

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO” – FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E
VETERINÁRIAS CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PREVALÊNCIA DE CLOSTRIDIOS SULFITO
REDUTORES E *Clostridium perfringens* NA MUCOSA
INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE**

Mariana Casteleti Beraldo- Massoli

Biomédica

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” – FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E
VETERINÁRIAS CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PREVALÊNCIA DE CLOSTRIDIOS SULFITO
REDUTORES E *Clostridium perfringens* NA MUCOSA
INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE**

Mariana Casteleti Beraldo- Massoli

**Orientador: Prof. Dr. Ruben Pablo Schocken-
Iturrino**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de
Jaboticabal como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor em Microbiologia
Agropecuária

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

Julho de 2014

B482p Beraldo-Massoli, Mariana Casteleti
Prevalência de Clostrídios Sulfito Redutores e *Clostridium perfringens* na mucosa intestinal de frangos de corte. / Mariana Casteleti Beraldo-Massoli. -- Jaboticabal, 2014
xix, 59 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: Ruben Pablo Schocken-Iturrino

Banca examinadora: Luis Augusto do Amaral, Antonio Carlos Paulillo, Caroline Petters Pigato de Nardi, Clovis Wesley Oliveira de Souza

Bibliografia

1. Frango de corte. 2. Frigoríficos. 3. *Clostridium perfringens*. 4. PCR Multiplex. 5. *Enterococcus* spp. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 616:98:636.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PREVALÊNCIA DE CLOSTRÍDIOS SULFITO REDUTORES E *Clostridium perfringens* NA MUCOSA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE

AUTORA: MARIANA CASTELETI BERALDO MASSOLI

ORIENTADOR: Prof. Dr. RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. CLOVIS WESLEY OLIVEIRA DE SOUZA

Universidade Federal de São Carlos / São Carlos/SP



Profa. Dra. CAROLINE PETERS PIGATTO DE NARDI

Instituto Federal de São Paulo / Matão/SP



Prof. Dr. LUIZ AUGUSTO DO AMARAL

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. ANTONIO CARLOS PAULILLO

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIANA CASTELETI BERALDO-MASSOLI – Nascida em 07 de abril de 1984, em Ribeirão Preto, estado de São Paulo, filha de Marcos Antonio Beraldo e Rosa Helena Casteleti Beraldo, casada com Antonio Massoli Neto em 2008, tornou-se graduada em Ciências Biológicas (Modalidade Médica) - Biomedicina, em janeiro de 2006, pelo Centro Universitário Barão de Mauá em Ribeirão Preto, SP. Coursou Pós-Graduação (latu senso) em Educação Ambiental no ano de 2006, pela Faculdade São Luis de Jaboticabal, S.P. Realizou Iniciação científica no departamento de anatomia da FCAV/UNESP com bolsa FAPESP sob a orientação da professora Márcia Rita Fernandes Machado, no período de 2003 a 2005. Obteve a primeira colocação no processo seletivo para obtenção de Bolsa do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária no curso de mestrado da FCAV/UNESP, realizado no período de março de 2008 a fevereiro de 2010 sob orientação do Prof. Titular Ruben Pablo Schocken-Iturrino. Ingressou no doutorado pelo mesmo programa em março de 2010 com bolsa CNPq e de março a julho do mesmo ano foi professora substituta da disciplina de Microbiologia para a turma de graduação em Zootecnia da FCAV/UNESP.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”

(José de Alencar)

Ao meu marido e companheiro **Antonio Massoli Neto** que sempre esteve ao meu lado, me apoiou com palavras, atos de carinho e amor e nunca mediu esforços para me ajudar, a você meu amor e eterna gratidão.

Aos meus pais **Marcos Antonio e Rosa Helena Beraldo** por acreditarem na minha capacidade, pelas palavras de apoio e pelas orações.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que está ao meu lado em todos os momentos da minha vida, me dando forças para seguir cada vez mais adiante e me dando oportunidades incríveis para viver a vida. Agradeço por sentir Sua presença sempre.

Agradeço meu marido e companheiro de todas as horas Antonio Massoli Neto por estar ao meu lado em todos os momentos, mesmo distante sou eternamente grata pela compreensão, amor e apoio que você me ofereceu. Agradeço todos os seus gestos de carinho. Obrigada por estar ao meu lado em mais uma conquista.

A minha filha Isabella Beraldo Massoli por me mostrar a imensidão do amor de mãe e por deixar menos estressante o final do meu experimento. Te amo demais.

Aos meus pais Marcos Antonio e Rosa Helena Beraldo por todo amor. Pela base e princípios. Pelos exemplos. Pelo apoio. Pela confiança que depositaram em mim. Não existem palavras para agradecer. Tentarei seguir seus exemplos sempre.

A Maisa minha irmã, minha amiga, que sempre está ao meu lado me apoiando e me incentivando. Ao Leandro meu cunhado e amigo. Obrigado por proporcionarem vários momentos alegres durante este período.

Aos meus avós maternos (*in memoriam*) Augusto e Durvalina Casteleti que me incentivaram e me deram forças e orações para chegar até aqui. Agradeço por estarem tão próximos de mim nesse percurso e de confiar tanto na minha capacidade, mesmo os perdendo no fim, me fez ver a vida de outra forma. Poder ajudá-los e estar ao lado de vocês em quase todos os momentos que precisaram me fez tornar uma pessoa muito melhor. Vou seguir seus ensinamentos e exemplos até o fim.

A minha avó paterna Amélia Beraldo pelo exemplo de alegria e força em todas as horas. Por admirar tanto seus netos.

A toda minha família, tios, primos, sogros e cunhados. Sempre ao meu lado dando força e carinho. Agradeço aos momentos que me incentivaram, oraram e os que passamos juntos.

A meu orientador Ruben Pablo Schocken-Iturrino que acreditou em mim e na minha capacidade e me mostrou o quão valiosa é a carreira acadêmica. Agradeço pelo incentivo. Por depositar toda confiança em mim. Pelos empurrões para novos desafios. Por mostrar a importância da amizade, uma vez que ela é a única coisa que levamos dessa vida.

A minha primeira orientadora Marcia Rita Fernandes Machado, nunca vou esquecer da oportunidade do meu primeiro estágio e bolsa na universidade. Foi essa experiência que abriu meus olhos para o maravilhoso “mundo científico” e fez-me encantar tanto por ele.

Aos meus amigos anaeróbios, Marcinha, Lílian, Marita, Mariana, Lívia, Silvina, Carol, Aninha, Tiago, Ricardo, Marcio, pelas risadas, reuniões e pelo harmonioso convívio no laboratório. Aos amigos e técnicos do departamento de microbiologia e muitos outros que passaram por aí.

A técnica nível IV Andressa de Souza, do laboratório de epidemiologia molecular (LEM) do departamento de medicina veterinária preventiva. Sem você nenhuma de minhas análises molecular daria certo. Sou muito grata por ter aprendido biologia molecular com você.

Aos amigos que fiz no LEM, José Roberto Ferreira, Roberta, Luciana, Cinthia, Mariah, entre outros.

Aos professores do departamento de medicina veterinária preventiva, sempre prontos para solucionar qualquer dúvida.

Aos professores do departamento de patologia e microbiologia. Sempre dispostos a ajudar e colaborar de alguma forma com meu trabalho. Muito obrigada.

Aos membros da banca pelos conselhos e sugestões, sempre de grande importância para a melhoria dos trabalhos realizados na universidade.

Sumário

SUMARIO.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. Introdução e Revisão de Literatura.....	1
1.2.1.Dados sobre avicultura.....	1
1.2.2.Importância do Manejo, Nutrição e Sanidade.....	1
1.2.3.Formas de contaminação do frango.....	2
1.2.4.Processo das carcaças.....	2
1.2.5.Testes laboratoriais.....	3
2. Objetivos Gerais.....	4
CAPÍTULO 2. DETECÇÃO DE <i>Clostridium perfringens</i> PROVENIENTES DE RASPADOS INTESTINAIS DE FRANGOS DE CORTE COMERCIAIS E FARINHAS DE ORIGEM ANIMAL POR MEIO DA PCR MULTIPLEX.....	5
1.Introdução e Revisão de Literatura.....	5
2.Objetivos.....	10
3.Materiais e Métodos.....	10
3.1.Coleta das amostras, cultivo e extração de DNA.....	10
3.2.Tipificação de <i>C. perfringens</i> pela detecção dos genes das toxinas cpa, cpb, etx e iA pela PCR multiplex.....	11
3.3.Análise microbiológica das farinhas de pena, osso e sangue.....	11
4.Resultados.....	12
5.Discussão.....	16
6.Conclusão.....	19

7.Referências.....	19
CAPÍTULO 3. CRESCIMENTO DE <i>Enterococcus</i> spp EM MEIOS DE CULTURA SELETIVO PARA CLOSTRIDIOS SULFITO REDUTORES E <i>Clostridium perfringens</i>	29
1.Introdução e Revisão de Literatura.....	29
2.Objetivos.....	34
3.Materiais e Métodos.....	34
3.1.Coleta das amostras e extração de DNA.....	34
3.2.Sequenciamento da região 16S rDNA.....	35
3.3.Hidrólise de esculina na presença de bile.....	36
3.4.Avaliação da multiplicação em caldo contendo Cloreto de Sódio (NaCl a 6,5%).....	36
3.5.Meio de cultura DRCM.....	36
3.6.Teste de Resistência a Temperatura.....	37
4.Resultados.....	37
5.Discussão.....	40
6.Conclusão.....	44
7.Referências.....	44

PREVALÊNCIA DE CLOSTRIDIOS SULFITO REDUTORES E *Clostridium perfringens* NA MUCOSA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE

RESUMO - O gênero *Clostridium* é amplamente distribuído na natureza, está presente no solo e conteúdo intestinal dos animais, produzem toxinas que são capazes de provocar doenças e intoxicações. O *Clostridium perfringens* está envolvido com prejuízos na avicultura, pois a doença (Enterite Necrotica) na maioria das vezes é subclínica, e o produtor só observa na hora do abate que a ave não ganhou o peso esperado. O controle dessa e de outras enfermidades e agentes patogênicos na avicultura de corte tem grande importância uma vez que o Brasil está entre os principais países exportadores de carne. O objetivo deste trabalho primeiramente foi pesquisar *Clostridium perfringens* em frangos de corte sadios, provenientes de dois grandes frigoríficos com Inspeção federal, um no Estado de São Paulo e outro no Estado de Minas Gerais. Foram obtidos 300 raspados intestinais, os quais foram semeados em Agar SPS e incubados em anaerobiose. A identificação dos tipos A, B, C, D e E de *C. perfringens* foi realizada mediante o emprego da PCR multiplex por amplificação dos genes codificadores das toxinas alfa, beta, épsilon e iota do mesmo. A partir das amostras positivas na PCR (37), procedeu-se o isolamento do agente. Depois de muitas tentativas, verificou-se por meio do sequenciamento da região 16S rDNA, que as colônias sulfito redutoras que estavam sendo isoladas eram *Enterococcus* spp, microrganismo coexistente na microbiota intestinal de frango de corte, que compete com o *C. perfringens* pelo crescimento das colônias no mesmo meio de cultura, ainda que este seja seletivo e diferencial para clostrídios sulfito redutores. Dessa forma, notou-se que o crescimento de colônias de enterococos interferia muito na identificação e enumeração do *C. perfringens* e ainda apresentavam colônias muito semelhantes às de *C. perfringens* nos oito meios de cultura testados. Visto isto, foram feitos alguns testes para avaliar o comportamento dos enterococos em relação ao *C. perfringens*. A PCR mostrou-se uma ferramenta rápida e segura para a identificação dos diferentes tipos de *C. perfringens*, mas essa metodologia devido ao custo e conhecimento ainda não é empregada no diagnóstico em todas as empresas, utilizando normalmente o método tradicional de cultivo e contagem em placas. Método este, que pode apresentar falhas na contagem das colônias sulfito redutoras pois muitas delas podem ser *Enterococcus* spp induzindo a erro nas contagens do número de *C. perfringens*

