22 isolados de <i>C. perfringens</i> isolados de frangos com enterite necrótica.....	53
Tabela 4 -	Resultados dos testes de adesão e invasão em células HEp-2 para os isolados de <i>C. perfringens</i>	57
Tabela 5 -	Valores de CIM e porcentagem de resistência para 14 drogas antimicrobianas de 22 <i>C. perfringens</i> isolados de frangos com enterite necrótica.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST - “Basic Local Alignment Search Tool for nucleotide”

CIM - Concentração Inibitória Mínima

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

EN - Enterite Necrótica

HA - Hemaglutinação

LCT - Grandes citotoxinas clostridiais (Large Clostridial Cytotoxins)

NCBI - Centro Nacional de Informação Biotecnológica

NA - Atividade Neuraminidase

NetB - Toxina da enterite necrótica similar á toxina β (Necrotic Enteritis toxin like B)

bp - Pares de bases

PCR - Reação em cadeia da Polimerase

PLC - Fosfolipase tipo C

TGI - Trato gastrointestinal

TpeL - Grande citotoxina de *C. perfringens* (toxin *C. perfringens* large Cytotoxin)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Geral.....	19
2.2 Específicos.....	19
3 ANÁLISE DA LITERATURA.....	20
3.1 Microbiota residente intestinal aviar.....	20
3.2 <i>Clostridium perfringens</i>.....	22
3.2.1 Aspectos taxonômicos.....	22
3.2.2 Características fisiológicas.....	23
3.2.3 Aspectos genéticos.....	24
3.2.4 Aspectos ecológicos.....	24
3.3 Patogenecidade e virulência de <i>Clostridium perfringens</i>...	25
3.3.1 Exotoxinas.....	26
3.3.2 Regulação da Virulência.....	32
3.4 Importância clínica de <i>C. perfringens</i> na enterite necrótica.....	33
3.4.1 Patogênese.....	36
3.5 Susceptibilidade aos antimicrobianos.....	38
3.6 Diversidade genética.....	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 Amostras clínicas.....	41
4.2 Isolamento e identificação bacteriana.....	41
4.3 Características fenotípicas.....	42
4.3.1 Detecção (HA) e inibição (IHA) da hemaglutinação.....	42
4.3.2 Detecção da produção e da inibição da atividade da enzima	

<i>neuraminidase</i>	42
4.3.3 Ensaio citotóxico em células Vero	43
4.3.4 Ensaios de adesão e invasão em células HEp-2	44
4.3.5 Determinação da susceptibilidade às drogas antimicrobianas...	45
4.4 Características genotípicas	46
4.4.1 Extração de DNA	46
4.4.2 Toxinotipagem dos <i>Clostridium perfringens</i> isolados	47
4.4.3 Sequenciamento do gene <i>tpeL</i>	49
4.4.4 Detecção dos genes <i>nanH</i>, <i>nanI</i> e <i>nanJ</i> (neuraminidase)	49
4.4.5 Avaliação da diversidade genética	50
5 RESULTADOS	52
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICES	97
APÊNDICE A - Características gerais das amostras clínicas analisadas	98
APÊNDICE B - Artigo publicado	105

1 INTRODUÇÃO

Dentre os microrganismos anaeróbios que colonizam o trato intestinal do homem e animais, destaca-se o gênero *Clostridium*, composto por pelo menos 150 espécies (GARRITY et al., 2007; SAVAGE, 1986). Estas bactérias anaeróbias, esporuladas e fermentadoras de diversos compostos orgânicos, participam ativamente da degradação final de alguns nutrientes no ecossistema gastrointestinal, assim como, do processo de renovação da biomassa, quando habitam solos e esgotos, cumprindo um importante papel ecológico (GONG et al., 2008; SONGER, 1996).

Apesar da maioria das bactérias deste gênero *Clostridium* ser comensal, aproximadamente 10% possui elevada patogenicidade, recorrente da produção de potentes toxinas. Este gênero bacteriano abriga espécies que produzem aproximadamente 20% de todas as toxinas bacterianas conhecidas (POPPOF; VOUBET, 2013).

Dentre as espécies do gênero *Clostridium*, a mais frequentemente isolada de casos de enterites, abscessos, e toxemias, entre outros, é *C. perfringens*. Este microrganismo é o principal responsável pela gangrena gasosa, por intoxicações alimentares, e diarreias associadas ao uso de antibióticos em humanos (ROOD et al., 1997). Também, esta bactéria tem sido isolada de doenças inflamatórias crônicas, como colite ulcerativa e doença de Crohn, sendo também proposta por alguns autores a sua participação no desenvolvimento de câncer de cólon (PRUTEANU et al., 2011; PRUTEANU; SHANAHAN, 2013).

Clostridium perfringens também desenvolve processos infecciosos em animais, produzindo a enterite necrótica (EN) em aves. Esta doença causa morte súbita quando se apresenta na forma aguda, e baixo rendimento produtivo na forma subclínica, assim como também, produz grandes perdas econômicas em países exportadores de carne de aves, principalmente frangos (VAN IMMERSEEL et al., 2009).

Esta espécie bacteriana é capaz de produzir mais de quinze toxinas, que constituem seus principais fatores de virulência. Dessas toxinas somente quatro, consideradas letais: α , β , ϵ e ι , servem para classificar essa espécie em cinco toxinotipos: A, B, C, D, e E, os quais estão relacionados às doenças de importância

na medicina humana e veterinária (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999; SONGER, 1996).

A toxina α é o fator de virulência de *C. perfringens* mais estudada, devido a seu rápido efeito letal em animais de experimentação, à ampla distribuição de seus receptores e substratos na superfície de células eucarióticas, e à sua relação com doenças severas (GOÑI; MONTES; ALONSO, 2012; SONGER, 1996; TITBALL; NAYLOR; BASAK, 1999). O gene *plc* codifica a produção desta toxina, que está localizada muito próxima da origem de replicação no genoma dos *C. perfringens* sequenciados, e é considerado um fator de virulência de origem cromossomal (MYERS et al., 2006; SHIMIZU et al., 2001; SHIMIZU et al., 2002a).

Na EN se observa a degradação das células eucarióticas intestinais, e este processo é produzido pela toxina α , considerada uma fosfolipase tipo C. Estudos têm mostrado que, a inativação da toxina α diminui a severidade das lesões, sugerindo-se a participação de outros fatores no desenvolvimento deste processo infeccioso (KEYBURN et al., 2006; THOMPSON et al., 2006).

Estudos realizados por Keyburn et al. (2008), relataram a presença de uma nova toxina denominada NetB a qual é de origem plasmidial e apresenta uma atividade de formação de poros na membrana de células eucarióticas. Essa toxina NetB é a última descrita em *C. perfringens*, e também, é sugerida a sua participação nas lesões iniciais da EN. Recentemente, Lepp et al. (2010), analisando a origem plasmidial do gene *netB*, identificaram três loci de patogenicidade: locus 1, locus 2 e locus 3. Os loci 1 e 3 são de origem plasmidial, sendo que o gene *netB* se encontra localizado no locus 1. O locus 2 é considerado de origem cromossomal que ao lado do locus 3 (plasmidial) carregam genes relacionados ao metabolismo bacteriano e produção de adesinas, entre outros. Também, estes autores relataram que esses três loci eram observados somente em cepas patogênicas e não em cepas comensais.

Estudos têm mostrado que a prevalência do gene *netB* em *C. perfringens* de diferentes origens, é baixa, e frequentemente observado em isolados bacterianos de animais sadios do que em doentes (ABILDGAARD et al., 2010; CHALMERS et al., 2008a; MARTIN; SMYTH, 2009). Isto sugere que, a presença da toxina NetB não seja suficiente para iniciar o processo infeccioso. Por outro lado, Coursodon et al. (2010), avaliando a produção da toxina α no intestino de frangos inoculados com *C. perfringens* (*plc* mutantes) questionou o experimento realizado por Keyburn et al.

(2008), uma vez que estes autores não utilizaram animais livres de germes, e esta toxina poderia ser produzida por *C. perfringens* residentes no intestino aviário.

Amimoto et al. (2007) relataram a presença da toxina TpeL a qual foi classificada como pertencente a Família das Grandes Citotoxinas Clostridiais (LCT): junto às toxinas A e B de *C. difficile*, toxina letal de *C. sporogenes*, e toxina alfa de *C. novyi*. Esta família de toxinas se constitui importante fator de virulência envolvida em doenças entéricas de interesse médico veterinário (AKTORIES et al., 2012; BUSCH; AKTORIES, 2000).

Também, sabe se que, a atividade desta toxina TpeL tem atividade glicosilante nas proteínas Rho-Ras GTPases, modifica a estrutura da actina e afeta a fisiologia das células epiteliais, particularmente, das células Vero (rim de macaco verde) (CARTER; ROOD; LYRAS, 2012; DJOUDER et al., 2000; NAGAHAMA et al., 2011). Assim, Chalmers et al. (2008a) e Coursodon et al. (2012), ressaltaram a importância dessa toxina no agravamento das lesões, aumentando a mortalidade por EN em animais de experimentação.

O processo de adesão ao epitélio intestinal se constitui a etapa mais importante na colonização bacteriana, a qual pode ser mediada por estruturas fimbriais e não fimbriais (PARKER; SPERANDIO, 2009). Em *C. perfringens* o processo de adesão tem sido demonstrado pela capacidade de produzir biofilmes, e essa capacidade é favorecida pela presença de pili tipo IV e pela produção de sialidases (BORASTON; FICKO-BLEAN; HEALEY, 2007; VARGA; THERIT; MELVILLE, 2008; WALTERS; STIREWALT; MELVILLE, 1999). Vidal et al. (2009b) e McClane (2010), relataram que o processo de adesão realizado por *C. perfringens* serviria como um regulador positivo para a produção de neuraminidases e toxinas.

A EN é considerada um processo infeccioso que causa aproximadamente US\$ 2 bilhões de dólares por ano, no mundo todo, e é causada pelas toxinas produzidas por *C. perfringens*, adicionado da ausência de vacinas efetivas para o controle da EN; assim, maiores estudos são necessários para minimizar os fatores que participam dessa doença. Alguns antimicrobianos vêm sendo muito utilizados como promotores de crescimento de aves, trazendo como consequência o surgimento de bactérias resistentes a múltiplas drogas antimicrobianas, dificultando o tratamento de vários processos infecciosos de interesse na medicina veterinária (VAN IMMERSEEL et al., 2009). A presença de cepas bacterianas multirresistentes constitui-se um sério risco para saúde humana, uma vez que esses animais são

utilizados na alimentação do homem (KATHER; MARKS; FOLEY, 2006; SCHENTAG; GUILLILAND; PALADINO, 2001; SONGER, 1996).

Estudos de susceptibilidade aos antimicrobianos de *C. perfringens* são pouco observados na literatura, principalmente, avaliando-se comparativamente os perfis de resistência entre localidades e granjas de criação avícola (MARTEL et al., 2004; VAN IMMERSEEL et al., 2004). Drogas como penicilinas, bacitracina e ionóforos vêm sendo utilizados como promotores de crescimento em aves, assim como para o tratamento e prevenção da EN em vários países como Índia, Argentina e Brasil. Entretanto, os Estados Unidos, Canadá e países Europeus, o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento está totalmente proibido.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar as características fenotípicas e genotípicas de *C. perfringens* isolados de frangos com enterite necrótica.

2.2 Específicos

1. Determinar a presença de *C. perfringens* em frangos diagnosticados com enterite necrótica;
2. Determinar a produção e a presença de genes de neuraminidases;
3. Determinar a presença de genes que codificam a produção de toxinas letais;
4. Determinar a susceptibilidade dos isolados a drogas antimicrobianas;
5. Determinar a diversidade genética dos *C. perfringens* isolados; e
6. Avaliar a atividade citotóxica, adesiva e de invasão dos *C. perfringens* isolados.

3 ANÁLISE DA LITERATURA

3.1 Microbiota residente intestinal aviar

O trato gastrointestinal (TGI) das aves de consumo humano é formado pelo bico, esôfago, papo, proventrículo e moela, que estão adaptados para a ingestão e processamento de alimentos duros, como grãos. Também, apresentam ceco bifurcado e relativamente grande, que serve para a degradação dos nutrientes. O TGI realiza movimentos retrógrados característicos que começam na cloaca e terminam na moela, cumprindo algumas funções imunológicas, como a apresentação de antígenos, e exposição dos nutrientes às enzimas digestivas (SKLAN et al., 1978).

A microbiota residente que coloniza o TGI de aves é composta por diversos gêneros bacterianos facultativos e anaeróbios estritos, tais como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium* e *Escherichia*. As bactérias destes dois últimos gêneros são consideradas de importância devido a sua multiplicação excessiva, por conta de um desequilíbrio na microbiota intestinal, o que pode afetar a saúde do hospedeiro (DUBOS; SCHAEDELER, 1960; DUBOS et al., 1965; SAVAGE, 1986; SCHAEDELER; DUBOS; COSTELLO, 1965).

Assim, a microbiota residente exerce influência direta na fisiologia intestinal aumentando a velocidade de trânsito alimentar, regulando a atividade enzimática e a renovação dos enterócitos, além de favorecer a absorção de água e eletrólitos, entre outros componentes (SAVAGE, 1986). Os produtos metabólicos produzidos pelas bactérias anaeróbias no intestino das aves, como o ácido butírico, colaboram com a resistência das células intestinais às agressões alimentares e bacterianas, preservando a integridade e funcionalidade do cólon (ARVANS et al., 2005).

Estudos têm demonstrado que em aves, como frangos, a microbiota residente em equilíbrio, principalmente da região do ceco representa um requisito importante na proteção contra o desenvolvimento de infecções bacterianas (BARROW; TUCKER; SIMPSON, 1987). Também, nessa região do ceco, ocorre uma intensa fermentação de nutrientes não degradados como alguns carboidratos que não

contêm amido e que favorecem a absorção alimentar (SAVAGE, 1986; ANGELAKIS; RAOULT, 2010).

Após a eclosão dos ovos, os pintinhos, apresentam seu TGI livre de microrganismos, mas que nas próximas 2 a 4 h algumas bactérias como *Streptococcus faecalis* e *E. coli* tornam-se prevalentes. Após a primeira semana, *Lactobacillus* spp. predominam no intestino delgado; enquanto que, no ceco ocorre a colonização de anaeróbios estritos gram negativos, como *Bacteroides* e *Fusobacterium*, e gram positivos, como *Bifidobacterium*, *Eubacterium* e *Clostridium* (MEAD; ADAMS, 1975; SHANE; KOETTING; HARRINGTON, 1984). No frango adulto, a microbiota intestinal é composta por 10^{13} bactérias diferentes (BARNES et al., 1972; SALANITRO et al., 1978), sendo que os microrganismos anaeróbios excedem aos aeróbios por pelo menos em 10^2 bactérias/gramas de fezes.

A microbiota intestinal do frango torna-se instável devido às alterações causadas pela idade, dieta, uso de antimicrobianos, e pelos movimentos retrógrados intestinais (DUBOS et al., 1965; SKLAN et al., 1978). As técnicas clássicas de cultivo têm se mostrado pouco eficazes para determinar as alterações que podem ocorrer na microbiota intestinal dos frangos (DUBOS et al., 1965). Entretanto, com o surgimento das técnicas moleculares se podem conhecer melhor a diversidade, distribuição, filogenia, e sucessão desses importantes microrganismos que habitam o ecossistema intestinal de aves (ANGELAKIS; RAOULT, 2010; ENGBERG et al., 2000; ENGBERG et al., 2004; GONG et al., 2007; GONG et al., 2008; STANLEY et al., 2012).

Estudos têm mostrado a presença de uma variedade de diferentes espécies bacterianas, entre elas, *Acetanaerobacterium elongatum*, *Bilophila wadsworthia*, *Bifidobacterium pullorum*, *C. celerecrescens*, *C. clostridioforme*, *C. orbiscindens*, *C. leptum*, *C. saccharolyticum*, *C. difficile*, *E. coli*, *Enterococcus faecium*, *E. tenue*, *E. tortuosum*, *Lactobacillus salivarius*, *L. aviarius*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *Peptococcus niger*, *Pseudobutyrvibrio ruminis*, *Megamonas hypermegale*, *Ruminococcus schinkii*, *Subdoligranulum variabile*, e outras ainda não cultiváveis (GONG et al., 2007; GONG et al., 2008).

Espécies do gênero *Clostridium* estão entre as primeiras bactérias a colonizar o ceco de frangos (LEV; BRIGGS, 1956); entretanto, no intestino delgado a sua presença é baixa, devido ao pH ácido e à elevada concentração de O_2 que não permitem o crescimento intenso desta bactéria (ADAMS, 2006; BARE; WISEMAN,

1964; SHANE; KOETTING; HARRINGTON, 1984). Entre as espécies desse gênero, se destaca *C. perfringens* como parte da microbiota intestinal residente de frangos, observando-se em números inferiores a 10^2 bactérias/g fezes (LONG; TRUSCOTT, 1976; NIILLO, 1980; PEDERSEN et al., 2003).

3.2 *Clostridium perfringens*

3.2.1 Aspectos taxonômicos

Classicamente, o gênero *Clostridium* foi constituído por microrganismos anaeróbios gram positivos, esporulados, e que não reduzem sulfato. Com as técnicas de sequenciamento do DNA (gene 16S rRNA), permitiu-se reclassificar antigos membros em outros gêneros e identificar novas espécies (DWORKIN et al., 2006; NOEL; HOLT, 2001).

No último Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey (2007), *C. perfringens* está classificado como membro pertencente ao Filo *Firmicutes* (com baixo conteúdo de G-C), Classe *Clostridia*, Ordem *Clostridiales*, Família *Clostridiaceae* e Gênero *Clostridium* (GARRITY et al., 2007).

Análises realizadas por hibridização de DNA (JOHNSON; FRANCIS, 1975) e sequenciamento (COLLINS et al., 1994; STACKEBRAND et al., 1999) indicam que a maioria das espécies do gênero *Clostridium* possui elevada diversidade genotípica e não representam um táxon uniforme. Também, o gênero *Clostridium* agrupa espécies em diferentes clusters, sendo que *C. perfringens* esta incluído no Cluster I, por apresentar características fenotípicas e genotípicas semelhantes a *C. butyricum* (cepa tipo do gênero), ao lado de outros patógenos importantes como *C. botulinum* e *C. tetani* (COLLINS et al., 1994).

Em termos de importância médica, *C. perfringens* está subdividido em 5 toxinotipos (A-E), baseado na produção de quatro principais toxinas letais (α , β , ϵ , ι), que determinam o potencial patogênico de cada isolado (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999; ROOD, 1998; SMEDLEY et al., 2004; YOO et al., 1997).

Clostridium perfringens foi isolado pela primeira vez, por Welch e Nuttall (1892) de tecido necrosado de cadáver humano em estado de decomposição, sendo denominado inicialmente como *Bacillus aerogenes capsulatus*. Posteriormente, outras denominações foram atribuídas, tais como: *Bacillus phlegmones*

emphysematosae (FRAENKEL, 1893), *Bacillus enteritidis sporogenes* (KLEIN, 1895), *Bacillus perfringens* (VEILLON; ZUBER, 1898), *Bacillus welchii* (MIGULA, 1900), *Bacillus saccharobutyricus immobilis* (SCHATTENFROH; GRASSBERGER, 1900), *Welchillus aerogenes* (HELLER, 1922) e *Welchia perfringens* (PRÉVOT, 1938). Finalmente, na 5ª Edição do Manual de Bergey's (1939), foi designada oficialmente como *C. perfringens*.

3.2.2 Características fisiológicas

Clostridium perfringens é um microrganismo anaeróbio, gram positivo, esporulado, imóvel, que se apresenta na forma de bacilos individuais ou formando cadeias curtas. São caracterizados pela formação de uma dupla zona de hemólise em ágar sangue de carneiro, coelho ou humano, devido à ação das toxinas tetha (Φ) e alfa (α); à atividade lecitinase em ágar gema de ovo, e produzir o processo de fermentação tormentosa no leite com tornassol. Este microrganismo é resistente à bile (20%) e NaCl (2%), e apresenta uma temperatura ideal de crescimento variando de 20 a 50 °C; suportando também, variações de pH entre 5,5 e 8,0. Também, se caracteriza por fermentar diferentes açúcares, aminoácidos e ácidos nucléicos, tendo como produtos finais do metabolismo a produção de H₂, CO₂, ácidos graxos de baixo peso molecular (principalmente ácido acético e butírico), e álcool (GARRITY et al., 2007).

Na ausência de ferro *C. perfringens* realiza a fermentação homoláctica, e com isto, sua multiplicação é seriamente afetada, ressaltando assim, a importância deste elemento no crescimento bacteriano, como na produção de toxinas (BARD; GUNSALUS, 1950). Mais recentemente, Lepp et al. (2013) identificaram genes envolvidos na aquisição de ferro e no metabolismo de alguns carboidratos, que podem conferir vantagem na capacidade patogênica de *C. perfringens* para causar doenças.

Outra característica fisiológica importante para sobrevivência de *C. perfringens* é a capacidade de esporular, mas, isto é dificilmente observado “in vitro” precisando de meios de cultivo suplementados com amido, dextrina, carbono ativado, tripticaseína e sais, como Na₂HPO₄·7H₂O para a estimulação da formação de esporos em quantidades significativas (DUNCAN; STRONG, 1968). O papel que

os esporos cumprem nas intoxicações alimentares está bem elucidado, mas isso não é observado em doenças que afetam aves, como a enterite necrótica.

3.2.3 Aspectos genéticos

O cromossomo da cepa *C. perfringens* 13 foi o primeiro a ser sequenciado totalmente, sendo constituído por três milhões de pares de bases, contendo baixa concentração de G+C (29%), e com dez diferentes operons rRNA, codificando a produção de pelo menos 2.660 proteínas (ACINAS et al., 2004; NOEL; HOLT, 2001; SHIMIZU et al., 2001; SHIMIZU et al., 2002a).

Neste genoma são observados genes que participam da produção de enzimas importantes na fermentação anaeróbia tais como: *pgi* (glicose-6-fosfato isomerase), *fba* (frutose-1,6-bisfosfato aldolase), *gap* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *eno* (enolase), *pykA* (piruvato kinase), *ldh* (L-lactato desidrogenase) e *pfo* (piruvato ferredoxina oxidoreductase), entre outros. Entretanto, não são observados genes que participam da biossíntese de aminoácidos tais como: histidina (*hisABDFGHI*), leucina (*leuABCD*, *thrC*), arginina (*argCJ*), glicina (*glnA*), triptofano (*trpABCDF*) e isoleucina-valina (*ilvDN*). Devido à falta desses genes, *C. perfringens* utiliza proteínas transportadoras de arginina (ArgW), peptídeos transportadores de carbono durante a escassez (CstA) para a captação de ferro iônico (FeoB), transportador-captador de vitaminas (VUT ou ECF), e exportador treonina/serina (Thre) (SHIMIZU et al., 2002a).

Clostridium perfringens pode ter seu crescimento afetado na ausência desses aminoácidos, e é sugerido que ao produzir a lise das células eucarióticas, há a consequente liberação dos aminoácidos necessários para seu crescimento (SHIMIZU et al., 2002a,b).

Elementos extra-cromossômicos como plasmídios e transposons são frequentemente observados em *C. perfringens* carregando genes importantes para a virulência bacteriana e para a sobrevivência em ambientes adversos, dentro deles podem ser mencionados os genes *cpb* (toxinas β), *cpb2* (β_2), *etx* (ϵ), *iap*, *ibp* (ι), λ (protease *lam*) e *ureA-C* (urease), entre outras (ROOD; COLE, 1991).

3.2.4 Aspectos ecológicos

Para se estabelecerem em um determinado nicho ecológico, as bactérias secretam peptídeos com atividade antimicrobiana, denominados bacteriocinas, as quais têm limitado espectro de atividade, e afetam consideravelmente a composição de algumas comunidades bacterianas que habitam o intestino (CZÁRÁN; HOEKSTRA; PAGIE, 2002; GILLOR; ETZION; RILEY, 2008; RILEY, 1998).

Espécies do gênero *Clostridium* produzem substâncias tipo bacteriocinas, sendo a atividade delas pouco pesquisada. Entretanto, bacteriocinas produzidas contra *C. perfringens* têm sido caracterizadas, sendo produzidas por *Carnobacterium divergens*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus* spp. *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus* e *Ruminococcus gnavus* (ALLAART; VAN ASTEN; GRÖNE, 2013; MARTINEZ et al., 2013). Espécies patogênicas de *C. perfringens* têm a capacidade de produzir bacteriocinas contra espécies não patogênicas desta bactéria visando a sua proliferação nos processos infecciosos (BARBARA et al., 2008).

Wrigley (2004) demonstrou que *Bacteroides fragilis* atua como regulador natural de *C. perfringens*, devido à ação do ácido isobutírico, produzido durante o metabolismo, e atuando diretamente sobre as células vegetativas e a produção de esporos.

Dietas com elevado conteúdo de proteínas e deficientes em energia, favorecem o crescimento de bactérias com potencial patogênico, como *Clostridium* spp., e a diminuição de bactérias benéficas, como *Bifidobacterium* spp., devido à fermentação de nutrientes com a consequente produção de NH₃, amidas, indol, aminas e fenol, nocivas para o hospedeiro e alguns membros da microbiota intestinal (BAUER et al., 2006).

3.3 Patogenecidade e virulência de *Clostridium perfringens*

Os mecanismos de virulência de *C. perfringens* estão relacionados principalmente à produção de potentes toxinas e enzimas codificadas por genes localizados no cromossomo ou em plasmídios (ROOD, 1998; SAWIRES; SONGER, 2006). Assim, *C. perfringens* produz mais de quinze toxinas com potencial de causar severas lesões necróticas na parede intestinal, afetar os rins, destruir o tecido muscular e danificar as células nervosas, que podem levar o hospedeiro à morte

(PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999). Na Figura 1, pode-se observar a ação das toxinas produzidas por *C. perfringens*.

3.3.1 Exotoxinas

Dentre os genes relacionados à produção das quatro toxinas letais, o gene *p/c* (que codifica a produção da toxina α) é o único que está localizado no cromossomo (SHIMIZU et al., 2002a). Esta toxina α é constituída de 370 aminoácidos, com atividade de fosfolipase tipo C, e é considerada a primeira toxina bacteriana que teve seu mecanismo de ação reconhecido (TITBALL; NAYLOR; BASAK, 1999). Esta toxina hidrolisa esfingomielina, fosfatidil-serina e fosfatidil-colina, promovendo a desorganização da membrana celular, e a formação de diacilglicerol, que ativa a proteína cinase C, e estimula a produção de ácido araquidônico (SONGER, 1996; TITBALL, 1993).

A toxina α tem capacidade de causar hemólise intravascular, aumentar a permeabilidade capilar e ativar a agregação plaquetária, assim como, diminuir as contrações cardíacas (SAKURAI; NAGAHAMA; ODA, 2004; TITBALL; NAYLOR; BASAK, 1999). Na patogênese da gangrena gasosa, da qual a toxina α é o principal fator de virulência, há a expressão de adesinas no endotélio dos vasos sanguíneos, prejudicando o tráfego dos neutrófilos para o sítio da infecção. Além disso, as contrações musculares e a vaso constrição causadas pela ativação do ácido araquidônico criam as condições anóxicas necessárias para o crescimento deste microrganismo (FLORES-DIAZ et al., 2005).

Figura 1. Mecanismo de ação das principais toxinas de *C. perfringens*.

Estudos têm mostrado que, o gene *plc* é altamente conservado em cepas isoladas de amostras fecais de frangos saudáveis e doentes. As possíveis mutações que o gene possa sofrer não alteram o sítio de adesão nem a atividade da toxina (ABILDGAARD et al., 2009a; SHEEDY et al., 2004). Assim, a produção da toxina é considerada indutiva durante a fase de crescimento exponencial, mas sua produção pode ser estimulada também, pelas condições ambientais, como a temperatura elevada (ABILDGAARD et al., 2009b; MATSUSHITA et al., 1996).

A produção da toxina α tem sido considerada um requisito importante para o desenvolvimento da EN, pelo mecanismo de ação associado à severidade das lesões (AL-SHEIKHLY; TRUSCOTT, 1977a, b; AWAD et al., 1995; SI et al., 2007; THOMPSON et al., 2006). Diversas tentativas vacinais com a toxina α foram

testadas para conferir proteção contra esta infecção, mas, só se observou a diminuição da severidade das lesões (COOPER; SONGER, 2009; COOPER; TRINH; SONGER, 2009; KULKARNI et al., 2007; SCHOEPE et al., 2006). Em 2006, Keyburn et al., mostraram que a produção da toxina α não estaria diretamente relacionada ao desenvolvimento da EN visto que cepas mutantes para este gene *p/c* ainda conservaram a capacidade de produzir lesões intestinais em modelo de experimentação animal.

