

1 **INCIDÊNCIA DE *Clostridium perfringens* EM FRANGOS DE CORTE**
2 **PROVENIENTES DE AVIÁRIOS DA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO – SP**

3
4 **Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens from Ribeirão Preto –SP zone.**

5
6 **Ruben Pablo Schocken-Iturrino^I, Juliano Vittori^I, Mariana Casteleti Beraldo Massoli^I,**
7 **Luiz Felipe Stelzer Alves de Meirelles Gama^I**

8
9 **RESUMO**

10 Visando estudar a incidência de *Clostridium perfringens* em frangos de cortes
11 provenientes de aviários da região de Ribeirão Preto-SP, amostras de conteúdo cecal de aves,
12 foram pesquisadas quanto a presença desse microrganismo. As amostras foram semeadas em
13 meios seletivos para clostrídios e incubadas anaerobicamente. As culturas foram identificadas
14 através do método de Gram, e caracterizadas por meio de séries bioquímicas. Posteriormente
15 realizou-se teste de inoculação em camundongos para constatar patogenicidade. De um total
16 de 560 amostras, 374 (66,78%) apresentaram positivas para o gênero *Clostridium*, enquanto
17 que 94 (16,78 %) mostraram-se positivas para *Clostridium perfringens*. Verificou-se que 19
18 (3,4%) amostras foram positivas para outras espécies de clostrídios patogênicos: *Clostridium*
19 *chauvoei* (3 - 0,54 %), *Clostridium sordelli* (9 - 1,61%), *Clostridium bifermentans* (3 -
20 0,54%), *Clostridium septicum* (3 - 0,54%) e *Clostridium tetani* (1 - 0,18%).

21 **Palavras-chave:** enterite necrótica, avicultura, microbiologia, sanidade

22
23

^I 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.

1 **ABSTRACT**

2 The aim of the present study was to detect the incidence of *Clostridium perfringens* in
3 broiler chickens from intensive poultry farms in Ribeirão Preto-SP zone. 516 samples of
4 caecal content were cultivated onto selective media for *Clostridium* and incubated under
5 anaerobic conditions. Gram smears were carried out from the positive samples and identified
6 using biochemical tests. Mice inoculation test was performed in order to confirm
7 pathogenicity. The results showed that 66.78% of the samples were positive for Clostridia,
8 being 16.78% of *C. perfringens*. It was confirmed that 19 (3,4%) samples were positive to
9 others Clostridia pathogenic species: *Clostridium chauvoei* (3 - 0,54 %), *Clostridium sordelli*
10 (9 - 1,61%), *Clostridium bifermentans* (3 - 0,54%), *Clostridium septicum* (3 - 0,54%) e
11 *Clostridium tetani* (1 - 0,18%).

12 **Key words:** aviculture, health, microbiology, necrotic enteritis

14 **INTRODUÇÃO**

15 Dentre os principais patógenos de importância avícola, destacam-se entidades
16 nosológicas aparentemente de pequena importância, entre as quais encontramos o *Clostridium*
17 *perfringens*. Esse microrganismo é uma bactéria em forma de bastonete, Gram positivo,
18 anaeróbio, com esporos subterminais e centrais que principalmente em animais jovens,
19 provoca a enterite necrótica (CARTER, 1995).

20 Essa é uma doença enterotoxêmica aguda e não-contagiosa, com início súbito, e
21 necrose confluyente do intestino delgado, que, em infecções subclínicas, apresenta redução na
22 absorção dos nutrientes, menor ganho de peso, piora na conversão alimentar e aumento na
23 condenação de carcaças (colangio-hepatite), que juntos acarretam prejuízos a produção
24 avícola (SCHOCKEN-ITURRINO *et al.*, 2009; LOVLAND & KALDHUSDAL, 2001, VAN
25 DER SLUIS, 2000).

1 Diversos trabalhos internacionais tem estudado a freqüência desse microrganismo no
2 intestino de aves (CRAVEN *et al.*, 2001; DE CESARE *et al.*, 2009; GOMES, *et al.*, 2008;
3 MANFREDA *et al.*, 2006; SVOBODOVÁ *et al.*, 2007; TSCHIRDEWAHN *et al.*, 1991),
4 porém poucos trabalhos nacionais fazem referência ao assunto.

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

9

10 MATERIAL E MÉTODOS

11 Foram coletados aleatoriamente 560 aves vivas e saudáveis, submetidas a dietas
12 suplementadas com antibióticos, diretamente de abatedouros da região de Ribeirão Preto.
13 Após sacrificio por destroncamento, os intestinos foram retirados e transportados em caixas
14 isotérmicas com gelo ao Departamento de Microbiologia da UNESP – campus Jaboticabal -
15 SP.

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

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

1 anaerobiose, utilizando-se jarras com o sistema gas-pak da 88L à 37°C por 24-48 horas
2 (SCHOCKEN-ITURRINO *et al.*, 1986).

3 As colônias características foram submetidas à observação macroscópica e
4 microscópicas em lâminas, coradas pelo método de Gram, sendo as suspeitas repicadas em
5 tubos de BHI (Difco) para caracterização através da série bioquímica, segundo DOWELL &
6 HAWKINS, (1968).

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

10 Para confirmar a presença de toxinas, 2 ml das culturas puras foram filtradas em
11 membranas de milipore (0,45 micras) e destes 0,5 ml injetados intraperitonealmente em
12 camundongos, os quais foram observados durante 7 dias para sintomas neurológicos ou morte
13 (HOBBS *et al.*, 1971).