Palavras chave: Microbiota, frangos de corte, avicultura, PCR, Sequenciamento da região 16S rDNA

PREVALENCE OF REDUCING SULFITE *Clostridium* AND *Clostridium perfringens* and MUCOSAL BOWEL OF POULTRY

ABSTRACT – *Clostridium* genus is widely distributed in nature and is present in soil and intestinal contents of animals, produce toxins which are capable of causing diseases and intoxication. *Clostridium perfringens* is involved with losses in the poultry industry, because the disease is most often subclinical, and producer only observed at the time of slaughter the bird has not gained the expected weight. The control of this and other diseases and pathogens in poultry production is very important since Brazil is among the major meat exporting countries. The aim of this study was to evaluate the presence of *Clostridium perfringens* in poultry coming from two large slaughter-house, one from São Paulo state and another from Minas Gerais. Were obtained 300 intestinal scraped and cecal contents, which were sown onto SPS agar and incubated anaerobically. The identification of *C. perfringens* types A, B, C, D and E was performed by the use of multiplex PCR. After identification of the presence of *C. perfringens* in 37 of 300 samples by amplification of the *cpa* gene, alpha toxin encoder, the isolation of pure colonies was proceeded. However, through the sequencing of 16S rDNA region, it was also found the presence of *Enterococcus* spp. that lives in the intestinal microbiota of poultry and disputes in growth on the same culture medium, even been selective and differential for clostridia. Thus, it was observed that colony morphology of enterococci is very similar to *C. perfringens* in this medium what make isolation of pure colonies difficult. Having on mind the difficulty of *C. perfringens* isolation under these circumstances, the PCR is an rapid and secure alternative for detection of *C. perfringens* and its different types, being effective for diagnostics.

Key words: Microbiota, poultry, aviculture, PCR, 16S rDNA Sequencing

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1.** Crescimento das colônias sulfito redutoras em agar SPS.....12
- Figura 2.** Produto da amplificação dos tipos A, B, C, D e E de *Clostridium perfringens* referente aos genes *cpa*, *cpb*, *etx* e *iA*.....13
- Figura 3.** Crescimento das colônias em agar SPS para isolamento das sulfito redutoras.....14
- Figura 4.** Coloração de Gram das colônias sulfito redutoras isoladas com morfologia de diplococos alongados (pleomórficos).....14
- Figura 5.** Crescimento das colônias que foram isoladas em ágar SPF.....15
- Figura 6.** Coloração de Gram do caldo BHI do raspado das culturas iniciais, mostrando a presença de bactérias esporuladas.....15
- Figura 7.** Coloração de Gram das colônias apresentando diplococos pleomórficos.....37
- Figura 8.** Agrupamento por Neighbour-joining das sequências de *Enterococcus* spp. obtidas no estudo e de sequências do banco de dados.....38
- Figura 9.** Prova do crescimento em caldo contendo cloreto de sódio (NaCl) a 6,5% e da hidrolise da esculina na presença de bile.....39
- Figura 10.** Produto da amplificação dos genes de resistência de *Enterococcus* spp, referentes aos genes VanA e VanB.....40

CAPITULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Dados sobre avicultura

No Brasil, a avicultura emprega mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. O setor é representado por dezenas de milhares de produtores integrados, centenas de empresas beneficiadoras e dezenas de empresas exportadoras. A importância social da avicultura no Brasil se verifica também pela presença maciça no interior do país, principalmente nos estados do Sul e Sudeste. Em muitas cidades a produção de frangos é a principal atividade econômica. Em 2011 a produção brasileira atingiu a marca histórica de 13,058 milhões de toneladas, garantindo ao Brasil uma posição entre os três maiores produtores mundiais de carne de frango, com Estados Unidos e China. Desse total, cerca de 69% permanecem no mercado interno, o que comprova a força dessa indústria para o país. O consumo per capita de carne de aves no Brasil está em aproximadamente 39 quilos por ano. Nas exportações, o Brasil mantém, desde 2004, a posição de maior exportador mundial, tendo terminado 2011 com a marca de 3,9 milhões de toneladas embarcadas para mais de 150 países. Com esse desempenho, a carne de frango brasileira aumentou ainda mais sua presença na mesa dos consumidores no Brasil e no mundo (UBABEF 2014).

1.2.2 Importância do Manejo, Nutrição e Sanidade

A ação concomitante da nutrição, manejo, genética e saúde animal na indústria avícola, redundam nos maiores índices de produtividade da cadeia agropecuária (ANDREATTI FILHO et al., 2009). Porém, é importante que estes índices estejam associados ao atendimento às legislações vigentes, exigências sanitárias da cadeia avícola e preservação ao meio ambiente. Por isto, se faz necessário que as indústrias invistam em inovações tecnológicas e pesquisas científicas para garantir a produtividade e custos competitivos (CAVANI, 2012).

Do ponto de vista sanitário, o sistema de criação intensivo expõe os frangos a várias formas de contaminação, as quais podem ter origem desde as matrizes e se estender até o final do processo de abate.

1.2.3 Formas de Contaminação do Frango

Na criação, os frangos podem ser contaminados através da alimentação, pragas e práticas inadequadas de manejo.

No abatedouro as aves chegam com esta carga microbiana aderida na superfície externa (penas, tegumentos cutâneos, espaços interdigitais) e, de forma menos significativa em seu aparelho respiratório (SILVA, 1998). Segundo CASON et al., (2004), frangos saudáveis chegam às plantas processadoras carregando milhões de bactérias, tanto externamente quanto internamente.

As carcaças podem ser contaminadas por meio do extravasamento do conteúdo gastrointestinal durante a evisceração das aves, ocorrência comum em processos de abate inadequado ou ainda por higienização deficiente em ambientes, equipamentos e utensílio ou através de procedimentos inadequados realizados pelos operadores das indústrias (CAVANI, 2012).

1.2.4. Processo das Carcaças

O processo de evisceração pode ser manual ou automático (BRASIL, 1998). No processo automático, as carcaças passam primeiramente pela extratora de cloaca, que realiza o corte, extração e exposição da cloaca da carcaça. Em algumas indústrias as vísceras são depositadas em pequenas bandejas plásticas que correm paralelas as carcaças (BRASIL, 1998). Isto se faz necessário para que se possa saber através do exame das vísceras, se a carcaça esta apta para consumo ou se há necessidade do descarte devido alguma anomalia na víscera ou na carcaça.

Após os exames, acontece a separação das vísceras comestíveis (coração, moela e fígado) das não comestíveis. As vísceras comestíveis são separadas e direcionadas para o sistema de pré-resfriamento de miúdos e as vísceras não comestíveis são descartadas em tubulações com água corrente e ou vácuo até a fábrica de farinhas e óleos ou local específico (CAVANI, 2012).

Em seguida, as carcaças são obrigatoriamente inspecionadas visualmente quanto à presença de contaminações de fezes e bile. Esta inspeção é realizada pela empresa e faz parte do programa de APPCC/HACCP (BRASIL, 2006).

As instalações destinadas ao fabrico dos subprodutos não comestíveis, ou seja, local para onde são direcionadas as vísceras, penas, sangue, ossos e carcaças e suas partes que não podem ser aproveitadas. O direcionamento destes subprodutos às fábricas, geralmente são realizados por gravidade, tendo a água como condutor ou por propulsores mecânicos (vácuo). As fábricas de farinhas e óleos devem ter área própria para recepção, processamento e armazenagem. A área de recepção deve ser isolada da área de processamento (CAVANI, 2012).

O processamento dos subprodutos deve ser em equipamentos que atinjam temperaturas não inferiores a 133°C, por no mínimo 20 minutos, garantindo a eliminação de possíveis microrganismos patogênicos (BRASIL, 2008).

1.2.5 Testes Laboratoriais

Os testes microbiológicos visam atender as exigências do mercado interno e países importadores, quanto a exames e padrões microbiológicos em produtos e processos do abate de aves. Os resultados destes exames laboratoriais servem para o monitoramento de produtos e processos e também como liberação de produtos a serem consumidos internamente ou a serem exportados (CAVANI, 2012).

Os laboratórios utilizados pelas indústrias para as análises devem fazer parte da lista de laboratórios credenciados e ou reconhecidos pelo MAPA. O serviço de inspeção federal utiliza os laboratórios oficiais do MAPA (LANAGRO) distribuídos no país e laboratórios credenciados.

Segundo a ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) os microrganismos indicadores no processo de abate de aves podem ser agrupados em: (I) Microrganismos que não oferecem um risco direto a saúde: contagem padrão de mesófilos, contagem de psicrotróficos e termófilos, contagem de bolores e leveduras; (II) Microrganismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde: coliformes totais, coliformes fecais, *Enterococcus*, *enterobacteriaceae* e *Escherichia coli* (SILVA, 2002).

Resultados dos monitoramentos destes microrganismos em ambientes e produtos são exigências no Brasil (BRASIL, 2001), na Comunidade Européia (CE, 1992; 2007) e outros países importadores como África do Sul, Namíbia, Rússia, Venezuela e Vietnã.

Apesar de alguns microrganismos indicadores sugerirem a presença de microrganismos patogênicos, uma vez que a maior parte dos patógenos de importância em saúde pública é mesófila, a pesquisa efetiva de patógenos é fundamental para garantia da segurança microbiológica de produtos cárneos e para evidenciar os riscos que estes produtos podem representar para os consumidores.

Já os microrganismos patogênicos no processo de abate de aves são aqueles que podem causar enfermidades no homem ou animais. Podem ser classificados como liberadores de toxinas: *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus cereus*, fungos filamentosos ou causadores de infecções: *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Shigella* sp, *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter* sp, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia* sp (HOLT et al., 1994).

Para o mercado brasileiro e “lista geral” (países que não possuem legislações próprias e que aceitam as legislações do país exportador), como exemplo o Japão, Geórgia, China, as exigências e padrões microbiológicos estão contidas no RIISPOA (Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, de 19 de Dezembro de 1950), na RDC 12 (Resolução que aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, de 02 de Janeiro de 2001) e na Circular 12 (Padronização de procedimentos de controle da fiscalização de estabelecimentos produtores de carne de aves e ovos e das auditorias da DICA/CGI/DIPOA nos estados, de 13 de Abril de 2007).

Com base nas informações supracitadas é importante o contínuo monitoramento do *C. perfringens* na criação avícola.