Posteriormente, Keyburn et al. (2008), analisando a sequência do cromossomo de *C. perfringens* relataram a presença do gene *netB*, e realizando experimentos genéticos de mutação/complementação, demonstraram que a citotoxicidade deste gene estaria relacionada à produção da toxina NetB, sugerindo que a mesma, também seria essencial para o desenvolvimento da EN, descartando o papel atribuído exclusivamente à toxina α .

A toxina NetB de 370 aminoácidos e com peso molecular de 33 kDa se caracteriza por formar poros na membrana celular. A elevada prevalência observada em surtos na Austrália motivou novas pesquisas epidemiológicas em frangos doentes e sadios em diferentes países (ABILDGAARD et al., 2010; CHALMERS et al., 2008a; KEYBURN et al., 2008; MARTIN; SMYTH, 2009).

Interessantemente, a produção “in vitro” desta toxina é observada em cepas provenientes de frangos afetados com EN que de animais saudáveis (ABILDGAARD et al., 2010). Entretanto, também é sugerido que a presença da toxina NetB no ecossistema intestinal, não garante o desenvolvimento da doença (ABILDGAARD et al., 2010).

A toxina TpeL inicialmente detectada em sobrenadantes de *C. perfringens* tipo C de origem suína, foi relatada, mostrando-se letal em camundongos e produzindo alterações citotóxicas em células Vero (AMIMOTO et al., 2007; NAGAHAMA et al., 2011). Esta toxina também é produzida durante o processo de esporulação, da mesma forma que ocorre com a enterotoxina (PAREDES-SABJA; SARKER; SARKER, 2011). A toxina TpeL apresenta peso molecular de 191 KDa, com a conformação DXD e com triptofano em posições conservadas, essenciais para a atividade glicosil-transferase (AMIMOTO et al., 2007; BUSCH et al., 2000; GUTTENBERG et al., 2012; NAGAHAMA et al., 2011).

É sabido que, a toxina TpeL causa citotoxicidade e apoptose em células epiteliais; e tem sido incluída na Família *Large Clostridial Citotoxin* (LCT), produzidas

também, por *C. difficile*, *C. sordelli* e *C. novy* (AMIMOTO et al., 2007; SONGER, 1996).

As toxinas dessa Família LCT apresentam quatro domínios funcionais A-D, envolvidos no sítio ativo (domínio A), reconhecimento dos receptores de superfície celular (domínio B), região de auto clivagem (domínio C) e translocação da toxina através da membrana citoplasmática (domínio D) (BELYI; AKTORIES, 2010; RICHARD et al., 1999).

A ação dessas toxinas é dirigida à glicosilação das proteínas da família Rho/Ras GTPases, que regulam a polimerização da actina, inativando-as e modificando assim, o cito esqueleto, causando alongamento e arredondamento celular, e alteração da permeabilidade, entre outras (CARON; HALL, 1998; CARTER; ROOD; LYRAS, 2012; DJOUDER et al., 2000; RICHARD et al., 1999).

Coursodon et al. (2012), demonstraram que frangos desafiados por via oral com *C. perfringens tpeL* (+) desenvolvem lesões intestinais mais severas e compatíveis com EN, indicando que a toxina TpeL pode participar da patogênese desta doença.

Outras toxinas produzidas por *C. perfringens* são consideradas de importância na patogênese de diversos processos infecciosos em animais. Assim, as toxinas β e β_2 , apresentam similar mecanismo de ação e são estruturalmente diferentes. A toxina β parece estar associada em processos de EN; enquanto que, a β_2 tem uma predisposição para agravar os processos infecciosos em suínos (GIBERT; JOLIVET-RENAUD; POPOFF, 1997; HERHOLZ et al., 1999; ROOD, 1998).

A toxina iota se caracteriza por ser frequentemente observada em processos toxêmicos, produz alterações na morfologia celular e bloqueia a ativação de leucócitos (AKTORIES et al., 2012). Esta toxina tem dois componentes, um que serve de ligação ao receptor celular e que permite a transposição do outro componente, que possui o sítio ativo, e atua desorganizando a actina (PERELLE et al., 1993; TSURUMURA et al., 2013).

A enterotoxina (CPE) produz diarreias em diferentes animais, incluindo o homem (STRONG; DUNCAN; PERNA, 1971). Sua ação é caracterizada pela formação de poros na membrana celular e o gene *cpe* está localizado em transposon conjugativo (IS 1470) (BRYNESTAD; SYNSTAD; GRANUM, 1997).

Frequentemente participa nos processos de intoxicação alimentar em humanos e está associada ao uso inadequado de antibióticos (WEN; McCLANE, 2004). Devido à baixa prevalência em quadros da EN sua participação nesta infecção é pouco provável.

Clostridium perfringens produz outras toxinas conhecidas como toxinas menores, tais como: colagenase (ColA), estruturalmente relacionada à ColG de *C. histolyticum*, e que apresenta um efeito adicional à toxina alfa (CPA) na destruição de tecidos (MATSUSHITA et al., 1994; MATSUSHITA et al., 1999); perfringolisina (toxina θ) que se une ao colesterol das membranas eucarióticas e após sua polimerização forma poros que alteram a permeabilidade vascular e o cito esqueleto dos PMN provocando a degranulação (BRYANT et al., 1993; STEVENS; MITTEN; HENRY, 1987; STEVENS et al., 1988; STEVENS; BRYANT, 1997).

Sialidases ou neuraminidases são enzimas que hidrolisam as ligações α -(2 $\rightarrow$ 3)-, α -(2 $\rightarrow$ 6)- ou α -(2 $\rightarrow$ 8)-glicosídicos de ácidos siálicos presentes na região terminal de oligossacarídeos, glicoproteínas, glicolípídeos, ácido colômico e substratos sintéticos (CABEZAS, 1991; SCHAUER, 1985).

Esses ácidos siálicos são importantes componentes terminais das membranas celulares eucarióticas, estando envolvidos nos processos de adesão e renovação celular, mediando a comunicação intercelular e contribuindo na carga negativa da superfície celular (CORFIELD, 1992; NELSON; COX, 2005). Os ácidos siálicos também são componentes importantes da mucina que recobrem os epitélios, sendo especialmente abundantes no trato intestinal do homem e animais (SCHAUER, 1985).

Estudos têm mostrado que entre os carboidratos utilizados pelas bactérias intestinais, particularmente aquelas que habitam o cólon, como *Clostridium* spp., destacam-se os mucopolissacarídeos não digeríveis e as glicoproteínas secretadas, constituindo-se as principais fontes nutritivas (SALYERS et al., 1977b; SAVAGE, 1986), uma vez que açúcares simples da dieta não estariam disponíveis (SALYERS, 1979).

A atividade neuraminidase em *C. perfringens* foi reportada pela primeira vez por McCrae em 1947, ao verificar que esta enzima destruía o sítio do receptor para mixovírus, inibindo assim, o processo de hemaglutinação causada por esse vírus (BORASTON; FICKO-BLEAN; HEALEY, 2007). Também, esta enzima participa degradando a camada protetora de mucina do cólon humano (SALYERS et al.,

1977a), como ocorre na enterite necrótica neonatal em humanos (POPOFF; DODIN, 1985), em infecções entéricas (CORFIELD, 1992), e também, durante a patogênese da gangrena gasosa (FRASER, 1978).

As neuraminidases também participam nos passos iniciais da degradação de sialo conjugados do epitélio intestinal, facilitando a colonização bacteriana no intestino (BORASTON; FICKO-BLEAN; HEALEY, 2007; GREGG et al., 2008; RAY; SIMONS, 1972). Neuraminidases NanI e NanJ (enzimas extracelulares com ampla especificidade por substratos), e NanH (enzima intracelular com preferência por oligossacarídeos curtos), assim como, a liase (NanA) e epimerase (NanE) produzidos por *C. perfringens*, que metabolizam o ácido siálico até piruvato e N-acetilglicosamina-6-fosfato sendo utilizados como fonte de energia ou na síntese de outras moléculas estruturais (ROGGENTIN; KLEINEIDAM; SCHAUER, 1995; WALTERS; STIREWALT; MELVILLE, 1999). Na estrutura de NanJ produzida por *C. perfringens* existem receptores específicos para a ligação de fibronectina e coesina, que atuam recrutando hidrolases e outras toxinas, favorecendo com isto, a potencialização da toxina α na atividade necrótica (BORASTON; FICKO-BLEAN; HEALEY, 2007; FLORES-DIAZ et al., 2005).

Clostridium perfringens possui atividade aglutinante de hemácias de carneiro, boi, frango, cavalo e coelho (WICKHAM, 1956). Esta propriedade parece estar associada à parede celular bacteriana (DAFAALLA; SOLTYS, 1953), sendo detectável em elevado título entre cepas conservadas por longos períodos de tempo e ausente em cepas recém-isoladas (WICKHAM, 1956). Diferenças na capacidade aglutinante entre os tipos de *C. perfringens* têm sido reportadas (DAFAALLA; SOLTYS, 1953), e a capacidade de aglutinar hemácias, não está relacionada às doenças, em particular, à EN.

A adesão é o passo inicial para a colonização e patogênese de infecções intestinais humanas e animais. Este processo permite o contato íntimo entre as bactérias e a mucosa intestinal, a formação do biofilme, e favorece a ação das toxinas. Assim, *C. perfringens* tem mostrado capacidade de adesão ao muco intestinal canino (RINKINEN et al., 2003), porém, sua capacidade de adesão às culturas celulares é um fator de virulência que ainda precisa ser mais bem pesquisado.

Clostridium perfringens invade tecidos nas fases finais de algumas enterotoxemias e gangrena gasosa, embora, tenha sido demonstrada a capacidade

de degradar mucina que recobre o epitélio intestinal e os componentes da matriz extracelular, tais como elastina, colágeno tipo I e IV, a característica de invasão deste microrganismo é pouco estudada, também como o processo de adesão, e novas pesquisas devem ser desenvolvidas para verificar a participação desses fatores no contexto da EN (PRUTEANU et al., 2011; PRUTEANU; SHANAHAN, 2013).

3.3.2 Regulação da Virulência

A virulência de *C. perfringens* é regulada por pelo menos três sistemas: 1) Sistema de dois componentes VirS/VirR, composto por uma proteína sensora de membrana e outra que funciona como regulador de transcrição (BANU et al., 2000; BA-THEIN et al., 1996; CHEUNG et al., 2009; SHIMIZU et al., 2002b); 2) Sistema de “Quorum sensing” dependente da proteína LuxS (OHTANI; HAYASHI; SHIMIZU, 2002); e 3) Sistema Agr (homólogo àquele identificado em *Staphylococcus aureus*) e com função similar ao sistema de “Quorum sensing” (VIDAL et al., 2009a). A presença desses três sistemas reguladores, sugere que, *C. perfringens* não expressa seus fatores de virulência a não ser extremamente necessário para sua sobrevivência, entretanto, considera-se que o Sistema VirS/VirR seria o principal regulador desses fatores de virulência.

Sayeed et al. (2005) e Abildgaard et al. (2009b) observaram que a toxina α (PLC), assim como outras toxinas, são produzidas na fase logarítmica do crescimento, indicando que sua produção se inicia quando os nutrientes começam a esgotar, indicando que sua produção é de natureza indutiva (FISHER et al., 2006).

Outro mecanismo de ativação da virulência, descoberto por Vidal et al. (2009b), sugere que o contato físico entre *C. perfringens* tipo C e tipo D, adicionado a uma camada celular de enterócitos Caco-2, provoca forte estímulo para a produção das toxinas α , β , β_2 , e perfringolisina. Aparentemente, este processo é mediado pelo Sistema VirS/VirR, mostrando-se a importância dos sistemas regulatórios na patogênese das doenças causadas por *C. perfringens* (McCLANE, 2010).

3.4 Importância clínica de *C. perfringens* na enterite necrótica

Em humanos, *C. perfringens* tipo A é o agente causador da gangrena gasosa, abscessos abdominais e diarreias, enquanto que, o tipo C está relacionado à enterite necrótica severa (BORRIELLO et al., 1984; BRYNESTAD; GRANUM, 2002). Também, este microrganismo tem sido associado ao câncer de cólon pela conversão de esteróides a metabólitos carcinogênicos (GODDARD et al., 1975).

Na medicina veterinária, *C. perfringens* é reconhecido pelas diversas enterotoxemias do gado bovino, ovelhas, cabras e alpacas (ROSADIO et al., 2010; SONGER, 1996). Também, foi relatada sua participação na enterite hemorrágica em cães e outros animais de estimação (MARKS et al., 2011).

Clostridium perfringens é causador de doenças aviárias, como a enterite necrótica em corvos, colangiohepatite e celulite em perus, galinhas de postura e em pintinhos (ASAOKA et al., 2004; CARR et al., 1996; FOSSUM; SANDSTEDT; ENGSTRÖM, 1988; GAZDZINSKI; JULIAN, 1992; JORDAN, 1996; KALDHUSDAL et al., 2001; LOVLAND; KALDHUSDAL, 2001a, b; SASAKI; GORYO; OKADA, 2000; THACHIL et al., 2010).

A EN é uma importante doença que afeta a produção de frangos causando enorme prejuízo econômico no mundo todo (COOPER; SONGER, 2010; VAN IMMERSEEL et al., 2009). Esta doença foi descrita pela primeira vez, por Parish (1961), na Inglaterra. Desde então, já foi reportada em diferentes países onde a avicultura é uma importante atividade econômica, como na Austrália (NAIRN; BAMFORD, 1967), USA (BERNIER; FILION, 1971), Perú (JOHNSON; PINEDO, 1971), Canadá (LONG, 1973), Dinamarca (MORCH, 1974), Alemanha (KOHLE et al., 1974), China (TSAI; TUNG, 1981), Índia (CHAKRABORTY et al., 1984), e Brasil (BALDASSI et al., 1995).

No Brasil, o primeiro relato desta doença ocorreu no Estado de São Paulo na forma de um surto, que num intervalo de tempo de 3 a 4 dias afetou três granjas avícolas, causando grandes perdas econômicas devido à mortalidade de 10% (sobre uma população de 86.000 aves), como também, diminuição significativa na conversão alimentar (10%) e no ganho de peso (4%) (BALDASSI et al., 1995).

A infecção por *C. perfringens* em aves se apresenta nas formas clínica aguda e subclínica. A forma aguda da doença se caracteriza pelo surgimento de surtos

com elevada mortalidade e perdas de até 1% ao dia, e que durante as últimas semanas do período de engorde, pode chegar até 40% (KALDHUSDAL; LOVLAND, 2000). Durante os surtos, as aves se apresentam deprimidas e amontoadas, com as penas eriçadas, apresentando diarreia e anorexia, sendo que na maioria das vezes a mortalidade é súbita (FICKEN; WAGES, 1997; LONG, 1973). Na forma subclínica, a EN causa lesões na mucosa intestinal que diminuem a digestão e absorção, reduzindo o ganho de peso e aumentando a taxa de conversão alimentar (FICKEN; WAGES, 1997).

Devido à estrutura anatômica e ao pH intestinal, as lesões ocorrem principalmente no jejuno. A histopatologia corresponde a uma severa necrose coagulativa aguda da mucosa, usualmente com hemorragia, similar às reproduções experimentais da doença, só que geralmente mais severa (LONG; PETTIT; BARNUM, 1974; FICKEN; WAGES, 1997). Na Figura 2, observa-se a lesão intestinal característica da EN.

Figura 2- Lesões características da enterite necrótica.

Legenda: **A:** Segmento intestinal com enterite necrótica; **B:** Corte histológico com necrose coagulativa severa do ápice das vilosidades intestinais com infiltrado inflamatório (HE, 10 X). Fonte Sadia.

A enterite necrótica afeta frangos entre 2 a 6 semanas de idade, (FICKEN; WAGES, 1997; LONG, 1973), e sua prevalência varia no mundo todo, sendo mais elevada em países onde o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento tem sido proibido (GRAVE et al., 2004; GRAVE et al., 2006).

O controle da EN é realizado minimizando os fatores de risco pelo uso de antibióticos, probióticos e óleos essenciais, entre outros (WILSON et al., 2005). Com tudo, pode-se dizer que a EN é uma doença característica de sistemas intensivos de criação, onde os animais vivem em espaços reduzidos, com uma elevada densidade

populacional e são alimentados com dietas que visam o rápido crescimento e ganho de massa muscular.

3.4.1 Patogênese

As enterotoxemias clostridiais se caracterizam por ter sua origem na própria microbiota residente. Os eventos que desencadeiam a patogênese incluem a colonização por esporos ou células vegetativas, condições de anaerobiose e baixo potencial Redox, seguido pela germinação dos esporos e multiplicação bacteriana, com a consequente produção de toxinas que atingem rapidamente a corrente sanguínea (DUERDEN; DRASAR, 1991; KONEMAN et al., 2004).

As regiões do jejuno e íleo onde as lesões da EN são mais evidentes, normalmente são habitadas por *Lactobacillus* spp. (GONG et al., 2007), e não por *C. perfringens* que coloniza consistentemente a região do ceco de frangos saudáveis. Por isso, se acredita que, o desenvolvimento da EN não seja uma consequência direta da infecção por *C. perfringens*, e sim, devido a um processo pelo qual as populações bacterianas intestinais se alteram em resposta às mudanças ambientais. Isto, também produz alterações na composição qualitativa e quantitativa dos microrganismos da microbiota intestinal (MEAD, 1989; WILSON et al., 2005).

Outros experimentos têm mostrado o decréscimo de algumas espécies de *Lactobacillus* no íleo, principalmente *L. aviarius* que é a mais abundante na microbiota dessa região (DAHIYA et al., 2005; FENG et al., 2010), e de outras, na região do ceco, como *Weissella*, *Eubacterium*, *C. leptum* e *C. orbisdictens*, produtoras de butirato e ácidos graxos de cadeia curta, as quais estariam relacionadas à saúde intestinal de frangos (STANLEY et al., 2012).

Aparentemente o surgimento da EN requer de uma lesão prévia na mucosa intestinal, como por exemplo, a infecção produzida por coccídeos (AL-SHEIKHLY; AL-SAIEG, 1980). Em concordância com esses dados, Baba et al. (1997), verificaram que a inoculação conjunta de *Eimeria necatrix* e *C. perfringens*, aumentam consideravelmente as populações de *C. perfringens* e que esse sinergismo microbiano eleva a mortalidade e intensidade do edema intestinal. Adicionalmente, a infecção com *Eimeria* ou o uso de dietas com alto conteúdo de fibras ou proteínas, como farinha de peixe, e de alguns cereais, favorecem a

multiplicação excessiva de *C. perfringens* facilitando o início das lesões intestinais (BABA et al., 1997; FICKEN; WAGES, 1997; TIMBERMONT et al., 2011).

A EN é uma doença multifatorial, e até hoje, não tem sido demonstrado um modelo experimental adequado para reproduzir este processo infeccioso (CHALMERS et al., 2007; KALDHUSDAL et al., 1999). Na Figura 3, estão representados alguns fatores importantes no desenvolvimento da EN em frangos.

Figura 3. Fatores críticos para o desenvolvimento da EN.

Shojadoost et al. (2012).

*IBD: Infecção da Bursa

3.5 Susceptibilidade aos antimicrobianos

Os antibióticos são utilizados principalmente no tratamento das infecções bacterianas, e desde a década de 50, como promotores de crescimento, que favorecem o ganho de peso (acima de 8%) em animais jovens. Esses promotores funcionam como um mecanismo de alteração/diminuição da carga bacteriana na região intestinal, para que a mucosa se torne mais permeável e absorva mais nutrientes. Também, diminuem os microrganismos patogênicos e sua produção de toxinas, reduz o gasto energético empregado na produção de anticorpos, secreção de mucina, resposta linfocitária e renovação de células danificadas (ACAR et al., 2000).

É sabido que, as drogas antimicrobianas exercem um efeito drástico na microbiota intestinal de homens e animais, causando um desequilíbrio entre a microbiota e o hospedeiro, podendo se iniciar com isto, diversos processos infecciosos (SCHENTAG; GUILLILAND; PALADINO, 2001).

Durante muitos anos a utilização de antibióticos em frangos visou principalmente dois aspectos: 1) diminuir ou erradicar as espécies de *Salmonella*, e 2) diminuir ou erradicar *C. perfringens*, assim como também, induzir uma aparência mais saudável dos intestinos dos animais, obtendo assim, melhores parâmetros produtivos (STUTZ; LAWTON, 1984).

Por outro lado, também é sabido que, a utilização de antibióticos favorece a seleção de microrganismos resistentes às drogas antimicrobianas, devido à pressão exercida por essas substâncias utilizadas como promotores de crescimento nos animais, tornando-se reservatórios de genes de resistência, os quais podem ser transferidos a outros microrganismos que habitam o ecossistema intestinal (KATHER; MARKS; FOLEY, 2006; SCHENTAG; GUILLILAND; PALADINO, 2001; WITTE, 2000).

A primeira evidência de resistência aos antibióticos utilizados pela indústria avícola foi reportada por Starr e Reynolds (1951), que identificaram que o uso de estreptomicina na ração de perus, estava diretamente relacionado à aparição de *E. coli* altamente resistentes a esta droga. O surgimento de isolados clínicos bacterianos que exibem resistência a múltiplos antimicrobianos tem se tornado um desafio mundial. Assim, a rápida aparição de cepas multirresistentes tem afetado as medidas terapêuticas tradicionais, sendo obrigado o monitoramento contínuo da

atividade destes fármacos. A presença de cepas resistentes em animais levou os países Europeus e o Canadá, proibirem o uso de agentes antimicrobianos como promotores de crescimento. Também, tem sido notado que a resistência bacteriana, particularmente de *C. perfringens* varia segundo a localização geográfica (MARTEL et al., 2004; VAN IMMERSEEL et al., 2004; WATKINS et al., 1997).

Nas últimas décadas agentes antimicrobianos eram utilizados na criação de aves com a finalidade de aumentar o ganho de peso e prevenir alguns processos infecciosos. Com o aparecimento de cepas resistentes aos diferentes antibióticos, alguns países começaram a diminuir seu uso com a preocupação da saúde humana (VAN IMMERSEEL et al., 2004). Dentre os antibióticos mais utilizados para essa finalidade estão: sulfas, eritromicina, penicilinas e tetraciclina, entre outros; entretanto, estudos têm mostrado que as penicilinas continuam apresentando excelente ação contra as espécies de *Clostridium* isoladas de aves (GHARAIBEH; AL-RIFAI; AL-MAJALI, 2010; LANCKRIET et al., 2010).

Alguns países da América do Norte e Europeus têm banido o uso de antibióticos na produção avícola, mas, isto tem propiciado o desenvolvimento de infecções re-emergentes em frangos, e nesses casos, considera-se a utilização das penicilinas como droga de escolha para o tratamento de infecções produzidas por *Clostridium*, particularmente, visando evitar a EN em aves (AGUNOS; LÉGER; CARSON, 2012).

Infelizmente, nos países em desenvolvimento, algumas drogas antimicrobianas como bacitracina e tilosina ainda continuam sendo usadas para o engorde e prevenção de infecções em aves, sendo elas as mais variadas, e isto, é reflexo da falta de políticas para a prevenção e tratamento dessas doenças.

3.6 Diversidade genética

Clostridium perfringens isolados de doenças humanas e veterinárias têm sido analisados para determinar novos fatores de virulência e/ou marcadores genéticos que possam estar associados aos diversos processos infecciosos.

Técnicas moleculares, como o Pulsed Field Gel Eletrophoresis (PFGE) têm sido utilizadas para tipagem de *C. perfringens* visando diferenciar as cepas comensais das patogênicas, associadas a surtos de EN (ABILDGAARD et al., 2009a). Também, tem se procurado associar determinados genótipos a algumas

características fenotípicas importantes, como nível de produção da toxina α , estado de saúde, e habilidade de inibir o crescimento de outros *C. perfringens* comensais (ABILDGAARD et al., 2009a; GHOLAMIANDEKHORDI et al., 2006; TIMBERMONT et al., 2009).

As análises de diversidade genética das populações intestinais de *C. perfringens* de animais saudáveis e doentes, têm mostrado uma elevada heterogeneidade (BARBARA et al., 2008; ENGSTRÖM et al., 2003; NAUERBY; PEDERSEN; MADSEN, 2003). Neste processo infeccioso, observa-se a presença de um tipo genético predominante, que nem sempre está associado à doença (ENGSTRÖM et al., 2003; GHOLAMIANDEKHORDI et al., 2006; NAUERBY; PEDERSEN; MADSEN, 2003; SAWIRES; SONGER, 2006).

Estudos realizados utilizando-se a técnica de Multi Locus Sequencing Type (MLST) demonstraram que alguns subtipos de *C. perfringens* tipo C e tipo A (*cpe+*) estariam, respectivamente, estreitamente relacionados à EN suína e às intoxicações alimentares em humanos (JOST; TRINH; SONGER, 2006; ROONEY et al., 2006). Isto, também tem sido comprovado para alguns subtipos clonais de *C. perfringens*, sugerindo-se certo grau de predisposição pelo nicho ecológico intestinal aviário (HIBBERD et al., 2011).

A técnica de RAPD-PCR tem sido usada para tipagem de *C. perfringens* e *C. difficile* de origem suína com o objetivo de analisar a diversidade genética desses microrganismos, em sistemas diferentes de produção, com histórico de infecções clostridiais, e em localidades distantes (BAKER et al., 2010). Estes autores mostraram que além da elevada prevalência de *C. perfringens* nas fezes de animais diarreicos é possível detectar alguns clones em diferentes sítios geográficos, sugerindo-se a associação destas cepas com os quadros patológicos produzidos. Também, como na EN ocorre a proliferação quase que exclusiva de um ou dois clones responsáveis pelo desenvolvimento do quadro clínico, a informação obtida poderá colaborar com a adoção de medidas epidemiológicas e preventivas para tratamento deste quadro infeccioso (SAWIRES; SONGER, 2006).

Outras técnicas moleculares como a ribotipagem (CRAVEN et al., 2003; DE CESARE et al., 2009) e Multiple locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) (SAWIRES; SONGER, 2005) também têm-se mostrado eficientes na tipagem e diferenciação de *C. perfringens* de diferentes origens, assim como, em estudos de evolução e adaptação de *C. perfringens* a diferentes nichos ecológicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras clínicas

Segmentos intestinais de jejuno ou íleo mostrando lesões severas, características da enterite necrótica de 96 frangos foram selecionados para este estudo. As características gerais das amostras clínicas analisadas são mostradas no Anexo 1. Estas amostras estavam congeladas (-20 °C) no Laboratório de Patologia Aviar da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, e gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira. O processamento microbiológico das amostras clínicas foi realizado no Laboratório de Anaeróbios do Depto. de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (Proc. No. 104).

4.2 Isolamento e identificação bacteriana

Segmentos intestinais de aproximadamente 2 cm foram inoculados em caldo carne (cooked meat medium - Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), e incubados em condições de anaerobiose (10% CO₂ e 90% N₂) a 37 °C por 72 h. Após o crescimento bacteriano, alíquotas de 10 µL foram inoculadas, em duplicata, em placas com ágar de soja tripticaseína (TSA- Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) enriquecidas com 5% de sangue de carneiro, e em seguida, incubadas em anaerobiose, a 37 °C por 48 h.

As colônias características apresentando dupla hemólise no ágar sangue, foram também, inoculadas em ágar gema de ovo para visualizar a atividade lecitinase como um halo opaco ao redor da colônia. Também, desse crescimento foi realizado o teste de catalase gotejando se peróxido de hidrogênio diretamente na colônia, sendo negativo, e a coloração de gram (bacilos curtos gram positivos).

A identificação definitiva em nível de espécie foi realizada pela fermentação de carboidratos em caldo peptona-extrato de levedura, segundo Holdeman et al. (1977). A fermentação de glicose, lactose, sacarose (Difco Laboratories, USA) e maltose (Merck, Germany), e não fermentação de salicina (Merck, Germany) nem

manitol (Difco Laboratories, USA), foram identificados como *C. perfringens*. A cepa *Clostridium perfringens* ATCC 13124 foi utilizada como controle.

4.3 Características fenotípicas

4.3.1 Detecção (HA) e inibição (IHA) da hemaglutinação.

Foi realizada segundo a metodologia descrita por Nakano, Fontes Piazza e Avila-Campos. (2006), utilizando placas de microtitulação e sangue de frango coletado em solução Alsever, lavado três vezes em PBS (0,01M, pH 7,3), centrifugado (2.000 g x 5 min), e suspenso à concentração de 1% no mesmo tampão. As células bacterianas foram cultivadas em caldo BHI (anaerobiose, 37 °C, 24 h), suspensas a $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL. Nas placas, 50 µL de PBS e 50 µL da solução bacteriana foram misturadas, realizando se diluições seriadas em base 2. Seguidamente, foi adicionado a cada poço 50 µL da suspensão de eritrócitos. As placas foram incubadas inicialmente a 37 °C por 1 h, e depois a 4 °C durante a noite. O título de HA foi definido como o recíproco da maior diluição bacteriana que aglutinou os eritrócitos. Como controle negativo da HA foi usada a suspensão de eritrócitos (1%) sem a adição de bactérias.

