

## PRESENÇA DE *Clostridium perfringens* EM FRANGOS DE CORTE PROVENIENTES DE AVIÁRIOS DA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO – SP

### PRESENCE OF *Clostridium perfringens* IN BROILER FROM CHICKEN FARMS IN RIBEIRÃO PRETO-SP

R. P. SCHOCKEN-ITURRINO<sup>1\*</sup>, J. VITTORI<sup>1</sup>, M. C. B. MASSOLI<sup>1</sup>, L. F. S. A. M. GAMA<sup>1</sup>

#### RESUMO

Visando estudar a presença de *Clostridium perfringens* em frangos de cortes provenientes de aviários da região de Ribeirão Preto-SP, amostras de conteúdo cecal de aves foram pesquisadas quanto a presença desse microrganismo. As amostras foram semeadas em meios seletivos para clostrídios e incubadas anaerobicamente. As culturas foram identificadas e caracterizadas pelo método de Gram e séries bioquímicas. Posteriormente realizou-se teste de inoculação em camundongos para confirmar patogenicidade. De um total de 560 amostras coletadas, 374 (66,78%) foram positivas para o gênero *Clostridium*, sendo 94 (16,78 %) *Clostridium perfringens*. Verificou-se que 19 (3,4%) amostras foram positivas para outras espécies de clostrídios patogênicos como *Clostridium chauvoei* (3 - 0,54 %), *Clostridium sordelli* (9 - 1,61%), *Clostridium bifermentans* (3 - 0,54%), *Clostridium septicum* (3 - 0,54%) e *Clostridium tetani* (1 - 0,18%).

**PALAVRAS-CHAVE:** Enterite necrótica. Avicultura. Microbiologia. Sanidade.

#### SUMMARY

The aim of the present study was to detect *Clostridium perfringens* in broiler chickens from intensive poultry farms in Ribeirão Preto-SP. We collected 516 samples of caecal content that were cultivated onto selective medium for *Clostridium* and incubated under anaerobic conditions. Gram smears were carried out from the positive samples and identified using biochemical tests. Mice inoculation test was performed in order to confirm pathogenicity. The results showed that 66.78% of the samples were positive for Clostridia, of which 16.78% were *C. perfringens*. It was confirmed that 19 (3.4%) of the samples were positive to other Clostridia pathogenic species such as *Clostridium chauvoei* (3 - 0.54%), *Clostridium sordelli* (9 - 1.61%), *Clostridium bifermentans* (3 - 0.54%), *Clostridium septicum* (3 - 0.54%) and *Clostridium tetani* (1 - 0.18%).

**KEY-WORDS:** Aviculture. Health. Microbiology. Necrotic enteritis.

---

<sup>1</sup> Departamento de Patologia Veterinária – Laboratório de Microbiologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal-SP, Brasil. Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Zona Rural, Jaboticabal-São Paulo, Cep14.870-970, pablo@fcav.unesp.br.

## INTRODUÇÃO

Dentre os principais patógenos de importância avícola, destacam-se entidades nosológicas aparentemente de pequena importância, entre as quais encontramos o *Clostridium perfringens*. Esse microrganismo é uma bactéria em forma de bastonete, Gram positivo, anaeróbico, com esporos subterminais e centrais, encontrado principalmente em animais jovens e responsável pela enterite necrótica (CARTER, 1995). Doença essa enterotoxêmica aguda e não-contagiosa, com início súbito, e necrose confluyente do intestino delgado, que, em infecções subclínicas, apresenta redução na absorção dos nutrientes, menor ganho de peso, piora na conversão alimentar e aumento na condenação de carcaças (colangio-hepatite), que juntos acarretam prejuízos a produção avícola (SCHOCKEN-ITURRINO *et al.*, 2009; LOVLAND & KALDHUSDAL, 2001, VAN DER SLUIS, 2000).

Em diversos trabalhos internacionais tem-se estudado a frequência desse microrganismo no intestino de aves (CRAVEN *et al.*, 2001; DE CESARE *et al.*, 2009; GOMES, *et al.*, 2008; MANFREDA *et al.*, 2006; SVOBODOVÁ *et al.*, 2007; TSCHIRDEWAHN *et al.*, 1991), porém poucos trabalhos nacionais fazem referência ao assunto.