2. OBJETIVOS GERAIS

1. Isolamento de *Clostridium perfringens* de raspados intestinais e farinhas de origem animal.
2. Tipificação molecular dos tipos de *Clostridium perfringens*.
3. Estudo molecular das diferentes cepas isoladas

CAPITULO 2 - DETECÇÃO DE *Clostridium perfringens* PROVENIENTES DE RASPADOS INTESTINAIS DE FRANGOS DE CORTE COMERCIAIS E FARINHAS DE ORIGEM ANIMAL POR MEIO DA PCR MULTIPLEX

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Clostridium* compreende em um grupo de microrganismos que são ubíquos, anaeróbios, Gram positivos e formadores de esporos. Algumas espécies são patogênicas, causando doenças chamadas de clostridioses, que são infecções e intoxicações que acometem animais e humanos devido a produção de toxinas (HATHEWAY, 1990).

Pertencentes à família *Bacillaceae*, microrganismos do gênero *Clostridium* são anaeróbios, encapsulados, móveis e, bioquimicamente, são classificados como gelatinase, maltose, sacarose, indol e nitrato positivos, e salicina negativos (GOMES et al., 2008).

A temperatura ótima para crescimento é de 37 a 45°C e o pH próximo à neutralidade, cerca de 7 (BLASCHEK & SOLBERG, 1981). Entretanto, na forma esporulada, os clostrídios podem sobreviver às extremas variações de temperatura e acidez (CATO et al., 1986).

Os clostrídios têm a habilidade de passar por uma forma de resistência chamada espora e podem se manter potencialmente infectantes no solo por longos períodos, o que representa um risco significativo para a população animal e humana (TITBALL et al., 2006).

A contaminação ambiental nas granjas pelo *Clostridium perfringens* é um grave problema enfrentado pelos avicultores brasileiros. A enterite necrótica, enfermidade provocada por este agente, pode apresentar necrose confluyente do intestino delgado, que em infecções subclínicas diminui a absorção dos nutrientes desencadeando um menor ganho de peso e piora a conversão alimentar das aves. É

comum em animais jovens e o maior agravante é que as perdas provocadas pela doença são observadas pelo produtor apenas no momento do abate (SCHOCKEN-ITURRINO AND ISHI, 2000; ELWINGER et al, 1992.; HOFSHAGEN AND KALDHUSDAL, 1992; KALDHUSDAL et al., 2001; HOFACRE et al. , 2003), porém pode ser também caracterizada por severa necrose da mucosa do intestino delgado, levando a altas taxas de mortalidade. (HELMBOLDT & BRYANT, 1971; BROUSSARD et al., 1986; GADZINSKI & JULIAN, 1992).

O *Clostridium perfringens* é um bastonete Gram positivo esporulado, encontrado no solo e no trato intestinal (JOHNSON & GERDING 1997; MCCLANE 1997). Cepas patogênicas deste agente causam uma variedade de doenças humanas e animais, incluindo intoxicação alimentar, diarreia associada a antibióticos e gangrena gasosa. Em animais além da gangrene gasosa provoca enterite necrótica, colite necrosante, síndrome da morte súbita e enterotoxemia (LINDSAY 1996; SONGER 1996; GIBERT et al. 1997; MEER et al. 1997; ROOD 1998; BRYNESTAD & GRANUM 2002; BOS et al. 2005). É um patógeno oportunista (FIORENTIN, 2006) presente no intestino das aves e no ambiente, inclusive na água (SARTORI et al., 2006). Coloniza o animal nos primeiros dias de vida e causa doença principalmente em animais de duas a cinco semanas de idade (VAN IMMERSEEL et al., 2004). Sua presença não conduz a doença sem a presença de fatores predisponentes (GHOLAMIANDEKHORDI, et al. 2002). Os fatores mais importantes para desenvolvimento de enterite necrótica são danos na mucosa devido a patógenos coccidianos, dietas com altos níveis de polissacarídeos não digeríveis e amidos não solúveis em água (CRAVEN et al, 2001;. LA RAGIONE e WOODWARD, 2003; JACKSON et al, 2003;. VAN IMMERSEEL et al, 2004; WILLIAMS, 2005). A coccidiose tem sido considerada como um importante fator predisponente da enterite necrótica (VAN IMMERSEEL et al., 2004).

O *C. perfringens* é, provavelmente, uma das espécies potencialmente patogênicas deste gênero mais difundidas no mundo e, sem dúvida, a mais importante causadora de enterites por *Clostridium* em animais domésticos (BERCHIERI JUNIOR & MACARI, 2000).

Do ponto de vista econômico, a Enterite necrótica é conhecida por seu impacto negativo na produção avícola (VAN DER SLUIS, 2000). Dados atuais

mostram que o Brasil exportou mais de 360 mil toneladas de carne de frango em julho de 2010 (AGRONEGOCIO, 2010). Estima-se que o prejuízo dessa doença seja de mais de U\$ 0.05 por animal, sendo que as perdas variam desde problemas com o aumento da conversão alimentar, redução do peso vivo, bem como aumento na condenação de carcaças (LOVLAND & KALDHUSDAL, 2001).

Craven et al. (2001a) encontraram as maiores populações de *C. perfringens* bactéria em fezes de animais com duas e quatro semanas de vida, decaindo na sexta semana e o isolaram, em trabalho subsequente, de paredes de aviários, ventiladores, comedouros, bebedouros, armadilhas para insetos e botas de operadores, com maior frequência na primavera e no verão, demonstrando que a estrutura do aviário e seus equipamentos, assim como o incubatório, podem ser vias de transmissão de *C. perfringens* nas aves (CRAVEN et al., 2001b).

O *C. perfringens* pode ser classificado como A, B, C, D ou E, em razão da produção de quatro toxinas principais: alfa, beta, epsilon, e iota (MACLENNAN, J. D. 1962, MCDONEL, J. L. 1980; NILO, 1980). O tipo A produz apenas toxina alfa, o tipo B produz alfa, beta e epsilon, o tipo C produz alfa e beta, o tipo D produz alfa e épsilon e o tipo E produz alfa e iota (SONGER, 1996). Porém, sabe-se que várias outras toxinas, chamadas de secundárias (MCDONEL, 1986) são produzidas juntamente com estas e estão relacionadas com patologias e agravamentos de lesões diversas, principalmente aquelas causadas pela enterite necrótica (CARTER, 1998), causada pelos tipos A e C de *C. perfringens* (SCHOCKEN-ITURRINO & ISHI, 2000). Estudos com aves na Escandinávia relatou casos de enterite quase que exclusivamente pelo *C. perfringens* tipo A (ENGSTRÖM et al., 2003; NAUERBY et al., 2003).

Não se sabe quais as causas ambientais que resultam no aumento da produção de toxinas e sobre as diferenças entre os isolados na capacidade de produção da alfa e das outras toxinas (GHOLAMIANDEKHORDI et al. 2002)

O *C. perfringens* oriundo de frangos de corte também pode ser transmitido a humanos por meio da cadeia alimentar (VAN IMMENSEEL et al., 2004), como foi comprovado por Singh et al. (2005), que isolaram a bactéria de 70,4% de amostras de carne de frango obtidas em lojas de varejo na Índia. É um dos patógenos bacterianos mais frequentemente isolados de surtos de doenças transmitidas por

alimentos em humanos, após alguns outros patógenos, como *Campylobacter* spp e *Salmonella* spp (BUZBY & ROBERTS, 1997). Os surtos de doenças devido ao *C. perfringens* pode ser rastreado por meio de fontes diferentes, uma delas são as aves (SCHIEMANN, 1977; REGAN et al, 1995; GANCHO et al, 1996).

Como o *Clostridium perfringens* é um habitante normal do ceco e do intestino grosso, as patologias ocorrem principalmente quando quantidades significativas do microrganismo são ingeridas com alimentos contaminados (BIGNARDE et al., 2008). Em vários surtos de enterite necrótica, a ração foi uma das principais vias de transmissão (BERCHIERI JUNIOR & MACARI, 2000).

Lovland & Kaldhusdal (2001) em estudo com comparação de frangos de corte sadios e com EN, revelaram diferença considerável no desempenho da produção, afirmando que os pesos reduzidos no momento do abate foram o fator negativo mais evidente.

Segundo Keyburn et al. (2006), a perfeita função intestinal é essencial para se obter uma conversão alimentar bem sucedida, entretanto quando com EN, os animais apresentam lesões necróticas no intestino impedindo sua funcionalidade habitual (KEYBURN et al., 2006).

Na Europa, os promotores de crescimento utilizados em rações para aumentar o ganho de peso em frangos de corte, foram proibidos devido ao risco de propagação da resistência aos antibióticos (Bedford, 2000). Essa proibição dos promotores na alimentação é um fator que irá inevitavelmente alterar a microbiota do trato intestinal de frangos de corte (KNARREBORG et al., 2002).

Alfa toxina é uma esfingomielinase fosfolipase C que hidrolisa os fosfolípidos e promove desorganização da membrana (NAYLOR et al, 1998; TITBALL et al, 2000). A hidrólise de lecitina resulta na formação de diacilglicerol, ativando a proteína quinase C, e subsequentemente estimula a cascata do ácido araquidônico. Isso induz a síntese de mediadores inflamatórios, tais como os leucotrienos, tromboxano, aglutinador de plaquetas e fator de prostaciclina (TITBALL, 1993; BUNTINGET et al., 1997). Esses mediadores causam contrações dos vasos sanguíneos, agregação plaquetária e disfunção do miocárdio, levando à morte aguda (VAN IMMERSEEL, F. et al., 2010).

A toxina beta induz a necrose hemorrágica da mucosa intestinal (LAWRENCE & COOKE, 1980; GILBERT et al., 1997). Embora o exato mecanismo de ação não seja conhecido, é provável que essa toxina prejudique a membrana. A toxina beta tem alta homologia com a alfa e com a leucocidina gama do *Staphylococcus aureus*, formando poros na membrana da célula eucariótica (HUNTER et al., 1993).

No que se refere à ração para aves e outros, a legislação Brasileira do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2003) que aprova o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos que processam resíduos de animais destinados à alimentação animal, estabelece que o produto colhido após o tratamento térmico não deve conter bactérias patogênicas e esporos termorresistentes, especificando “ausência de *Clostridium perfringens*”. Além disso, amostras de cada lote do produto final, antes de ser armazenado, deveriam ser submetidas à pesquisa e apresentarem ausência de *Salmonella* spp em 25 g de amostra.

A cocção é obrigatória para todos os tipos de farinhas, pois é proibido que os resíduos fossem destinados a alimentação animal sem passarem pelo tratamento térmico, com a função de eliminar microrganismos patogênicos. O aquecimento de farinhas segue o estabelecido pela IN 34, na qual a temperatura não pode ser inferior a 133°C, durante pelo menos 20 minutos, sem interrupção, a uma pressão absoluta não inferior a 3 bar, produzida por vapor saturado (BRASIL, 2008). Em seguida, a gordura é drenada, prensada ou centrifugada e o resíduo sólido moído na forma de farinha com especificações de granulometria variáveis. De acordo com Bellaver (2002), a granulometria é baseada na porcentagem de retenção em peneiras apresentando diferentes medidas de malhas. A granulometria mais utilizada é de 5% de retenção em peneira com malha de 2mm.

Vidal-Martins et al. (2008) afirmam que microrganismos esporulados podem sobreviver a altas temperaturas e, uma vez que o tratamento térmico não seja 100% eficiente na destruição desses microrganismos, o aquecimento pode exercer efeito estimulante sobre a multiplicação.

Calixto et al. (2002) ressaltam que a utilização de farinhas de origem animal como fonte de proteína na ração de frangos é viável, entretanto, afirmam que a produção desses subprodutos deve ser rigorosamente monitorada.