Para a inibição da hemaglutinação foram preparadas soluções de arabinose, galactose, manose, e xilose em PBS à concentração final de 60 mM. Em seguida, em 9,9 mL de cada carboidrato, foram adicionados 0,1 mL de eritrócitos lavados, atingindo-se a concentração final de 1%. A cada diluição bacteriana com 50 µL, foram adicionados 50 µL de eritrócitos tratados com os respectivos carboidratos, sendo incubados a 37 °C, por 1 h, seguido de incubação a 4 °C, por uma noite. O título de IHA foi determinado como o recíproco da menor diluição capaz de inibir a HA. Como controle negativo da IHA foi utilizada uma suspensão de eritrócitos sem adição de carboidratos. Também, *C. perfringens* ATCC 13124 (HA+) e *B. fragilis* ATCC 25285 (HA-) foram utilizados como controles.

4.3.2 Detecção e inibição da produção da enzima neuraminidase.

Foram determinadas segundo metodologia descrita por Nakano, Fontes Piazza e Avila-Campos. (2006), em placas de microtitulação utilizando-se sangue de

frango coletado em solução Alsever e mantido a 4 °C durante uma semana. As células bacterianas foram cultivadas em infuso cérebro coração (BHI, brain hearth infusion-Difco Laboratories, USA), em anaerobiose, 37 °C por 24 h. O crescimento bacteriano foi padronizado utilizando-se a escala 0,5 de McFarland para atingir $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL, em seguida, foram realizadas três lavagens sucessivas em solução salina tamponada (PBS, 0,01M, pH 7,3). Assim, 1 mL dessa suspensão bacteriana foi misturado com 10 µL de hemácias (1%) previamente lavadas, sendo essa mistura cuidadosamente homogeneizada e incubada em anaerobiose, 37 °C, por uma noite. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas, em base 2, adicionando-se nos poços das placas 18 µL de PBS e 2 µL de lectina de amendoim (2,5 mg/mL) (*Arachis hypogaea* – PNA, Sigma Chemical Co, USA). Em seguida, em cada diluição foi adicionada 20 µL da mistura bactérias-eritrócitos, sendo homogeneizados e incubados a 37 °C, por 1 h, seguido de incubação a 4 °C, por uma noite.

A produção da neuraminidase foi determinada quando houve aglutinação (bactéria-lectina-eritrócitos). Em cada ensaio foi utilizada a mistura de bactérias-eritrócitos, sem a adição de lectina, como controle negativo da reação (precipitação).

A inibição da atividade da neuraminidase foi verificada nas espécies produtoras da enzima, com o prévio tratamento das bactérias com galactose (1 mM), à temperatura ambiente, por 30 min. Em seguida, a mistura foi concentrada por centrifugação (12.000 g x 10 min). Nas placas foram adicionados 18 µL de PBS e 2 µL de lectina, realizando-se diluições seriadas, em base 2. A cada diluição foram adicionados 20 µL de bactérias sensibilizadas com galactose e 20 µL de uma suspensão de eritrócitos. As placas foram homogeneizadas e incubadas a 37 °C, por 1 h, e a inibição da enzima foi observada pela presença de precipitação dos eritrócitos. A mistura bactéria-eritrócitos-lectina foi utilizada como controle negativo.

As cepas de referência *B. fragilis* ATCC 25285 (neuraminidase positivo), *C. difficile* VPI 10468 (neuraminidase negativo) foram utilizadas como controles.

4.3.3 Ensaio citotóxico em células Vero (McCLANE; McDONEL, 1979)

A citotoxicidade foi realizada em células Vero utilizando-se os sobrenadantes dos *C. perfringens* *plc*-positivo/*tpeL*-negativo e *plc*-positivo/*tpeL*-positivo. As células epiteliais foram cultivadas em meio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) (Vitrocell-

Embrilife, SP, Brasil), suplementado com 2% (v/v) de soro fetal bovino. Em seguida, 1 mL da suspensão celular (1×10^5 células/mL), foi adicionado em microplacas de 24 poços e incubado a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂, por 24 h. Posteriormente, 0,5 mL de sobrenadante bacteriano foram adicionados a cada poço e a placa, incubada nas condições anteriormente descritas. As células foram observadas em microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100, Japão) durante três dias e fotografadas com câmera digital (Sony, CyberShot).

O sobrenadante de *C. perfringens* ATCC 13124 foi usado como controle positivo de citotoxicidade, e caldo BHI esterilizado como controle negativo. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos duas vezes independentes.

4.3.4 Ensaios de adesão e invasão às células HEP-2 (NAKANO et al., 2008)

Neste ensaio as células HEP-2 (carcinoma de laringe humano) foram cultivadas nas condições anteriormente descritas para as células Vero (item 4.3.4), em garrafas de poliestireno esterilizadas (TPP, Suíça), contendo Meio 199 (sais de Earle) (Cultilab, SP, Brasil) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10 mg/mL). A monocamada celular foi lavada uma vez com PBS esterilizado (NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM) (0,1 M, pH 7,4), sendo as células descoladas da superfície utilizando-se a solução ATV (associação tripsina versene) e recuperadas em meio de cultura na presença de SFB.

Para o teste de adesão, 1,0 mL da suspensão com aproximadamente 1×10^5 células/mL, foram transferidas a cada poço, contendo uma lamínula de 13 mm de diâmetro. As placas foram incubadas para obter uma monocamada celular sub-confluenta, a qual foi lavada cinco vezes com PBS. Seguidamente, foi adicionado 960 µL de MEM (Cultilab, SP, Brasil) contendo 2% de SFB. Posteriormente, 40 µL do crescimento bacteriano de 16 h em caldo BHI (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células/mL) foram inoculados nos poços das placas, sendo incubados por 6 h em atmosfera com 5% de CO₂. Após esse período, o meio foi retirado e os poços lavados cinco vezes com PBS. As células foram fixadas com metanol absoluto por 30 min e coradas com a coloração de May Grünwald (1:2), em tampão Sörensen (KH₂PO₄, NaHPO₄, pH 7,3), durante 10 min, seguida pela coloração Giemsa (1:3), diluído no mesmo tampão, durante 20 min. Finalmente, a placa foi lavada em água

corrente e as lamínulas secas à temperatura ambiente, e montadas sobre lâminas porta-objeto para serem observadas ao microscópio óptico de luz (100 X). A cepa *E. coli* enteroagregativa O42 (EAEC) que tem padrão de adesão agregativo (AA), foi utilizada como controle positivo. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos duas vezes independentemente.

Para o teste de invasão foram utilizadas células de três a quatro dias de crescimento, lavadas em PBS e recuperadas em SFB como no experimento anterior. Para obter a monocamada celular sub-confluyente, uma alíquota de 3,0 mL, com aproximadamente $3,5 \times 10^5$ células/mL, foi adicionada em cada poço, e as placas incubadas, nas condições mencionadas anteriormente. Após lavagem das células com PBS três vezes e de adicionar 900 µL de DMEM contendo 2% de SFB, inoculou-se 100 µL do crescimento bacteriano ($1,5 \times 10^8$ células/mL) e incubado por 2 h. Posteriormente, à lavagem com PBS, foi adicionado a cada poço 1 mL de DMEM (Dulbecco's modified Eagle's) contendo 2% SFB, cefoxitina 200 mg/L (para *C. perfringens*) e gentamicina 300 mg/L (para *E. coli*), visando eliminar as células que não invadiram, sendo as placas incubadas por 1 h. Esta concentração de antibióticos não afetou a fisiologia nem morfologia celulares. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS (3X) e adicionaram-se 400 µL de Triton-X-100 (1%) em cada poço. Logo, após a homogeneização, 400 µL foram transferidos para tubos contendo 1,6 mL de BHI, e em seguida, 100 µL de cada mistura foram semeados em ágar sangue e incubados em condições de anaerobiose a 37 °C por 48 h para determinar as unidades formadoras de colônias (UFC). As cepas *E. coli* enteroinvasiva O124:NM (EIEC) e *E. coli* HB101 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. A invasão foi expressa como a porcentagem de bactérias recuperadas do inóculo inicial após do tratamento antibiótico e a lise das células epiteliais.

A preparação das células e os ensaios de citotoxicidade, adesão e invasão foram realizados no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantã, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Roxane M. F. Piazza.

4.3.5 Determinação da susceptibilidade às drogas antimicrobianas

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de diluição em ágar (CLSI, 2007). O inóculo bacteriano foi preparado em caldo BHI,

suplementado com 0,5% de extrato de levedura atingindo-se aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células/mL (escala 0,5 de McFarland). Cada placa com ágar Wilkins & Chalgren contendo diferentes concentrações de antibióticos variando de 0,25 até 512 µg/mL, foi inoculada com o replicador Steers (10^5 células/mL/ponto). As placas inoculadas, em duplicata, foram incubadas em condições de anaerobiose, a 37 °C, por 48 h. Meios sem antibióticos foram utilizados como controle.

Os antibióticos utilizados foram: amoxicilina, cefalexina, clindamicina, eritromicina, e tetraciclina (Luper Ind. Farm. Ltda., São Paulo, SP, Brasil); amoxicilina-ácido clavulânico (Smithkline Beecham Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil); cefoxitina (Merck, Sharp & Dohme, São Paulo, SP, Brasil); metronidazol (Aventis Farm. Ltda., São Paulo, SP, Brasil); bacitracina e cloranfenicol (Sigma Aldrich, São Paulo, SP, Brasil); enrofloxacin (Montana Lab, Lima, Perú); oxitetraciclina (GenFar, Cali, Colômbia), penicilina-estreptomicina (Univet, Irlanda); e sulfaquinoxalina (Veterinária Laboratórios, Lima, Perú).

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de cada agente antimicrobiano capaz de inibir totalmente o crescimento macroscópico dos microrganismos.

4.4 Características genotípicas

4.4.1 Extração de DNA

O DNA bacteriano foi extraído pelo método fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989). Uma colônia representativa de cada isolado foi crescida em 5 mL de BHI em anaerobiose por 48 h. O sedimento bacteriano lavado duas vezes em PBS (pH 7,2), foi incubado com 70 µL de lisozima (10 mg/mL) a 37 °C por 3 h. Em seguida, foram adicionados 35 µL de sódio duodecil sulfato (SDS 20%) e 35 µL de proteinase K (20 mg/mL), e incubados a 55 °C por 2 h, sendo posteriormente, adicionados volumes iguais de fenol:clorofórmio (1:1) e centrifugados (14.000 g x 6 min). O sobrenadante (DNA) foi precipitado com volumes iguais de acetato de sódio (20%) e isopropanol absoluto. Em seguida, o DNA foi lavado com etanol gelado (70%) e centrifugado (14.000 g x 10 min), e o mesmo, eluído em 100 µL de TE, sendo estocado a - 30 °C, até seu uso.

4.4.2 Toxinotipagem dos *Clostridium perfringens* isolados

A determinação dos diferentes toxinotipos dos *C. perfringens* isolados foi realizada por Multiplex-PCR, segundo Baums et al. (2003) (Tabela 1). As reações de amplificação de DNA foram realizadas em volumes finais de 25 µL contendo 2,5 µL de 10 x buffer PCR, 1,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 1 µL de dNTP (0,2 mM), 1 µL de cada iniciador (0,4 mM), 0,25 µL de Platinum *Taq* polimerase (0,5 U) (Invitrogen), e 1 µL de DNA (10 ng). A reação de amplificação foi realizada em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) programado para: 1 ciclo de 95 °C (3 min); seguido de 35 ciclos de 95 °C (1 min), 56 °C (1 min), e 72 °C (2 min); e 1 ciclo final de 72 °C (5 min).

A detecção dos genes *netB* e *tpeL* que codificam, respectivamente, a produção das toxinas NetB e TpeL foi realizada segundo Keyburn et al. (2008) e Amimoto et al. (2007) (Tabela 1). As reações de amplificação foram realizadas com volumes finais de 25 µL contendo 2,5 µL de 10 x buffer PCR (Invitrogen, Brasil), 1,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 1 µL de dNTP (0,2 mM), 1 µL de cada iniciador (0,4 mM), 0,25 µL de Platinum *Taq* polimerase (0,5 U) (Invitrogen, Brasil), e 1 µL de DNA (10 ng). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) programado para 1 ciclo de 94 °C (2 min); seguido de 35 ciclos de 94 °C (30 s), 55 °C (1 min), e 72 °C (1 min); e 1 ciclo final de 72 °C (5 min).

Todos os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%), corados com brometo de etídio (0,5 mg/mL) e fotografados sob transiluminador de luz UV com o sistema Kodak (EDAS, DC-120). Foi utilizado como marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Brasil).

DNA de *C. perfringens* ATCC 13124 (toxinotipo A, *plc*+), e DNA de amostras laboratoriais de *C. perfringens* CpB (toxinotipo B, *plc*+, *cpb*+, *etx*+), *C. perfringens* CpD (toxinotipo D, *plc*+, *etx*+) e *C. perfringens* CpE (toxinotipo E, *plc*+, *iap*+), e *C. perfringens* EHE-NE-18 (*netB*+) (cedida pelo Dr. Rob Moore da Universidade de Monash, Austrália), e DNA de *C. perfringens* JGS-5369 (*tpeL*+) (cedida pelo Dr. Glenn Songer da Universidade de Arizona, USA), foram utilizados como controles positivos. Também, DNA de *C. difficile* VPI 10468 e *C. sporogenes* ATCC 2413 foram utilizados como controles negativos.

Tabela 1 – Genes e oligonucleotídeos utilizados na toxinotipagem por Multiplex-PCR de *C. perfringens* isolados de frangos com enterite necrótica.

Gene	Toxina codificada	Oligonucleotídeos 5' → 3'	Amplicon (bp)
<i>plc</i>	alfa	AGTCTACGCTTGGGATGGAA TTTCCTGGGTTGTCCATTTT	900
<i>cpb</i>	beta	TCCTTTCTTGAGGGAGGATAAA TGAACCTCCTATTTTGTATCCCA	611
<i>cpe</i>	enterotoxina	GGGGAACCCTCAGTAGTTTCA ACCAGCTGGATTTGAGTTTAATG	506
<i>etx</i>	epsilon	TGGGAACCTTCGATACAAGCA TTAACTCATCTCCCATAACTGCAC	396
<i>iap</i>	iota	AAACGCATTAAAGCTCACACC CTGCATAACCTGGAATGGCT	293
<i>cpb2</i>	beta 2	CAAGCAATTGGGGGAGTTTA GCAGAATCAGGATTTTGACCA	200
<i>netB</i>	NetB	GCTGGTGCTGGAATAAATGC TCGCCATTGAGTAGTTTCCC	384
<i>tpeL</i>	TpeL	ATATAGAGGCAAGCAGTG GAG GGAATACCACTTGATATA CCTG	466

4.4.3 Sequenciamento do gene *tpeL*

Os DNA bacterianos que abrigaram o gene *tpeL* foram submetidos a reação de sequenciamento, com os iniciadores usados na detecção do gene (Tabela 1). Os produtos de PCR foram purificados com o kit comercial (Gel Extraction, QIAGEN), e as reações foram realizadas segundo o sistema MEGABACE 1000, utilizando DYENAMIC ET Dye Terminator kit (Thermo Sequenase II DNA polimerase), e enviadas para sequenciamento (Projeto Genoma Humano, Serviço de Sequenciamento, IB-USP). As sequências obtidas foram analisadas pelos programas Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd.) e comparadas com as sequências depositadas no GenBank, com o auxílio do programa BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi).

4.4.4 Detecção dos genes *nanH*, *nanI* e *nanJ* (neuraminidase)

A detecção dos genes que codificam a produção dos três tipos neuraminidasas (NanI e NanJ) em *C. perfringens* foi determinada segundo Sheu et al. (2002) e Chiarezza et al. (2009) (Tabela 2). Os iniciadores para o gene *nanH* foram desenhados neste estudo, utilizando-se o programa NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>). As reações de amplificação foram realizadas em volumes finais de 25 µL contendo 2,5 µL de 10 x buffer PCR, 1,0 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 1 µL de dNTP (0,2 mM), 1 µL de cada iniciador (0,4 mM), 0,25 µL de Platinum *Taq* polimerase (0,5 U) (Invitrogen, Brasil), e 1 µL de DNA (10ng). As amplificações foram realizadas em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) programado para: 1 ciclo de 94 °C (2 min), seguido de 35 ciclos de 94 °C (30 s), 50 °C (1 min), e 72 °C (3 min), e 1 ciclo final de 72 °C (5 min). Como controle positivo foi utilizado o DNA de *C. perfringens* ATCC 13124 (*nanH*+, *nanI*+, *nanJ*+))

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados na detecção dos genes que codificam a produção de neuraminidase em *Clostridium perfringens* isolados de frangos com enterite necrótica.

Gene	Neuraminidase codificada	Oligonucleotídeos 5' → 3'	Amplicon (bp)	Referências
<i>nanI</i>	NanI	ATTACAAAGGGATAACTTTAATTTTAAC TTTATTAGCTCCACTCTC	2.060	Sheu et al. (2002)
<i>nanJ</i>	NanJ	ATCTTCATCTAAACTTCAAT GCTATTATTGAACTGCTATT	2.400	Chiarezza et al. (2009)
<i>nanH</i>	NanH	ACAACGAAACGCTTATCGTGGCTAT ACCTTGGCATCCAGAGCCCTT	1.108	Este estudo

4.4.5 Determinação da diversidade genética

A diversidade genética dos *C. perfringens* isolados de frangos com EN foi determinada pela técnica de AP-PCR (WILLIAMS et al., 1990) utilizando-se iniciadores arbitrários. Inicialmente, foram avaliados nove iniciadores como segue: OPA-03 (AGT CAG CCA C), OPA-09 (GGG TAA CGC C), OPA-12 (TCG GCG ATA G), OPA-17 (GAC CGC TTG T), OPA-18 (AGG TGA CCG T), OPF-05 (CCG AAT TCC C), OPI-01 (ACC TGG ACA C), OPI-04 (CCG CCT AGT C), e OPI-14 (TGA AGG CGG T). Desses, foram selecionados os iniciadores OPA-3, OPA-9, e OPA-18, por amplificarem bandas visíveis em todos os DNA avaliados. As reações de amplificação foram realizadas em volumes finais de 25 µL contendo 2,5 µL de 10x buffer PCR, 1,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 1 µL de dNTP (0,2 mM), 1 µL de cada iniciador (0,4 mM), 0,25 µL de Platinum *Taq* polimerase (0,5 U), e 1 µL de DNA (10 ng). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems), programado para: 1 ciclo de 94 °C (5 min); seguido de 35 ciclos de 94 °C (1 min), 42 °C (2 min), e 72 °C (2 min); e 1 ciclo final de 72 °C (10 min). As cepas *B. fragilis* ATCC 25285, *C. difficile* VPI 10468, *C.*

perfringens ATCC 13124, *C. sporogenes* 2413 e *E. coli* E-2369, foram incluídas na análise.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose (1%), corados com brometo de etídio (0,5 mg/mL) e fotografados sob transiluminador de luz UV. Os marcadores de peso molecular 100 bp DNA ladder e 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen, Brasil) foram utilizados nas corridas eletroforéticas.

Os diferentes perfis genéticos foram analisados, construindo-se os respectivos dendrogramas com o programa NTSYS (Applied Biostatitics, Inc. versão 2.21), utilizando-se os coeficientes de similaridade de Jaccard, Dice, Simple Matching (SM) e UN1.

5 RESULTADOS

Dos 96 segmentos intestinais de frangos com enterite necrótica analisados, nove (9,4%) foram positivos para a presença de *C. perfringens*, e do crescimento em ágar sangue, de 1 a 4 colônias foram aleatoriamente avaliadas bioquimicamente, obtendo-se 22 *C. perfringens*. Todos os *C. perfringens* produziram dupla hemólise em ágar sangue de carneiro e lecitinase em ágar gema de ovo, mas nenhum deles produziu a enzima catalase. Na Figura 4, pode ser observada a dupla hemólise característica de *C. perfringens*.

Figura 4 – Característica fenotípica de *C. perfringens*.

Legenda: Dupla hemólise em ágar sangue de carneiro.

A capacidade de aglutinação em sangue de frango foi observada em seis (27%) dos 22 isolados, mostrando títulos de HA = 4 (Tabela 3). Quando os eritrócitos foram tratados com os seis açúcares avaliados (arabinose, fructose, galactose, glicose, lactose e xilose), nenhum deles foi capaz de inibir a hemaglutinação.

Dos 22 *C. perfringens* isolados, 19 (86,4%) produziram a enzima neuraminidase, com títulos que variaram de 2 a 32 (Tabela 3), e a galactose foi o único açúcar que mostrou capacidade inibitória para a produção dessa enzima em todos os isolados.

Tabela 3 - Características fenotípicas e genotípicas dos 22 *C. perfringens* isolados de frangos com enterite necrótica.

Isolado	Toxinotipo	Hemaglutinação (Título HA)	Neuraminidase (Título NA)	Genes		Grupos genéticos por AP- PCR	Perfil de resistência
				<i>nanI</i>	<i>nanJ</i>		
1a	A, <i>tpeL</i> (-)	(0)	2	+	+	I	B, CF, CL, ER, O, S, T
1b	A, <i>tpeL</i> (-)	(0)	2	+	+	I	CF, CL, ER, O, S, T
3c	A, <i>tpeL</i> (+)	4	8	+	+	I	B, CF, CL, ER, S
1d	A, <i>tpeL</i> (-)	(0)	(0)	-	-	II	CF, CL, ER, S
5a	A, <i>tpeL</i> (-)	4	16	+	+	II	CF, ER, S, T
8c	A, <i>tpeL</i> (-)	(0)	32	+	+	II	CF, ER, S
2a	A, <i>tpeL</i> (-)	4	16	+	+	II	CF, ER, S
6a	A, <i>tpeL</i> (-)	(0)	8	+	+	III	B, CF, ER, S
6b	A, <i>tpeL</i> (+)	(0)	4	+	+	III	B, CF, ER, S
6c	A, <i>tpeL</i> (+)	(0)	8	+	+	III	B, CF, ER, S
6d	A, <i>tpeL</i> (+)	(0)	16	+	+	III	B, CF, ER, S
8a	A, <i>tpeL</i> (-)	4	16	+	+	III	CF, ER, S
Cp	A, <i>tpeL</i> (-)	(0)	4	+	+	III	CF, CL, S
8b	A, <i>tpeL</i> (-)	4	16	+	+	III	CF, ER, S, T
8d	A, <i>tpeL</i> (-)	(0)	8	+	+	III	CF, ER, S
4a	A, <i>tpeL</i> (+)	(0)	4	+	+	IV	CF, CL, ER, O, S, T
9a	A, <i>tpeL</i> (-)	0	4	+	-	IV	CF, ER, S
9b	A, <i>tpeL</i> (+)	0	4	+	-	IV	CF, ER, S, T
7a	A, <i>tpeL</i> (-)	0	2	+	-	V	B, CL, S
3a	A, <i>tpeL</i> (-)	0	0	+	+	VI	B, CF, CL, ER, S
3b	A, <i>tpeL</i> (-)	0	0	+	+	VI	B, CF, ER, O, S
3d	A, <i>tpeL</i> (+)	4	8	+	+	VI	B, CF, ER, O, S
1c	A, <i>tpeL</i> (-)	0	16	+	+	VII	B, CF, CL, ER, S

Legenda: (+): presença; (-): ausência. Cp: *C. perfringens* ATCC 13124; B: Bacitracina, CF: Cefalexina, CL: Clindamicina, ER: Eritromicina, O: Oxitetraciclina, S: Sulfaquinoxalina, T: Tetraciclina.

Neste estudo a ação das toxinas α e TpeL foi avaliada em células Vero. Assim, sete *C. perfringens* *plc+/tpeL+* (isolados 3c, 3d, 4a, 6b, 6c, 6d e 9b) e dois *plc+/tpeL-* (1c e 8d) foram avaliadas. O efeito produzido pelos *C. perfringens* *plc+/tpeL+* foi observado a partir das 3 h de incubação; em 6 h observou-se o alongamento bem definido, sendo que às 48 h este efeito foi mais acentuado. Finalmente, após 72 h, as células epiteliais se mostraram completamente alongadas e arredondadas (Figura 5A, C, E, G e I). À diferença dos *C. perfringens* *plc+/tpeL-* que nas três primeiras horas de contato causaram uma drástica modificação celular tornando-as arredondadas, as quais se mantiveram após 72 h de incubação, mostrando o efeito citotóxico irreversível (Figura 5B, D, F, H e J).

Os ensaios de adesão e invasão foram realizados com os mesmos isolados utilizados no ensaio citotóxico, isto é, com perfil *plc+/tpeL+* (isolados 3c, 3d, 6b, 6c, 6d e 9b) e *plc+/tpeL-* (isolados 1c e 8d). Dos oito isolados avaliados, sete apresentaram capacidade de adesão às células HEp-2 mostrando padrão não específico, com formação de aglomerados não localizados (Figura 6B). Nessa Figura 6A, se pode observar também, o padrão de adesão de *C. perfringens* ATCC 13124 com perfil *plc+/tpeL-*, mostrando padrão similar aos isolados clínicos. Também, foi observado o padrão de adesão característico da *E. coli* enteroagregativa O42 (EAEC) sendo agregativo e bem definido (Figura 6D).

Dos oito isolados avaliados somente cinco foram capazes de invadir as células epiteliais, numa faixa entre $0,03 \times 10^3$ a $1,58 \times 10^3$ células/mL (Tabela 4). Também, pode ser observado que, os isolados 6b e 9b foram capazes de aderir, mas não de invadir as células, e o isolado 1c não teve a capacidade de aderir nem invadir às mesmas células (Tabela 4).

Figura 5 - Efeito citopático de *C. perfringens* em células Vero.

Legenda: Ação de *tpeL*⁺/*plc*⁺: A (6 h), C (24 h), E (48 h), G (72 h) e I (72 h). Ação de *tpeL*⁻/*plc*⁻: B (6 h), D (24 h), F (48 h), H (72 h) e J (72 h). L: Células Vero sem sobrenadante bacteriano (controle); M: Células Vero com BHI (controle); A,B,C,D,E,F,G e H Aumento: 1000X; I e J: 72 h Aumento 2000X de G e H, respectivamente.

Figura 6 - Adesão de *C. perfringens* em células HEp-2.

Legenda: **A:** *C. perfringens* ATCC 13124 (*plc*+/*tpeL*-); **B:** *C. perfringens* 6c (*plc*+/*tpeL*+); **C:** célula HEp-2 (controle); **D:** *Escherichia coli* O42 (EAEC). Aumento: 1000X. As setas indicam os diferentes padrões de adesão em D (agregativo) e em A e B (não definido).

Tabela 4. Adesão e invasão de *C. perfringens* em células HEp-2.

Bactéria	Adesão	Invasão	UFC/mL ^a
<i>C. perfringens</i>			
1c (<i>tpeL</i> -)	-	-	0
3c (<i>tpeL</i> +)	+	+	0,03 x 10 ³
3d (<i>tpeL</i> +)	+	+	1,58 x 10 ³
6b (<i>tpeL</i> +)	+	-	0
6c (<i>tpeL</i> +)	+	+	0,1 x 10 ³
6d (<i>tpeL</i> +)	+	+	0,13 x 10 ³
8d (<i>tpeL</i> -)	+	+	0,03 x 10 ³
9b (<i>tpeL</i> +)	+	-	0
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 (<i>tpeL</i> -)	+	+	0,75 x 10 ³
<i>E. coli</i> O42	+	-	0
<i>E. coli</i> O143	+	+	12,56 x 10 ³
<i>E. coli</i> HB101	-	-	0

Legenda:

^aMédia dos ensaios, em duplicata, com como inóculo inicial 1,5 x 10⁸ bactérias/mL

E. coli O42 (enteroagregativa) controle positivo para o teste de adesão.

E. coli O143 (enteroinvasiva) controle positivo para o teste de invasão.

E. coli HB101 controle negativo para ambos os testes.

Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e as porcentagens de resistência aos diferentes antimicrobianos estão descritos na Tabela 5. Todos os isolados foram sensíveis à amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, cefoxitina, cloranfenicol, enrofloxacina, metronidazol e penicilina-estreptomicina, apresentando valores de CIM variando de $\leq 0,25$ a 4. A maioria dos isolados apresentou resistência de 95% para cefalexina e eritromicina, seguido de bacitracina (50%). Também, 36% dos isolados foram resistentes à clindamicina, 32% para tetraciclina e 22% para oxitetraciclina. Nesta Tabela pode-se observar que todos os isolados foram resistentes à sulfaquinoxalina (CIM ≥ 512 µg/mL), sendo importante ressaltar que, esta droga é utilizada em diferentes meios seletivos para *Clostridium* spp.