Em virtude desse quadro, estudos que demonstrem a ocorrência desse patógeno, assumem grande importância para a avicultura nacional, sendo assim, objetivou-se com este trabalho, isolar e determinar a presença de *C. perfringens* em frangos provenientes de granjas da região de Ribeirão Preto-SP.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados aleatoriamente um total de 560 aves vivas e saudáveis, submetidas a dietas suplementadas com antibióticos, diretamente de abatedouros da região de Ribeirão Preto durante o período de janeiro a novembro de 2009. Após sacrifício por destroncamento, os intestinos foram retirados, amarrados e transportados em caixas isotérmicas com gelo ao Departamento de Microbiologia da UNESP – campus Jaboticabal – SP. As amostras foram processadas até 2 horas após a coleta.

Dos intestinos retiraram-se amostras de fezes e mucosa, sendo semeadas em tubos de ensaio contendo meio de Tarozzi e de Infusão de Cérebro e Coração (BHI - Difco). Posteriormente as mesmas foram incubadas, em anaerobiose, à 37°C durante 48 horas (SCHOCKEN-ITURRINO *et al.*, 1986). Após o desenvolvimento das culturas, foram realizados esfregaços corados pelo método de Gram, para confirmar a presença de bastonetes Gram positivos, com ou sem esporos, característicos do gênero *Clostridium* (HOLDEMAN *et al.*, 1977).

Para o isolamento de *Clostridium*, 1 ml das culturas, com presença de bastonetes Gram positivos, foi semeada em placas de Petri contendo meio de ágar tripton-sulfito-neomicina (T.S.N.-Difco) previamente

esterilizados, e incubadas em condições de anaerobiose, utilizando-se jarras com o sistema gas-pak da 88L à 37°C por 24-48 horas (SCHOCKEN-ITURRINO *et al.*, 1986).

As colônias características foram submetidas à observação microscópica em lâminas coradas pelo método de Gram, sendo as suspeitas repicadas em tubos de BHI (Difco) para caracterização por meio de série bioquímica, de acordo com o que preconiza DOWELL & HAWKINS (1968).

A série bioquímica consistiu-se dos testes de catalase, gelatinase, motilidade, reação em Litmus Milk, produção de Indol, redução de nitrato, produção de ácidos resultantes da fermentação da glicose, sacarose, lactose e maltose. (SCHOCKEN-ITURRINO *et al.*, 1988).

Para confirmar a presença de toxinas, 2 ml das culturas puras foram filtradas em membranas de milipore (0,45 micras) e destes, 0,5 ml injetados intraperitonealmente em camundongos, os quais foram observados durante sete dias para sintomas neurológicos ou morte (HOBBS *et al.*, 1972).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 e nos gráficos 1 e 2, observa-se que das 560 amostras analisadas, 374 (66,78%) apresentaram desenvolvimento de bactérias anaeróbias esporuladas do gênero *Clostridium* e nas outras 186 (33,22%) verificou-se presença de bactérias de outros gêneros. Do total de amostras coletadas, 94 (16,78 %) mostraram-se positivas para *C. perfringens*, enquanto que 280 (50%) apresentaram-se como sendo outras espécies de *Clostridium*.

Por meio da identificação bioquímica e inoculação em camundongos foi demonstrado que das 280 amostras negativas para *C. perfringens*, 19 (3,41 %) eram clostrídios patogênicos e as restantes 261 (46,61%) eram clostrídios saprófitos.

Os testes bioquímicos e de toxidez realizados nas 19 amostras positivas para bactérias patogênicas do gênero *Clostridium*, excetuando o *C. perfringens*, demonstraram a presença de *Clostridium chauvoei* (3-0,54 %), *Clostridium sordelli* (9-1,61%), *Clostridium bifementans* (3-0,54%), *Clostridium septicum* (3-0,54%) e *Clostridium tetani* (1-0,18%) (tabela 1).