14

15 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

16 Através da tabela 1 e gráficos 1 e 2, observamos que das 560 amostras analisadas, 374
17 (66,78%) apresentaram desenvolvimento de bactérias anaeróbias esporuladas do gênero
18 *Clostridium* e nas outras 186 (33,22%) verificou-se presença de bactérias de outros gêneros.
19 Do total de amostras coletadas, 94 (16,78 %) mostraram-se positivas para *C. perfringens*,
20 enquanto que 280 (50%) apresentaram-se como sendo outras espécies de *Clostridium*
21 (patogênicos e não patogênicos).

22 Através da identificação bioquímica e inoculação em camundongos foi demonstrado
23 que, das 280 amostras negativas para *C. perfringens*, 19 (3,41 %) eram clostrídios
24 patogênicos e o restante 261 (46,61%), eram clostrídios saprófitos.

1 Os testes bioquímicos e de toxidez realizados nas 19 amostras positivas para bactérias
2 patogênicas do gênero *Clostridium*, excetuando o *C. perfringens*, demonstraram a presença de
3 *Clostridium chauvoei* (3-0,54 %), *Clostridium sordelli* (9-1,61%), *Clostridium bifermentans*
4 (3-0,54%), *Clostridium septicum* (3-0,54%) e *Clostridium tetani* (1-0,18%) (tabela 1).

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

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

13 Da mesma forma DE CESARE *et al.* (2009), estudando a incidência de *C. perfringens*
14 em frangos criados na Itália e na república Checa, detectaram o microrganismo em 64,7 e
15 82,9% das amostras estudadas respectivamente. TSCHIRDEWAHN *et al.*, (1991) relataram a
16 presença de *C. perfringens* em 80% de 59 frangos testados.

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

20 Observa-se que a variação dos dados pertinentes ao assunto é grande e que as
21 frequências de *C. perfringens* verificadas neste estudo foram inferiores aos achados na
22 literatura mundial. Acredita-se que essas diferenças, possam advir principalmente das
23 diferentes metodologias adotadas para isolamento e classificação do microrganismo, bem
24 como dos tipos de manejos adotados aos animais estudados (composição da dieta, tempo e

1 tipo de criação, estado de saúde das aves e utilização de promotores de crescimento ou
2 aditivos).

3 O *C. perfringens* é normalmente encontrado nos intestinos de aves saudáveis em altas
4 concentrações (CRAVEN *et al.*, 2001), não implicando obrigatoriamente na manifestação do
5 quadro de enterite necrótica, seja ela clínica ou subclínica, porém ainda assim, acreditamos
6 que o controle do mesmo faz-se necessário, em vista que a manifestação da enterite necrótica
7 está também associada a fatores de predisposição que as aves estão expostas, tais como uma
8 infecção concomitantemente por coccídea, bem como dietas contendo altos níveis de arroz,
9 trigo, cevada e farinhas de origem animal (farinhas de peixe, ossos e carne) (LILLEHOJ *et al.*,
10 2007; VAN IMMERSEEL *et al.*, 2004).

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

15

16 **CONCLUSÕES**

17 O *C. perfringens* foi encontrado em uma frequência significativa nos intestinos das
18 aves estudadas. Sugere-se o controle desses microrganismos, envolvendo toda cadeia de
19 produção em vista que o mesmo pode provocar grandes prejuízos à avicultura nacional, bem
20 como gerar problemas de saúde pública.

21

22 **REFERÊNCIAS**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3 SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; *et al.*. Isolation and characterization of
4 pathogenic *Clostridium* in meats products. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 4, n. 1, p. 91-98,
5 1988.

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

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

10 TSCHIRDEWAHN, B. *et al.*. The presence of enterotoxigenis *Clostridium perfringens*
11 strains in faeces of various animals. **International Journal of Food Microbiology**, v. 14, p.
12 175–178, 1991.

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

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

17
18
19
20
21
22
23
24

1 **Tabela 1** – Distribuição da frequência de bactérias (*C. perfringens*, *C.* patogênicos e outras
2 bactérias) isoladas do intestinos de frangos, coletados em abatedouros da região de Ribeirão
3 Preto – SP.

4

Grupos bacterianos	Frequência (%)*	Amostras positivas*
<i>Clostridium</i> SSP	66,78	374
<i>C.</i> patogênicos	20,17	113
<i>C.</i> não patogênicos	46,61	261
Outras bactérias	33,22	186
<i>C. perfringens</i>	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

5 ***Total de 560 amostras**

6

7

8

9

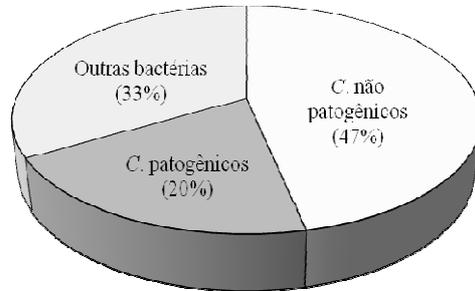
10

11

12

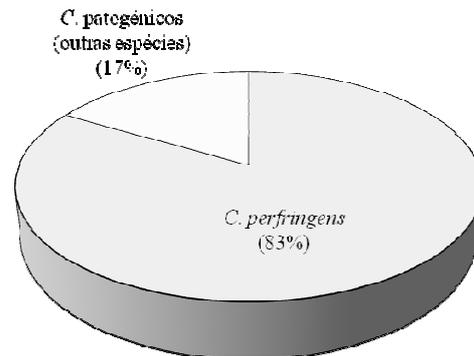
13

1 **Gráfico 1** – Distribuição da frequência de bactérias (*C. patogênicos*, *C. saprófitos* e outras
2 bactérias) isoladas de intestinos de frangos coletados em abatedouros da região de Ribeirão
3 Preto – SP).



4
5 **Gráfico 2** – Distribuição da frequência de clostrídios patogênicos isolados de intestinos de
6 frangos coletados em abatedouros da região de Ribeirão Preto – SP.

7



8

9

10