Tabela 5 - Valores de CIM e porcentagem de resistência para 14 drogas antimicrobianas de 22 *Clostridium perfringens* isolados de frangos com enterite necrótica.

Antimicrobiano	Ponto crítico (µg/mL)	Faixa	CIM (µg/mL)		Resistência %
			50%	90%	
Amoxicilina	8	≤ 0,25 - 1	≤ 0,25	0,5	0
Amoxicilina-Ácido clavulânico	8	≤ 0,25 - 4	0,5	4	0
Bacitracina	8	≤ 0,25 - 512	4	128	50
Cefalexina	8	4 - 64	16	64	95
Cefoxitina	32	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	0
Clindamicina	4	0,5 - 256	0,5	128	36
Cloranfenicol	8	1 - 4	4	4	0
Enrofloxacina	8	≤ 0,25 - 4	≤ 0,25	4	0
Eritromicina	8	4 - 64	16	32	95
Metronidazol	16	≤ 0,25 - 8	4	4	0
Oxitetraciclina	8	≤ 0,25 - 128	4	8	23
Penicilina-estreptomicina	8	≤ 0,25 - 8	0,5	4	0
Sulfaquinoxalina	ND*	≥ 512	≥ 512	≥ 512	100
Tetraciclina	8	2 - 32	4	8	32

Legenda:

Pontos críticos segundo CLSI (2007).

ND: Ponto Crítico não determinado para *C. perfringens*.

Valores de CIM para *C. perfringens* ATCC 13124: Amoxicilina (≤ 0,25 µg/mL); Amoxicilina-Ac. clavulânico (0,5 µg/mL); Bacitracina (2,0 µg/mL); Cefalexina (8 µg/mL); Cefoxitina (≤ 0,25 µg/mL); Clindamicina (4 µg/mL); Cloranfenicol (4 µg/mL); Enrofloxacina (≤ 0,25 µg/mL); Eritromicina (2,0 µg/mL); Metronidazol (4 µg/mL); Oxitetraciclina (≤ 0,25 µg/mL); Penicilina-estreptomicina (0,5 µg/mL); Sulfaquinoxalina (≥ 512 µg/mL); Tetraciclina (2,0 µg/mL).

O método utilizado na extração de DNA dos *C. perfringens* mostrou ser eficiente, recuperando uma boa quantidade e qualidade do DNA bacteriano. Todos os 22 *C. perfringens* isolados abrigaram o gene *plc*, sendo por tanto classificados como *C. perfringens* tipo A. Desses 22 isolados, somente sete (31,8%) abrigaram

também o gene *tpeL* (Tabela 3). Nas Figuras 7A e 7B podem ser observados as amplificações dos genes *plc* e *tpeL*, respectivamente.

O DNA dos sete isolados que abrigaram o gene *tpeL* foram sequenciados para verificação da similaridade genética e comparadas com a sequências depositadas no GenBank, sendo observado uma similaridade variando de 96% a 98% com a cepa *C. perfringens* JGS 5369 (código de acesso GenBank: AB262081.1).

Figura 7 - Detecção dos gene *plc* e *tpeL*.

Legenda: **A:** Linhas 1 a 3, *C. perfringens plc* positivos; linha 4, *C. perfringens* ATCC 13124 (*plc* positivo); linha 5, marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder. **B:** linha 1 e 2, *C. perfringens tpeL* positivos; linha 3, *C. perfringens tpeL* negativo; linha 4, *C. perfringens* JGS 5369 (*tpeL* positivo); linha 5, marcador de peso molecular, 50 bp DNA Ladder.

Dos 22 *C. perfringens* isolados, 21 (95,5%) abrigaram o gene *nanI* e 18 (81,8%) o *nanJ*. Somente um isolado (1d) não abrigou algum dos três genes avaliados. Também, os isolados 9a, 9b e 7a não abrigaram o gene *nanJ*. Nenhum dos 22 isolados abrigou o gene *nanH* (Tabela 3). Interessantemente, foi observado

que 18 dos 22 isolados abrigaram ambos os genes (*nanI* e *nanJ*). Na Figura 8 se observa a detecção dos genes *nanI* e *nanJ* produzindo, respectivamente, amplicons de 2.060 bp e 2.400 bp (Tabela 3).

Figura 8 - Detecção dos genes *nanI* e *nanJ*.

Legenda: gene *nanI* (linhas 1 a 3) e gene *nanJ* (linhas 7 a 9), nos mesmos *C. perfringens*.
Linhas 4 e 6, *C. perfringens* ATCC 13124; linhas 5 e 10, marcadores de peso molecular 100 bp DNA Ladder e 1 kb Plus DNA Ladder, respectivamente.

Dos três iniciadores arbitrários selecionados (OPA-3, OPA-9 e OPA-18) neste estudo, somente o iniciador OPA-3 foi utilizado, pela amplificação de bandas nítidas pelo AP-PCR, que facilitaram a análise com o coeficiente UN1. Dessa forma, na Figura 9 observa-se o dendrograma com os agrupamentos bacterianos.

Figura 9 - Dendrograma de 22 *C. perfringens* isolados de frangos com enterite necrótica.

Legenda: Cp: *C. perfringens* ATCC 13124; Cd: *C. difficile* VPI 10468; Cs: *C. sporogenes* 2413; Ec: *E. coli* E 2369; Bf: *B. fragilis* ATCC 25285.

Todos os *C. perfringens* analisados foram agrupados em sete clusters (I-VII) mostrando similaridade de aproximadamente 96% (Figura 9). O cluster I abrigou três espécies em dois subgrupos: A e B. O cluster IA agrupou dois clones. O cluster IB

formado pelo isolado 3c se diferenciou das anteriores por apresentar o perfil HA (+) e *tpeL* (+).

No cluster II se observam dois subgrupos A e B, sendo que o subgrupo IIA1 abrigou um isolado (1d) e o IIA2 (clones 5a e 8c). É importante ressaltar que, desses três somente o isolado 1d não abrigou os genes *nanI* e *nanJ*, e pela análise de AP-PCR mostrou bandas nítidas; à diferença dos clones onde nenhuma banda foi amplificada. O subgrupo IIB abrigou o isolado 2a com características similares a os clones do grupo IIA2.

O cluster III mostrou vários subgrupos. Assim, o subgrupo IIIA foi dividido em IIIA1 que agruparam isolados de frangos, e o grupo IIIA2 que agrupou a cepa de referência *C. perfringens* ATCC 13124. Também, este subgrupo IIIA1a apresentou quatro clones com características similares, sendo o isolado 6a o único que não abrigou o gene *tpeL*, todos esses clones foram isolados de um mesmo frango. Por outro lado, o subgrupo IIIA1b (isolado 8a) apresentou-se sensível à bacitracina e pertenceu a um frango diferente dos anteriores. O subgrupo IIIB abrigou dois clones 8b e 8d com características similares ao isolado 8a, e pertencendo ao mesmo animal.

O subgrupo IVA contendo o isolado 4a se diferençou dos isolados do subgrupo IVB, principalmente, pela presença dos genes *nanI* e *nanJ*, e pela resistência a seis antimicrobianos. Já, os isolados incluídos no subgrupo IVB1 (9a) e IVB2 (9b) se diferenciaram entre si, pela ausência do gene *tpeL* no primeiro, e pela presença deste gene no segundo, além da resistência à tetraciclina.

O cluster V formado por um único isolado (7a) que se caracterizou pela resistência à bacitracina, clindamicina e sulfaquinoxalina, e pela ausência dos genes *nanJ* e *tpeL*. O cluster VI agrupou três isolados sendo que o subgrupo VIA reuniu dois isolados (3a e 3b) com características similares, incluindo a ausência do gene *tpeL* à diferença do isolado 3d (subgrupo VIB) que abrigou este gene. Esses três isolados pertenceram a um mesmo animal.

O cluster VII abrigou o isolado 1c, que embora apresente características fenotípicas e genotípicas similares com os isolados 1a e 1b foi agrupado num cluster diferente. Finalmente, nesse dendrograma pode ser observado que a cepa de referência *C. difficile* VPI 10468 e *C. sporogenes* 2413 apresentaram uma similaridade de aproximadamente 86% a 87% com os isolados; entretanto a *E. coli*

2339 e *B. fragilis* ATCC 25285 apresentaram diferenças genéticas abaixo de 85% de similaridade.

6 DISCUSSÃO

Clostridium perfringens é uma bactéria anaeróbia, gram positiva e esporulada, e pertence à microbiota residente intestinal do homem e animais, especialmente de frangos (GONG et al., 2008; SONGER, 1996). Esse microrganismo é ocasionalmente observado causando infecções de interesse médico humano e veterinário, sendo também, comumente encontrado em águas de esgotos e solo (HATHEWAY, 1990).

A presença de *C. perfringens* tem recebido enorme importância na indústria avícola devido às perdas econômicas que são causadas pelos processos infecciosos que esse microrganismo produz em frangos de corte. Esta bactéria causa a EN que afeta fatalmente uma enorme população de aves em diferentes partes do mundo, incluindo o Brasil. Estudos determinando-se a prevalência e a patogênese deste processo infeccioso em aves são escassos em nosso país, talvez, devido à dificuldade de se utilizar técnicas de anaerobiose para o cultivo destes microrganismos.

A utilização de testes presuntivos e definitivos convencionais na identificação de *C. perfringens* se mostraram eficientes, concordando com Holdeman et al. (1977) e Shimizu et al. (2002a). Neste estudo, foram utilizadas amostras clínicas de segmentos intestinais de frangos acometidos por EN, os quais foram coletados e estocados entre 2003 e 2010. Assim, das 96 amostras analisadas, apenas em 10% delas foram confirmadas a presença de *C. perfringens*, concordando com Long (1973) e Ficken e Wages (1997). A baixa prevalência de *C. perfringens* observada nas amostras analisadas pode ser explicada, pelos antimicrobianos a que esses animais comumente são submetidos, o que infelizmente, no Brasil, ainda é uma prática comum nas indústrias avícolas. Isto pode ter mascarado a real situação dessa doença e da porcentagem de recuperação desses microrganismos.

Dentre os antimicrobianos mais utilizados no Brasil são ionóforos e bacitracina, sendo administrados juntamente com a ração para promover o crescimento rápido das aves e para prevenir a EN. Contrariamente ao que ocorre no Brasil, na Comunidade Européia e nos Estados Unidos o aumento da incidência e mortalidade de aves por esta doença têm-se tornado um sério problema de importância econômica, devido à proibição do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento (DIBNER; RICHARDS, 2005).

A Food and Drug Administration (FDA, 2012), organismo que regula e controla a produção de alimentos e fármacos nos Estados Unidos, tem indicado a restrição de antimicrobianos como promotores de crescimento (em doses sub-terapêuticas); permitindo a sua utilização na prevenção, controle e tratamento de doenças, desde que supervisionada e prescrita por médicos veterinários, sendo restringido o uso de algumas drogas, como quinolonas de 3ª geração e cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, indicadas para o uso na medicina humana.

Assim, a FDA tem promovido a adesão voluntária dos produtores pecuários a estas normativas, sendo fundamentadas em estudos previamente desenvolvidos pela Organização Mundial da Saúde desde 1997, e os quais vêm comprovando que os alimentos de origem animal constituem-se um dos principais veículos de transmissão para homem de bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos, assim como, dos genes que conferem esta resistência (AARESTRUP, 1999; AARESTRUP et al., 2008; GILCHRIST et al., 2007; JOHANSSON et al., 2004).

É sabido que, condições de coleta, transporte e armazenamento adequados de amostras clínicas, são extremamente importantes para o isolamento de bactérias anaeróbias, incluindo espécies esporuladas pertencentes ao gênero *Clostridium* (BLAUT et al., 2002; DUERDEN; DRASAR, 1991).

Em nosso estudo, dos 22 *C. perfringens* isolados, somente seis produziram hemaglutinação em sangue de frango. Esta atividade tem sido observada em diferentes tipos sanguíneos, entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada neste estudo. A utilização de sangue de frango justifica-se devido à EN que afeta esses animais.

Clostridium perfringens é um habitante comum da microbiota intestinal aviária, entretanto, a colonização das células epiteliais por esta bactéria no seria suficiente para causar a EN, já que alguns fatores ambientais, entre eles, dieta com elevado conteúdo de fibra (aveia e centeio), elevado conteúdo de proteína de origem animal (farinha de peixe), e infecção por coccídeas, são necessários para que se desenvolva a doença (WILLIAMS, 2005). Sabe-se que, as células epiteliais intestinais sejam de mamíferos e aves, são recobertas por uma camada de mucus, funcionando como uma barreira física para vários patógenos (DEPLANCKE; GASKINS, 2001; GAUDIER et al., 2004). Também, é sabido que *C. perfringens* produz substâncias mucolíticas as quais colaboram com a degradação mucóide, expondo assim, receptores nas células epiteliais intestinais, sendo mais facilmente

atingidas pelas toxinas que vão agredir esse tecido intestinal (COLLIER et al., 2003; COLLIER et al., 2008; DEPLANCKE et al., 2002).

Os ácidos siálicos ou neuramínicos estão presentes nas superfícies das células eucarióticas cumprindo importantes papéis biológicos, como: reconhecimento intercelular, barreira contra os patógenos, e nutrição (CORFIELD, 1992; SCHAUER, 2000). Todos os isolados de *C. perfringens* avaliados neste estudo produziram esta enzima com títulos variando de 2 a 32, com a exceção de três isolados que, coincidentemente, não produziram esta enzima, hemaglutinação em sangue de frango e não abrigaram o gene *tpeL*. Desses três somente um isolado (1d) não abrigou nenhum dos genes que codificam a produção da neuraminidase. Neste caso específico, o isolado 1d somente abrigou o gene *plc* que codifica a produção da toxina α , o que provavelmente pode ser considerado como o principal fator agressor ou de virulência desta bactéria.

Também, é sabido que, o ácido siálico é secretado de forma contínua no processo de renovação de glicoconjugados presentes na superfície celular. Em condições de homeostase este ácido siálico é disponibilizado para as bactérias como fonte de carbono e nitrogênio (VIMR et al., 2004). Algumas bactérias patogênicas como *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, e *Streptococcus agalactiae* incorporam o ácido siálico em suas respectivas cápsulas ou lipopolissacarídeos, fortalecendo dessa forma, a evasão das células de resposta imunológica do hospedeiro, inibindo a opsonização e fagocitose (McGUCKIN et al., 2011; SEVERI; HOOD; THOMAS, 2007).

A produção da enzima neuraminidase foi avaliada em eritrócitos de frangos, e a maioria dos *C. perfringens* testados (19/22) produziu essa enzima. Neste estudo, a utilização de sangue de frango foi devida à expectativa de encontrar alguma diferença significativa na ação dessas células obtidas dos animais com EN. A produção dessa enzima, assim como a atividade de hemaglutinação, também foi avaliada em sangue de humano e de cavalo, observando-se que não houve diferenças significativas na ação dessa enzima sobre essas hemácias (dados não apresentados).

Amimoto et al (2007) e Nagahama et al (2011) avaliaram o efeito citotóxico da toxina Tpel purificada em células Vero, observando que a ação dessa toxina produzia alongamento característico nestas células, facilmente diferenciado do efeito produzido pela toxina α (arredondamento inicial). Em nosso estudo, os isolados *C.*

perfringens com perfil *plc+/tpeL+* mostraram um efeito citotóxico nas células Vero diferentes dos *C. perfringens plc+/tpeL-* como pode ser observado na Figura 8. Essa diferença no efeito citotóxico foi observada nas primeiras 6 h de incubação, tornando-se similar após 48 h de incubação.

Este resultado sugere que, nas espécies *plc+/tpeL-* o arredondamento celular produzido, foi devido à ação da toxina α , e que o alongamento inicial nas células Vero em contato com os isolados *plc+/tpeL+* possa ser explicado pela ação da toxina TpeL característica, ou pelo efeito sinérgico entre elas, sugerindo-se que o efeito observado na Figura 8A tenha sido produzido pela toxina TpeL, concordando com os autores anteriormente citados, ou pela competição das toxinas, já que o sobrenadante dessas bactérias foi utilizado nos ensaios. Sabe-se que, a toxina TpeL descrita em 2007, por Amimoto et al., pertence ao grupo de toxinas *Large Clostridial Cytotoxin* (LCT), que afeta o citoesqueleto celular causando morte celular (NAGAHAMA et al., 2011; GUTTENBERG et al., 2012).

No Brasil não tem sido reportada a presença desta toxina produzida por *C. perfringens* tipo A. Assim, a presença deste gene e a provável ação citotóxica da toxina de *C. perfringens* isolados de frangos com EN em células Vero, parece ser o primeiro relato em nosso meio. É provável que, a associação desta toxina possa ter algum papel importante no desenvolvimento e severidade da EN em frangos (CHALMERS et al., 2008a; COURSDON et al., 2012; JIANG et al., 2009; SHOJADOOST; VINCE; PRESCOTT, 2012).

Thompson et al. (2006), analisando cepas de *C. perfringens* patogênicas e não patogênicas, relataram que somente as primeiras participaram do desenvolvimento da EN, e que estas eram capazes de estimular a resposta imune em animais de experimentação. Também, estudos posteriores mostraram que as cepas patogênicas produziram somente a toxina TpeL, e a ausência da toxina NetB (JIANG et al., 2009; LEE et al., 2011).

Na Tabela 4, se observam as características de adesão e invasão dos *C. perfringens* avaliados, com e sem a presença do gene *tpeL*. A maioria dos isolados mostrou capacidade adesiva, mas nem todos tiveram a capacidade de invadir as células HEp-2, indicando que a produção das toxinas α e TpeL tenham algum papel no processo de adesão ou invasão às células eucarióticas. Estudos realizados têm mostrado que, a toxina α apresenta atividade citotóxica sobre células endoteliais, fibroblastos de hamster chinês e células musculares de camundongo, mostrando

sua potente ação citotóxica celular (BRYANT; STEVENS, 1996; FLORES-DIAZ et al., 1998; FLORES-DIAZ et al., 2005; JEPSON et al., 2001).

O efeito citotóxico observado por *C. perfringens* produzindo a toxina α e TpeL é observado nas Figuras 8A, 8C, 8E e 8G, mostrando um alongamento celular o que poderia indicar, uma maior quantidade desta toxina ou um efeito antagônico em relação a toxina α , uma vez que essa ação sobre as células epiteliais foi observada até as 48 h de incubação, e após esse tempo as células ficaram arredondadas ou destruídas. Entretanto, não foi possível definir qual das toxinas exerceu um maior efeito sobre as células epiteliais. Estes resultados sugerem que, estudos mais detalhados são necessários para compreender melhor a atividade desta importante toxina, e que, a quantificação da mesma, transcrição, expressão e purificação da toxina possam colaborar para elucidar seu mecanismo de ação.

Interessantemente, Pruteanu e Shanahan (2013), observaram que o sobrenadante de *C. perfringens* tipo A não apresentou citotoxicidade para células de cólon humano (C2BBE1), à diferença da ação sobre as células Vero, CHO (carcinoma de ovário de hamster chinês), e HEp-2. Esses autores sugeriram que, devido ao ecossistema preferencial para a manutenção de *C. perfringens* seja o cólon, região onde dificilmente se observam lesões típicas da EN, essas bactérias ao atingir o jejuno e íleo iniciam a produção das toxinas que podem desencadear esse processo infeccioso.

A habilidade bacteriana de aderir às células epiteliais é considerada importante fator de virulência em vários patógenos, como *Clostridium difficile*, *Salmonella* Typhimurium, *Shigella* spp. e *Helicobacter pylori* (BORRIELLO et al., 1998; NAVANEETHAN; GIANNELLA, 2008; RHEE; WALKER; CHERAYIL, 2005; SUERBAUM; JOSEPHANS, 2007). Entretanto, este processo tem sido pouco avaliado em *C. perfringens* devido que a maioria dos estudos é direcionada exclusivamente para a produção das toxinas (SONGER, 1996). Análises histopatológicas de intestino com lesão característica de EN mostram presença de *C. perfringens* aderidas ao redor das zonas necróticas, sugerindo-se que este microrganismo é capaz de produzir as toxinas após a colonização do tecido intestinal (FICKEN; WAGES, 1997; OLKOWSKI et al., 2006).

Estudos têm mostrado que o processo de adesão de *C. perfringens* às células HEp-2 poderia ser mediada pela presença pili tipo IV, uma vez que essa estrutura teria um papel importante na formação de biofilme nas células epiteliais (VARGA;

THERIT; MELVILLE, 2008). Assim, os *C. perfringens* isolados de EN usados neste estudo, mostraram um padrão não definido de adesão nas células HEp-2, com aglomerados não localizados. Entretanto, neste estudo não foi avaliada a presença de pili nos isolados avaliados.

Clostridium perfringens expressa seus principais fatores de virulência por diferentes sistemas regulatórios, sendo o mais importante o VirS/VirR, um sistema de dois componentes que está envolvida na produção das toxinas α , NetB e β , incluindo algumas neuraminidases. Os sinais que medeiam a expressão desses fatores de virulência são diversos, e incluem moléculas autoestimuladoras e concentrações de compostos ambientais (CHEUNG et al., 2010; OHTANI et al., 2003; SHIMIZU et al., 2002b).

Por outro lado, tem sido demonstrado que este microrganismo após o contato com células epiteliais, tais como Caco-2, HT-29 e MDCK, imediatamente após sua adesão, têm a capacidade de produzir toxinas e neuraminidases, e esta resposta também é regulada pelo Sistema VirR/VirS (LI et al., 2011; VIDAL et al., 2012).

Em nosso estudo, alguns *C. perfringens* não apresentaram a capacidade de invadir as células eucarióticas HEp-2, e aquelas que apresentaram esta capacidade não apresentaram valores significativos após a invasão. Isto sugere que, o processo de invasão nestes microrganismos não seria um fator chave na destruição das células epiteliais, reforçando a hipótese que as enzimas são vitais para o início e progressão da EN. Poucos são os estudos que avaliam o processo de invasão nestes microrganismos. Por outro lado, é importante observar que nossos isolados produzindo toxina α e TpeL, também apresentaram um número baixo de invasão e alguns deles não tiveram a capacidade de invadir (Tabela 4).

Pruteanu et al. (2011) e Pruteanu e Shanahan (2013) mostraram que *C. perfringens* tem a capacidade de degradar a matriz extracelular e ligações intercelulares de células Caco-2 e C2BBel1, mostrando que a bactéria tem a capacidade de invadir o epitélio intestinal, sugerindo que proteases do tipo collagenase colA participariam desse processo, iniciando processos inflamatórios e autoimunes, tais como o síndrome do cólon irritado, enterite necrótica, e câncer de cólon.

Por outro lado, O'Brien e Melville (2000) mostraram que *C. perfringens* isolados de gangrena gasosa em humanos têm a capacidade de sobreviver no interior de macrófagos peritoneais de camundongos (macrófago J774-33),

sugerindo-se que, esses microrganismos apresentam alguma proteção contra a atividade lítica desses macrófagos, sendo essa proteção atribuída à cápsula polissacarídica (PLÜDDEMANN, MUKHOPADHYAY; GORDON, 2006).

No Brasil, a regulação do uso de antimicrobianos na criação de aves consta no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal, instituído pela Instrução Normativa DAS Nº 42 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1999). Esta instituição é a responsável por oferecer uma lista com os princípios ativos que podem ser usados como aditivos nas dietas de uso animal, sendo que a determinação sobre a proibição de um determinado antimicrobiano é baseado em evidências científicas individuais, e não pelo princípio de precaução adotada pela Comunidade Europeia.

A portaria No. 808 do MAPA manifesta à utilização de algumas drogas, como a bacitracina, espiranimicina, virginiamicina e tilosina, nas rações para animais (BRASIL, 2003). É necessário observar que, o MAPA procura adaptar suas disposições segundo as normas internacionais (MERCOSUL, CODEX, OMC, FAO, OIE, WHO) para não afetar a exportação da carne de frango, e nesse sentido, desde 1988, as penicilinas, sulfonamidas, cloranfenicol, e tetraciclinas estão banidos da indústria avícola.

Van Immerseel et al. (2004) preconizaram o uso de antimicrobianos para eliminar o *C. perfringens* do TGI de aves, como método mais efetivo para controlar a EN. Por outro lado, é sabido que, em alguns casos, antibióticos são adicionados à ração dos animais visando uma diminuição desses microrganismos no intestino, trazendo como consequência a diminuição de toxinas, e favorecendo o melhor aproveitamento da energia disponível do crescimento animal (GOLDER et al., 2011; NIEWOLD, 2007).

No entanto, é sabido que, o uso indiscriminado e contínuo desses fármacos produz alterações na microbiota residente intestinal do animal, favorecendo a seleção de bactérias resistentes às múltiplas drogas, sendo este procedimento considerado um problema de saúde pública, por atuarem como reservatórios de genes de resistência (BEZIRTZOGLOU, 1997). Como consequência da proibição da utilização de antimicrobianos na ração de aves, a EN vem crescendo alarmantemente trazendo como resultado grandes perdas econômicas em nível mundial, sendo calculado em aproximadamente US\$ 2 bilhões de dólares (LOVLAND; KALDHUSDAL, 2001; VAN IMMERSEEL et al., 2004).

Estudos avaliando a susceptibilidade às drogas de *C. perfringens* de origem aviária têm mostrado a sensibilidade para β -lactâmicos, cloranfenicol, quinolonas e metronidazol (GHARAIBEH; AL-RIFAI; AL-MAJALI, 2010; GHOLAMIANDEKHORDI et al., 2009). Também, as 22 espécies isoladas neste estudo mostraram-se sensíveis a esses antimicrobianos, com a exceção da cefalexina que mostrou baixa eficácia (Tabela 5). A elevada resistência (95%) dos *C. perfringens* avaliados, pode ser devida a uma possível alteração ou diminuição dos sítios específicos de ligação nas proteínas de ligação às penicilinas (PBP1) da membrana citoplasmática para essa droga (SCHWARTZMAN; RELLER; WANG, 1977; WATKINS et al., 1997; WILLIAMSON, 1983).

Na Europa (Bélgica, Suécia, Noruega e Dinamarca) e no Canadá, o tratamento da EN é realizado pela administração de algumas drogas β -lactâmicas, como amoxicilina, cefoxitina e penicilina (AGUNOS; LÉGER; CARSON, 2012; GADBOIS et al., 2008; GHOLAMIANDEKHORDI et al., 2009; JOHANSSON et al., 2004; MARTEL et al., 2004; SLAVIC et al., 2011). Por outro lado, alguns estudos têm mostrado que *C. perfringens* de origem animal não aviar e de origem humano, mostram sensibilidade às drogas β -lactâmicas (LAWHON; TAYLOR; FAJT, 2013; ODOU et al., 2007; ROBERTS et al., 2006; TYRREL et al., 2006). Tansuphasiri, Matra e Sangsuk. (2005), analisaram *C. perfringens* isolados de porcos, aves e da população, na Índia, observando diferenças nos padrões de sensibilidade e de resistência às penicilinas.

Dentre os antibióticos avaliados, a enrofloxacin (quinolona de 3ª. geração) apresentou excelente atividade contra os *C. perfringens* testados. Entretanto, estudos realizados em isolados de frangos têm mostrado elevada resistência a esta droga (GHARAIBEH; AL-RIFAI; AL-MAJALI, 2010; SINGER; HOFACRE, 2006). É importante lembrar que, as quinolonas apresentam baixa atividade contra bactérias anaeróbias e que estas drogas, particularmente, a enrofloxacin é muito utilizada na medicina veterinária para processos infecciosos produzidos por *E. coli*.

Em nosso estudo, 50% dos *C. perfringens* avaliados foram resistentes à bacitracina. É importante observar que, atualmente o uso desta droga como promotor de crescimento em aves é permitido em alguns países como no Canadá, Nova Zelândia, Estados Unidos, e Brasil (BRASIL, 2003), entretanto, na Europa seu uso está proibido desde 1999. Certamente, essa resistência observada pode estar relacionada ao uso da bacitracina na ração alimentar.

Engberg et al. (2000) e Si et al. (2007) justificaram que devido à excelente ação da bacitracina sobre *C. perfringens* pode ser utilizada como promotor de crescimento, uma vez que essa droga tem a capacidade de preservar a estrutura das vilosidades e criptas intestinais, assim como, de diminuir as células de Globet, prejudicando a produção de mucina que é utilizada por esta bactéria na colonização do ecossistema intestinal (GOLDER et al., 2011).