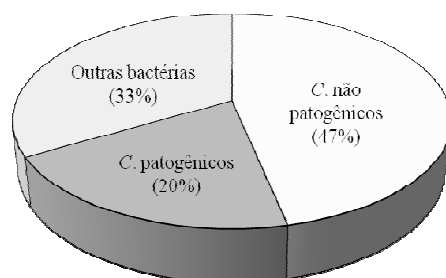
SVOBODOVÁ *et al.* (2007) e BJERRUM *et al.* (2006), encontraram valores aproximados aos verificados no presente trabalho quanto a frequência de *C. perfringens*, isolando o mesmo em 18,64 % e 30% das amostras estudadas, respectivamente. Porém KALENDER & ERTAS (2005) encontraram apenas 5% dos conteúdos intestinais positivos para *C. perfringens*.

Em contraste GOMES *et al.* (2008), em um estudo nacional, constataram a presença de *C. perfringens* em 68,4% de amostras provenientes de um frigorífico da região de Pará de Minas-MG.

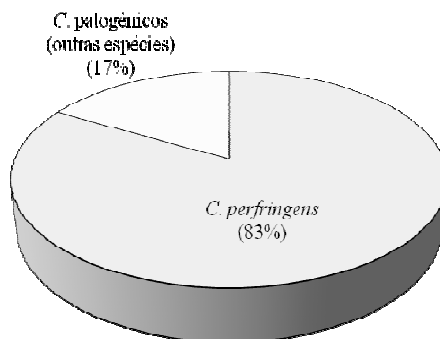
**Tabela 1** – Distribuição da porcentagem de bactérias (*C. perfringens*, *C. patogênicos* e outras bactérias) isoladas do intestinos de frangos, coletados em abatedouros da região de Ribeirão Preto – SP, no ano de 2009.

Grupos bacterianos	(%)*	Amostras positivas*
<i>Clostridium</i> SSP	66,78	374
<i>C. patogênicos</i>	20,17	113
<i>C. não patogênicos</i>	46,61	261
Outras bactérias	33,22	186
<b><i>C. perfringens</i></b>	16,78	94
<i>C. tetatni</i>	0,18	1
<i>C. septicum</i>	0,54	3
<i>C. sordelli</i>	1,61	9
<i>C. bifermentans</i>	0,54	3
<i>C. chauvoei</i>	0,54	3

\*Total de 560 amostras



**Gráfico 1** – Distribuição da porcentagem de bactérias (*C. patogênicos*, *C. saprófitos* e outras bactérias) isoladas de 560 amostras de intestinos de frangos coletados em abatedouros da região de Ribeirão Preto – SP, no ano de 2009.



**Gráfico 2** – Relação entre a porcentagem de *C. perfringens* e outras espécies de Clostrídios patogênicos, isolados de 374 amostras de intestinos de frangos, de um total de 560 amostras coletadas em abatedouros da região de Ribeirão Preto – SP, no ano de 2009.

Da mesma forma DE CESARE *et al.* (2009), estudando a incidência de *C. perfringens* em frangos criados na Itália e na república Checa, detectaram o microrganismo em 64,7 e 82,9% das amostras estudadas respectivamente. TSCHIRDEWAHN *et al.* (1991) relataram a presença de *C. perfringens* em 80% de 59 frangos testados.

Corroborando aos trabalhos supracitados, MANFREDA *et al.* (2006), pesquisando a presença do patógeno em 33 fazendas de avícolas, encontraram *C. perfringens* em 87 de um total de 149 amostras (58,40%).

Observa-se que a variação dos dados pertinentes ao assunto é grande e que a porcentagem de amostras positivas para *C. perfringens* verificada neste estudo foi inferior aos achados na literatura mundial. Acredita-se que essas diferenças possam advir principalmente das diferentes metodologias adotadas para isolamento e classificação do microrganismo, bem como dos tipos de manejos adotados aos animais estudados (composição da dieta, tempo e tipo de criação, estado de saúde das aves e utilização de promotores de crescimento ou aditivos). O *C. perfringens* é normalmente encontrado nos intestinos de aves saudáveis em altas concentrações (CRAVEN *et al.*, 2001), não implicando obrigatoriamente na manifestação do quadro de enterite necrótica, seja ela clínica ou subclínica, porém, acreditamos que o controle do mesmo faz-se necessário, em vista que a manifestação da enterite necrótica está também associada a fatores de predisposição à que as aves estão expostas, tais como uma infecção concomitantemente por coccídea, bem como dietas contendo altos níveis de arroz, trigo, cevada e farinhas de origem animal (farinhas de peixe, ossos e carne) (LILLEHOJ *et al.*, 2007; VAN IMMERSEEL *et al.*, 2004).

