

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Clostridium perfringens* EM FRANGOS

(ANALYSIS OF THE GENETIC DIVERSITY AMONG *Clostridium perfringens*
ISOLATES FROM CHICKENS)

(ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE AISLADOS DE *Clostridium perfringens*
EN POLLOS)

E. OLIVEIRA¹, R. P. SCHOCKEN-ITURRINO*¹, L. M. FERREIRA², R. P. OLIVEIRA¹

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo analisar a diversidade genética entre estirpes de *Clostridium perfringens* isoladas em frangos acometidos pela enterite necrótica. As estirpes ($n = 48$) foram isoladas em frangos de diferentes granjas no Estado de São Paulo e caracterizadas de acordo com a sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos e a PCR-ribotipagem. Foi observada uma grande diversidade em ambos os métodos. Os resultados mostraram que a PCR-ribotipagem é útil para a classificação detalhada de isolados de *C. perfringens* e pode ser considerada para estudos epidemiológicos da enterite necrótica causada por esse patógeno.

PALAVRAS-CHAVE: *Clostridium perfringens*. Enterite necrótica. PCR-ribotipagem. Enterite de frangos.

SUMMARY

This study aimed to analyze the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from commercial broiler chickens with necrotic enteritis. Isolates ($n = 48$) collected from chickens from different farms of São Paulo State, Brazil, were characterized by their *in vitro* susceptibility to antibiotics and PCR ribotyping. A high genetic diversity was found by both methods. Results showed that PCR ribotyping is suitable for classifying *C. perfringens* isolates below the species level and may be considered for epidemiological investigations of necrotic enteritis caused by this pathogen.

KEY-WORDS: *Clostridium perfringens*. Necrotic enteritis. PCR-ribotyping. Chicken enteritis.

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo analizar la diversidad genética entre estirpes de *Clostridium perfringens* aisladas de pollos afectados por enteritis necrótica. Las estirpes ($n=48$) fueron aisladas en pollos de diferentes granjas en el Estado de São Paulo, Brasil, y caracterizadas de acuerdo con la sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos y a la PCR-ribotipaje. Fue observada una grande diversidad en los dos métodos. Los resultados mostraron que la PCR-ribotipaje es útil para la clasificación detallada de aislados de *C. perfringens* y puede ser considerada para estudios epidemiológicos sobre enteritis necrótica causada por este patógeno.

PALABRAS-CLAVE: *Clostridium perfringens*. Enteritis necrótica. PCR-ribotipaje. Enteritis de pollos.

¹ Departamento de Patologia Veterinária, FCAV – Unesp – Campus Jaboticabal.

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV – Unesp – Campus Jaboticabal.

* End. Correspondência: Departamento de Patologia Veterinária, FCAV – Unesp – Campus Jaboticabal. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n. CEP. 14884-900 – Jaboticabal – SP. End. Eletrôn.: pablo@fcav.unesp.br

INTRODUÇÃO

Os clostrídios são conhecidos como prolíficos produtores de toxinas e a maioria das espécies patogênicas produz uma ou mais toxinas letais (TWETEN et al., 2001). Embora o impacto das toxinas sobre o hospedeiro seja variado e complexo, as perdas econômicas relacionadas às diferentes enfermidades causadas pelo gênero *Clostridium* são de grande importância na produção animal.

A enterite necrótica em frangos, descrita de forma pioneira por Parish (1961, citado por BABA et al., 1997), é caracterizada por necrose hemorrágica da mucosa intestinal e sua etiologia está relacionada ao *C. perfringens* tipos A ou C (BABA et al., 1997). A enfermidade também ocorre em, pelo menos, algumas espécies de aves selvagens mantidas em cativeiro e em perus (SONGER, 1997). A investigação da presença de cepas produtoras de enterotoxina não tem sido realizada de forma usual, o que dificulta a interpretação dos resultados em relatos de enfermidade entérica provavelmente causada por *Clostridium perfringens* tipo A. No entanto, as evidências sugerem o envolvimento de cepas enterotoxigênicas na etiologia da enterite em muitas espécies animais.