Por outro lado, estudos realizados no exterior (CHALMERS et al., 2008a, b; WATKINS et al., 1997) e no Brasil (SILVA et al., 2009) mostraram que os *C. perfringens* de origem aviar apresentaram elevada resistência ($\geq 92\%$) para bacitracina. A utilização da bacitracina seja para o tratamento da EN ou como promotor de crescimento é matéria de discussão, uma vez que a utilização ou não dessa droga pode trazer consequências econômicas e de saúde pública na maioria dos países, particularmente, nos exportadores desses animais. Isto, alerta para reflexão das autoridades para criar políticas adequadas à realidade de cada país.

Neste estudo, foi observada a resistência dos *C. perfringens* para clindamicina (36%) e eritromicina (95%). Por outro lado, alguns estudos têm reportado a sensibilidade de *C. perfringens* de origem aviária (DUTTA; DEVRIESE, 1980), e outros têm mostrado elevada resistência com valores de CIM $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ (GHARAIBEH; AL-RIFAI; AL-MAJALI, 2010). É sabido que, ambas as drogas apresentam uma excelente ação contra a maioria das bactérias anaeróbias e são muito utilizadas para o tratamento de processos infecciosos em humanos.

Cloranfenicol e metronidazol mostraram excelente ação contra os *C. perfringens* avaliados. Este resultado era esperado uma vez que ambas as drogas são muito eficazes para o tratamento de processos infecciosos produzidos por bactérias anaeróbias, particularmente, o metronidazol que é muito utilizado na medicina humana, à diferença do cloranfenicol que é extremamente tóxico para alguns órgãos vitais, tanto em humanos como animais, incluindo aves.

As tetraciclinas também têm sido utilizadas como promotores de crescimento na produção avícola, particularmente, no Brasil. Entretanto, o uso desta droga tem sido proibido devido à elevada resistência observada em microrganismos de origem humana e animal. Assim, em nosso estudo, foi observada a resistência dos isolados testados para oxitetraciclina (23%) e tetraciclina (32%). Da mesma forma Johansson et al. (2004) e Silva et al. (2009) reportaram resistência de 60% e 76%, respectivamente, em isolados de origem aviária.

Em nosso estudo, todos os isolados avaliados apresentaram valores de CIM $\geq$ 512 μ g/ml para sulfaquinoxalina. Embora as sulfas não sejam adequadas para o tratamento da EN em aves, são muito utilizadas para o tratamento de processos respiratórios e coccidiose (SINGER; HOFACRE, 2006).

Espécies do gênero *Clostridium* são taxonomicamente agrupados em XIX Clusters, dentro deles as espécies do Cluster I, que agrupa *C. perfringens*, que se constituem microrganismos comensais, mais que em desequilíbrio do ecossistema intestinal podem-se tornar patógenos oportunistas. Este microrganismo habita a região do ceco de aves, e em condições de superpopulação causa lesões no jejuno e íleo, devido à expressão de potentes toxinas (POPOFF; BOUVET, 2013).

Todos os isolados testados abrigaram o gene *p/c* que codifica a produção da toxina α , sendo então, pertencentes ao tipo A (Tabela 3). Esses resultados concordam com dados da literatura, mostrando o toxinotipo A como membro predominante da microbiota intestinal aviária e dos processos de EN (ENGSTRÖM et al., 2003; GHOLAMIANDEKHORDI et al., 2006; HEIKINHEIMO; KORKEALA, 2005).

A toxina α é um importantíssimo fator de virulência envolvido na produção da gangrena gasosa em humanos, assim como, de quadros de enterites em animais, incluindo-se a EN aviária (NILO, 1980). Os primeiros estudos para entender a patogênese dessa infecção foram focados no efeito do sobrenadante de *C. perfringens* inoculado diretamente no duodeno de frangos, sendo sugerido que a toxina α seria o principal fator de virulência neste processo, já que a sua ação é dirigida à membrana celular e disfunção vascular sistêmica, causando perda de eletrólitos, albumina e água. Tudo isto, além da elevada quantidade de toxina vai favorecer a formação de edema e produção de diarreia (AL-SHEIKHLY; TRUSCOTT, 1977a, b, c).

Estudos têm mostrado diferenças quantitativas de *C. perfringens* toxigênicos de material fecal de frangos com e sem diarreia, demonstrando a prevalência desses microrganismos produtores da toxina α , utilizando-se as técnicas de PCR em tempo real e ELISA (McCOURT et al., 2005; SI et al., 2007). Alguns pesquisadores na tentativa de elaborar vacinas específicas para esta toxina observaram a ineficiência das mesmas (COOPER; TRINH; SONGER, 2009; KULKARNI et al., 2007; SCHOEPE et al., 2006; THOMPSON et al., 2006), sem perceber que outras possíveis toxinas poderiam estar envolvidas (SAWIRES; SONGER, 2006).

Em 2006, Keyburn et al., descobriram a participação de outra toxina chamada NetB, produzida por *C. perfringens*, sendo sugerido a sua participação na EN de aves. A descoberta desta nova toxina justifica em parte a ineficácia nas tentativas de encontrar uma vacina específica contra a EN. Em nosso estudo, nenhum dos 22 *C. perfringens* avaliados abrigou o gene *netB*.

Com esta informação novos estudos foram realizados para determinar a presença do gene *netB* em frangos doentes e sadios de diferentes países, entre eles Austrália (KEYBURN et al., 2008), Canadá (CHALMERS et al., 2008a), USA (MARTIN; SMYTH, 2009) e Dinamarca (ABILDGAARD et al., 2010), observando-se elevada prevalência desse gene nos animais doentes. Entretanto, é observado que a prevalência do gene *netB* em animais sadios varia segundo a região geográfica desses animais, e isto, poderia ser explicado pelas condições de tratamento e manutenção, climáticas e de alimentação, entre outros.

Lepp et al. (2010), identificou três loci de patogenicidade 1-3, relacionados à EN, sendo o locus 2 o único de origem cromossomal, enquanto que, o locus 1, localizado num plasmídeo de 85 kb, abriga o gene *netB*, junto a outros genes relacionados à adesão e captação de nutrientes. Estes mesmos autores comentaram que a perda deste gene *netB* não é um fato infrequente, que isto pode dever-se a seu grande tamanho ou à falta das condições necessárias para sua replicação, e que estaria diretamente relacionado a perda da patogenicidade.

Também, estudos têm mostrado que, *C. perfringens* abrigando o gene *netB* de frangos sadios não expressaram a produção da toxina, sendo sugerido que a simples presença deste gene necessariamente não estaria envolvida nos processos de EN (ABILDGAARD et al., 2010; BRADY et al., 2010); entretanto, não se descarta a possibilidade que a toxina NetB tenha alguma ação sinérgica com a toxina α neste processo infeccioso (BARBARA et al., 2008; COURSDON et al., 2010).

Conforme pode ser observado na Tabela 3, a maioria dos *C. perfringens* analisados abrigaram os genes *nanI* (21/22) e *nanJ* (18/22), e nenhum deles abrigou o gene *nanH*, isto pode indicar que a presença de um dos três genes é suficiente para que o microrganismo possa expressar a produção da enzima. Por outro lado, é sabido que, a produção dessa enzima pode cumprir um papel ecológico no ecossistema intestinal de aves, e que possivelmente, em associação com outros fatores possam participar de alguma forma no início do desenvolvimento da EN nesses animais.

Boraston, Ficko-Blean e Healey. (2007), analisando a estrutura molecular da neuraminidase NanJ de *C. perfringens* identificaram sítios de ligação às fibronectinas e coesinas colaborando com a estabilidade e potencialização das toxinas ϵ e α produzidas por este microrganismo. Também, estudos têm mostrado que a enterotoxemia observada em gado é causada por *C. perfringens* produzindo a toxina épsilon, mas que a produção das neuraminidases cumpre um importante papel de expor receptores específicos para a ação dessa toxina; isto também tem sido demonstrado em processos de gangrena gasosa (FLORES-DIAZ et al., 2005; LI et al., 2011).

Neste estudo, a presença de *C. perfringens* apresentando genes (isolados 3a e 3b), e não produziram a enzima, pode indicar a inativação dos genes ou o estado silencioso em que eles se encontraram ou até a presença de sequências incompletas do genoma desses microrganismos. Também, é sugerido que análises completas de sequenciamento desses genes possam ser úteis para a melhor compreensão dessa falta de expressão fenotípica.

Os 22 *C. perfringens* avaliados foram agrupados em sete clusters pela análise com o coeficiente UN1. Na Figura 7 observa-se o dendrograma onde mostra uma similaridade de aproximadamente 96% entre as bactérias isoladas de frango com EN, incluindo também, a cepa de referência *C. perfringens* ATCC 13124. Também, é possível observar que somente o isolado 1c foi geneticamente mais distante, sendo esta bactéria a única que não mostrou capacidade de adesão e invasão às células epiteliais HEp-2.

A utilização da técnica de tipagem AP-PCR com auxílio do oligonucleotídeos de sequência aleatória mostrou uma boa reprodutibilidade e discriminação entre as bactérias analisadas. Com esta técnica pode-se diferenciar polimorfismos nucleotídicos facilitando a comparação clonal pela similaridade genética dos microrganismos (ABILDGAARD et al., 2009a; WILLIAMS et al., 1990).

Estudos avaliando a diversidade genética de *C. perfringens* de origem aviária, têm mostrado valores de similaridade de 97% a 100%, utilizando técnicas como sequenciamento e análise do gene 16S rRNA (BRADY et al., 2010; SENGUPTA et al., 2011). É importante ressaltar que, os isolados 5a e 8c, agrupados no cluster IIA2 apresentaram-se como clones, entretanto, essa agrupação foi devida à ausência de bandas. Em adição, Baker et al. (2010) analisando a diversidade genética de *C. perfringens* isolados de suínos nos Estados Unidos, não conseguiram associar a

presença de alguns isolados com alguma das localidades onde esses animais eram mantidos.

A presença dos sete clusters observados na Figura 7 mostram grupos e subgrupos de *C. perfringens*, com elevada similaridade e em alguns casos se observa a clonalidade de alguns isolados, entretanto, é importante ressaltar que, estes sete agrupamentos não apresentaram nenhuma associação com as características de hemaglutinação, produção de neuraminidase, e presença dos genes *nanI* e *nanJ*. Entretanto, a característica de resistência aos antimicrobianos foi a que mais colaborou na diferenciação entre os respectivos clusters formados (Tabela 3, Figura 7).

Estudos têm mostrado a diversidade clonal de *C. perfringens* isolados de aves saudáveis e afetadas com EN, assim como também, os aspectos fenotípicos e genotípicos de virulência foram avaliados, tais como as toxinas NetB, TpeL, enterotoxina e $\beta 2$, mais que em nenhum dos casos foram relacionadas a algum tipo clonal específico que poderiam participar da EN (BARBARA et al., 2008; CHALMERS et al., 2008a; ENGSTRÖM et al., 2012; GHOLAMIANDEKHORDI et al., 2006; NAUERBY; PEDERSEN; MADSEN, 2003; SHEU et al., 2002).

Os *C. perfringens* isolados de EN de frangos avaliados neste estudo, mostraram características fenotípicas e genotípicas variadas, e isto reflete o comportamento heterogêneo que estas bactérias apresentam o que dificulta a melhor compreensão da sua participação no desenvolvimento e progressão desta doença em nível mundial. Os resultados mostrados neste estudo levam a sugerir, em concordância com a literatura, que a produção de toxinas é o fator crítico para a agressão do tecido intestinal de animais, particularmente aves, e que outros estudos mais específicos são necessários para uma melhor compreensão da participação destes microrganismos nos diferentes quadros infecciosos em que eles estão envolvidos, seja de humanos ou animais.

Também, torna-se necessária a adoção de políticas nacionais que visem à eliminação ou substituição gradativa do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, evitando colocar em risco a saúde humana, assim como perdas econômicas para criadouros, e consequentemente, para o país.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

1. Os *C. perfringens* isolados foram classificados como tipo A (*plc+*), sendo que alguns deles abrigaram também o gene *tpeL*;
2. A maioria dos isolados apresentou característica citotóxica, adesiva e invasiva;
3. Os isolados mostraram perfil similar de resistência para alguns antimicrobianos; e
4. Os *C. perfringens* avaliados neste estudo foram agrupados em clusters estreitamente relacionados apesar de apresentarem características fenotípicas e genotípicas heterogêneas.

REFERÊNCIAS*

- AARESTRUP, F. M. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 12, p. 279-285, 1999.
- AARESTRUP, F. M.; OLIVER, DURAN, C.; BURCH, D. G. Antimicrobial resistance in swine production. **Anim. Health Res. Rev.**, v. 9, p. 135-148, 2008.
- ABILDGAARD, L.; ENGBERG, R. M.; PEDERSEN, K.; SCHRAMM, A.; HOJBERG, O. Sequence variation in the α -toxin encoding *plc* gene of *Clostridium perfringens* strains isolated from diseased and healthy chickens. **Vet. Microbiol.**, v. 136, p. 293-299, 2009a.
- ABILDGAARD, L.; SCHRAMM, A.; RUDI, K.; HOJBERG, O. Dynamics of *plc* gene transcription and α -toxin production during growth of *Clostridium perfringens* strains with contrasting α -toxin production. **Vet. Microbiol.**, v. 139, p. 202-206, 2009b.
- ABILDGAARD, L.; SONDERGAARD, T. E.; ENGBERG, R. M.; SCHRAMM, A.; HØJBERG, O. In vitro production of necrotic enteritis toxin B, NetB, by *netB*-positive and *netB*-negative *Clostridium perfringens* originating from healthy and diseased broiler chickens. **Vet. Microbiol.**, v. 144, p. 231-235, 2010.
- ACAR, J.; CASEWELL, M.; FREEMAN, J.; FRIIS, C.; GOOSSENS, H. Avoparcin and virginiamycin as animal growth promoters: a plea for science in decision-making. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 6, p. 477-482, 2000.
- ACINAS, S. G.; MARCELINO, L. A.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M. F. Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 2629-2635, 2004.
- ADAMS, C. A. Nutrition-based health in animal production. **Nut. Res. Rev.**, v. 19, p. 79-89, 2006.
- AGUNOS, A.; LÉGER, D.; CARSON, C. Review of antimicrobial therapy of selected bacterial diseases in broiler chickens in Canada. **Can. Vet. J.**, v. 53, p. 1289-1300, 2012.
- AKTORIES, K.; SCHWAN, C.; PAPATHEODOROU, P.; LANG, A. E. Bidirectional attack on the actin cytoskeleton. Bacterial protein toxins causing polymerization or depolymerization of actin. **Toxicon**, v. 60, p.572-581, 2012.
- ALLAART, J. G.; VAN ASTEN A. J.; GRÖNE, A. Predisposing factors and prevention of *Clostridium perfringens* associated enteritis. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 36, p. 449-64, 2013.
- AL-SHEIKHLY, F.; AL-SAIEG, A. Role of coccidia in the occurrence of necrotic enteritis of chickens. **Avian Dis.**, v. 24, p. 324-333, 1980.
- AL-SHEIKHLY, F.; TRUSCOTT, R. B. The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of broth cultures of *Clostridium perfringens* into duodenum. **Avian Dis.**, v. 21, p. 230-240, 1977a.
- AL-SHEIKHLY, F.; TRUSCOTT, R. B. The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of crude toxins of *Clostridium perfringens* into duodenum. **Avian Dis.**, v. 21, p. 241-255, 1977b.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

- AL-SHEIKHLY, F.; TRUSCOTT, R. B. The interaction of *Clostridium perfringens* and its toxins in the production of necrotic enteritis of chickens. **Avian Dis.**, v. 21, p. 256-263, 1977c.
- AMIMOTO, K.; NORO, T.; OISHI, E.; SHIMIZU M. A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of *Clostridium perfringens* type C. **Microbiology**, v. 153, p. 1198-1206, 2007.
- ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. The Increase of *Lactobacillus* Species in the Gut Flora of Newborn Broiler Chicks and Ducks Is Associated with Weight Gain. **PLoS ONE**, v. 5, p. e10463. 2010.
- ARVANS, D. L.; VAVRICKA, S. R.; REN, H.; MUSCH, M. W.; KANG, L.; ROCHA, F. G.; LUCIONI, A.; TURNER, J. R.; ALVERDY, J.; CHANG, E. B. Luminal bacterial flora determines physiological expression of intestinal epithelial cytoprotective heat shock proteins 25 and 72. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, v. 288, p. G696-G704. 2005.
- ASAOKA, Y., YANAI, T., HIRAYAMA, H., UNE, Y., SAITO, E., SAKAI, H., GORYO, M., FUKUSHI, H., MASEGI, T. Fatal necrotic enteritis associated with *Clostridium perfringens* in wild crows (*Corvus macrorhynchos*). **Avian Pathol.**, v. 33, p. 19-24, 2004.
- AWAD, M. M.; BRYANT, A. E.; STEVENS, D. L.; ROOD, J. L. Virulence studies on chromosomal α -toxin and θ -toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential role of α -toxin in *Clostridium perfringens* -mediated gas gangrene. **Mol. Microbiol.**, v. 15, p. 191-202, 1995.
- BABA, E.; IKEMOTO, T.; FUKATA, T.; SASAI, K.; ARAKAWA, A.; MCDOUGALD, L. R. Clostridial population and the intestinal lesions in chickens infected with *Clostridium perfringens* and *Eimeria necatrix*. **Vet. Microbiol.**, v. 54, p. 301-308, 1997.
- BAKER, A. A.; DAVIS, E.; REHBERGER, T.; ROSENER, D. Prevalence and diversity of toxigenic *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* among swine herds in the midwest. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, p. 2961-2967, 2010.
- BALDASSI, L.; CASTRO, A. G. M.; GUERRA, J. L.; PORTUGAL, M. A. S. C.; CALIL, E. M. B.; MACRUZ, R. Necrotic enteritis in broilers in São Paulo state. **Arq. Inst. Bio., São Paulo**, v. 62, p. 37-43, 1995.
- BANU, S.; OHTANI, K.; YAGUCHI, H.; SWE, T.; COLE, S. T.; HAYASHI, H.; SHIMIZU, T. Identification of novel VirR/VirS-regulated genes in *Clostridium perfringens*. **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 854-864, 2000.
- BARBARA, A. J.; TRINH, H. T.; GLOCK, R. D.; SONGER, J. G. Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. **Vet. Microbiol.**, v.126, p. 377–382, 2008.
- BARD, R.; GUNSALUS, I. Glucose metabolism of *Clostridium perfringens*: Existence of a metallo-aldolase. **J. Bacteriol.**, v. 59, p. 387-400, 1950.
- BARE, L. N.; WISEMAN, R. F. Delayed Appearance of Lactobacilli in the Intestines of Chicks Reared in a "New" Environment. **Appl. Microbiol.**, v. 12, p. 457-459, 1964.
- BARNES, E. M.; MEAD, G. C.; BARNUM, D. A.; HARRY, E. G. The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. **Br. Poult. Sci.**, v. 13, p. 311-326, 1972.

- BARROW, P. A.; TUCKER, J. F.; SIMPSON, J. M. Inhibition of colonization of the chicken alimentary tract with *Salmonella typhimurium* gram-negative facultatively anaerobic bacteria. **Epidemiol. Infect.**, v. 98, p. 311-322, 1987.
- BA-THEIN, W.; LYRISTIS, M.; OHTANI, K.; NISBET, I. T.; HAYASHI, H.; ROOD, J. I.; SHIMIZU, T. The virR/virS locus regulates the transcription of genes encoding extracellular toxin production in *Clostridium perfringens*. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 2514-2520, 1996.
- BAUER, E.; WILLIAMS, B. A.; SMIDT, H.; MOSENTHIN, R.; VERSTEGEN, M. W. A. Influence of dietary components on development of the microbiota in single-stomached species. **Nutr. Res. Rev.**, v. 19, p. 63-78, 2006.
- BAUMS, C. G.; SCHOTTE, U.; AMTSBERG, G.; GOETHE, R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. **Vet. Microbiol.**, v. 100, p. 11-16, 2004.
- BELYI, Y.; AKTORIES, K. Bacterial toxin and effector glycosyltransferases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1800, p. 134-143, 2010.
- BERNIER, G.; FILION, R. Necrotic enteritis in broiler chickens. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 158, p. 1896-1897, 1971.
- BEZIRTOGLOU, E. The intestinal Microflora during the first weeks of life. **Anaerobe**, v. 3, p. 173-177, 1997.
- BLAUT, M.; COLLINS, M. D.; WELLING, G. W.; DORE, J.; van LOO, J.; de VOS, W. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. **Br. J. Nutr.**, v. 87, p. S203-S211, 2002.
- BORASTON, A. B.; FICKO-BLEAN, E.; HEALEY, M. Carbohydrate Recognition by a Large Sialidase Toxin from *Clostridium perfringens*. **Biochemistry**, v. 46, p. 11352-11360, 2007.
- BORRIELLO, S. P.; LARSON, H. E.; WELCH, A. R.; BARCLAY, F.; STRINGER, M. F.; BARTHOLOMEW, B. A. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: a possible cause of antibiotic-associated diarrhoea. **Lancet**, v. 1, p. 305-307, 1984.
- BORRIELLO, S. P. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 41, p. 13-19, 1998.
- BRADY, J.; HERNANDEZ-DORIA, J. D.; BENNETT, C.; GUENTER, W.; HOUSE, J. D.; RODRIGUEZ-LECOMPTÉ, J. C. Toxinotyping necrotic enteritis producing and commensal isolates of *Clostridium perfringens* from chickens fed organic diets. **Avian Pathol.**, v. 39, p. 475-481, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa N.42. Define os requisitos e critérios específicos para o funcionamento dos laboratórios de Análises de resíduos e Contaminantes em Alimentos integrantes da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários.** Brasília, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Portaria do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, nº 808.** Brasília, 2003.
- BRYANT, A. E.; BERGSTROM, R.; ZIMMERMAN, G. A.; SALTER, J. L.; HILL, H. R.; TWETEN, R. K.; SATO, H.; STEVENS, D. L. *Clostridium perfringens* invasiveness is enhanced by effects of theta toxin upon PMNL structure and function: the roles of

leukocytotoxicity and expression of CD11/CD18 adherence glycoprotein. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 7, p. 321-336, 1993.

BRYANT, A. E.; STEVENS, D. L. Phospholipase C and Perfringolysin O from *Clostridium perfringens* Upregulate Endothelial Cell-Leukocyte Adherence Molecule 1 and Interleukin-8 Synthesis in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 358-362, 1996.

BRYNESTAD, S.; SYNSTAD, B.; GRANUM, P. The *Clostridium perfringens* enterotoxin gene is on transposable element in type A human food poisoning strains. **Microbiology**, v. 143, p. 2109-2115, 1997.

BRYNESTAD, S.; GRANUM, P. E. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 74, p. 195-202, 2002.

BUSCH, C.; AKTORIES, K. Microbial toxins and the glycosylation of rho family GTPases. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 10, p. 528-535, 2000.

BUSCH, C.; HOFMANN, F.; GERHARD, R.; AKTORIES, K. Involvement of a conserved tryptophan residue in the UDP-glucose binding of large clostridial cytotoxin glycosyltransferases. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 13228-13234, 2000.

CABEZAS, J. A. Some questions and suggestions on the type references of the official nomenclature (IUB) for sialidase(s) and endosialidase. **Biochem. J.**, v. 278, p. 311-312, 1991.

CARON, E.; HALL, A. Identification of Two Distinct Mechanisms of Phagocytosis Controlled by Different Rho GTPases. **Science**, v. 282, p. 1717-1721, 1998.

CARR, D.; SHAW, D. D.; HALVORSON, A.; RINGS, B.; ROEPKE, D. Excessive mortality in market-age turkeys associated with cellulitis. **Avian Dis.**, v. 40, p. 736-741, 1996.

CARTER, G. P.; ROOD, J. I.; LYRAS, D. The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. **Trends Microbiol.**, v. 20, p. 21-29, 2012.

CHAKRABORTY, G. C.; CHAKRABORTY, D.; BHATTACHARYYA, D.; BHATTACHARYYA, S.; GOSWAMI, U. N.; BHATTACHARYYA, H. M. Necrotic enteritis in poultry in West Bengal. **Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.**, v. 5, p. 54-57, 1984.

CHALMERS, G.; BRUCE, H. L.; TOOLE, D.L.; BARNUM, B. A.; P. BOERLIN. Necrotic Enteritis Potential in a Model System Using *Clostridium perfringens* Isolated from Field Outbreaks. **Avian Dis.**, v. 51, p. 834-839, 2007.

CHALMERS, G.; BRUCE, H. L.; HUNTER, D. B.; PARREIRA, V. R.; KULKARNI, R. R.; JIANG, Y. F.; PRESCOTT, J. F.; BOERLIN, P. Multilocus Sequence Typing Analysis of *Clostridium perfringens* Isolates from Necrotic Enteritis Outbreaks in Broiler Chicken Populations. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 3957-3964, 2008a.

CHALMERS, G.; MARTIN, S.; HUNTER, D.; PRESCOTT, J.; WEBER, L.; BOERLIN, P. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm. **Vet. Microbiol.**, v. 127, p. 116-127, 2008b.

CHEUNG, J. K.; AWAD, M. M.; MCGOWAN, S.; ROOD, J. I. Functional Analysis of the VirSR Phosphorelay from *Clostridium perfringens*. **PLoS ONE**, v. 4, p. e5849, 2009.

CHEUNG, J. K.; KEYBURN, A. L.; CARTER, G. P.; LANCKRIET, A. L.; VAN IMMERSEEL, F.; MOORE, R. J.; ROOD, J. I. The VirSR Two-Component Signal Transduction System Regulates NetB Toxin Production in *Clostridium perfringens*. **Infect. Immun.**, v. 78, p. 3064-3072, 2010.

CHIAREZZA, M.; LYRAS, D.; PIDOT, S. J.; FLORES-DÍAZ, M.; AWAD, M. M.; KENNEDY, C. L.; CORDNER, L. M.; PHUMMOONNA, T.; POON, R.; HUGHES, M. L.; EMMINS, J. J.; ALAPE-GIRÓN, A.; ROOD, J. I. The NanI and NanJ Sialidases of *Clostridium perfringens* are not essential for virulence. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 4421-4428, 2009.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Approved standard M100-S17. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement.** Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.

COLLIER, C. T.; van der KLIS, J. D.; DEPLANCKE, B.; ANDERSON, D. B.; GASKINS, H. R. Effects of tylosin on bacterial mucolysis, colonization, and intestinal barrier function in a chick model of necrotic enteritis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, p. 3311-3317, 2003.

COLLIER, C. T.; HOFACRE, C. L.; PAYNE, A. M.; ANDERSON, D. B.; KAISER, P.; MACKIE, R. I.; GASKINS, H. R. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting growth. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 122, p.104-115, 2008.

COLLINS, M. D.; LAWSON, P. A.; WILLEMS, A.; CORDOBA, J. J.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.; GARCIA, P.; CAI, J.; HIPPE, H.; FARROW, J. A. E. The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 44, p. 812-826, 1994.

COOPER, K. K.; TRINH, H. T.; SONGER, J. G. Immunization with recombinant alpha toxin partially protects broiler chicks against experimental challenge with *Clostridium perfringens*. **Vet. Microbiol.**, v. 133, p. 92-97, 2009.

COOPER, K. K.; SONGER, J. G. Necrotic enteritis in chickens: A paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. **Anaerobe**, v. 15, p. 55-56, 2009.

COOPER, K. K.; SONGER, J. G. Virulence of *Clostridium perfringens* in an experimental model of poultry necrotic enteritis. **Vet. Microbiol.**, v. 142, p. 323-328, 2010.

CORFIELD, T. Bacterial sialidases roles in pathogenicity and nutrition. **Glycobiology**, v. 2, p. 509-521, 1992.

COURSODON, C. F.; TRINH, H. T.; MALLOZZI, M.; VEDANTAM, G.; GLOCK, R. D.; SONGER, J. G. *Clostridium perfringens* alpha toxin is produced in the intestines of broiler chicks inoculated with an alpha toxin mutant. **Anaerobe**, v. 16, p. 614-617, 2010.

COURSODON, C. F.; GLOCK, R. D.; MOORE, K. L.; COOPER, K. K.; SONGER, J. G. TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A are highly virulent for broiler chicks. **Anaerobe**, v. 18, p. 117-121, 2012.

CRAVEN, S. E.; COX, N. A.; BAILEY, J. S.; COSBY, D. E. Incidence and tracking of *Clostridium perfringens* through an integrated broiler chicken operation. **Avian Dis.**, v. 47, p. 707-711, 2003.