2. OBJETIVOS

1. Considerando a ocorrência de *Clostridium perfringens* nas granjas de frangos de corte, este trabalho teve por objetivo pesquisar este agente na mucosa intestinal de frangos abatidos em frigoríficos fiscalizados assim como em farinhas de pena, osso e sangue produzidas pelo mesmo frigorífico.

2. Realizar um estudo molecular das cepas isoladas para verificar similaridade das cepas.

3. MATERIAL E METODOS

3.1. Coleta das amostras, cultivo e extração de DNA

Foram coletados aleatoriamente intestinos de frangos de corte, no final da linha de abate de frigoríficos, um localizado no Estado de São Paulo e o outro no Estado de Minas Gerais.

Os intestinos foram amarrados com tiras de barbante previamente esterilizadas e colocados individualmente em sacos plásticos, os quais foram acondicionados em caixas térmicas e encaminhados ao laboratório de bactérias anaeróbias do Departamento de Patologia da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, para o processamento das amostras em um período de, no máximo, quatro horas. O processamento deu-se de maneira individual, utilizando bandejas com papel alumínio previamente esterilizado, trocado a cada amostra.

Com o auxílio de um bisturi, cada intestino foi aberto e o conteúdo intestinal retirado. Com uma alça de platina raspou-se uma parte do intestino delgado que foi

semeada em placas de Petri contendo meio de cultura SPS (Sulfito Polimixina Sulfadiazina). Após a semeadura dos raspados, acrescentou-se à placa outra camada de meio de cultura (método de plaqueamento “sanduíche”) para o favorecimento da anaerobiose. As placas então foram incubadas em jarras anaeróbicas, utilizando Gaspack a 37°C durante 48 horas. Após incubação, as culturas foram repicadas para tubos contendo caldo BHI e incubadas por mais 18 horas à 37°C. Após esse período, uma alíquota de 1 mL foi destinada à extração de DNA, segundo o protocolo de Marmur (1961).

3.2 Tipificação de *C. perfringens* pela detecção dos genes das toxinas *cpa*, *cpb*, *etx* e *iA* pela PCR multiplex

Para a identificação dos genes *cpa*, *cpb*, *etx*, e *iap* de *C. perfringens* utilizou-se pares de primers desenhados por Baums et al. (2004) os quais, de acordo com a amplificação corresponde aos tipos A,B,C,D e E.

As reações de PCR multiplex foram realizadas utilizando-se tampão 1X (KCl 50mM, TRIS-HCl 200mM, pH 8,4); MgCl₂ 2mM; dNTP's 0,2mM, 1,5U de Taq DNA polimerase, oligonucleotídeos 5 pmol, 60 ng de DNA genômico e água pura estéril q.s.p. 20µL. Para a amplificação, as reações foram realizadas em um termociclador Veriti (Applied Biosystems), sendo utilizados 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 40 segundos, 40 segundos a 60°C e 72°C por 1 minuto, e para finalizar um ciclo a 72°C por 7 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %, contendo SYBR Safe DNA Gel Stain 1X e padrão de concentração 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas), e após visualizadas sob luz UV em equipamento de fotodocumentação GEL DOC™ XRQ (BioRad).

3.3 Análise microbiológica das farinhas de pena, osso e sangue

Foram pesados 25 g de cada amostra, transferidos e homogeneizados em um frasco tipo Erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada a 1% estéril. Procedeu-se a diluição até 10³. Realizou-se choque térmico dessas diluições e depositou 1mL de cada amostra em placas de Petri nas quais foram vertidos ágar SPS em duplicata, e o plaqueamento foi realizado pelo método de “Pour Plate”. As placas foram incubadas em jarras anaeróbicas com o sistema Gas Pack, à 37°C por até 72 horas (SEGNER et al., 1971). Colônias consideradas sugestivas por serem sulfito-

reduzoras positivas, as quais apresentavam coloração negra, foram transferidas para tubos de ensaio com tampas de rosca, para manter as condições de anaerobiose, contendo caldo BHI e incubadas à 37°C por 24 horas para realização da extração de DNA e PCR multiplex para verificação dos quatro principais genes das toxinas de *C. perfringens* (*alfa*, *beta*, *épsilon* e *iota*) correspondentes ao tipo A,B,C,D e E conforme as ampliações.

4. RESULTADOS

Foi realizado o raspado de 300 intestinos e semeados em agar SPS. Após a incubação verificou que 200 amostras apresentaram crescimento das colônias e dessas, 90% eram positivas para clostrídios sulfito redutores, ou seja, mudaram a cor do meio básico para preto (figura 1).

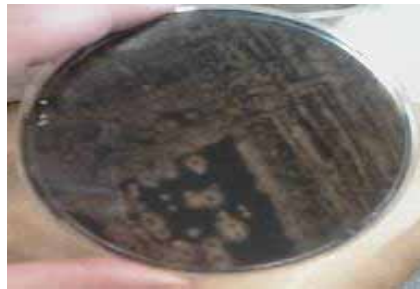


Figura 1. Crescimento das colônias sulfito redutoras em agar SPS

As colônias que cresceram foram raspadas e transferidas para caldo BHI, incubado por mais 18 horas e após essa etapa uma alíquota foi retirada para a extração do DNA.

Utilizou-se a técnica de PCR multiplex para facilitar a triagem das amostras detectando os genes das toxinas de *C. perfringens*, a fim de selecionar somente as amostras positivas de *C. perfringens*. Uma vez que, os genes pesquisados são cromossomal, ou seja, se estiver presente(s) corresponde a espécie de *C. perfringens*.

Das 300 amostras coletadas, o gene *cpa* de *C. perfringens* foi detectado em 38 amostras. Dessas, 35 foram provenientes do frigorífico 1 (São Paulo) e três amostras do frigorífico 2 (Minas Gerais). A figura 2 mostra o gel das amostras, as primeiras são os primers padrão correspondente ao tipo A, B, C, D e E de *C. perfringens* respectivamente. As amostras de 1 a 6 e a 8 são amostras positivas e a 7 uma amostra negativa.

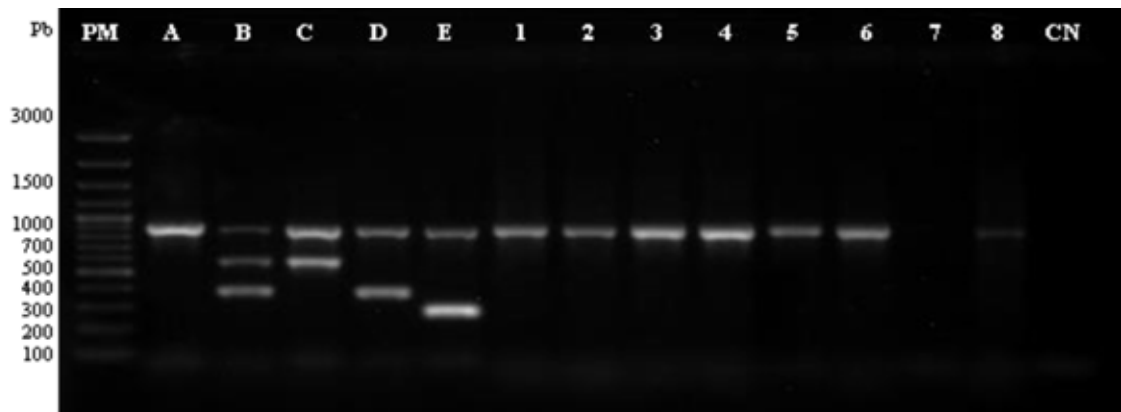


Figura 2. Produto da amplificação dos tipos A (*cpa* - 900pb), Tipo B (*cpa* - 900pb, *cpb* - 611pb e *etx* - 396 pb), Tipo C (*cpa* - 900pb e *cpb* - 611pb), Tipo D (*cpa* - 900pb e *etx* - 396 pb) e Tipo E (*cpa* - 900pb e *iap* - 293 pb) de *Clostridium perfringens* referente aos genes *cpa* (900pb), *cpb* (611pb), *etx* (396 pb) e *iap* (293 pb). Linhas de 1-6 e 8: Amostras positivas para o gene *cpa*. Linha 7: amostra negativa. PM: padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas). CN: controle negativo (mix sem DNA).

Após a detecção e a identificação de *C. perfringens* nessas amostras, procedeu-se o isolamento das colônias pela utilização de meios de cultura específicos (figura 3).

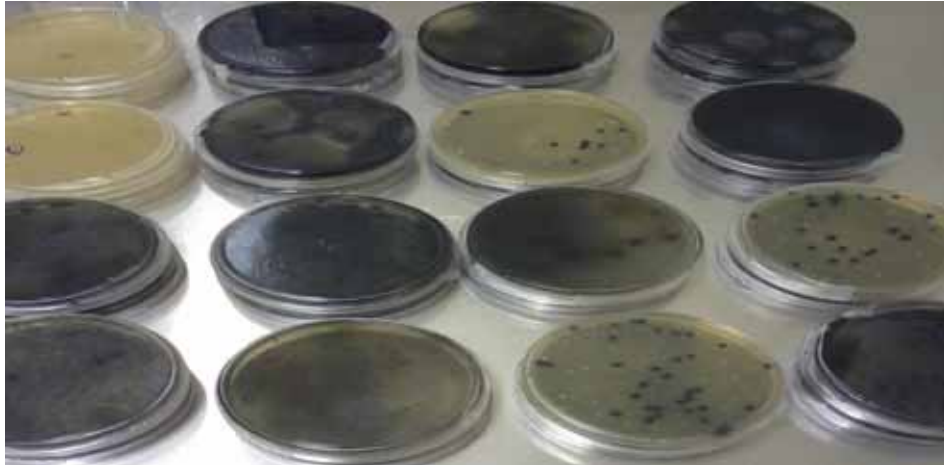


Figura 3. Crescimento das colônias em agar SPS para isolamento das sulfito redutoras.

Observou-se que a maioria das colônias eram semelhantes as de *C. perfringens*, porém, pela coloração do método de Gram das colônias isoladas verificou-se que muitas vezes havia uma morfologia de cocobacilos que formavam cadeias curtas, referindo tratar-se de outra bactéria e não de *Clostridium* (figura 4).

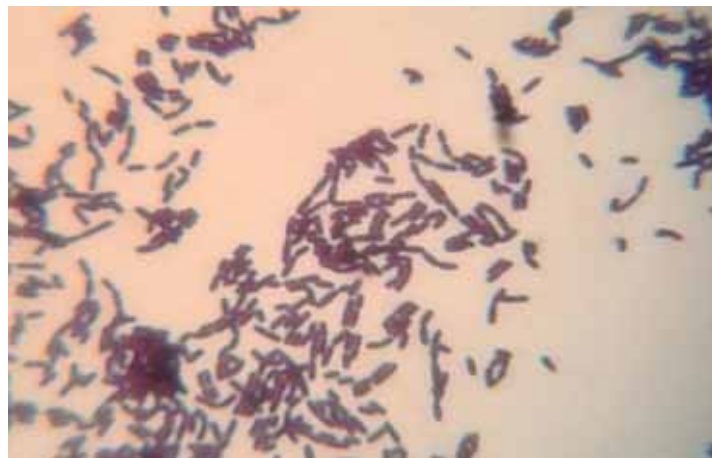


Figura 4. Coloração de Gram das colônias sulfito redutoras isoladas com morfologia de diplococos alongados (pleomórficos).