Estudos moleculares têm sido descritos em cepas de *C. perfringens* com base na utilização de “primers” direcionados para os genes das toxinas alfa, beta e/ou da enterotoxina (BABA et al., 1997, KANAKARAJ et al., 1998, MIWA et al., 1999, KADRA et al., 1999, GARMORY et al., 2000). No entanto, esses relatos relacionam-se tão-somente à identificação de toxitipos de *C. perfringens*. Embora os métodos descritos apresentem grande relevância na escolha das vacinas por permitirem o conhecimento das cepas de *C. perfringens* responsáveis pela enfermidade (KADRA et al., 1999), o diagnóstico rápido e preciso da presença do agente não é possível por intermédio deles.

Durante a última década, a genotipagem de microrganismos por métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido desenvolvida a partir da utilização de grande variedade de técnicas e “primers” (KERR, 1994, VAN BELKUM, 1994 citados por HYYTIÄ et al., 1999). Foram descritos protocolos de RAPD e PCR-ribotipagem (TASTEYRE et al., 2000, KATO et al., 2001), os quais, embora não tão discriminatórios quanto a eletroforese em campo pulsado, oferecem a vantagem de serem mais rápidos e de mais fácil execução.

Nesse contexto, o presente estudo teve como finalidade identificar estirpes de *C. perfringens* isoladas em casos de enterite necrótica em frangos, assim como analisar a relação epidemiológica existente entre os isolados bacterianos, a partir da utilização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos e da ribotipagem pela reação em cadeia da polimerase.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento bacteriano: foram analisadas amostras das mucosas intestinal do íleo e do jejuno de frangos com enterite necrótica, provenientes de 38 propriedades avícolas localizadas no interior do Estado de São Paulo. As amostras foram solubilizadas em tampão salina-fosfato e as soluções, aquecidas a 80°C por 10 minutos. O volume de uma alça de platina foi utilizado para semear placas de ágar sulfito-polimixina-sulfadiazina (SPS), as quais foram incubadas entre 35 e 37°C, por 24 h, em condições de anaerobiose (MIWA et al., 1999).

Caracterização bioquímica dos isolados: as colônias isoladas das placas foram submetidas aos testes bioquímicos descritos por Mac Faddin (1976). A identificação compreendeu análise da morfologia das colônias, verificação da presença de hemólise, coloração de Gram e testes bioquímicos, como catalase, motilidade, gelatinase e lecitinase, fermentação da lactose, produção de indol e de H₂S.

Susceptibilidade das estirpes a antimicrobianos: a susceptibilidade dos isolados a antimicrobianos foi determinada a partir da técnica de difusão em disco Bauer et al., (1966), em placas de ágar Mueller-Hinton (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000). Os antimicrobianos utilizados foram ampicilina (AMP-10µg), cefalotina (CFL-30µg), eritromicina (ERI-15µg), gentamicina (GEN-10µg), lincomicina (LIN-2 µg), neomicina (NEO-30µg), norfloxacin (NOR-10µg), oxacilina (OXA-1µg), penicilina (PEN-10µg), sulfazotrim (SUT-25µg), tetraciclina (TET-30µg) e vancomicina (VAN-30µg).

Extração de DNA bacteriano: para a extração de DNA dos isolados bacterianos, foi utilizado meio de cultura líquido infusão cérebro-coração (BHI, Difco). Após incubação a 37° C por 24 h, em condições de anaerobiose, as culturas foram centrifugadas a 10.000Xg por 5 minutos e as células, lavadas com tampão salina-fosfato 0,01M pH 7,4 e solubilizadas em 200 µL de água destilada. As soluções foram fervidas a 80°C por 10 minutos e centrifugadas a 10.000Xg por 5 minutos. Cinco microlitros do sobrenadante foram utilizados nas reações de PCR (KANAKARAJ et al., 1998). Paralelamente para esse fim também foi utilizado o kit comercial Instagene (BioRad, Hercules, CA, EUA), conforme recomendação do fabricante.