CZÁRÁN, T. L.; HOEKSTRA, R. F.; PAGIE, L. Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. **PNAS**, v. 99, p. 786 -790, 2002.

DAHIYA, J. P.; HOEHLER, D.; WILKIE, D. C.; VAN KESSEL, A. G.; DREW, M. D. Dietary Glycine Concentration Affects Intestinal *Clostridium perfringens* and *Lactobacilli* Populations in Broiler Chickens. **Poult. Sci.**, v. 84, p. 1875-1885, 2005.

DAFAALLA, E. N.; SOLTYS, M. Agglutination of red cells by *Clostridium welchii*. **Nature**, v. 172, p. 38-39, 1953.

DE CESARE, A.; BORILOVA, G.; SVOBODOVA, I.; BONDIOLI, V.; MANFREDI, G. *Clostridium perfringens* occurrence and ribotypes in healthy broilers reared in different European countries. **Poult. Sci.**, v. 88, p. 1850-1857, 2009.

DEPLANCKE, B.; GASKINS, H. R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 1131S–1141S, 2001.

DEPLANCKE, B.; VIDAL, O.; GANESSUNKER, D.; DONOVAN, S.M.; MACKIE, R.I.; GASKINS, H. R. Selective growth of mucolytic bacteria including *Clostridium perfringens* in a neonatal piglet model of total parenteral nutrition. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 76, p. 1117-1125, 2002.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poult. Sci.**, v. 84, p. 634-643, 2005.

DJOUDER, N.; PREPENS, U.; AKTORIES, K.; CAVALIE, A. Inhibition of Calcium Release-activated Calcium Current by Rac/Cdc42-inactivating Clostridial Cytotoxins in RBL Cells. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 18732-18738, 2000.

DUBOS, R. J.; SCHAEDELER, R. W. The effect of the intestinal flora on the growth rate of mice, and on their susceptibility to experimental infections. **J. Exp. Med.**, v. 1, p. 407-417, 1960.

DUBOS, R.; SCHAEDELER, R.; COSTELLO, R.; HOET, P. Indigenous, Normal, and Autochthonous Flora of the Gastrointestinal Tract. **J. Exp. Med.**, v. 122, p. 67-76, 1965.

DUERDEN, B. I.; DRASAR, B. B. **Anaerobes and Human Disease**. London: Ed. Hodder Arnold, 1991.

DUNCAN, C. L.; STRONG, D. H. Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. **Appl. Microbiol.**, v. 16, p. 82-89, 1968.

DUTTA, G. N.; DEVRIESE, L. Susceptibility of *Clostridium perfringens* of animal origin to fifteen antimicrobial agents. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v. 3, p. 227-237, 1980.

DWORKIN, M. M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria**. USA. Third Edition. Ed. Springer, 2006.

ENGBERG, R. M.; HEDEMANN, M. S.; LESER, T. D.; JENSEN, B. B. Effect of Zinc Bacitracin and Salinomycin on Intestinal Microflora and Performance of Broilers. **Poult. Sci.**, v. 79, p. 1311-1319, 2000.

ENGBERG, R. M.; HEDEMANN, M. S.; STEENFELDT, S.; JENSEN, B. B. Influence of Whole Wheat and Xylanase on Broiler Performance and Microbial Composition and Activity in the Digestive Tract. **Poult. Sci.**, v. 83, p. 925-938, 2004.

ENGSTRÖM, B. E.; FERMÉR, C.; LINDBERG, A.; SAARINEN, E.; BAVERUD, V.; GUNNARSSON, A. Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. **Vet. Microbiol.**, v. 94, p. 225-235, 2003.

ENGSTRÖM, B. E.; JOHANSSON, A.; ASPAN, A.; KALDHUSDAL, M. Genetic relatedness and *netB* prevalence among environmental *Clostridium perfringens* strains associated with a broiler flock affected by mild necrotic enteritis. **Vet. Microbiol.**, v. 159, p. 260-264, 2012.

FENG, Y.; GONG, J.; YU, H.; JIN, Y.; ZHU, J.; HAN, J. Identification of changes in the composition of ileal bacterial microbiota of broiler chickens infected with *Clostridium perfringens*. **Vet. Microbiol.**, v. 140, p. 116-121, 2010.

FICKEN, M. D., WAGES, D. P. Necrotic enteritis. In: CALNEK, B. W. (Ed.). **Diseases of poultry**. 10. ed. Iowa: Mosby-Wolfe, 1997.

FISHER, D. J.; FERNANDEZ-MIYAKAWA, M. E.; SAYEED, S.; POON, R.; ADAMS, V.; ROOD, J. I.; UZAL, F. A.; McCLANE, B. A. Dissecting the contributions of *Clostridium perfringens* type C toxins to lethality in the mouse intravenous injection model. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 5200-5210, 2006.

FLORES-DÍAZ, M.; ALAPE-GIRÓN, A.; TITBALL, R.; MOOS, M.; GUILLOUARD, I.; COLE, S.; HOWELLS, A. M.; VON EICHEL-STREIBER, C.; FLORIN, I.; THELESTAM, M. UDP-glucose Deficiency Causes Hypersensitivity to the Cytotoxic Effect of *Clostridium perfringens* Phospholipase C. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 24433-24438, 1998.

FLORES-DÍAZ, M.; ALAPE-GIRÓN, A.; CLARK, G.; CATIMEL, B.;HIRABAYASHI, Y.; NICE, E.; GUTIÉRREZ, J. M.; TITBALL, R.;THELESTAM, M. A Cellular Deficiency of Gangliosides Causes Hypersensitivity to *Clostridium perfringens* Phospholipase C. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 26680-26689, 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. US FDA takes steps to reduce use of antibiotic growth promoters. **Vet. Rec.**, v. 170, p. 404, 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry. The Judicious Use of Medically Important Antimicrobial Drugs in Food-Producing Animals**. USA. 2012

FOSSUM, O.; SANDSTEDT, K.; ENGSTRÖM, B. E. Gizzard erosions as a cause of mortality in White Leghorn chickens. **Avian Pathol.**, v. 17, p. 519-525, 1988.

FRASER A. G. Neuraminidase production by *Clostridia*. **J. Med. Microbiol.**, v. 11, p. 269-280, 1978.

GADBOIS, P.; BRENNAN, J. J.; BRUCE, L.; WILSON, J. B.; ARAMINI, J. J. The role of penicillin G potassium in managing *Clostridium perfringens* in broiler chickens. **Avian Dis.**, v. 52, p. 407-411, 2008.

GARRITY, G. M.; LILBURN, T. G.; COLE, J. R.; HARRISON, S. H.; EUZÉBY, J.; TITDALL, B. J. **Taxonomic outline of the bacteria and Archaea**. Michigan State University Board of Trustees, 2007.

GAUDIER, E.; JARRY, A.; BLOTTIÈRE, H. M.; DE COPPET, P.; BUISINE, M. P.; AUBERT, J. P.; LABOISSE, C.; CHERBUT, C.; HOEBLER, C. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 287, p. G1168-1174, 2004.

GAZDZINSKI, P.; JULIAN, R. J. Necrotic enteritis in turkeys. **Avian Dis.**, v. 36, p. 792-798, 1992.

GHARAIBEH, S.; AL RIFAI, R.; AL-MAJALI, A. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from broiler chickens. **Anaerobe**, v. 16, p. 586-589, 2010.

GHOLAMIANDEKHORDI, A. R.; DUCATELLE, R.; HEYNDRICKX, M.; HAESBROUCK, F.; VAN IMMERSEEL, F. Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. **Vet Microbiol.**, v. 113, p. 143-152, 2006.

GHOLAMIANDEKHORDI, A.; EECKHAUT, V.; LANCKRIET, A.; TIMBERMONT, L.; BJERRUM, L.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F.; VAN IMMERSEEL, F. Antimicrobial resistance in *Clostridium perfringens* isolates from broilers in Belgium. **Vet. Res. Commun.**, v. 33, p. 1031-1037, 2009.

GIBERT, M.; JOLIVET-RENAUD, C.; POPOFF, M. R. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. **Gene**, v. 203, p. 65-73, 1997.

GILCHRIST, M. J.; GREKO, C.; WALLINGA, D. B.; BERAN, G. W.; RILEY, D. G.; THORNE, P. S. The potential role of concentrated animal feeding operations in infectious disease epidemics and antibiotic resistance. **Environ. Health Perspect.**, v. 115, p. 313-316, 2007.

GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 8, p. 591-606, 2008.

GODDARD, P.; FERNANDEZ, F.; WEST, B.; HILL, M. J.; BARNES, P. The nuclear dehydrogenation of steroids by intestinal bacteria. **J. Med. Microbiol.**, v. 8, p. 429-435, 1975.

GOLDER, H. M.; GEIER, M. S.; FORDER, R. E. A.; HYND, P. I.; HUGHES, R. J. Effects of necrotic enteritis challenge on intestinal micro-architecture and mucin profile. **Br. Poult. Sci.**, v. 52, p. 500-506, 2011.

GONG, J.; SI, W.; FORSTER, R.; HUANG, R.; YU, H.; YIN, Y.; YANG, C.; HAN, Y. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 59, p. 147-157, 2007.

GONG, J.; YU, H.; LIU, T.; GILL, J. J.; CHAMBERS, J. R.; WHEATCROFT, R.; SABOUR, P. M. Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens. **J. Appl. Microbiol.**, v. 104, p. 1372-1382, 2008.

GOÑI, F. M.; MONTES, L. R.; ALONSO, A. Phospholipases C and sphingomyelinases: Lipids as substrates and modulators of enzyme activity. **Prog. Lipid. Res.**, v. 51, p. 238-266, 2012.

GRAVE, K.; KALDHUSDAL, M. C.; KRUSE, H.; HARR, L. M.; FLATLANDSMO, K. What has happened in Norway after the ban of avoparcin? Consumption of antimicrobials by poultry. **Prev. Vet. Med.**, v. 62, p. 59-72, 2004.

GRAVE, K.; JENSEN, V. F.; ODENSVIK, K.; WIERUP, M.; BANGEN, M. Usage of veterinary therapeutic antimicrobials in Denmark, Norway and Sweden following termination of antimicrobial growth promoter use. **Prev. Vet. Med.**, v. 75, p. 123-132, 2006.

GREGG, K.; FINN, R.; ABBOTT, D.; BORASTON, A. Divergent of glycan recognition by a new family of carbohydrate-binding modules. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 12604-12613, 2008.
GUTTENBERG, G.; HORNEI, S.; JANK, T.; SCHWAN, C.; LÜ, W.; EINSLE, O.; PAPTAEODOROU, P.; AKTORIES, K. Molecular Characteristics of *Clostridium perfringens* TpeL Toxin and Consequences of Mono-O-GlcNAcylation of Ras in Living Cells. **J. Biol. Chem.**, v. 287, p. 24929-24940, 2012.

HATHEWAY, C. Toxigenic Clostridia. **Clin. Microb. Rev.**, v. 3, p. 66-98, 1990.

HEIKINHEIMO, A.; KORKEALA, H. Multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium perfringens* isolates obtained from Finnish broiler chickens. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 40, p. 407-411, 2005.

HERHOLZ, C.; MISEREZ, R.; NICOLET, J.; FREY, J.; POPOFF, M.; GIBERT, M.; GERBER, H.; STRAUB, R. Prevalence of β 2-Toxigenic *Clostridium perfringens* in Horses with Intestinal Disorders. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 358-361, 1999.

HIBBERD, M. C.; NEUMANN, A. P.; REHBERGER, T. G.; SIRAGUSA, G. R. Multilocus sequence typing subtypes of poultry *Clostridium perfringens* isolates demonstrate disease niche partitioning. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, p. 1556-1567, 2011.

HOLDEMAN, L. V.; CATO, E. P.; MOORE, W. E. **Anaerobic laboratory manual**. 4. ed. Blackburg, VA: Virginia Polytechnic Institute, 1977.

JEPSON, M.; BULLIFENT, H. L.; CRANE, D.; FLORES-DIAZ, M.; ALAPE-GIRON, A.; JAYASEKEERA, P.; LINGARD, B.; MOSS, D.; TITBALL, R. W. Tyrosine 331 and phenylalanine 334 in *Clostridium perfringens* α -toxin are essential for cytotoxic activity. **FEBS Lett.**, v. 495, p. 172-177, 2001.

JIANG, Y.; KULKARNI, R. R.; PARREIRA, V. R.; PRESCOTT, J. F. Immunization of broiler chickens against *Clostridium perfringens* induced necrotic enteritis using purified recombinant immunogenic proteins. **Avian Dis.**, v. 53, p. 409-415, 2009.

JOHANSSON, A.; GREKO, C.; ENGSTRÖM, B. E.; KARLSSON, M. Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. **Vet. Microbiol.**, v. 99, p. 251-257, 2004.

JOHNSON, C.; PINEDO, C. Gizzard erosion and ulceration in Peru broilers. **Avian Dis.**, v. 15, p. 835-837, 1971.

JOHNSON, J. L.; FRANCIS, B. Taxonomy of the Clostridia: Ribosomal Ribonucleic Acid Homologies among the Species. **J. Gen. Microbiol.**, v. 88, p. 229-244, 1975.

JORDAN, F. T. W. Clostridia. In: JORDAN, F. T. W.; PATTISON, M. (Ed.). **Poultry diseases**. 4th ed. London: W. B. Saunders Co, 1996.

JOST, B. H.; TRINH, H. T.; SONGER, J. G. Clonal relationships among *Clostridium perfringens* of porcine origin as determined by multilocus sequence typing. **Vet. Microbiol.**, v. 116, p. 158-165, 2006.

KALDHUSDAL, M.; HOFSHAGEN, M.; LØVLAND, A.; LANGSTRAND, H.; REDHEAD, K. Necrotic enteritis challenge models with broiler chickens raised on litter: evaluation of preconditions, *Clostridium perfringens* strains and outcome variables. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 24, p. 337-343, 1999.

KALDHUSDAL, M. I.; LOVLAND, A. Necrotic enteritis (4): the economical impact of *Clostridium perfringens* is greater than anticipated. **World Poult.**, v. 16, p. 50-51, 2000.

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, p. 149-156, 2001.

KATHER, E. J.; MARKS, S. L.; FOLEY, J. E. Determination of the prevalence of antimicrobial resistance genes in canine *Clostridium perfringens* isolates. **Vet. Microbiol.**, v. 113, p. 97-101, 2006.

KEYBURN, A. L.; SHEEDY, S. A.; FORD, M. E.; WILLIAMSON, M. M.; AWAD, M. M.; ROOD, J. I.; MOORE, R. J. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 6496-6500, 2006.

KEYBURN, A. L.; BOYCE, J. D.; VAZ, P.; BANNAM, T. L.; FORD, M. E.; PARKER, D.; DI RUBBO, A.; ROOD, J. I.; MOORE, R. J. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. **PLoS Pathogens**, v. 4, p. 1-11, 2008.

KOHLER, B.; MARX, G.; KOLBACH, S.; BOTTCHE, E. Untersuchungen zur nekrotischen enteritis der hühner 1. Mitt.: Diagnostik und bekämpfung. **Monatsh Veterinaarmed**, v. 29, p. 380-384, 1974.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 5. ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 2004.

KULKARNI, R. R.; PARREIRA, V. R.; SHARIF, S.; PRESCOTT, J. F. Immunization of broiler chickens against *Clostridium perfringens* induced necrotic enteritis. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, p. 1070-1077, 2007.

LANCKRIET, A.; TIMBERMONT, L.; EECKHAUT, V.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. Variable protection after vaccination of broiler chickens against necrotic enteritis using supernatants of different *Clostridium perfringens* strains. **Vaccine**, v. 28, p. 5920-5923, 2010.

LAWHON, S. D.; TAYLOR, A.; FAJT, V. R. Frequency of resistance in obligate anaerobic bacteria isolated from dogs, cats, and horses to antimicrobial agents. **J. Clin. Microbiol.**, v. 51, p. 3804-3810, 2013.

LEE, K.; LILLEHOJ, H. S.; LI, G.; PARK, M. S.; JANG, S. I.; JEONG, W.; JEOUNG, H. Y.; AN, D. J.; LILLEHOJ, E. P. Identification and cloning of two immunogenic *Clostridium perfringens* proteins, elongation factor Tu (EF-Tu) and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) of *C. perfringens*. **Res. Vet. Sci.**, v. 91, p. e80-86, 2011.

LEPP, D.; ROXAS, B.; PARREIRA, V. R.; MARRI, P. R.; ROSEY, E. L.; GONG, J.; SONGER, J. G.; VEDANTAM, G.; PRESCOTT, J. F. Identification of novel pathogenicity loci in *Clostridium perfringens* strains that cause avian necrotic enteritis. **PLoS One**, v. 5, p. e10795, 2010.

- LEPP, D.; GONG, J.; SONGER, J. G.; BOERLIN, P.; PARREIRA, V. R.; PRESCOTT, J. F. Identification of Accessory Genome Regions in Poultry *Clostridium perfringens* Isolates Carrying the *netB* Plasmid. **J. Bacteriol.**, v. 195, p. 1152-1166, 2013.
- LEV, M.; BRIGGS, C. A. E. The gut flora of the chick. I. The flora of newly hatched chicks. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 19, p. 36-38, 1956.
- LI, J.; SAYEED, S.; ROBERTSON, S.; CHEN, J.; McCLANE, B. A. Sialidases Affect the Host Cell Adherence and Epsilon Toxin-Induced Cytotoxicity of *Clostridium perfringens* Type D Strain CN3718. **PLoS Pathog.**, v. 7, p. e1002429, 2011.
- LONG, J. R.; Necrotic enteritis in broiler chickens. I. A review of the literature and the prevalence of the disease in Ontario. **Can. J. Comp. Med.**, v. 37, p. 302-308, 1973.
- LONG, J. R.; PETTIT, J. R.; BARNUM, D. A. Necrotic enteritis chickens. II. Pathology and proposed pathogenesis. **Can. J. Comp. Med.**, v. 38, p. 467-474, 1974.
- LONG, J. R.; TRUSCOTT, R. Necrotic enteritis in broiler chickens. III. Reproduction of the disease. **Can. J. Comp. Med.**, v. 40, p. 53-59, 1976.
- LOVLAND, A.; KALDHUSDAL, M. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens* -associated hepatitis. **Avian Pathol.**, v. 30, p. 73-81, 2001.
- LOVLAND, A.; KALDHUSDAL, M. Liver lesions seen at slaughter as the indicator of necrotic enteritis in broilers flocks. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 24, p. 345-351, 2001b.
- MARKS, S. L.; RANKIN, S. C.; BYRNE, B. A.; WEESE, J. S. Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 25, p. 1195-1208, 2011.
- MARTEL, A.; DEVRIESE, L. A.; CAUWERTS, K.; DE GUSSEN, K.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F. Susceptibility of *Clostridium perfringens* to antibiotic and anticoccidials. **Avian Pathol.**, v. 33, p. 3-7, 2004.
- MARTIN, T. G.; SMYTH, J. A. Prevalence of *netB* among some clinical isolates of *Clostridium perfringens* from animals in the United States. **Vet. Microbiol.**, v. 136, p. 202-205, 2009.
- MARTINEZ, F. A.; BALCIUNAS, E. M.; CONVERTI, A.; COTTER, P. D.; de SOUZA OLIVEIRA, R. P. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. **Biotechnol. Adv.**, v. 4, p. 482-488, 2013.
- MATSUSHITA, O.; YOSHIHARA, K.; KATAYAMA, S. I.; MINAMI, J.; OKABE, A. Purification and Characterization of a *Clostridium perfringens* 120-Kilodalton Collagenase and Nucleotide Sequence of the Corresponding Gene. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 149-156, 1994.
- MATSUSHITA, C.; MATSUSHITA, O.; KATAYAMA, S.; MINAMI, J.; TAKAI, K.; OKABE, A. An upstream activating sequence containing curved DNA involved in activation of the *Clostridium perfringens* *plc* promoter. **Microbiology**, v. 142, p. 2561-2566, 1996.
- MATSUSHITA, O.; JUNG, C. M.; KATAYAMA, S. I.; MINAMI, J.; TAKAHASHI, Y.; OKABE, A. Gene Duplication and Multiplicity of Collagenases in *Clostridium histolyticum*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 923-933, 1999.

McCLANE, B. A.; McDONEL, J. L. The effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin on morphology, viability, and macromolecular synthesis in Vero cells. **J. Cell Physiol.**, v. 99, p. 191-200, 1979.

McCLANE, B. A. *Clostridium perfringens* type C isolates rapidly upregulate their toxin production upon contact with host cells. New insights into virulence?. **Virulence**, v. 1-2, p. 97-100, 2010.

McCOURT, M. T.; FINLAY, D. A.; LAIRD, C.; SMYTH, J. A.; BELL, C.; BALL, H. J. Sandwich ELISA detection of *Clostridium perfringens* cells and α -toxin from field cases of necrotic enteritis of poultry. **Vet. Microbiol.**, v. 106, p. 259-264, 2005.

McGUICKIN, M. A.; LINDÉN, S. K.; SUTTON, P.; FLORIN, T. H. Mucin dynamics and enteric pathogens. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 9, p. 265-278, 2011.

MEAD, G. C.; ADAMS, B. W. Some observations on the caecal microflora of the chick during the first two weeks of life. **Br. Poult. Sci.**, v. 16, p. 169-176, 1975.

MEAD, G. C. Microbes of the avian cecum: types present and substrates utilized. **J. Exp. Zool.**, v. 3, p. 48-54, 1989.

MORCH, J. Necrotic enteritis in broilers in Denmark. **Proc. XV World's Poult. Congr. Expos.**, p. 290-292, 1974.

MYERS, G. S.; RASKO, D. A.; CHEUNG, J. K.; RAVEL, J.; SESHADRI, R.; DEBOY, R. T.; REN, Q.; VARGA, J.; AWAD, M. M.; BRINKAC, L. M.; DAUGHERTY, S. C.; HAFT, D. H.; DODSON, R. J.; MADUPU, R.; NELSON, W. C.; ROSOVITZ, M. J.; SULLIVAN, S. A.; KHOURI, H.; DIMITROV, G. I.; WATKINS, K. L.; MULLIGAN, S.; BENTON, J.; RADUNE, D.; FISHER, D. J.; ATKINS, H. S.; HISCOX, T.; JOST, B. H.; BILLINGTON, S. J.; SONGER, J. G.; McCLANE, B. A.; TITBALL, R. W.; ROOD, J. I.; MELVILLE, S. B.; PAULSEN, I. T. Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. **Genome Res.** v. 16, p. 1031-1040, 2006.

NAGAHAMA, M.; OHKUBO, A.; ODA, M.; KOBAYASHI, K.; AMIMOTO, K.; MIYAMOTO, K.; SAKURAI, J. *Clostridium perfringens* TpeL Glycosylates the Rac and Ras Subfamily Proteins. **Infect. Immun.**, v. 79, p. 905-910, 2011.

NAIRN, M. E.; BAMFORD, V. W. Necrotic enteritis of broiler chickens in western Australia. **Aust. Vet. J.**, v. 43, p. 49-54, 1967.

NAKANO, V.; FONTES PIAZZA, R. M.; AVILA-CAMPOS, M. J. A rapid assay of the sialidase activity in species of the *Bacteroides fragilis* group by using peanut lectin hemagglutination. **Anaerobe**, v. 12, p. 238-241, 2006.

NAKANO, V.; PIAZZA, R. M.; CIANCARULLO, A. M.; BUERIS, V.; SANTOS, M. F.; MENEZES, M. A.; MENDES-LEDESMA, M.R.; SZULCZEWSKI, V.; ELIAS, W. P.; PUMBWE, L.; WEXLER, H.; AVILA-CAMPOS, M. J. Adherence and invasion of *Bacteroidales* isolated from the human intestinal tract. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 14, p. 955-963, 2008.

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, p. 257-266, 2003.

NAVANEETHAN, U.; GIANNELLA, R. A. Mechanisms of infectious diarrhea. **Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 5, p. 637-647, 2008.

NELSON, D.; COX, M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4. ed, USA. Ed. W. H. FREEMAN, 2005.

NI EWOLD, T. A. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. **Poultry Sci.**, v. 86, p. 605-609, 2007.

NI ILO, L. *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. **Can. Vet. J.**, v. 21, p. 141-148, 1980.

NOEL, K.; HOLT, J. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams e Wilkins, 2001.

O'BRIEN, D. K.; MELVILLE, S. B. The anaerobic pathogen *Clostridium perfringens* can escape the phagosome of macrophages under aerobic conditions. **Cell Microbiol.**, v. 2, p. 505-519, 2000.

ODOU, M. F.; MULLER C, CALVET, L.; DUBREUIL, L. In vitro activity against anaerobes of retapamulin, a new topical antibiotic for treatment of skin infections. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 59, p. 646-651, 2007.

OHTANI, K.; HAYASHI, H.; SHIMIZU, T. The *luxS* gene is involved in cell-cell signaling for toxin production in *Clostridium perfringens*. **Mol. Microbiol.**, v. 44, p. 171-179, 2002.

OHTANI, K.; KAWSAR, H. I.; OKUMURA, K.; HAYASHI, H.; SHIMIZU, T. The VirR/VirS regulatory cascade affects transcription of plasmid-encoded putative virulence genes in *Clostridium perfringens* strain 13. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 222, p. 137-141, 2003.

OLKOWSKI, A. A.; WOJNAROWICZ, C.; CHIRINO-TREJO, M.; DREW, M. D. Responses of broiler chickens orally challenged with *Clostridium perfringens* isolated from Field cases of necrotic enteritis. **Res. Vet. Sci.**, v. 81, p. 99-108, 2006.

PAREDES-SABJA, D.; SARKER, N.; SARKER, M. R. *Clostridium perfringens tpeL* is expressed during sporulation. **Microb. Pathog.**, v. 51, p. 384-388, 2011.

PARKER, C. T.; SPERANDIO, V. Cell-to-cell signalling during pathogenesis. **Cell. Microbiol.**, v. 11, p. 363-369, 2009.

PEDERSEN, K.; BJERRUM, L.; NAUERBY, B.; MADSEN, M. Experimental infections with rifampicin-resistant *Clostridium perfringens* strains in broiler chickens using isolator facilities. **Avian Pathol.**, v. 32, p. 403-411, 2003.

PERELLE, S.; GIBERT, M.; BOQUET, P.; POPOFF, M. R. Characterization of *Clostridium perfringens* iota-toxin genes and expression in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 5147-5156, 1993.

PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. **Trends Microbiol.**, v. 7, p. 104-110, 1999.

PLÜDDEMANN, A.; MUKHOPADHYAY, S.; GORDON, S. The interaction of macrophage receptors with bacterial ligands. **Expert. Rev. Mol. Med.**, v. 8, p. 1-25, 2006.

POPOFF, M. R.; DODIN, A. Survey of Neuraminidase Production by *Clostridium butyricum*, *Clostridium Beijerinckii*, and *Clostridium difficile* Strains from Clinical and Nonclinical Sources. **J. Clin. Microbiol.**, v. 22, p. 873-876, 1985.

POPOFF, M. R.; BOUVET, P. Genetic characteristics of Toxigenic Clostridia and toxin gene evolution. **Toxicon**, v. 75, p. 63-89, 2013.

PRUTEANU, M.; HYLAND, N. P.; CLARKE, D. J.; KIELY, B.; SHANAHAN, F. Degradation of the Extracellular Matrix Components by Bacterial-derived Metalloproteases: Implications for Inflammatory Bowel Diseases. **Inflamm. Bowel. Dis.**, v. 17, p. 1189-1200, 2011.

PRUTEANU, M.; SHANAHAN, F. Digestion of epithelial tight junction proteins by the commensal *Clostridium perfringens*. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 305, p. G740-748, 2013.

RAY, P. K.; SIMMONS, R. Comparative effect of viral and bacterial neuraminidase on the complement sensitivity of lymphoid cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 10, p. 139-150, 1972.

RHEE, S. J.; WALKER, W. A.; CHERAYIL, B. J. Developmentally regulated intestinal expression of IFN-gamma and its target genes and the age-specific response to enteric *Salmonella* infection. **J. Immunol.**, v. 175, p. 1127-1136, 2005.

RICHARD, J. F.; PETIT, L.; GIBERT, M.; MARVAUD, J. C.; BOUCHAUD, C.; POPOFF, M. R. Bacterial toxins modifying the actin cytoskeleton. **Int. Microbiol.**, v. 2, p. 185-194, 1999.

RILEY, M. A. Molecular mechanisms of Bacteriocin evolution. **Annu. Rev. Genet.**, v. 32, p. 255-278, 1998.

RINKINEN, M.; JALAVA, K.; WESTERMARCK, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization?. **Vet. Microbiol.**, v. 92, p. 111-119, 2003.