Em um segundo teste, o meio de cultura foi trocado para observar se o microrganismo crescia da mesma maneira. Dessa forma, a semeadura deu-se em Agar SPF com adição de emulsão de gema de ovo (seletivo para *C. perfringens*), sendo o mesmo incubado a 46°C por 48 horas, uma vez que o *C. perfringens* suportaria essas condições aumentando a seletividade. Entretanto, verificou-se

novamente um crescimento similar ao de *C. perfringens* (figura 5) e uma morfologia no Gram semelhante à citada anteriormente.

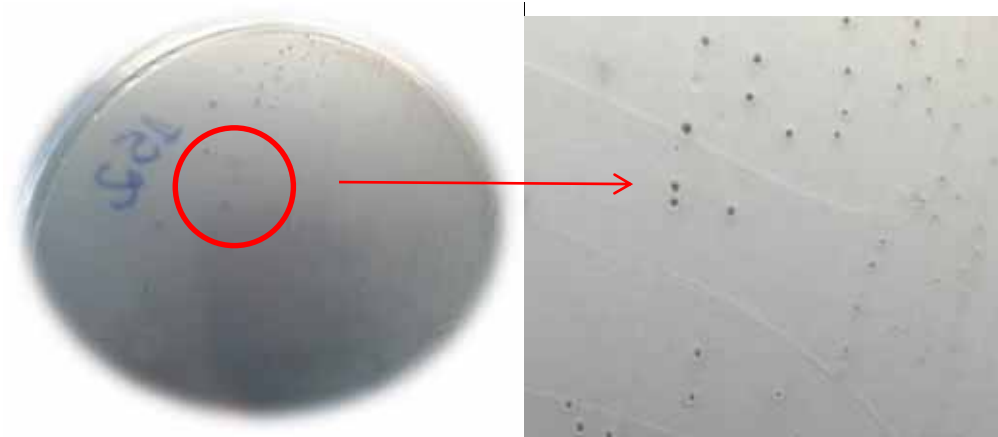


Figura 5. Crescimento das colônias que foram isoladas em ágar SPF

Um terceiro teste foi realizado utilizando choque térmico a 80°C durante 15 minutos e resfriamento à 20°C (tem por finalidade eliminar os contaminantes e favorecer somente bactérias esporuladas que são resistentes a tais condições de temperatura) uma vez que as colorações de Gram realizadas apresentavam a presença de esporos (figura 6).

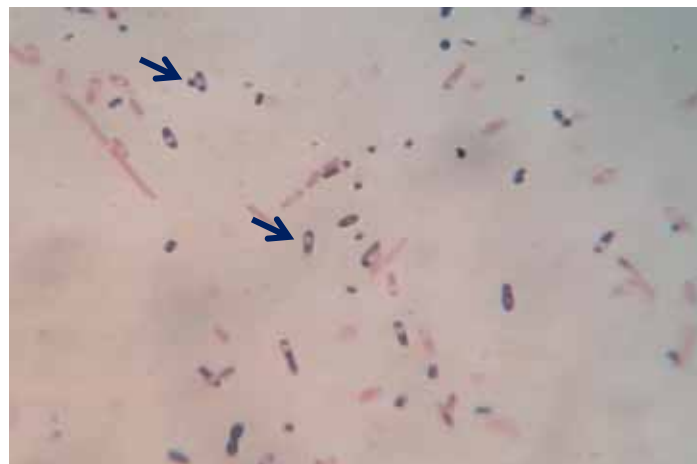


Figura 6. Coloração de Gram do caldo BHI do raspado das culturas iniciais, mostrando a presença de bactérias esporuladas (setas).

A confirmação pela PCR das colônias continuava não amplificando os genes de *C. perfringens*.

Questionáveis quanto aos resultados, coletamos ainda alguns raspados intestinais de frangos doentes (com EN) e fizemos dois testes, um deles foi tentar isolar o *Clostridium perfringens* e confirmar por PCR, o que foi possível na primeira tentativa. O segundo foi tentar isolar de alguns frangos que apresentavam uma clínica característica de enterite necrótica, neste caso, observamos que de dez colônias sulfito redutoras isoladas, apenas uma delas foi positiva para *Clostridium perfringens*.

Outro teste foi realizado com cepas (200) que já haviam sido isoladas e caracterizadas como *Clostridium perfringens* e armazenadas no laboratório. Tentamos isolar várias vezes nos diferentes meios de cultura, mas não conseguimos nenhum isolado positivo para os genes na PCR.

As amostras de farinhas foram negativas para o crescimento de colônias.

5. DISCUSSÃO

Omeira et al. (2006) avaliaram as características microbiológicas das camas dos aviários em diferentes sistemas de produção e observaram que poedeiras e frangos de corte em sistema intensivo apresentaram populações menores de *C. perfringens* do que em criações não-confinadas, sugerindo que animais em contato com o solo ingerem maior número de esporos da bactéria que animais criados exclusivamente sobre cama em ambiente controlado.

Quando a carne de aves é analisada para *C. perfringens*, elevadas porcentagens são encontradas, em alguns casos até 84% (BEAN et al, 1996; MIWA et al, 1998; CRAVEN et al., 2001a). Sugere-se que a colonização de frangos de corte por *C. perfringens* é um acontecimento que ocorre cedo na vida dos animais, e pode ser transmitido entre os frangos de corte a partir da incubadora (CRAVEN et al., 2001a,b, 2003).

A enterotoxina é produzida durante a esporulação de *C. perfringens*. Porém a maioria dos isolados de *C. perfringens* de animais não produz enterotoxina (ENGSTRÖM et al., 2003).

Tschirdewahn et al. (1992) estudando a presença de estirpes enterotoxigenicas de *C. perfringens* nas fezes de vários animais, encontrou o gene que codificou a produção da enterotoxina em apenas 10% dos *C. perfringens* isolados de aves.

Ao analisar conteúdo intestinal de frangos de corte para a presença de *C. perfringens*, cerca de 75% a 95 % dos animais analisados foram positivos (SHANE et al, 1984; MIWA et al, 1997; CRAVEN et al., 2001a,b).

A detecção de tipos e subtipos de toxinas de *C. perfringens* é importante para uma melhor compreensão da epidemiologia das infecções por este agente e pode ser útil no desenvolvimento de medidas preventivas eficazes (BAUMS, 2004).

Santos (2008) relatou que Engström et al. (2003), Nauerby et al. (2003), Johansson et al. (2004), Heikinheimo & Korkeala (2005) e Gholamiandekhordi et al. (2006) detectaram por PCR somente o gene *cpa* em amostras de frangos de corte entre outros, sugerindo que o agente causador da Enterite necrotica é o *C. perfringens* sorotipo A. Trabalhos condizentes a este.

Gomes, et al (2008) isolaram 171 *C. perfringens* de jejuno e íleo de frangos de corte provenientes de um frigorífico da região de Pará de Minas-MG. Foram isolados 62 de 125 amostras de conteúdo luminal de jejunos e em 109 de igual número de íleos dos frangos de corte. A PCR múltiplex mostrou que das 62 estirpes isoladas do jejuno, foram obtidos 42 do tipo A, 17 do tipo C, um do tipo D e nenhum do tipo B. Das 109 amostras isolados do íleo foram obtidos 62 do tipo A, 1 do tipo B, 38 do tipo C e 1 do tipo D. Cinco das 171 amostras isoladas não foram tipificadas.

O Sequenciamento da região 16S DNA revelou que 17 amostras obteve esses genes com 97% de similaridade com os nucleotídeos de *Clostridium* sp, indicando também outras espécies que não *C. perfringens*. As 22 amostras restantes foram identificadas como não formador de esporos, mas eram bastonetes anaeróbios Gram-positivos (WOO, et al 2005).

A classificação de *C. perfringens* isolado de tipos toxigênicos até poucos anos atrás era tradicionalmente desempenhadas por soro neutralização com ratos ou

cobaias (OAKLEY e WAYRACK 1953; STERNE e BATTY 1975; MCDONEL 1986). Porém, estes métodos são demorados e caros, eles têm sido largamente substituídos por métodos baseados na detecção por PCR.

Os clostrídios encontrados em conteúdo intestinal, na maioria das vezes são transitórios, ou seja, podem ser encontrados na forma esporulada ou mesmo como células bacterianas, porém dessa maneira, eles precisam estar em quantidades significativas para causar algum sintoma ou então o animal precisa estar debilitado.

Em raspados intestinais há relatos de *C. perfringens* isolados quando ele está causando lesões no intestino e não como microbiota residente. Possivelmente há uma competição que dificulta esse isolamento.

Quando se trata de uma amostra clínica é muito mais fácil o isolamento, pois o microrganismo que causa a infecção prevalece, tornando mais fácil sua identificação. Já amostras de microbiotas não são simples como se imagina uma vez que os microrganismos presentes coexistem ali da mesma forma.

Cardoso et al (2008) relatam que das 180 amostras de farinhas analisadas, 71 (39,4%) apresentaram resultado positivo para presença de *Clostridium perfringens*, sendo que das 60 amostras de farinha de vísceras, 16 (26,6%) foram positivas; das 60 amostras de farinha de pena e sangue, 33 (55%) foram positivas e das 60 amostras de farinha de carne e osso, 22 (36,7%) apresentaram resultado positivo em relação à presença de *C.perfringens*.

Após a proibição da utilização indiscriminada de antibióticos como promotores de crescimento, aumentaram os casos de Enterite necrótica pelo mundo. Como tentativa de controle de microrganismos, a legislação permitiu a utilização de substâncias químicas nas rações e em farinhas de origem animal (ANITOX, 1998; EFSA, 2006). A partir de então, várias substâncias têm sido testadas, entre elas, ácido acético, ácido propiônico, ácido cítrico, etanol, formaldeído, ácido fórmico, álcool, acetato de zinco e propionato de zinco (RICKE et al., 2005). Os aditivos bactericidas devem ser estáveis até o momento do consumo. Entretanto esses compostos devem ser metabolizados ou não serem absorvidos evitando resíduos em carne e ovos dos animais que receberam o tratamento (EFSA, 2008). Essa afirmação justificaria os resultados negativos para as análises das farinhas de origem animal avaliadas neste trabalho.

6. CONCLUSÃO

A PCR multiplex provou ser uma técnica muito eficaz e rápida para o diagnóstico, auxiliando no processo de triagem antes do isolamento das cepas de *C. perfringens*, além de analisar os cinco tipos de uma só vez.

Os intestinos aparentemente sadios apresentam uma microbiota ampla em relação a aves doentes o que dificultou o isolamento do agente microbiologicamente.

Os espécimes armazenados no laboratório não foram repicados durante esses anos e provavelmente acidificaram o meio de cultura e o DNA foi degradado

A presença de *Enterococcus* spp requer atenção uma vez que ele está presente nas amostras e são principalmente propensos a sofrer seleção quando administrados antimicrobianos, além de terem apresentado resistência ao calor.

A maior preocupação é que colônias sulfito redutoras estão sendo contadas, principalmente em indústrias, e liberadas como *Clostridium perfringens* sem muitas provas complementares. Sugere-se fazer Gram de mais de cinco colônias, e caracterizar bioquimicamente ou pela biologia molecular.

7. REFERENCIAS

ANDREATTI FILHO, R. L.; LIMA, E. T.; MENCONI, A.; ROCHA, T. S.; GONÇALVES, G. A. M. Pesquisa de *Salmonella* spp. em suabes de arrasto provenientes de granjas avícolas. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 1, p. 190-194, 2009.