PCR-ribotipagem: a discriminação molecular entre as cepas de *C. perfringens* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Stubbs et al. (1999), com modificações referentes ao volume final e às concentrações dos reagentes utilizados para as reações. As reações de amplificação consistiram em 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2,25 mM MgCl₂, 200 µM de cada desoxinucleotídeo, 10 µM de cada primer rRNA1 (5' – CTG GGG TGA AGT CGT AAC AAG G – 3') e rRNA2 (5' – GCG

CCC TTT GTA GCT TGA CC – 3’), e 2,0 U de *Taq* polimerase, em volume final de 50 µL. As condições de amplificação compreenderam 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto, *annealing* a 55° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 2 minutos, seguidos de incubação a 75° C, por 30 minutos, para concentração do volume. Os produtos amplificados foram observados em gel de agarose em concentração de 2,0 % corado com brometo de etídio. *Ladder* 1 Kb foi utilizado como padrão de peso molecular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras colhidas de casos de enterite necrótica em frangos nas 38 propriedades avícolas, foram isoladas 48 estirpes de *Clostridium perfringens*. As colônias típicas foram caracterizadas como bastonetes gram-positivos, anaeróbios, esporulados e se apresentaram positivas nos testes da gelatinase e da lecitinase e negativas nos testes da catalase e de motilidade, além de não terem produzido indol. De forma adicional, apresentaram hemólise, foram capazes de fermentar a lactose e produziram H₂S.

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos revelou 22 padrões de resistência distintos, sendo 19 estirpes de *C. perfringens* (42,2%) sensíveis a todos os

antimicrobianos testados. Conforme consta na Tabela 1, dos 22 padrões relacionados, 15 (68,2%) grupos apresentaram apenas um isolado bacteriano. Os padrões de resistência predominantes compreenderam os grupos 1 e 4, com 3 isolados cada um, e os padrões 2, 10, 14 e 16, os quais agruparam 2 estirpes de *C. perfringens* cada um. De forma adicional, é relevante mencionar que, dos 21 padrões de resistências encontrados, 15 (71,4%) grupos apresentaram a lincomicina como um dos agentes microbianos relacionados à resistência das estirpes. Hamdy et al., (1983) citam o uso de antimicrobianos na forma de promotores de crescimento, adicionados à dieta das aves, entre eles a lincomicina.

O grande número de estirpes de *C. perfringens* sensíveis no teste de difusão em disco pode estar relacionado à própria escolha dos antimicrobianos utilizados no estudo. À exceção da lincomicina e da penicilina, os demais antimicrobianos empregados não são comumente utilizados como promotores de crescimento em avicultura. Watkins et al. (1997) relataram resultados de teste de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* apresentados por estirpes de *C. perfringens* isoladas em granjas comerciais de frangos e perus. Entre os antimicrobianos utilizados, estavam tilmicosina, tilosina, virginiamicina, avilamicina, avoparcina, monensina, narasina, penicilina, bacitracina e lincomicina. Devriese et al. (1993) também descreveram a susceptibilidade *in*

Tabela 1 – Padrões de resistência aos antimicrobianos apresentados por estirpes de *Clostridium perfringens* isoladas em casos de enterite necrótica em frangos do Estado de São Paulo.

Padrões	Fenótipo de resistência aos antimicrobianos *	Número de isolados
1	Lin	3
2	Nor	2
3	Oxa	1
4	Sut	3
5	Cfl/Tet	1
6	Eri/Lin	1
7	Gen/Sut	1
8	Nor/Sut	1
9	Lin/Nor/Oxa	1
10	Lin/Oxa/Pen	2
11	Lin/Pen/Sut	1
12	Gen/Lin/Nor/Oxa	1
13	Gen/Lin/No/Sut	1
14	Gen/Lin/Oxa/Sut	2
15	Lin/No/Oxa/Pen	1
16	Lin/Oxa/Pen/Sut	2
17	Amp/Lin/No/Nor/Pen/Sut	1
18	Eri/Lin/Oxa/Sut/Tet/Van	1
19	Lin/Nor/Oxa/Pen/Sut/Tet	1
20	Amp/Cfl/Gen/Lin/Nor/Oxa/Pen/Sut/Tet	1
21	Amp/Cfl/Eri/Gen/Lin/No/Oxa/Pen/Sut/Van	1
22	Sensível	19