ROBERTS, S. A.; SHORE, K. P.; PAVIOUR, S. D.; HOLLAND, D.; MORRIS, A. J. Antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in New Zealand: 1999-2003. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 57, p. 992-998, 2006.

ROGGENTIN, P.; KLEINEIDAM, R. G.; SCHAUER, R. Diversity in the properties of two sialidase isoenzymes produced by *Clostridium perfringens* spp. **Biol. Chem. Hoppe Seyler**, v. 376, p. 569-575, 1995.

ROOD, J.; COLE, S. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. **Microbiol. Rev.**, v. 55, p. 621-648, 1991.

ROOD, J. I.; McCLANE, B. A.; SONGER, J. G.; TITBALL, R. W. **The clostridia: molecular biology and pathogenesis**. San Diego, California: Academic Press, 1997.

ROOD, J. I. Virulence Genes of *Clostridium perfringens*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 52, p. 333-360, 1998.

ROONEY, A. P.; SWEZEY, J. L.; FRIEDMAN, R.; HECHT, D. W.; MADDOX, C. W. Analysis of core housekeeping and virulence genes reveals cryptic lineages of *Clostridium perfringens* that are associated with distinct disease presentations. **Genetics**, v. 172, p. 2081-2092, 2006.

ROSADIO, R.; LONDOÑE, P.; PÉREZ, D.; CASTILLO, H.; VÉLIZ, A.; LLANCO, L.; YAYA, K.; MATURRANO, L. *Eimeria macusaniensis* associated lesions in neonate alpacas dying from enterotoxemia. **Vet. Parasitol.**, v. 168, p. 116-120, 2010.

SAKURAI, J.; NAGAHAMA, M.; ODA, M. *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin: Characterization and Mode of Action. **J. Bio. Chem.**, v. 136, p. 569–574, 2004.

SALANITRO, J. P.; BLAKE, I. G.; MUIRHEAD, P. A.; MAGLIO, M.; GOODMAN, J. R. Bacteria Isolated from the Duodenum, Ileum, and Cecum of Young Chicks. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 35, p. 782-790, 1978.

SALYERS, A. A.; VERCELLOTTI, J. R.; WEST, S. E. H.; WILKINS, T. D. Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from human colon. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 33, p. 319-322, 1977a.

SALYERS, A. A.; WEST, S. E. H.; VERCELLOTTI, J. P.; WILKINS, T. D. Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 34, p. 529-533, 1977b.

SALYERS, A. A. Energy sources of major intestinal fermentative anaerobes. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 32, p. 158-163, 1979.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual. Book 1-3.** 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SASAKI, J.; GORYO, M.; OKADA, K. Cholangiohepatitis in chickens induced by bile duct ligations and inoculation of *Clostridium perfringens*. **Avian Pathol.**, v. 29, p. 405-410, 2000.

SAVAGE, D. C. Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. **Ann. Rev. Nutr.**, v. 6, p. 155-178, 1986.

SAWIRES, Y. S.; SONGER, J. G. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for strain typing of *Clostridium perfringens*. **Anaerobe**, v. 11, p. 262-272, 2005.

SAWIRES, S. Y.; SONGER, J. G. *Clostridium perfringens*: Insight into virulence evolution and population structure. **Anaerobe**, v. 12, p. 23-43, 2006.

SAYEED, S.; FERNANDEZ-MIYAKAWA, M. E.; FISHER, D. J.; ADAMS, V.; POON, R.; ROOD, J. I.; UZAL, F. A.; McCLANE, B. A. Epsilon-toxin is required for most *Clostridium perfringens* type D vegetative culture supernatants to cause lethality in the mouse intravenous injection model. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 7413-7421, 2005.

SCHAEGLER, R.; DUBOS, R.; COSTELLO, R. Association of germfree mice with bacteria isolated from normal mice. **J. Exp. Med.**, v. 122, p. 77-82, 1965.

SCHAUER, R. Sialic acids and their role as biological masks. **Trends Biochem. Sci.**, v. 10, p. 357-360, 1985.

SCHAUER, R. Achievements and challenges of sialic acid research. **Glycoconj. J.**, v. 17, p. 485-499, 2000.

SCHENTAG, J. J.; GILLILAND, K. K.; PALADINO, J. A. What have we learned from pharmacokinetic and pharmacodynamic theories? **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. S39-46, 2001.

SCHOEPE, H.; NEUBAUER, A.; SCHLAPP, T.; WIELER, L. H.; BALJER, G. Immunization with an alpha toxin variant 121A/91-R212H protects mice against *Clostridium perfringens* alpha toxin. **Anaerobe**, v. 12, p. 44-48, 2006.

- SCHWARTZMAN, J. D.; RELLER, L. B.; WANG, W. L. Susceptibility of *Clostridium perfringens* isolated from human infections to twenty antibiotics. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 11, p. 695-697, 1977.
- SENGUPTA, N.; ALAM, S. I.; KUMAR, R. B.; SINGH, L. Diversity and antibiotic susceptibility pattern of cultivable anaerobic bacteria from soil and sewage samples of India. **Infect. Genet. Evol.**, v. 11, p. 64-77, 2011.
- SEVERI, E.; HOOD, D. W.; THOMAS, G. H. Sialic acid utilization by bacterial pathogens. **Microbiology**, v. 153, p. 2817-2822, 2007.
- SHANE, S. M.; KOETTING, D. G.; HARRINGTON, K. S. The occurrence of *Clostridium perfringens* in the intestine of chicks. **Avian Dis.**, v. 28, p. 1120-1124, 1984.
- SHEEDY, S. A.; INGHAM, A. B.; ROOD, J. I.; MOORE, R. J. Highly conserved alpha-toxin sequences of avian isolates of *Clostridium perfringens*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1345-1347, 2004.
- SHEU, S. Y.; TSENG, H. J.; HUANG, S. P.; CHIEN, C. H. Cloning, expression, and deletion analysis of large *nanH* of *Clostridium perfringens* ATCC 10543. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 31, p. 794-803, 2002.
- SHIMIZU, T.; OHSHIMA, S.; OHTANI, K.; HOSHINO, K.; HONJO, K.; HAYASHI, H.; SHIMIZU, T. Sequence heterogeneity of the ten rRNA operons in *Clostridium perfringens*. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 24, p. 149-156, 2001.
- SHIMIZU, T.; OHTANI, K.; HIRAKAWA, H.; OHSHIMA, K.; YAMASHITA, A.; SHIBA, T.; OGASAWARA, N.; HATTORI, M.; KUHARA, S.; HAYASHI, H. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 99, p. 996-1001, 2002a.
- SHIMIZU, T.; SHIMA, K.; YOSHINO, K. I.; YONEZAWA, K.; SHIMIZU, T.; HAYASHI, H. Proteome and Transcriptome Analysis of the Virulence Genes Regulated by the VirR/VirS System in *Clostridium perfringens*. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 2587-2594, 2002b.
- SHOJADOOST, B.; VINCE, A. R.; PRESCOTT, J. F. The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review. **Vet. Res.**, v. 43, p. 74, 2012.
- SI, W.; GONG, J.; HAN, Y.; YU, H.; BRENNAN, J.; ZHOU, H.; CHEN, S. Quantification of Cell Proliferation and Alpha-Toxin Gene Expression Of *Clostridium perfringens* in the Development of Necrotic Enteritis in Broiler Chickens. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 7110-7113, 2007.
- SILVA, R. O. S.; SALVARANI, F. M.; ASSIS, R. A.; MARTINS, N. R. S.; PIRES, P. S.; LOBATO, F. C. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* strains isolated from broiler chickens. **Braz. J. Microbiol.**, v. 40, p. 262-264, 2009.
- SINGER, R.; HOFACRE, C. Potential Impacts of Antibiotic Use in Poultry Production. **Avian Dis.**, v. 50, p. 161-172, 2006.
- SKLAN, D.; SHACHAF, B.; BARON, J.; HURWITZ, S. Retrograde Movement of Digesta in the Duodenum of the Chick: Extent, Frequency, and Nutritional Implications. **J. Nutr.**, v. 108, p. 1485-1490, 1978.

- SLAVIĆ, D.; BOERLIN, P.; FABRI, M.; KLOTINS, K.C.; ZOETHOUT, J. K.; WEIR, P. E.; BATEMAN, D. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. **Can. J. Vet. Res.**, v. 75, p. 89-97, 2011.
- SMEDLEY, J. G.; FISHER, D. J.; SAYEED, S.; CHAKRABARTI, G.; McCLANE, B. A. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.**, v. 152, p. 183-204, 2004.
- SONGER, J. G. Clostridial Enteric Diseases of Domestic Animals. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 9, p. 216-234, 1996.
- STACKEBRANDT, E.; KRAMER, I.; SWIDERSKI, J.; HIPPE, H. Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 24, p. 253-258, 1999.
- STANLEY, D.; KEYBURN, A. L.; DENMAN, S. E.; MOORE, R. J. Changes in the caecal Microflora of chickens following *Clostridium perfringens* challenge to induce necrotic enteritis. **Vet. Microbiol.**, v. 159, p. 155-162, 2012.
- STARR, M.; REYNOLDS, D. Streptomycin Resistance of coliform Bacteria from Turkeys Fed Streptomycin. **Am. J. Public Health**, v. 41, p. 1375-1380, 1951.
- STEVENS, D. L.; MITTEN, J. E.; HENRY, C. Effects of α and θ toxins from *Clostridium perfringens* on human polymorphonuclear leukocytes. **J. Infect. Dis.**, v. 156, p. 324-333, 1987.
- STEVENS, D. L.; TROYER, B. E.; MERRICK, D. T.; MITTEN, J. E.; OLSON, R. D. Lethal effects and cardiovascular effects of purified α and θ toxins from *Clostridium perfringens*. **J. Infect. Dis.**, v. 157, p. 272-279, 1988.
- STEVENS, D. L.; BRYANT, A. E. Pathogenesis of *Clostridium perfringens* infection: mechanisms and mediators of shock. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. S160-164, 1997.
- STRONG, D. H.; DUNCAN, C. L.; PERNA, G. *Clostridium perfringens* Type A Food Poisoning II. Response of the Rabbit Ileum as na Indication of Enteropathogenicity of Strains of *Clostridium perfringens* in Human Beings. **Infect. Immun.**, v. 3, p. 171-178, 1971.
- STUTZ, M. W.; LAWTON, G. C. Effects of diet and antimicrobials on growth, feed efficiency, intestinal *Clostridium perfringens*, and ileal weight of broiler chicks. **Poult. Sci.**, v. 63, p. 2036-2042, 1984.
- SUERBAUM, S.; JOSEPHANS, C. Helicobacter pylori evolution and phenotypic diversification in a changing host. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, p. 441-452, 2007.
- TANSUPHASIRI, U.; MATRA, W.; SANGSUK, L. Antimicrobial resistance among *Clostridium perfringens* isolated from various sources in Thailand. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 36, p. 954-961, 2005.
- THACHIL, A. J.; MCCOMB, B.; ANDERSEN, M.; SHAW, D.; HALVORSON, D.; NAGARAJA, K. Role of *Clostridium perfringens* and *Clostridium septicum* in Causing Turkey Cellulitis. **Avian Dis.**, v. 54, p. 795-801, 2010.
- TIMBERMONT, L.; LANCKRIET, A.; PASMANS, F.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. Intra-species growth-inhibition by *Clostridium perfringens* is a possible virulence trait in necrotic enteritis in broilers. **Vet. Microbiol.**, v. 137, p. 388-391, 2009.

TIMBERMONT, L.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. **Avian Pathol.**, v. 40, p. 341-347, 2011.

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, p. 25-34, 2006.

TITBALL, R. W. Bacterial phospholipases C. **Microbiol. Rev.**, v. 57, p. 347-366, 1993.

TITBALL, R. W.; NAYLOR, C. E.; BASAK, A. K. The *Clostridium perfringens* α -toxin. **Anaerobe**, v. 5, p. 51-64, 1999.

TSAI, S. S.; TUNG, M. C. An outbreak of necrotic enteritis in broiler chickens. **J. Chin. Soc. Vet. Sci.**, v. 7, p. 13-17, 1981.

TSURUMURA, T.; TSUMORI, Y.; QIU, H.; ODA, M.; SAKURAI, J.; NAGAHAMA, M.; TSUGE, H. Arginine ADP-ribosylation mechanism based on structural snapshots of iota-toxin and actin complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 110, p. 4267-4272, 2013.

TYRRELL, K. L.; CITRON, D. M.; WARREN, Y. A.; FERNANDEZ, H. T.; MERRIAM, C. V.; GOLDSTEIN, E. J. In vitro activities of daptomycin, vancomycin, and penicillin against *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *Finnegoldia magna*, and *Propionibacterium acnes*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, p. 2728-2731, 2006.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; PASMANS, F.; HUYGHEBAERT, G.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian Pathol.**, v. 33, p. 537-549, 2004.

VAN IMMERSEEL, F.; ROOD, J. I.; MOORE, R. J.; TITBALL, R. W. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. **Trends Microbiol.**, v. 17, p. 32-36, 2009.

VARGA, J. J.; THERIT, B.; MELVILLE, S. B. Type IV pili and the CcpA protein are needed for maximal biofilm formation by the Gram-positive anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 4944-4951, 2008.

VIDAL, J.; CHEN, J.; LI, J.; McCLANE, B. Use of an EZ-Tn 5 -Based Random Mutagenesis System to Identify a Novel Toxin Regulatory Locus in *Clostridium perfringens* Strain 13. **PLoS ONE**, v. 4, p. e 6232, 2009a.

VIDAL, J. E.; OHTANI, K.; SHIMIZU, T.; McCLANE, B. A. Contact with enterocyte-like Caco-2 cells induces rapid upregulation of toxin production by *Clostridium perfringens* type C isolates. **Cell Microbiol.**, v. 11, p. 1306-1328, 2009b.

VIDAL, J. E.; MA, M.; SAPUTO, J.; GARCIA, J.; UZAL, F. A.; McCLANE, B. A. Evidence that the Agr-like quorum sensing system regulates the toxin production, cytotoxicity and pathogenicity of *Clostridium perfringens* type C isolate CN3685. **Mol. Microbiol.**, v. 83, p. 179-194, 2012.

VIMR, E. R.; KALIVODA, K. A.; DESZO, E. L.; STEENBERGEN, S. M. Diversity of Microbial Sialic Acid Metabolism. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, p. 132-153, 2004.

- WALTERS, D. M.; STIREWALT, V. L.; MELVILLE, S. B. Cloning, Sequence, and Transcriptional Regulation of the Operon Encoding a Putative N-Acetylmannosamine-6-Phosphate Epimerase (*nanE*) and Sialic Acid Lyase (*nanA*) in *Clostridium perfringens*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 4526-4532, 1999.
- WATKINS, K. L.; SHRYOCK, T.; DEARTH, R.; SAIF, Y. In vitro antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. **Vet. Microbiol.**, v. 54, p. 195-200, 1997.
- WEN, Q.; McCLANE, B. A. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 2685-2691, 2004.
- WICKHAM, N. The production and inhibition of the haemagglutinin of *Clostridium welchii*. **J. Comp. Path.**, v. 66, p. 62-70, 1956.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- WILLIAMS, R. B. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. **Avian Pathol.**, v. 34, p. 159-180, 2005.
- WILLIAMSON, R. Resistance of *Clostridium perfringens* to β -Lactam Antibiotics Mediated by a Decreased Affinity of a Single Essential Penicillin-binding Protein. **J. Gen. Microbiol.**, v. 129, p. 2339-2342, 1983.
- WILSON, J.; TICE, G.; BRASH, M.; HILAIRE, S. Manifestations of *Clostridium perfringens* and related bacterial enteritides in broiler chickens. **World's Poult. Sci. J.**, v. 61, p. 435-448, 2005.
- WITTE, W. Selective pressure by antibiotic use in livestock. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 16, p. S19-24, 2000.
- WRIGLEY, D. M. Inhibition of *Clostridium perfringens* sporulation by *Bacteroides fragilis* and short-chain fatty acids. **Anaerobe**, v. 10, p. 295-300, 2004.
- YOO, H. S.; LEE, S. U.; PARK, K. Y.; PARK, Y. H. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 228-232, 1997.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Características gerais das amostras clínicas analisadas

Amostra	Origem	Informação zootécnica	Sinais clínicos	Idade
2	RJ	Sem dados.	Diarreia profusa.	Diversas idades.
4	Pará	Mortalidade de 4%, refugagem 20%. Tratamento desde 24-28 d.	Alta mortalidade desde 18 d. Diarreia leve aquosa esverdeada, com má absorção e ronqueira. Enterite leve duodenite, colibacilose e início de ascite.	29 d.
5	PR	Sem dados.	Baixo desempenho. Diarreia aquosa e branca. Coccidiose Máxima +1. Começou no dia 35.	38 d.
7	PR	Sem dados.	Baixo desempenho. Enterite leve. Diarreia aquosa, branca e sanguinolenta. Começou no dia 38.	58-41 d
8	PR	Morbilidade 10%, refugagem 10 %.	Refugagem. Baixo desempenho. Mortalidade normal, diarreia leve, refugando. Uratos, lesões musculares, com nefrite.	Desde 34 -42 d.
9	PR	Sem dados.	Baixo desempenho. Refugagem. Diarreia leve.	Desde 35 d.
10	PR	Sem dados.	Baixo desempenho. Problema respiratório. Refugagem. Diarreia leve.	35-38 d.
16	PR	Morbilidade 10%. O normal é 0.2 %.	Baixa produção e refugagem. Má aparência, penas quebradiças, caídas e embaixo do ninho. Postura abdominal, hemorragia. Fezes aquosas e brancas.	35-40 d.
17	DF	Sem dados.	Enterite, baixa produção, desempenho e uniformidade. Enterite, petequias, baixa espessura da mucosa. Conteúdo entérico hemorrágico e líquido.	35 d.
22	SP	Tratamento nicarbazina com Monteban até dia 21. Salinomicina até dia 40.	Desuniforme desde dia 3, baixa frequência cardiorrespiratória. Mortalidade inicial. Enterite e refugagem.	36 d.
28	SP	2 % de baixa na produção. Mortalidade 0.4 %. Morbidade 10 %. Refugagem 2%.	Desde as 3ª. Semana. Aparência de lote velho. Diarreia aquosa, branca. Enterite. Postura abdominal.	57 sem.
35	RS	Mortalidade menor a 5 %.10 ao dia (1200 total)	Desde dia 4. Refugagem, alta mortalidade aves sonolentas. Diarreia forte, sanguinolenta e aquosa, fezes empastadas na cloaca. Arrasamento vilosidades intestinais (translúcido). Não parece infecção. Síndrome má absorção.	20 d.

37	RS	Morreram 800 /14.000	Desde os 3 dias. Mortalidade, refugagem. Amontoados, diarreia sanguinolenta aquosa.	5 d.
38	PR	Baixa de 5 % na produção e 3% na eclosão. Mortalidade de 0.3 %. Tratamento enrofloxacino.	Diarreia branca, leve. Enterite leve no final. Queda na produção e eclosão. Salpingite e nefrite às vezes.	37 sem.
40	CE / PR	Mortalidade 12 %. Morbilidade 60%.	Desde o dia 25. Enterite. Fezes brancas e aquosas.	45 d.
41	CE	Mortalidade 4%, morbilidade 40 %.	Desde o dia 12. Fezes brancas e aquosas. Enterite.	47 d.
42	SP	Sem dados.	Enterite.	Sem dados.
47	SP	Sem dados.	Ovos com casca deformada e desuniformes, cloaca suja. Fezes diarreicas.	22 d.
55	SP	Sem dados.	Enterite.	27 d.
60	RS	Mortalidade 0.1%.	Fezes aquosas marrons. Enterite. Problema respiratório. Começou na semana 2.	16 sem.
79	PR	Sem dados.	Enterite mucosa, cor laranja, congestão, hemorragia. A partir do dia 14.	41 d.
80	PR	Sem dados.	Enterite mucosa, cor laranja, congestão, hemorragia. A partir do dia 14.	41 d.
89	SC	Sem dados.	Baixa de peso e desuniformidade.	22 d.
95	SP	Sem dados.	Cama úmida e baixo desempenho. Nefrite leve.	35 d.
97	PR	Mortalidade 3%. Tratamento sulfaclopirizadina.	Anorexia, apatia, baixo peso, ciscando, desuniforme. Enterite. Presença do saco vitelino, aumento da área de cartilagem da articulação tibio-tarso-femural. Desde dia 4.	13 d.
98	PR	0.1 % Mortalidade	Enterite, anorexia, apatia, amontoados. Gases nos cecos. Intestinos com exudatos catarral no duodeno e jejuno. Proventrículo abaulado, peritônio aumentado.	7 d.
100	PR	0.1 % Mortalidade	Anorexia, apatia e desuniforme, enterite mucoide, glândulas salientes no proventrículo. Baixa irrigação sanguínea no intestino. Desde dia 4.	9 d.
101	PR	Sem dados.	Enterite mucoide, erosão da moela.	35 d.
103	PR	Mortalidade de 0.1 %.	Má absorção. Enterite.	33 d.
107	PR	Mortalidade de 0.1 %.	Passagem de ração. Mucosa intestinal laranjada.	38 d.

118	SP	Sem dados.	Desempenho ruim, baixo ganho de peso desde a semana 1. Desuniforme, pigmentação ruim (canela branca).	22 d.
144	SP	Mortalidade 1 % mais do esperado.	Diarreia aquosa com rim aumentado. Começou com 28 d.	44-48 d.
151	SP	Sem dados.	Fezes aquosas e enterite. Diurese.	<13 d.
154	SP	Sem dados.	Fezes aquosas e enterite. Diurese.	13-25 d.
162	SP	Sem dados.	Fezes aquosas e enterite. Diurese.	33-35 d.
163	SP	Sem dados.	Fezes aquosas e enterite. Diurese.	36 d.
164	SP	Sem dados.	Fezes aquosas e enterite. Diurese.	35-37 d.
166	SP	Sem dados.	Fezes aquosas e enterite. Diurese.	39 d.
173	SP	Sem dados.	Diarreia, passagem rápida de alimento, desuniformidade e refugagem. Fezes aquosas e pastosas, marrom e laranja.	36 d.
174	SP	Mortalidade 3.35%.	Diarreia marrom laranja, pastosa ou líquida, passagem rápida da ração. Refugagem.	43 d.
264-1	SC	Mortalidade 3%.	Diarreia, prostração, baixo consumo de água e ração, fezes sanguinolentas e fétidas. Claudicação.	8 sem.
264-2	SC	Mortalidade 3%.	Diarreia, prostração, baixo consumo de água e ração, fezes sanguinolentas e fétidas.	8 sem.
267-1	SC	Morbilidade 80%, refugagem 20%, Mortalidade baixa (normal).	Baixo consumo, diarreia, fezes líquidas esverdeadas, parede intestinal fina. Piando muito. Ceco com conteúdo aquoso/espumoso.	6-7 sem.
267-4	SC	Morbilidade 80%, refugagem 20%, mortalidade baixa (normal).	Mortalidade normal. Baixo consumo. Diarreia. Fezes esverdeadas e aquosas. Parede intestinal fina. Ceco com conteúdo aquoso/espumoso.	12 sem.
269-1	SC	Mortalidade: 35/7840.	Aves piando. Cama empastada, diarreia. Aves desidratadas, intestino de parede fina, conteúdo aquoso. Mortalidade crescente.	44 d.
269-3	SC	Mortalidade 2% (30 ao dia), Morbilidade 80%, refugagem 80 %.	Ração baixa, diarreia, corre sem parar, peso 30% abaixo. Parede intestinal fina, ceco com conteúdo espumoso/aquoso.	14 d.

269-4	SC	Mortalidade 2% (20 ao dia), morbidade 100%.	Aves piando intensamente, encorujadas, baixo consumo, diarreia, correm sem parar. Fezes brancas (sanguinolentas às vezes) e fétidas. Ceco com conteúdo aquoso/espumoso.	21 d.
273-1	SC	Morbidade 20%, Mortalidade 82/3450.	Fezes aquosas. Intestino distendido com as paredes afinadas. Diarreia.	119 d.
273-2	SC	Sem dados.	Fezes aquosas, fétidas. Intestino dilatado com fezes líquidas e descamação das paredes intestinais. Diarreia.	45 d.
273-3	SC	Mortalidade 1% (10 ao dia), Morbidade 90%, refugagem 80%.	Fezes aquosas, sanguinolentas e fétidas. Intestino distendido com as paredes afinadas. Conteúdo muco sanguinolento (às vezes). Diarreia moderada, refugagem, baixo consumo, piando, encorujadas. Ceco com conteúdo espumoso/aquoso.	26 d.
336-18	SC	Sem dados.	Crescimento baixo e não uniforme.	8 d.
354-2	SC	Mortalidade de 1.5 % aprox. refugagem 3%.	Desuniformidade excessiva, baixo consumo. Começou aos 11 d. Intestino normal.	15 d.
354-3	SC	Mortalidade de 1.5 % aprox. refugagem 4%.	Desuniformidade excessiva, baixo consumo. Começou aos 12 d. Intestino normal.	16 d.
354-4	SC	Mortalidade de 1.5 % aprox.	Desuniformidade excessiva, baixo consumo. Começou aos 11 d. Intestino normal.	13 d.
354-5	SC	Mortalidade de 1.5 % aprox.	Enterite leve, necrose de fígado. Alta desuniformidade. Início dia 14.	29 d.
354-6	SC	Mortalidade de 1.5 % aprox.	Enterite leve. Baixo consumo da ração. Alta desuniformidade.	29 d.
354-7	SC	Mortalidade de 1.5 % aproximadamente, surto anterior de clostridiose.	Enterite leve, fezes fétidas, marrom. Desidratado. Alta desuniformidade. Começou no dia 15.	29 d.
354-8	SC	Mortalidade de 1.5 % aprox.	Enterite leve, fezes fétidas, marrom, desidratado. Começou no dia 14. Alta desuniformidade.	30 d.
371-1	RS	Sem dados.	Alta refugagem.	Sem dados.
371-2	RS	Sem dados.	Alta refugagem.	Sem dados.
371-3	RS	Sem dados.	Alta refugagem.	Sem dados.
371-4	RS	Sem dados.	Alta refugagem.	Sem dados.
371-5	RS	Sem dados.	Alta refugagem.	Sem dados.

CF-1	MT	Necropsia. Intestino irritado, enterite. Sistema respiratório limpo.	Aves encorujadas, penas arrepiadas, algumas bem mórvidas e passagem de ração sem absorção.	29 d.
CF-2	MT	Necropsia. Intestino irritado, enterite. Sistema respiratório limpo	Aves encorujadas, penas arrepiadas, algumas bem mórvidas e passagem de ração sem absorção.	29 d.
CF-3	MT	Necropsia. Intestino irritado, enterite. Sistema respiratório limpo	Aves encorujadas, penas arrepiadas, algumas bem mórvidas e passagem de ração sem absorção.	29 d.
CF-4	MT	Necropsia. Intestino irritado, enterite. Sistema respiratório limpo	Aves encorujadas, penas arrepiadas, algumas bem mórvidas e passagem de ração sem absorção.	29 d.
CF-5	MT	Necropsia. Intestino irritado, enterite. Sistema respiratório limpo	Aves encorujadas, penas arrepiadas, algumas bem mórvidas e passagem de ração sem absorção.	29 d.
MLT-1	MT	Necropsia. Intestino irritado, enterite. Sistema respiratório limpo	Aves encorujadas, penas arrepiadas, algumas bem mórvidas e passagem de ração sem absorção.	42 d.
MLT-2	MT	Necropsia. Intestino irritado, enterite. Sistema respiratório limpo	Aves encorujadas, penas arrepiadas, algumas bem mórvidas e passagem de ração sem absorção.	42 d.
MLT-3	MT	Necropsia. Intestino irritado, enterite. Sistema respiratório limpo	Aves encorujadas, penas arrepiadas, algumas bem mórvidas e passagem de ração sem absorção.	42 d.
MLT-4	MT	Necropsia. Intestino irritado, enterite. Sistema respiratório limpo.	Aves encorujadas, penas arrepiadas, algumas bem mórvidas e passagem de ração sem absorção.	42 d.
MLT-5	MT	Necropsia. Intestino irritado, enterite. Sistema respiratório limpo.	Aves encorujadas, penas arrepiadas, algumas bem mórvidas e passagem de ração sem absorção.	42 d.
RR 1	SC	Necropsia. Perda de mucosa intestinal, intestino fino, fezes com bastante fluido, cecos com gás e enterite.	Aves apáticas, perda de desempenho, aumento da mortalidade, febre e diarreia líquida. Aparentemente normal.	33 d.
RR 2	SC	Necropsia. Perda de mucosa intestinal, intestino fino, fezes com bastante fluido, cecos com gás e enterite.	Aves apáticas, perda de desempenho, aumento da mortalidade, febre e diarreia líquida. Com gás, fezes líquidas sem hemorragia.	33 d.