AGRONEGÓCIO/ Pecuária - Avicultura / Notícia. 2010. Disponível em:
<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=42528> . Acesso em 14 de agosto de 2010.

ANITOX, 1998. Termin-8R antimicrobial preservative can now be used in all types of animal feeds and feed ingredients. Disponível em

<http://www.anitox.com/tech%20sheet%202008/Termin8%20Salmex%20intl%20tech%20sheet%20tx8i.t911-5%20073108.pdf>>. Acesso em 20 de janeiro de 2011.

BAUMS CG., SCHOTTE U., AMTSBERG G., GOETHE R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. **Veterinary Microbiology** 2004; 100: 11–16.

BEAN, N.A., GOULDING, J.S., LAO, C. & ANGULO, F.J. (1996). Surveillance for foodborne-disease outbreaks* United States. **Morbidity Mortality Weekly Report** , 45, 1_ 54.

BEDFORD, M., 2000. Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimise subsequent problems. **World Poul. Sci. J.** 56, 347–365.

BELLAVER, C. A qualidade dos ingredientes e dos itens importantes na produção de rações. **Revista A Lavoura.** p.13-15. 2002.

BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**, Ed. FACTA, Campinas – SP, 2000. p. 333-338.

BUZBY, J.C. & ROBERTS, T. (1997). Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness. **World Health Status Quarterly**, 50, 57_ 66.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal - DIPOA. **Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Sanitária de Carnes de Aves**. Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Diário Oficial da União, Brasília, 26 de Novembro de 1998. Seção 1.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Resolução RDC 12, de 02 de Janeiro de 2001. Diário Oficial da União, Brasília - DF, 10 de Janeiro de 2001. n. 7 - E, seção 1, p. 45-53.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária - SDA. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal - DIPOA. Coordenação Geral de Programas Especiais - CGPE. **Modificação das instruções para a verificação do PPHO, encaminhados pela Circular Nº 201/97 DCI/DIPOA e aplicação dos procedimentos de verificação dos Elementos de Inspeção previstos na Circular Nº 175/2005 CGPE/DIPOA.** Circular 176/2005/CGPE/DIPOA. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de Maio de 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária - SDA. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal - DIPOA. Coordenação Geral de Programas Especiais - CGPE. **Diretrizes para preparação de Plano de APPCC (HACCP) para o processo de abate de aves.** Circular 668/2006/CGPE/DIPOA. Diário Oficial da União, Brasília, 19 de Setembro de 2006. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Regulamento Técnico da Inspeção Higiênico Sanitária e Tecnológica do Processamento de Resíduos de Animais e o Modelo de Documento de Transporte de Resíduos Animais, constantes dos Anexos I e II, respectivamente.** Instrução Normativa Nº 34, de 28 de Maio de 2008. Diário Oficial da União, Brasília, 29 de Maio de 2008.

BUNTING, M., LORANT, D.E., BRYANT, A.E., ZIMMERMAN, G.A., McIntyre, T.M., Stevens, D.L. & Prescott, S.M. (1997). Alpha toxin from *Clostridium perfringens* induces proinflammatory changes in endothelial cells. **Journal of Clinical Investigation** , 100 , 565 _ 574.

BROUSSARD, C.T., HOFACRE, C.L., PAGE, R.K., FLETCHER, O.J., 1986. Necrotic enteritis in cage-reared commercial layer pullets. **Avian Dis.** 30, 617–619.

BRYNESTAD, S. & GRANUM, P.E. (2002). *Clostridium perfringens* and foodborne infections. **International Journal of Food Microbiology**, 74, 195 _ 202.

CASON, J. A.; BERRANG, M. E.; BUHR, R. J.; COX, N. A. Effect of prechill fecal contamination on numbers of bacteria recovered from broiler chicken carcasses before and after immersion chilling. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 9, p. 1829-1833, 2004.

CAVANI, R. **Comparação da carga microbiana e mapeamento de salmonelas (pcr) em águas de pré-resfriamento por imersão e carcaças de frangos em diferentes jornadas de trabalho.** Jaboticabal, 2012. 129f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP.

CALIXTO, A. E. R.; SERAFINI, A. B.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M. C. D. P. B. Prevalência de *Salmonella* e ocorrência de cepas resistentes a antimicrobianos em insumos de rações para aves produzidos por um matadouro-frigorífico com fiscalização permanente, em Goiânia, GO. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 101, p. 56-62, 2002.

CARTER, G. R. et al. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária.** 3.ed. São Paulo: Roca, 1998. 249 p.

CARDOZO, M.V. **Salmonella spp. e Clostridium perfringens em farinhas de origem animal utilizadas na fabricação de rações e avaliação de aditivo na inibição de patógeno.** Jaboticabal, 2011. 129f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP.

CRAVEN, S.E., STERN, N.J., BAILEY, J.S., COX, N.A., 2001. Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during production and processing. **Avian Dis.** 45, 887– 896

COLODEL, E.C. et al. Enterotoxemia em caprinos no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.** 23(4):173-178, out./dez. 2003.

CRAVEN, S.E., STERN, N.J., BAILEY, J.S. & COX, N.A. (2001a). Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during production and processing. **Avian Diseases**, 45 , 887 _ 896.

CRAVEN, S.E., COX, N.A., STERN, N.J. & MAULDIN, J.M. (2001b). Prevalence of *Clostridium perfringens* in commercial broiler hatcheries. **Avian Diseases**, 45 , 1050 _ 1053.

CRAVEN, S.E., COX, N.A., BAILEY, J.S. & COSBY, D.E. (2003). Incidence and tracking of *Clostridium perfringens* through an integrated broiler chicken operation. **Avian Diseases**, 47 , 707 _ 711.

ENGSTRÖM, B.E., FERME´R, C., LINDBERG, A., SAARINEN, E., BAVERUD, A., GUNNARSSON, A., 2003. Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. **Vet. Microbiol.** 94, 225–235.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to use of formaldehyde as a preservative during the manufacture and preparation of food additives. **The EFSA Journal**, 415, 1-10, 2006.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from health and consumer protection,

Directorate General, European Commission on Microbiological Risk Assessment in feedingstuffs for food-producing animals. **The EFSA Journal**, 720, 1- 84, 2008.

ELWINGER, K., BERNDTSON, E., ENGSTROM, B., FOSSUM, O. & WALDENSTEDT, L. (1998). Effect of antibiotic growth promoters and anticoccidials on growth of *Clostridium perfringens* in the caeca and on performance of broiler chickens. **Acta Veterinaria Scandinavia** , 39, 433 _ 441.

GIL de los SANTOS, J. R.; CONCEIÇÃO F. R.; GIL-TURNES, C. Enterite necrótica aviária. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.2076-2082, 2008.

GOMES, A. M.; LOBATO, F.C.F.; MARTINS, N.R.S.; ASSIS, R.A. Genotipificação de *Clostridium perfringens* isolados de frangos de corte através da PCR múltipla. **Ciência Rural**, Santa Maria, p. 1943 – 1947, v.38, n.7 Oct. 2008.

GHOLAMIANDEKHORDI, A.R.; et al. 2002; Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with diferente disease status. **Veterinary Microbiology** 113 (2006) 143–152;

GOMES, A.M., LOBATO, F.C.F., MARTINS, N.R.S., ASSIS, R.A.. Genotipificação de *Clostridium perfringens* isolados de frangos de corte através da PCR múltipla. **Ciência Rural**, Santa Maria; 2008; 38 (7): 1943-1947.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T., Facultatively anaerobic gram-negative rods. In: Bergey's **Manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 9. ed., p. 787, 1994.

HATHEWAY, C.H. Toxigenic Clostridia. **Clinical Microbiology Reviews**, v.3, n.1, p.66-98, 1990.

HEIKINHEIMO, A., KORKEALA, H., 2005. Multiplex PCR assay for toxin typing *Clostridium perfringens* isolates obtained from Finnish broiler chickens. **Lett. Appl. Microbiol.** 40, 407–411.

HOFACRE, C.L. et al. Use of Aviguard and other intestinal bioproducts in experimental *Clostridium perfringens*-associated Necrotizing Enteritis in broiler chickens. **Avian Diseases**, v.42, p.579-584, 1998.

HOFSHAGEN, M.; STENWIG, H. Toxin production by *Clostridium perfringens* isolated from broiler chickens and capercaillies (*Tetrao urogallus*) with and without Necrotizing Enteritis. **Avian Diseases**, v.36, n.4, p.837-843, 1992

JAMES L. MCDONEL. *Clostridium perfringens* toxins (type A, B, C, D, E). **Pharmacology & Therapeutics**, Volume 10, Issue 3, 1980, Pages 617-655

MAC LENNAN, J.H. The histotoxic clostridial infections of MAN. *Bacteriol Rev.* Jun 1962; 26(2 Pt 1-2): 177–274

KALDHUSDAL, M., SCHNEITZ, C., HOFSHAGEN, M. & SKJERVE, E. (2001). Reduced incidence of *Clostridium perfringens* -associated lesions and improved performance in broiler chickens treated with normal intestinal bacteria from adult fowl. **Avian Diseases**, 45 , 149 _ 156.

KEYBURN, A.L. et al. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in Necrotic Enteritis in chickens. **Infection and Immunity**, v.74, n.11.

KNARREBORG, A., SIMON, M.A., ENGBERG, R.M., JENSEN, B.B. & TANNOCK, G.W. (2002). Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. **Applied and Environmental Microbiology**, 68 , 5918 _ 5924.

LA RAGIONE, R.M., WOODWARD, M.J., 2003. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. **Vet. Microbiol.** 94, 245–256.

LAWRENCE, G. & COOKE, R. (1980). Experimental pigbel: the production and pathology of necrotizing enteritis due to *Clostridium welchii* type C in the guinea pig. **British Journal of Experimental Pathology**, 61, 261 _ 271.

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.

MARMUR J. Procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal Molecular Biology**; 1961; 3: 208–218.

MEER, R.R., SONGER, J.G., 1997. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. **Am. J. Vet. Res.** 58, 702–705.

MIWA, N., NISHINA, T., KUBO, S., HONDA, H., 1997. Most probable numbers of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in intestinal contents of domestic livestock detected by nested PCR. **J. Vet. Med. Sci.** 59, 557–560.

NAUERBY, B., PEDERSEN, K., MADSEN, M., 2003. Analysis by pulsed field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. **Vet. Microbiol.** 94, 257–266.

OMEIRA, N. et al. Microbiological and chemical properties of litter from different chicken types and production systems. **Science of the Total Environment**, v.367, p.156-162, 2006.

RICKE, S.C., KUNDINGER, M.M; MILLER, D.R.; KEETON, J.T. Alternatives to

antibiotics chemical and physical antimicrobial interventions and foodborne pathogen response. **Poultry Science**, v. 84, p. 667 – 675, 2005.

ROOD, J.I., BUDDLE, J.R., WALES, A.J., SIDHU, R., 1985. The occurrence of antibiotic resistance in *Clostridium perfringens* from pigs. **Aust. Vet. J.** 8, 276–279.

SILVA, J. A. Microrganismos patogênicos em carne de frango. **Higiene Alimentar**, v. 12, n. 58, p. 9-14, 1998.