* Ampicilina (Amp), Cefalotina (Cfl), Eritromicina (Eri), Gentamicina (Gen), Lincomicina (Lin), Neomicina (Neo), Norfloxacin (Nor), Oxacilina (Oxa), Penicilina (Pen), Sulfazotrim (Sut), Tetraciclina (Tet) e Vancomicina (Van).

vitro de isolados de *C. perfringens* aos promotores de crescimento bambermicina, flavomicina, avoparcina, avilamicina e salinomicina. Em ambos os estudos, foi demonstrada a resistência adquirida à bacitracina. No estudo descrito por Watkins et al. (1997), a resistência à lincomicina e à bacitracina foi caracterizada para concentrações igual ou superiores a 64 mg/L.

No que diz respeito à ribotipagem, foram obtidos 27 padrões de amplificação distintos. Conforme consta da Tabela 2, o padrão 2 foi o mais freqüentemente encontrado entre as estirpes submetidas ao estudo, em um total de 16 isolados (59,2%). A segunda maior prevalência foi observada no padrão 8, com 2 (6,2%) estirpes de *C. perfringens*, seguida de outros seis padrões de amplificação 9, 10, 13, 18, 19 e 24 os quais agruparam 2 isolados bacterianos cada um. Também na ribotipagem, dos 27 padrões observados, 19 (70,4%) grupos apresentaram apenas 1 estirpe de *C. perfringens*.

A PCR-ribotipagem realizada no presente estudo foi descrita por Kato et al. (2001) e Stubbs et al. (1999) para o estudo epidemiológico molecular de estirpes de *C. difficile* isoladas de seres humanos. Esse é o primeiro relato a utilizar a metodologia descrita pelos autores para a análise de estirpes de *C. perfringens* isoladas em aves. No estudo descrito por Kato et al. (2001), foram obtidos 37 padrões de amplificação a partir da análise de 95 isolados de *C. difficile* submetidos ao estudo. Por outro lado, Stubbs et al. (1999) relataram a análise de quase 2 mil estirpes de *C. difficile* isoladas no meio ambiente, em hospitais, em animais e no meio rural, além de mais de 100 cepas referência desse patógeno. O objetivo do trabalho foi a construção de uma biblioteca de isolados de *C. difficile* para servir de referência para comparação em análises de rotina no Reino Unido. Um único padrão de amplificação foi relacionado a mais de 55% das cepas referência de *C. difficile*.

Os resultados no antibiograma e na PCR-ribotipagem podem ser observados na Tabela 3. Dos 19 isolados bacterianos classificados no padrão 22 de resistência aos antimicrobianos, 7 (36,8%) deles foram agrupados no padrão 2 da PCR-ribotipagem. De modo adicional, é de grande importância destacar o fato de as estirpes de *C. perfringens* pertencentes aos padrões de resistência 1 e 2, todas pertencerem ao padrão de ribotipagem 2. Esse agrupamento fica ainda mais notório quando se considera o grande número de padrões obtidos tanto no antibiograma, quanto na ribotipagem, e a distribuição uniforme dos demais isolados bacterianos analisados.

A caracterização molecular de estirpes de *C. perfringens* isoladas em frangos foi recentemente descrita por Engström et al. (2003) e por Nauerby et al. (2003). No primeiro estudo, os autores analisaram estirpes isoladas em frangos saudáveis e acometidos por enterite necrótica e hepatite associadas ao *C. perfringens*. A tipagem

Tabela 2 – Padrões de ribotipagem apresentados por estirpes de *Clostridium perfringens* isoladas em casos de enterite necrótica em frangos do Estado de São Paulo.