Além da saúde animal, outro ponto importante refere-se quanto à possível contaminação de carcaças, quando da abertura accidental do ingluvío ou dos intestinos por ocasião do abate (FIORENTIN, 2005; ENGSTRÖM *et al.*, 2003), tornando-se assim, também um problema de saúde pública.

## CONCLUSÃO

O *C. perfringens* foi encontrado em diversos intestinos do presente estudo. Sugere-se o controle desses microrganismos, envolvendo toda cadeia de produção em vista que o mesmo pode provocar grandes prejuízos à avicultura nacional, bem como gerar problemas de saúde pública.

## REFERÊNCIAS

BJERRUM, L., R. M. *et al.* Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. **Poultry Science**, v.85, p.1151–1164, 2006.

CARTER, G. R.; *et al.* **Essentials of veterinary microbiology**. 5. ed. London: Williams & Wilkins, 1995. p.394.

CRAVEN, S. E. *et al.* Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during production and processing. **Avian Diseases**, v.45, n.4, p.887-896, 2001.

DE CESARE, A. *et al.* *Clostridium perfringens* occurrence and ribotypes in healthy broilers reared in different European countries. **Poultry Science**, v.88, p.1850-1857, 2009.

DOWELL, V. R. JR., & T. M. HAWKINS. **Laboratory methods in anaerobic bacteriology**. Center for Disease Control, Atlanta, 1968.

ENGSTRÖM, B.E. *et al.* A molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. **Veterinary microbiology**, v.94, n.3, p.225-235, 2003.

FIORENTIN, L. **Aspectos bacteriológicos da reutilização da cama de aviários de frangos de corte**: versão eletrônica. EMBRAPA Suínos e Aves, p.05, 2005.

GOMES, A. M. *et al.* Genotipificação de *Clostridium perfringens* isolados de frangos de corte através da PCR múltipla. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.1943-1947, 2008.

HOLDEMAN, L. V. *et al.* **Anaerobe Laboratory Manual**, 4th Edition. Blacksburg, Virginia, 1977.

HOBBS, B. C. *et al.* *Clostridium perfringens* and *Bacillus cereus* infections. In: RIEMANN, H. **Food borne infections and intoxications**. New York: Academic Press, 1972. p.131-173.

KALENDER, H., ERTAS, H. B.. Isolation of *Clostridium perfringens* from chickens and detection of the alpha toxin gene by polymerase chain reaction (PCR). **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.29, p.847–851, 2005.

LILLEHOJ, H.S.; *et al.* Innate immune response to *Clostridium perfringens* and *Eimeria maxima* in necrotic enteritis model. **Proceedings of America Avian Veterinary Pathologists**, July 14-18, Washington, D.C. 2007.

LOVLAND, A.; KALDHUSDAL, M. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens*-associated hepatitis. **Avian Pathology**, v.30, p.73-81, 2001.

MANFREDA G, *et al.* Quantitative evaluation of *Clostridium perfringens* in Italian broilers. **Poultry Science**, v.62 (Suppl), p.91-92, 2006.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; *et al.*. Food-Borne Intoxication by *Clostridium perfringens*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.17, n.3, p.228-233, 1986.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; *et al.*. Isolation and characterization of pathogenic *Clostridium* in meats products. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v.4, n.1, p.91-98, 1988.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; *et al.*. Clostridioses em aves. In: BERCHIERI, A. JR.;MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, p.537-544, 2009.

SVOBODOVÁ, I. *et al.*. Incidence of *Clostridium perfringens* in Broiler Chickens in the Czech Republic. **ACTA VET. BRNO** 2007, 76: S25–S30

TSCHIRDEWAHN, B. *et al.*. The presence of enterotoxigenis *Clostridium perfringens* strains in faeces of various animals. [International Journal of Food Microbiology](#), v.14, p.175–178, 1991.

VAN DER SLUIS, W. Clostridial enteritis is an often underestimated problem. **World Poultry**, v.16, n.7, p.42-43, 2000.

VAN IMMERSEEL, F. *et al.*. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian Pathology**, v.33, n.6, p.537-549, 2004.