SINGH R., BHILEGAONKAR KN., AGARWAL RK. Studies on occurrence and characterization of *Clostridium perfringens* from select meats. **Journal of Food Safety**; 2005; 25: 146–156.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P; ISHI, M. Clostridioses em aves. In: BERCHIERI Jr, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2000. Cap.4.6, p.242-243.

SONGER JG., Clostridia enteric disease of domestic animals. **Clinical Microbiology Review**; 1996; 9: 216-234.

SONGER, J.G. & MEER, R.R. (1996). Genotyping of *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals. **Anaerobe**, 2 , 197 _ 203.

TITBALL, R.W., 1993. **Bacterial phospholipases C**. **Microbiol. Rev.** 57, 347–366.

TITBALL, R.W., Naylor, C.E., Miller, J., Moss, D.S. & Basak, A.K. (2000). Opening of the active site of *Clostridium perfringens* alpha-toxin may be triggered by membrane binding. **International Journal of Medical Microbiology**, 290 , 357 _ 361.

UBABEF, Associação Brasileira de Avicultura. Relatório anual UBABEF 2012.

Disponível em:

<<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=3293>>.

Acesso em: 29 de Novembro de 2012.

VAN IMMERSEEL, F., DE BUCK, J., PASMANS, F., HUYGEBART, G., HAESBROUCK, F., DUCATELLE, R., 2004. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian Pathol.** 33, 537–549.

VAN DER SLUIS, W. (2000). Clostridial enteritis is an often underestimated problem. **World Poultry**, 16, 42_ 43.

VIDAL MARTINS, A.M.C.; ROSSI JUNIOR, O.D.; SALOTTI, B.M.; BURGER, K.P.; CORTEZ, A.L.L., CARDOZO, M.M. Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.2, p.295-298, 2008.

WILLIAMS, R.B., 2005. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. **Avian Pathol.** 34, 159–180.

WOO PCY., LAU SKP, CHAN K-M, FUNG AMY., TANG BSF., YUEN K-Y. *Clostridium* bacteraemia characterised by 16S ribosomal RNA gene sequencing. **Journal of Clinical Pathology**; 2005; 58: 301-307. doi: 10.1136/jcp.2004.022830.

CAPITULO 3 - CRESCIMENTO DE *Enterococcus* spp EM MEIOS DE CULTURA SELETIVO PARA CLOSTRIDIOS SULFITO REDUTORES E *Clostridium perfringens*

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A proteção dos alimentos inclui considerações sobre a qualidade microbiológica e segurança dos produtos disponíveis para o consumo público. Embora estas preocupações frequentemente envolvem microrganismos específicos que apresentam um imediato risco para a saúde pública, há um interesse crescente na microbiota animal que também podem impactar negativamente os consumidores (HAYES et al, 2003).

Os enterococos são microrganismos presente em mamíferos, aves, insetos e répteis e são comumente encontrados no solo, nas plantas e na água. Este microrganismo é particularmente difícil de eliminar pela capacidade de adaptação a estresse ambiental (GIRAFFA, 2002).

No ambiente clínico, os enterococos podem persistir por longos períodos de tempo em superfícies e podem ser facilmente transferidas entre a população de pacientes, muitos dos quais podem estar propensos a colonização (O'CONNELL and HUMPHREYS, 2000). As opções terapêuticas para tratamento infecções de enterococos são cada vez mais limitada (MURRAY, 1990).

Enterococos é o gênero que apresenta a maior preocupação quanto à resistência aos antibióticos glicopeptídeos (POETA 2005). Hayes et al (2003) descreve que preocupações de que o uso de antimicrobianos na produção de alimentos possa comprometer a eficácia dos medicamentos relacionados na clínica humana por meio da seleção de populações resistentes e sua posterior transferência através da cadeia alimentar (GORBACH, 2001).

Várias classes de antibióticos, incluindo os glicolípidos (bambermicina) polipeptídeos (bacitracina), ionóforos (salinomicina) e beta-lactâmicos (penicilina), são utilizadas na produção de frangos para a promoção de crescimento e prevenção de doenças infecciosas (GORBACH et.al., 2003; SINGER and HOFACRE, 2006).

A salinomicina e a bacitracina são amplamente utilizados em fase inicial, de crescimento e final para frangos de corte. Estes antibióticos melhoram a conversão alimentar e o ganho de peso, através da alteração da composição e atividade microbiana (COLLIER et al., 2003; KNARREBORG, 2002). Esta prática pode modificar a microbiota intestinal e criar uma pressão seletiva em favor de bactérias resistentes (AARESTRUP, 2000; SINGER and HOFACRE, 2006) em resposta ao aparecimento de resistência a antibióticos, vários países europeus restringiram ou proibiram o uso de antibióticos como promotores de crescimento (ANONYMOUS, 2007). De acordo com Apajalahti et al (2004), a identidade de apenas cerca de 10% das bactérias do trato gastrointestinal dos pintinhos é conhecida. Pesquisas devem ser desenvolvidas para estudar a distribuição de genes de resistência aos antibióticos entre bactérias comensais em frangos alimentados com promotores de crescimento (DIARRA et al 2007).

A avoparcina é uma molécula similar à vancomicina com os mesmos mecanismos de ação e de resistência. Devido ao aparecimento de resistência cruzada entre esses antibióticos, em abril de 1997, o consumo de avoparcina foi proibido na União Européia. Nos últimos anos, diversos trabalhos, na Europa, mostraram o aparecimento de estirpes de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) em amostras de diferentes origens: águas residuais, alimentos e fezes de animais saudáveis (TORRES et al., 1996; DEVRIESE et al., 1997).

Os animais podem, portanto, constituir um reservatório importante de estirpes VRE (BATES et al., 1994). Apesar de existir grande especificidade de hospedeiros, as bactérias e os genes de resistência podem passar dos animais para o homem e vice-versa. Desse modo, distintos genes de resistência podem ser trocados pelos microrganismos do intestino dos animais, ser adquiridos por microrganismos saprófitas do intestino humano e, posteriormente, transferidos a possíveis patógenos, que podem ser disseminados a outros indivíduos (POETA 2005).

Bogaard et al. (2002) isolaram VRE de frangos provenientes de explorações com histórico de uso de avoparcina, embora em menor percentagem. Apesar da avoparcina ter sido proibida em 1997, o fato de aparecerem animais com estirpes VRE pode ser explicado porque certos produtores continuam a adicionar o antibiótico nas rações (POETA 2005). Por outro lado, os genes presentes nos transposons que codificam a resistência podem ser encontrados no meio ambiente e persistirem durante anos (BUTAYE et al., 2002).

Nos enterococos humanos, os mais importantes são os tipos genéticos VanA e VanB, o primeiro encontrado em cerca de 60% e o segundo em 40% dos enterococos resistentes isolados nos Estados Unidos da América (TAVARES, 2000). O gene VanB, induzível, é localizado no cromossoma ou em transposons cromossômicos e é responsável pela resistência intermediária somente à vancomicina, mantendo a sensibilidade à teicoplanina. Os genes VanA são também induzíveis e localizam-se em transposons situados em plasmídios que eventualmente podem passar ao cromossoma, sendo responsáveis pela resistência elevada tanto à vancomicina como à teicoplanina. Os genes plasmidiais podem ser transferidos entre os enterococos humanos e de animais (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. faecium*) e para outras bactérias gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Streptococcus sanguis*), questionando-se se tais plasmídios poderão ser transmitidos para estafilococos (TAVARES, 2000).

A resistência bacteriana adquirida é descrita em praticamente todas as espécies de bactérias, conhecendo-se detalhes dos mecanismos de aquisição de resistência e os mecanismos moleculares da manifestação da resistência (CUNHA, 1998; JACOB, 1998; JACOB & ARCHER, 1991).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no microrganismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. A resistência pode ser originada em mutações que ocorrem no germe durante seu processo reprodutivo e resultam de erros de cópia na sequência de bases que formam o DNA cromossômico, responsáveis pelo código genético. A outra origem da resistência é a importação dos genes causadores do fenômeno, consistindo na resistência transferível (TAVARES, 2000).

Esta resistência faz-se através dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação e, frequentemente, envolve genes situados em plasmídios e transposons (CUNHA, 1998; LACEY, 1984; LEVY, 1982; MCDONALD, 1996; NOVICK, 1980; TRABULSI, 1973).

Recentemente, Descheemaeker et al. (1994), na Bélgica, estabeleceram alguma identidade de genes de resistência contra glicopeptídeos em *Enterococcus faecium* isolados em suínos e aves e no homem, indicando possibilidade de troca de marcadores genéticos de resistência entre animais e o homem. Também recentemente, Donnelly et al. (1996) e Holzman (1998) discutem diversos aspectos da resistência dos enterococos à vancomicina em países da Europa e Américas, relacionando-a à utilização da avoparcina na alimentação de animais. O mesmo fenômeno vem sendo observado no México com as fluoroquinolonas, utilizadas neste país para promover o crescimento de animais (HOLZMAN, 1998).

A resistência dos enterococos à ampicilina foi inicialmente descrita em 1983 por Murray e Mederski-Samoraj nos Estados Unidos da América, devendo-se à produção de beta-lactamases mediadas por plasmídios transferíveis. Posteriormente, foram descritas estirpes resistentes por modificações das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), sobretudo no *E. faecium*, tornando-se frequente o isolamento de enterococos ampicilina/aminoglicosídeo resistentes em infecções hospitalares (DE JONGE et al., 1996; HERMAN & GERDING, 1991; OSTER et al., 1990; RHINEHART et al., 1990).

Nos enterococos humanos, os mais importantes são os tipos genéticos VanA e VanB, o primeiro encontrado em cerca de 60% e o segundo em 40% dos enterococos resistentes isolados nos Estados Unidos da América (HUYCKE et al., 1998). O gene VanB, induzível, é localizado no cromossoma ou em transposons cromossômicos e é responsável pela resistência intermediária somente à vancomicina, mantendo a sensibilidade à teicoplanina. Os genes VanA são também induzíveis e localizam-se em transposons situados em plasmídios que eventualmente podem passar ao cromossoma, sendo responsáveis pela resistência elevada tanto à vancomicina como à teicoplanina. Os genes plasmidiais podem ser transferidos entre os enterococos humanos e de animais (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. faecium*) e para outras bactérias gram-positivas (*Listeria*

monocytogenes, *Streptococcus sanguis*), questionando-se se tais plasmídios poderão ser transmitidos para estafilococos (BOYCE et al., 1992; RICE et al., 1998; ROSSATO et al., 1995).

Os enterococos são cocos entéricos Gram-positivos, anaeróbicos facultativos (as espécies carboxílicas, como *E. cecorum* e *E. columbae* precisam de uma incubação num ambiente rico em CO₂), ovais, que podem apresentar-se numa “mancha” de microrganismos, aos pares ou sozinhos. São bactérias com uma grande capacidade de resistência ao meio e são capazes de se desenvolver em meios hipotônicos, hipertônicos, meios ácidos e alcalinos. Substâncias que, geralmente, inibem ou inativam outros organismos são toleradas pelos enterococos, como, por exemplo, a azida sódica e a bÍlis concentrada. Estas substâncias são utilizadas, inclusive, como agentes seletivos em meios a base de agar, dada a grande capacidade que estes organismos possuem de tolerância a grandes concentrações de sais biliares (FACKLAM & COLLINS, 1989; DEVRIESE *et al.*, 1993; HUYCKE *et al.*, 1998; CETINKAYA *et al.*, 2000; MANERO & BLANCH, 2002; JOHNSTON & JAYKUS, 2004; POETA, 2006).