Padrões de rRNA	Estirpes	Número de isolados
1	1	1
2	3, 5, 6, 9, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 23, 29, 30, 31, 33	15
3	7	1
4	8	1
5	10	1
6	11	1
7	15	1
8	20, 25	2
9	22, 27	2
10	26, 28	2
11	34	1
12	37	1
13	38, 43	2
14	39	1
15	40	1
16	41	1
17	44	1
18	49, 58	2
19	54, 57	2
20	56	1
21	59	1
22	61	1
23	63	1
24	64, 65	2
25	67	1
26	69	1
27	72	1

Tabela 3 – Padrões de ribotipagem e resistência a antibióticos apresentados por estirpes de *Clostridium perfringens* isoladas em casos de enterite necrótica em frangos do Estado de São Paulo.

Padrões de rRNA	Estirpes	Número de isolados
1	1	1
2	3, 5, 6, 9, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 23, 29, 30, 31, 33	15
3	7	1
4	8	1
5	10	1
6	11	1
7	15	1
8	20, 25	2
9	22, 27	2
10	26, 28	2
11	34	1
12	37	1
13	38, 43	2
14	39	1
15	40	1
16	41	1
17	44	1
18	49, 58	2
19	54, 57	2
20	56	1
21	59	1
22	61	1
23	63	1
24	64, 65	2
25	67	1
26	69	1
27	72	1

molecular compreendeu a eletroforese em campo pulsado (PFGE, *pulsed field gel electrophoresis*) e o polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP, *amplified fragment length polymorphism*). Ambas as técnicas diferenciaram as 21 estirpes de *C. perfringens* analisadas em 10 grupos distintos, os quais mostraram grande correlação com a origem dos isolados bacterianos. Nauerby et al. (2003) também analisaram a diversidade genética entre estirpes de *C. perfringens* isoladas em frangos sadios e acometidos por enterite necrótica e colangio-hepatite. Os resultados da PFGE mostraram que os frangos sadios podem ser portadores de diversos clones de *C. perfringens*, tanto dentro de uma mesma granja, quanto entre granjas distintas. Por outro lado, animais acometidos pela enterite necrótica ou pela colangio-hepatite apresentaram apenas um ou dois clones diferentes de *C. perfringens*, também de acordo com a origem das amostras analisadas.

Kato et al. (2001b) descreveram que a combinação da PCR-ribotipagem e da PFGE foi útil para a investigação de estirpes de *C. difficile* isolados de portadores humanos. Embora a PFGE tenha sido mais discriminatória e tenha permitido uma análise de resultados mais fácil que no caso da ribotipagem, ela apresentou a desvantagem de degradação de DNA em algumas amostras, as quais puderam ser analisadas apenas pela PCR-ribotipagem. De forma adicional, a PCR-ribotipagem proporcionou informações referentes à relação genética entre os isolados que apresentaram perfis de macrorrestrrição distintos na PFGE.

No presente estudo, foram analisadas estirpes de *C. perfringens* isoladas em casos de enterite necrótica em frangos. Os resultados obtidos no teste de sensibilidade aos antimicrobianos e na PCR-ribotipagem sugerem a existência de múltiplos clones de *C. perfringens* relacionados à epidemiologia da enterite necrótica em frangos, assim como a grande diversidade genética entre os isolados nas diferentes granjas do Estado de São Paulo e entre as aves.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Profs. Drs. Antonio Nader Filho, Oswaldo Durival Rossi Jr., Rosângela Zacarias e Maria Inês Ferro por cederem seus laboratórios para a execução da análise molecular descrita. Os autores também agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasília/DF, pela concessão de bolsa de mestrado para desenvolvimento do presente estudo.