RR 3	SC	Necropsia. Perda de mucosa intestinal, intestino fino, fezes com bastante fluido, cecos com gás e enterite.	Aves apáticas, perda de desempenho, aumento da mortalidade, febre e diarreia líquida.	33 d.
RR 4	SC	Necropsia. Perda de mucosa intestinal, intestino fino, fezes com bastante fluido, cecos com gás e enterite.	Aves apáticas, perda de desempenho, aumento da mortalidade, febre e diarreia líquida. Ceco hemorrágico.	33 d.
RR 5	SC	Necropsia. Perda de mucosa intestinal, intestino fino, fezes com bastante fluido, cecos com gás e enterite.	Aves apáticas, perda de desempenho, aumento da mortalidade, febre e diarreia líquida. Levemente hemorrágica.	33 d.
RR 6	SC	Necropsia. Perda de mucosa intestinal, intestino fino, fezes com bastante fluido, cecos com gás e enterite.	Aves apáticas, perda de desempenho, aumento da mortalidade, febre e diarreia líquida. Aparentemente normal. Diarreia.	33 d.
RR 7	SC	Necropsia. Perda de mucosa intestinal, intestino fino, fezes com bastante fluido, cecos com gás e enterite.	Aves apáticas, perda de desempenho, aumento da mortalidade, febre e diarreia líquida. Aparentemente normal. Fezes líquidas. Leve congestão.	33 d.
RR 8	SC	Necropsia. Perda de mucosa intestinal, intestino fino, fezes com bastante fluido, cecos com gás e enterite.	Aves apáticas, perda de desempenho, aumento da mortalidade, febre e diarreia líquida. Hemorragia leve.	33 d.
RR 9	SC	Necropsia. Perda de mucosa intestinal, intestino fino, fezes com bastante fluido, cecos com gás e enterite.	Aves apáticas, perda de desempenho, aumento da mortalidade, febre e diarreia líquida. Aparentemente normal.	33 d.
RR 10	SC	Necropsia. Perda de mucosa intestinal, intestino fino, fezes com bastante fluido, cecos com gás e enterite.	Aves apáticas, perda de desempenho, aumento da mortalidade, febre e diarreia líquida.	33 d.
NB1	SP	Sem dados.	Zona hemorrágica nos cecos. Parede intestinal engrossada. Fezes líquidas no íleo. Parte final do reto com gás.	13 sem.
NB2	SP	Sem dados.	Jejuno congestionado, parede engrossada. Fezes líquidas. Um pouco de gás.	13 sem.

NB3	SP	Sem dados.	Parede intestinal engrossada. Conteúdo normal. Início dos cecos com um pouco de gás	13 sem.
NB4	SP	Sem dados.	Parede engrossada, congestionada ou hemorragia leve. Fezes líquidas.	13 sem.
NB5	SP	Sem dados.	Botão vermelho, hemorragia severa. Jejunó e duodeno com lesões +/- vermelhas.	4 sem.
NB6	SP	Sem dados.	Intestino congestionado.	4 sem.
391-1		Sem dados.	Diarreia hemorragia.	Sem dados.
391-2		Sem dados.	Diarreia hemorragia.	Sem dados.
391-3		Sem dados.	Intestino normal. Diarreia.	Sem dados.
391-4		Sem dados.	Diarreia hemorragia.	Sem dados.
391-5		Sem dados.	Gás. Diarreia hemorragia. Conteúdo amarelo.	Sem dados.

APÊNDICE B – Artigo publicado

International Journal of Microbiology Research

ISSN: 0975-5276 & E-ISSN: 0975-9174, Volume 4, Issue 7, 2012, pp.-290-294.

Available online at <http://www.bioinfo.in/contents.php?id=27>

TOXINOTYPING AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *Clostridium perfringens* ISOLATED FROM BROILER CHICKENS WITH NECROTIC ENTERITIS

LLANCO L.A.¹, VIVIANE NAKANO¹, FERREIRA A.J.P.² AND AVILA-CAMPOS M.J.^{1*}

¹Anaerobe Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

²Aviary Pathology Laboratory, Zootechny and Veterinary Medicine College, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

*Corresponding Author: Email- mariojac@usp.br

Received: August 06, 2012; Accepted: August 14, 2012

Abstract- The toxinotyping and the antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* strains isolated from chicken with necrotic enteritis were determined. All the 22 *C. perfringens* belonged to toxinotype A and the MIC values to 14 antimicrobial agents showed that all strains were susceptible to amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefoxitin, chloramphenicol, enrofloxacin, metronidazole and penicillin-streptomycin. Most strains showed high rates of resistance to erythromycin, cephalixin and bacitracin and sulfaquinolaxin. Our results suggest an important role of the α -toxin in the pathogenesis of necrotic enteritis and new strategies for preventing and controlling the *Clostridium perfringens* infection in poultry need to be investigated.

Key words- *Clostridium perfringens*, Chicken, Necrotic enteritis, Toxinotypes, Antimicrobial susceptibility

Citation: Llanco L.A., et al. (2012) Toxinotyping and Antimicrobial Susceptibility of *Clostridium perfringens* Isolated From Broiler Chickens with Necrotic Enteritis. International Journal of Microbiology Research, ISSN: 0975-5276 & E-ISSN: 0975-9174, Volume 4, Issue 7, pp.-290-294.

Copyright: Copyright©2012 Llanco L.A., et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Introduction

Clostridium perfringens is a spore-forming gram positive anaerobic rod and a common inhabitant of the intestine of healthy broiler chickens belonging to the resident microbiota [1]; however, this microorganism along with predisposing factors, such as mucosal damage are requisites to developing of the disease. In addition, certain conditions as coccidiosis and consumption of feed with high fiber content can also collaborate to the overgrowth of *C. perfringens* and subsequent toxin production, causing the both clinical and sub-clinical disease [2].

This microorganism is grouped into five toxinotypes (A, B, C, D and E) producing α , β , ϵ and i toxins [3]. *Clostridium perfringens* type A has a ubiquitous habitat and is the main gangrene-producing toxinotype and food poisoning in humans. In animals, this bacterium can be associated with diarrhea in foals and pigs and necrotic enteritis in chicken. The toxinotype B is associated with newborn lambs' dysentery, neonatal calves' hemorrhagic enteritis and sheep enterotoxaemia. The type C produces necrotic enteritis in piglets, lambs, calves, foals and chickens and the toxinotypes D and E are responsible for enterotoxaemia in lambs, sheep, calves and goats [3]. *Clostridium perfringens* also produces other potent toxins and enzymes, including NetB related to human and veterinary diseases [4].

Necrotic enteritis is an important clinical disease produced by *C. perfringens* that affects the poultry industry worldwide causing serious economic loss, about of two dollar billions/year [5]. This dis-

ease is characterized by severe necrosis of the small intestine mucosa in the proximal jejunum region and it is associated with high mortality rates [6]. On the other hand, subclinical disease leads to a decreased performance, due to the extensive mucosal damage [7].

Several studies have shown that *C. perfringens* type A is often isolated from poultry chicken; however, its presence producing poultry infections in different countries are still scarce. *Clostridium perfringens* toxinotype A produces a α -toxin, a phospholipase C that hydrolyzes phospholipids causing the production of inflammatory mediators and acute death [8].

The most effective method to prevent or to control the outbreak of necrotic enteritis is the use of antimicrobials mixed to feed and water, although, bacterial resistance to bacitracin, tetracycline, clindamycin, lincomycin and erythromycin has been reported in several countries, such as, Denmark, Switzerland, Norway, Belgium, Jordan and Brazil [9-11].

For decades, growth-promoting antibiotics have been used in broiler chicken to increase the weight and decrease food spending [12]. Although, in countries that have stopped of using growth-promoting antibiotics, the problems of diseases associated to *C. perfringens* in broiler chicken have increased [13].

In this study, the toxinotyping and the antimicrobial susceptibility of *C. perfringens* strains isolated from broiler chickens with necrotic enteritis were determined.

Materials and Methods

Intestinal Samples

Intestinal pieces from 96 chickens with necrotic enteritis (marked depression, decreased appetite, ruffled feathers, enteritis and diarrhea); and 63 intestinal pieces from healthy chickens were collected. The ethic committee in animal experimentation of the Institute of Biomedical Science, University of Sao Paulo, SP, Brazil (Proc. No. 104) approved this study.

Bacterial Isolation and Identification

Approximately, 2 cm of intestine, showing severe injuries, were transferred to tubes containing broth meat (Difco Laboratories, USA) and incubated at 37°C for 48 h under anaerobic conditions (90% N₂, 10% CO₂). Aliquots of 0.1 mL were streaked onto trypticase soy agar (TSA, Difco Laboratories, USA) enriched with 5% defibrinated horse blood agar. Plates were incubated at 37°C for 48 h in anaerobiosis. Bacterial identification was performed by colonial and cell morphology and biochemical tests. Characteristic colonies displaying short gram-positive bacilli, dual haemolysis and gelatinase and lectinase producing, were isolated for identification by biochemical tests [14]. The reference strain *C. perfringens* ATCC 13124 was used as positive control. All the tested strains were stored in 10% skimmed milk at -80°C until use.

Toxinotyping by PCR

Bacterial DNA was obtained from a colony grown in BHI according to Sambrook, et al. [15]. Briefly, bacteria were harvested by centrifugation and pellets were twice washed with PBS (pH 7.2). Pellet was incubated with lysozyme (10 mg/mL) at 37°C for 3 h. Then, 20% SDS and 20 mg/mL proteinase K were added and incubated at 55°C for 2 h. DNA was extracted by using equal volumes of phenol-chloroform and centrifuged (14,000 g x 5 min). The supernatant was precipitated with sodium acetate and isopropanol and centrifuged (14,000 g x 10 min). DNA was washed with 70% ethanol and eluted in 100 µL of TE and then, stored at -80°C until use.

Table 1- Primers used in toxinotype of *Clostridium perfringens* isolated from chickens with necrotic enteritis

Gene (Toxin)	Genetic localization	Sequence 5'→3'	Amplicon (bp)	Reference
cpa (a)	Chromosome	AGTCTACGCTTGGGATGGAA TTTCCTGGGTTGTCCATTTC	900	[16]
cpb (b)	Plasmid	TCCTTTCTTGAGGGAGGATAAA TGAACCTCCTATTTGTATCCCA	611	[16]
cpe*	Chromosome/Plasmid	GGGGAACCCCTCAGTAGTTTCA ACCAGCTGGATTGAGTTTAATG	506	[16]
etx (e)	Plasmid	TGGGAACCTCGATACAAGCA TTAAGTCATCTCCCACTGACAC	396	[16]
iap (i)	Plasmid	AAACGCATTAAAGCTCACACC CTGCATAACCTGGAATGGCT	293	[16]
cpb2 (b2)	Plasmid	CAAGCAATTGGGGAGTTTA GCAGAAATCAGGATTTGACCA	200	[16]
netB	Plasmid	GCTGGTCTGGAATAAATGC TCGCCATTGAGTAGTTTCCC	384	[4]

*Enterotoxin.

The presence of genes encoding the toxins α, β, ε, i, β₂ and enterotoxin production were detected by a multiplex PCR assay [16]. The DNA amplifications were performed by using final volumes of 25 µL containing 10 X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP

mix, 0.5 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen), 0.4 mM of each primer and 1 ng of DNA. A thermocycler (PE Applied Biosystems Gene Amp PCR System 9700) was programmed to: 1 cycle of 95°C (3 min), followed by 35 cycles of 95°C (1 min), 56°C (1 min) and 72°C (2 min) and a final cycle of 72°C (5 min) to allow the final DNA extension. The detection of the *netB* gene was performed using specific primers and annealing temperature of 55°C (1 min) with single PCR reactions. All the used primers are shown in Table 1.

PCR products were analyzed in 1% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 mg/mL) and photographed by using a Kodak Digital System DC-120. The reference strain *C. perfringens* ATCC 13124 (α-toxin positive) and *C. perfringens* EHE-NE-18 (*netB*-toxin positive) kindly provided by Dr. Rob Moore at the Monash University, Australia, were used as controls.

Antimicrobial Susceptibility Testing

The bacterial susceptibility to 14 antibiotics was determined by using an agar dilution method with Wilkins-Chalgren agar [17]. The antibiotics used were as follows: amoxicillin, cephalixin, clindamycin, erythromycin, tetracycline (Luper Ind. Farm. Ltd., Sao Paulo, SP, Brazil), amoxicillin - clavulanic acid (Smithkline Beecham Brazil Ltd., Sao Paulo, SP, Brazil), cefoxitin (Merck, Sharp & Dohme, Sao Paulo, SP), metronidazole (Aventis Farm. Ltd., Sao Paulo, SP, Brazil), bacitracin and chloramphenicol (Sigma Aldrich, Sao Paulo, SP, Brazil), enrofloxacin (Montana, Lima, Peru), oxytetracycline (GenFar, Cali, Colombia), penicillin-streptomycin (Univet, Ireland) and sulfaquinoxalin (Veterinaria Laboratorios, Lima, Peru). Plates containing two-fold serial dilutions of antimicrobial agents ranging from 0.25 to 512 µg/mL were used and the final inoculum of 1.5 x 10⁵ cfu/spot was delivered by using a Steers replicator. Media without antibiotics were used as controls. All the plates were incubated in anaerobiosis at 37°C for 48 h. The minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of each antimicrobial agent able to inhibit the macroscopic bacterial growth. The strain *C. perfringens* σ 215 was included in each experiment to assess the reliability of the method. All the tests were done in duplicate.

Results and Observations

In nine (9.4%) out of 96 intestinal samples with necrotic enteritis *C. perfringens* was found and 22 strains were recovered. All the isolated strains harbored only the *cpa* gene encoding the α-toxin production (Fig. 1) and they did not harbor the *cpe* gene encoding the enterotoxin production. In addition, none of these strains harbored the *cpb*, *etx*, *iap*, *cpb2* and *netB* genes. *Clostridium perfringens* strains were not isolated from the evaluated healthy chickens.

Fig. 1-

MIC values and the resistance rates to the different antibiotics against *C. perfringens* strains are shown in Table 2. Strains were susceptible to amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefoxitin, chloramphenicol, enrofloxacin, metronidazole and penicillin-streptomycin. In addition, amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefoxitin, clindamycin, enrofloxacin and penicillin-streptomycin showed the lowest MIC₅₀ values (≤ 0.25 µg/mL - 0.5 µg/mL). High MIC₉₀ values to sulfaquinoxalin, bacitracin, clindamycin, cephalixin and erythromycin (64 µg/mL - ≥ 512 µg/mL) were observed. Most of the strains were resistant to sulfaquinoxalin (100%), erythromycin (95%), cephalixin (95%), bacitracin (50%), clindamycin (36%), oxytetracycline (23%) and tetracycline (32%).

Table 2- Susceptibility to 14 antimicrobials of *Clostridium perfringens* Type A isolated of chickens with necrotic enteritis

Antibiotics	Breakpoint* mg/mL	MIC (µg/mL)			Resistance (%)
		Range	50%	90%	
Amoxicillin	8	≤ 0.25 - 1	≤ 0.25	0.5	0
Amoxicillin-Clavulanic acid	8	≤ 0.25 - 4	0.5	4	0
Bacitracin	8	≤ 0.25 - ≥ 512	4	128	50
Cephalixin	8	4-64	16	64	95
Cefoxitin	32	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	0
Clindamycin	4	0.5 - 256	0.5	128	36
Chloramphenicol	8	01-Apr	4	4	0
Enrofloxacin	8	≤ 0.25 - 4	≤ 0.25	4	0
Erythromycin	8	4-64	16	32	95
Metronidazole	16	≤ 0.25 - 8	4	4	0
Oxytetracycline	8	≤ 0.25 - 128	4	8	23
Penicillin-Streptomycin	8	≤ 0.25 - 8	0.5	4	0
Sulfaquinoxalin	ND**	≥ 512	≥ 512	≥ 512	100
Tetracycline	8	2-32	4	8	32

* Breakpoints used in accordance with CLSI (2007).

** ND: no defined.

Discussion

It is known that alpha-toxin-producing *C. perfringens* is predominant in intestinal microbiota of diseased broilers. Our results showed that *C. perfringens* isolated from chicken with necrotic enteritis harbored the α -gene as predominant toxinotype. Although, studies have shown that the presence of alpha-toxin-producing *C. perfringens* is not a prerequisite for initiating and developing the disease, because predisposing factors are required. In addition, the absence of *C. perfringens* in healthy chicken suggests that this microorganism has an important role in necrotic enteritis or feed mixed with antibiotics can suppress bacterial growth.

The presence of α -toxin-producing *C. perfringens* in poultry farm with necrotic enteritis appears to be no association with any subtype of *C. perfringens* or disease [18]. Previous studies have shown the induction of intestinal damage when *C. perfringens* culture supernatant was inoculated in chickens; however, the relevance of the α -toxin was not determined, since other toxins may also be present [19].

Ours results showed the absence of *C. perfringens* in healthy poultry and it may indicate that both the presence of α -toxin-producing *C. perfringens* and the mucosal damage are prerequisite to cause the necrotic enteritis. Although, the presence of α -toxin gene does not represent a virulence factor of *C. perfringens* type A and other factors, such as adhesion and invasion, could be involved and it need to be investigated [20].

The role of the NetB-toxin in the necrotic enteritis is still controversial because it has been detected in both healthy and sick animals and its prevalence varies in different countries [21]. In this study, none strains harbored the *netB* gene; although, it is interesting to note that its presence does not necessarily determine the toxin production [22]. In addition, another important toxin has been reported in *C. perfringens* type C and type A [23]. This novel TpeL toxin comprise a large clostridial cytotoxins ranging in size from 250 to 308 kDa and it is suggested that TpeL may contribute significantly to the pathogenesis of necrotic enteritis [24]; however, in this study, this toxin was not evaluated.

Antimicrobial drugs are still used in poultry as growth promoting and as preventing against several infectious diseases, however, their use have caused the spreading of bacterial resistance in different ecosystems. Antibiotics are used as growth promoting in Canada, but in European countries their use have been stopped [25]. It is well known that antimicrobial drugs can produce alterations on host's microbiota selecting resistant organisms, which can appear as opportunistic pathogens [26].

The modification of the host's intestinal bacterial population caused by external factors, such as diet or antibiotic, is not easily monitored using traditional methods [27]. In recent years, several molecular methods have been developed to evaluate population from different ecosystems [28].

The mechanisms by which antimicrobials improve growth performance is not well know, but it is suggested that nutrients are efficiently absorbed at the thinner small-intestine epithelium or microorganisms causing subclinical infections are reduced or eliminated; however, no explanation of this process has been observed.

Amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid and cefoxitin, as well as penicillin-streptomycin showed an excellent activity against the evaluated *C. perfringens* strains and it is in accordance with studies performed in other countries [10]. On the other hand, studies have shown that amoxicillin is effective against necrotic enteritis and its use is suggested for prevention of *C. perfringens* infection [29]. Cephalixin showed low activity against the tested strains and resistance rate of 95% was observed; it might be explained by its widespread use in broiler production and by the low cost [30].

Enrofloxacin showed a good activity against the tested strains, showing a value of MIC₅₀ ≤ 0.25 µg/mL in accordance with Ghola-miandehkordi, et al. [31]. On the other hand, our results divergent with those reported by Gharaibeh, et al. [10] showing a value of MIC₅₀ = 8 µg/mL and suggesting that the resistance to this drug could be due to the prolonged use in avian infections. Moreover, in some countries the use of this drug in poultry production is not indicated due to the negative impact on human health and to the transmission of resistant to antibiotics via food chain [32].

The resistance to tetracycline is commonly observed in *C. perfringens* and it is codified by the *tetP* gene [9]. Although, studies have shown that oxytetracycline has an excellent activity against *C. perfringens* [10]. In this study, the resistant to oxytetracycline and tetracycline was observed, respectively, in 23% and 32% of the tested strains. The use of tetracyclines and other antibiotics as growth-promoting is often observed in Brazilian poultry production.

Chloramphenicol is considered a drug of choice used against *Sal-*

Toxinotyping and Antimicrobial Susceptibility of *Clostridium perfringens* Isolated From Broiler Chickens with Necrotic Enteritis

monella Typhimurium and other severe gastrointestinal diseases, due to its action on almost all the members of the intestinal microbiota causing a complete depletion of coliforms and lactobacilli [33]. Chloramphenicol showed an excellent activity against all the tested strains with MIC₅₀ and MIC₉₀ values of 4 µg/mL in accordance to Rood, et al. [34].

Similarly, MIC values of 4 µg/mL to metronidazole were also observed in accordance with Chalmers, et al. [23]. Metronidazole is a drug used only for the treatment of anaerobic infections in humans; although, because of sensitivity of the *C. perfringens* strains isolated from chicken with low MIC₉₀ values, its use could be a choice for treatment or controlling infections in poultry.

In this study, 36% of the *C. perfringens* strains were resistant to clindamycin and it suggests that those genes were distributed in the evaluated avian industries. This drug produces a marked depletion of the intestinal microbiota, causing pseudomembranous colitis by *C. difficile*. Clindamycin and metronidazole are effective to control the acute symptoms but not the chronic process, maybe because they have not any effect neither on spores nor toxin [35].

Moreover, *C. perfringens* strains of animal origin often display a high resistant to clindamycin and erythromycin [36]. The resistance to the macrolide-lincosamide-streptogramin group has been attributed to the presence of the *ermQ* and *ermB* genes which codified enzymes responsible for the 23S rRNA dimethylation [37].

The use of bacitracin as a feed additive in poultry industry is often observed [32] and high resistance values in bacterial strains isolated from poultry have been reported [9,23]. Bacitracin is not absorbed from the gastrointestinal tract; however it produces no relief subclinical infection, as a primary mechanism of action for growth-permitting antibiotics [38]. In this study, 50% of the tested strains were resistant to this drug. It is known that bacteria become resistant due to the selective pressure in the intestinal ecosystem, however, the mechanisms of this resistance is not yet clear [23]. On the other hand, studies have shown that bacitracin was effective to decrease the morbidity and mortality in experimental models of necrotic enteritis [39].

Sulfonamide is another drug commonly used as feed additives and for the treatment of respiratory diseases in poultry. In this study, all the tested strains were resistant to sulfaquinoxalin in accordance with previous report [1].

A continuous monitoring of the virulence factors and the antimicrobial susceptibility profile of *C. perfringens* from animal origin, particularly, poultry are necessary for a better prevention and treatment of the necrotic enteritis in avian and new control and prevention strategies are needed.

Conflict of Interest Statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence the content of the paper.

Acknowledgements

The authors thank to Marcia Harumi Fukugaiti, Paulo Cesar Gomes Vieira and Dr. Carlos Riguetti for their technical support. This study was supported by grant of CNPq No. 143387/2008-1.

References

- [1] Sengupta N., Alam S., Kumar R. and Singh L. (2011) *Genet. Evol.*, 11(1), 64-77.
- [2] Collier C., Hofacre C., Payne A., Anderson D., Kaiser P., Mackie R. and Gaskins H. (2008) *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 122 (1-2), 104-115.
- [3] Petit L., Gibert M. and Popoff M. (1999) *Trends Microbiol.*, 7 (3), 104-110.
- [4] Keyburn A., Boyce J., Vaz P., Bannam T., Ford M., Parker D., Di Rubbo A., Rood J. and Moore R. (2008) *PLoS Pathog.*, 4(2), 1-11.
- [5] Kaldhusdal M. and Lovland A. (2000) *World' Poult.*, 16(8), 50-51.
- [6] Long J., Pettit J. and Barnum D. (1974) *Can. J. Comp. Med.*, 38(4), 467-474.
- [7] Lovland A. and Kaldhusdal M. (2001) *Avian Pathol.*, 30(1), 73-81.
- [8] Titball R. (1993) *Microbiol. Rev.*, 57(2), 347-366.
- [9] Silva R.O.S., Salvarani F.M., Assis R.A., Martins N.R.S., Pires P.S. and Lobato F.C.F. (2009) *Braz. J. Microbiol.*, 40(2), 262-264.
- [10] Gharaibeh S., Al Rifai R. and Al-Majali A. (2010) *Anaerobe*, 16 (6), 586-589.
- [11] Slavic D., Boerlin P., Fabri M., Klotins K., Zoethout J., Weir P. and Bateman D. (2011) *Can. J. Vet. Res.*, 75(2), 89-97.
- [12] Bedford M. (2000) *World's Poult. Sci. J.*, 56(4), 347-354.
- [13] Grave K., Kaldhusdal M., Kruse H., Fevang Harr L. and Flatlandsmo K. (2004) *Prev. Vet. Med.*, 62(1), 59-72.
- [14] Holdeman L.V., Cato E.P., Moore W.E. (1977) *Anaerobic Laboratory. Man. 4^a ed. Virginia Polytech. Inst., Blacksburg, VA.*
- [15] Sambrook J.K., Fritsch E. and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Book 1-3. Second Edition.*
- [16] Baums C.G., Schotte U., Amtsberg G. and Goethe R. (2004) *Vet. Microbiol.*, 100(1-2), 11-16.
- [17] Clinical and Laboratory Standards Institute (2007) *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. 7th ed., Approved Standard, M11-A7.*
- [18] Gholamiandehkordi A., Ducatelle R., Heyndrickx M., Haesebrouck F. and Van Immerseel F. (2006) *Vet. Microbiol.*, 113(1-2), 143-152.
- [19] Al-Sheikhly F. and Truscott R. (1977) *Avian Dis.*, 21(2), 241-255.
- [20] Sawires Y. and Songer J. (2006) *Anaerobe*, 12(1), 23-43.
- [21] Martin T. and Smyth J. (2009) *Vet. Microbiol.*, 136(1-2), 202-205.
- [22] Brady J., Hernandez-Doria J., Bennett C., Guenter W., House J. and Rodríguez-Lecompte J. (2010) *Avian Pathol.*, 39(6), 475

Llanco L.A., Viviane Nakano, Ferreira A.J.P. and Avila-Campos M.J.

-481.

- [23] Chalmers G., Bruce H.L., Hunter D., Parreira V.R., Kulkarni R.R., Jian Y.F., Prescott J.F. and Boerlin P. (2008) *J. Clin. Microbiol.*, 46(12), 3957-3964.
- [24] Coursodon C.F., Glock R.D., More K.L., Cooper K.K. and Songer J.G. (2012) *Anaerobe*, 18(1), 117 - 121.
- [25] Van Immerseel F., De Buck J., Pasmans F., Huyghebaert G., Haesebrouck F. and Ducatelle R. (2004) *Avian Pathol.*, 33(6), 537-549.
- [26] Bezirtoglou E. (1997) *Anaerobe*, 3(2-3), 173-177.
- [27] McCracken V.J., Simpson J., Mackie R. and Gaskins H. (2001) *J. Nutrition*, 131(6), 1862-1870.
- [28] Pryde S.E., Richardson A.J., Stewart C.S. and Flint H.J. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(12), 5372-5377.
- [29] Lanckriet A., Timbermont L., De Gussem M., Marien M., Vancraeynest D., Haesebrouck F., Ducatelle R. and Van Immerseel F. (2010) *Avian Pathol.*, 39(1), 63-68.
- [30] Allen S.D., Emery C.L. and Lyster D.M. (2003) *Clostridium*. In: *Man. Clin. Microbiol.*, ASM Press, Washington D.C, 835-856.
- [31] Gholamiandehkordi A., Eeckhaut V., Lanckriet A., Timbermont L., Bjerrum L., Ducatelle R., Haesebrouck F. and Van Immerseel F. (2009) *Vet. Res. Commun.*, 33(8), 1031-1037.
- [32] Singer R. and Hofacre C. (2006) *Avian Dis.*, 50(2), 161-172.
- [33] Kirtzalidou E., Pramateftaki P., Kotsou M. and Kyriacou A. (2011) *Anaerobe*, 17(6), 440-443.
- [34] Rood J., Maher E., Somers E., Campos E. and Duncan C. (1978) *Antimicrob. Agents Chemother.* 13(5), 871 - 880.
- [35] Freeman J., Baines S., Saxton K. and Wilcox M. (2007) *J. Antimicrob. Chemother.*, 60(1), 83-91.
- [36] Dutta G.N. and Devriese L.A. (1981) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 19(2), 274-278.
- [37] Berryman D.I., Lystis M. and Rood J.I. (1994) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35(5), 1041-1046.
- [38] Engberg R.M., Hedemann M.S., Leser T.D. and Jensen B.B. (2000) *Poult. Sci.*, 79(9), 1311-1319.
- [39] Brennan J., Skinner J., Barnum D.A. and Wilson J. (2003) *Poult. Sci.*, 82(3), 360-363.