ARTIGO RECEBIDO: Fevereiro/2004
APROVADO: Abril/2006

REFERÊNCIAS

- 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*. **Veterinary Microbiology**, v.54, p.301-308, 1997.
- BAUER, A. W., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C., TURCK, M. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.
- DEVRIESE, L. A., DAUBE, G., HOMMEZ, J., HAESBROUCK, F. In vitro susceptibility of *Clostridium perfringens* isolated from farm animals to growth-enhancing antibiotics. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p.55-57, 1993.
- 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. **Veterinary Microbiology**, v.94, p.225-235, 2003.
- GARMORY, H. S., CHANTER, N., FRENCH, N. P., BUESCHEL, D., SONGER, J. G., TITBALL, R. W. Occurrence of *Clostridium perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. **Epidemiology and Infection**, v.124, p.61-67, 2000.
- HAMDY, A. H., THOMAS, R. W., KRATZER, D. D. Lincomycin dose response for treatment of necrotic enteritis in broilers. **Poultry Science**, v.62, p.585-588, 1983.
- HYTYIÄ, E., BJÖRKROTH, J., HIELM, S., KORKEALA, H. Characterization of *Clostridium botulinum* groups I and II by randomly amplified polymorphic DNA analysis and repetitive element sequence-based PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v.48, p.179-189, 1999.
- KADRA, B., GUILLOU, J. P., POPOFF, M., BOURLIOUX, P. Typing of sheep clinical isolates and identification of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains by classical methods and by polymerase chain reaction (PCR). **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.24, p.259-266, 1999.
- KANAKARAJ, R., HARRIS, D.L., SONGER, J.G., BOSWORTH, B. Multiplex PCR assay for detection of *Clostridium perfringens* in feces and intestinal contents of pigs and in swine feed. **Veterinary Microbiology**, v.63, p.29-38, 1998.

KATO, H., KATO, N., WATANABE, K., YAMAMOTO, T., SUZUKI, K., ISHIGO, S., KUNIHICO, S., NAKAMURA, I., KILLGORE, G. E., NAKAMURA, S. Analysis of *Clostridium difficile* isolates from nosocomial outbreaks at three hospitals in diverse areas of Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.1391-1395, 2001a.

KATO, H., KITA, H., KARASAWA, T., MAEGAWA, T., KOINO, Y., TAKAKUWA, H., SAIKAI, T., KOBAYASHI, K., YAMAGISHI, T., NAKAMURA, S. Colonization and transmission of *Clostridium difficile* in healthy individuals examined by PCR ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Medical Microbiology**, v.50, p.720-727, 2001b.

Mac FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1976. 312p.

MIWA, N., MASUDA, T., TERAJ, K., KAWAMURA, A., OTAMI, K., MIYAMOTO, H. Bacteriological investigation of an outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning caused by Japanese food without animal protein. **International Journal of Food Microbiology**, v.49, p.103-106, 1999.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M7-A5. 5thed. Villanova: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000. 37p.

NAUERBY, B., PEDERSEN, K., MADSEN, M. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. **Veterinary Microbiology**, v.94, p.257-266, 2003.

SONGER, J. G. Clostridial diseases of animals. In: J.I. Rood, B.A. McClane, J.G. Songer, R.W. Titbal (Eds.). *The Clostridia: molecular biology and pathogenesis*. California: Academic Press, 1997, p.153-182.

STUBBS, S. L. J., BRAZIER, J. S., O'NEILL, G. L., DUERDEN, B. I. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.461-463, 1999.

TASTEYRE, A., KARJALAINEN, T., AVESANI, V., DELMÉE, M., COLLIGNON, A., BOURLIOUX, P., BARC, M.C. Phenotypic and genotypic diversity of the flagellin gene (*fliC*) among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.3179-3186, 2000.

TWETEN, R. K. *Clostridium perfringens* beta toxin and *Clostridium septicum* alpha toxin: their mechanisms and possible role in pathogenesis. **Veterinary Microbiology**, v.82, p.1-9, 2001.

WATKINS, K. L., SHRYOCK, T. R., DEARTH, R. N., SAIF, Y. M. In-vitro susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. **Veterinary Microbiology**, v.54, p.195-200, 1997.