O termo “*Enterococcus*” é aplicado à maioria de *streptococci* que cresce, entre 10 e 45°C, em meios com 6,5% de NaCl com pH de 9,6, que sobrevive durante 30 minutos a 60°C e que é capaz de decompor a esculina (SHERMAN, 1937; SCHLEIFER e KILPPER-BALZ, 1984; FACKLAM e CAREY, 1985; MURRAY, 1990; KLEIN, 2003).

No trato intestinal de Humanos e da maioria dos animais e, que por vezes, podem colonizar o sistema respiratório superior, o trato biliar, a cavidade oral e o trato vaginal (ZHANEL et al., 2001), apesar da percentagem de isolamento nestes locais não exceder os 20% (JETT et al., 1994; HUYCKE et al., 1998; Poeta, 2006). Os enterococos podem igualmente ser isolados de outras componentes naturais, tais como a vegetação, o solo e águas superficiais, possivelmente pela contaminação destas estruturas com excrementos de animais e/ou esgotos não tratados, persistindo e propagando-se devido à sua resistência intrínseca às adversidades do meio ambiente (JETT et al., 1994; TORRES et al., 1994; JOHNSTON and JAYKUS, 2004; POETA et al., 2005; POETA, 2006). Curiosamente, estes microrganismos podem ser encontrados em alguns alimentos e material

médico, mesmo após terem sido cumpridos rigorosos planos de limpeza e esterilização (SHEPARD e GILMORE, 2002).

Os enterococos foram reconhecidos como potencialmente patogênicos para os humanos desde o fim do século XIX. Provavelmente, a primeira vez que se descreveu, numa revista de medicina humana, uma doença causada por enterococos foi em 1912 e, posteriormente, em 1920, vários artigos foram publicados com esta temática (SHERMAN, 1937; MURRAY, 1990).

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo avaliar a microbiota de frangos de corte, abatidos em frigoríficos com inspeção federal, destinados à exportação para avaliar o grau de contaminação por *Clostridium perfringens* em raspados de mucosa intestinal, uma vez que este agente é responsável pela enterite necrótica (EN) nas granjas, e dependendo da contaminação, as carcaças poderão ser condenadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta das amostras e extração de DNA

Foram coletados aleatoriamente intestinos, no final da linha de abate de dois frigoríficos diferentes, um no Estado de São Paulo e o outro no Estado de Minas Gerais.

Os intestinos foram amarrados com tiras de barbante previamente esterilizadas e colocados individualmente em sacos plásticos, os quais foram acondicionados em caixas térmicas e encaminhados ao laboratório de bactérias anaeróbias do Departamento de Patologia da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para o processamento das amostras em um período de, no máximo, três horas. O

processamento foi de maneira individual, utilizando bandejas com papel alumínio previamente esterilizado, trocado a cada amostra.

Com o auxílio de um bisturi, cada intestino foi aberto e o conteúdo intestinal retirado. Com uma alça de platina raspou-se uma parte do intestino o qual foi semeado em placas de Petri contendo meio de cultura SPS. Após a semeadura dos raspados, acrescentou-se à placa outra camada de meio de cultura (método de plaqueamento “sanduíche”). As placas foram incubadas em condições de anaerobiose à 37°C durante 48 horas. Posteriormente, a cultura foi repicada para tubos contendo caldo BHI, os quais foram incubados por mais 18 horas em condições anaeróbias. Após a multiplicação das células, uma alíquota de 1 mL foi destinada à extração de DNA, segundo o protocolo de Marmur (1961).

3.2. Sequenciamento da região 16S rDNA

As colônias com as características morfológicas de *C. perfringens* que não amplificaram mediante utilização dos primers específicos para esta espécie, foram submetidas ao sequenciamento para elucidação do gênero. Para tanto, foi realizada amplificação de um fragmento da região 16S rDNA utilizando-se os primers 8F/907R (Nercessian et al., 2005). O programa de termociclagem foi o mesmo utilizado para a amplificação dos genes específicos de *C. perfringens*. O produto da amplificação foi então submetido à PCR de sequenciamento utilizando-se o Big Dye Terminator v3.1 Kit (Applied Biosystems) conforme instruções do fabricante.. Para a obtenção das sequências foi utilizado um sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems).

Os eletroferogramas obtidos foram visualizados e analisados por meio do software ABI Analysis Data Collection e convertidos em sequências de nucleotídeos por meio do software DNA Sequencing Analysis Software Versão 3.3. Os eletroferogramas gerados pelo processo de sequenciamento foram então submetidos ao pacote de programas Phred/Phrap/Consed (Ewing & Green, 1998; Green, 1996; Gordon et al., 1998), para verificação da sua qualidade, alinhamento e corte das extremidades. As sequências de DNA qualificadas foram então comparadas em banco de dados (GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) através da ferramenta BLAST (Altschull et al., 1997) para verificação da sua similaridade em relação às sequências já depositadas no banco de dados. O

dendrograma obtido pelo algoritmo de agrupamento Neighbor-Joining e as distâncias genéticas entre os isolados foram obtidas com o auxílio do software MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007).

Para a construção do dendrograma, as sequências de DNA obtidas no estudo e outras sequências do banco de dados foram alinhadas utilizando-se a ferramenta ClustalW (Thompson et al., 1994). Assim, as sequências de Enterococos do banco de dados (GenBank) incluídas nas análises foram: NR102790 *Enterococcus faecium*, DQ411814.1 *Enterococcus faecalis*, NR102793.1 *Enterococcus casseliflavus*, NR075022.1 *Enterococcus hirae*. Para constituir o grupo externo, foram acrescentadas duas sequências de bactérias Gram positivas: M59103.1 *C. perfringens* e M99704. *Lactobacillus acidophilus*.

Após o alinhamento das sequências, os dendrogramas foram construídos pelo método da distância, com o algoritmo de agrupamento neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) e modelo de substituição de nucleotídeos de Kimura-2-parameter (Kimura, 1980), por meio do software MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al., 2007). Para assegurar a confiabilidade do agrupamento, a avaliação da significância por bootstrap foi realizada com 2000 repetições (Felsenstein, 1985).

3.3 Hidrolise de esculina na presença de bile

Utilizou-se o agar bile-esculina (BBL) inclinado, sendo os tubos inoculados e incubados a 35°C por 18-24 horas. Um resultado positivo foi considerado quando houve o escurecimento do meio o que indicou a hidrólise da esculina na presença de 40% de bile.

3.4 Avaliação da multiplicação em caldo contendo cloreto de sódio (NaCl) a 6,5%

As amostras foram semeadas em caldo com 6,5% de NaCl. A acidificação do meio (variação da cor purpura para amarelo) indicava crescimento bacteriano e teste positivo.

3.5 Meio de cultura DRCM

Esse meio de cultura é seletivo para clostrídios em geral o qual o caldo fica preto mostrando se a amostra é positiva para clostrídio.

3.6 Teste de resistência a temperatura

Foram testados diferentes tempos (10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos) e temperaturas (50, 60, 70, 80, 90 e 100°C) de quatro cepas de campo diferentes de *Enterococcus* spp, confirmadas por sequenciamento e que cresceram como colônias sulfito redutoras no agar SPS.

4. RESULTADOS

A maioria dos isolados que apresentavam uma morfologia semelhante à de *C. perfringens*, quando coradas pelo Gram, observou diplococos pleomórficos que formavam cadeias curtas (figura 7).



Figura 7. Coloração de Gram das colônias apresentando diplococos pleomórficos.

Em um segundo teste, o meio de cultura foi trocado para observar como o microrganismo se apresentava, dessa forma foi semeado em Agar SPF com adição de emulsão de gema de ovo e o mesmo foi incubado a 43°C durante 48 horas, uma vez que o *C. perfringens* suportaria essas condições. Foi verificada novamente uma morfologia semelhante à citada anteriormente.

Um terceiro teste foi realizado utilizando choque térmico a 80°C durante 15 minutos nas amostras estoque que foram armazenadas a 4°C, uma vez que o Gram mostrava a presença de esporos. Este método visa eliminar os contaminantes, visto que somente os esporos são resistentes a tais condições de temperatura. A morfologia semelhante à citada anteriormente foi observada novamente e o sequenciamento da região 16S rDNA foi realizado a fim de se verificar o gênero bacteriano presente nessas culturas. Dentre as amostras sequenciadas, observou-se prevalência do gênero *Enterococcus* spp, das quais quatro amostras foram selecionadas para compor uma árvore genética (figura 8).

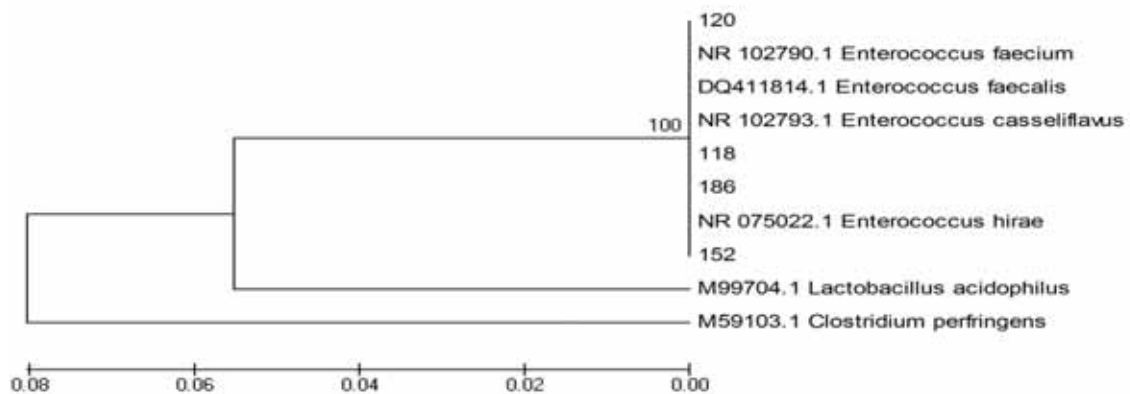


Figura 8. Agrupamento por Neighbour-joining das sequências de *Enterococcus* spp. obtidas no estudo e de sequências do banco de dados.

As amostras de *Enterococcus* spp. analisadas mostraram de 97 a 99% de homologia com sequências do banco de dados pertencentes às espécies *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus* e *E. hirae*, embora não seja possível identificar com precisão a espécie por meio do sequenciamento dessa região.

Devido à presença do *Enterococcus* spp nas amostras foram testados dois outros meios seletivos diferentes para conseguir isolar o *C. perfringens*, o TSC (com cicloserina) e o SPF (Yimedia®) e incubados a 46°C a fim de inibir o contaminante, porém os *Enterococcus* spp novamente foram isolados.

Para ativar os esporos de clostrídios foi dado um choque térmico a 80°C durante 10 minutos com esfriamento em gelo até 20°C (Ando, 1963) e além dos meios acima citados, foi cultivado em caldo DRCM (Merck®) o qual favorece o

crescimento de clostrídios em geral. O resultado foi o mesmo, apresentando colônias pretas, porém negativas para os genes de *C. perfringens* testados na PCR.

Após verificar que os *Enterococcus* spp estão resistindo altas temperaturas (choque térmico), foi feito um teste com diferentes temperaturas em dez cepas de *Enterococcus* spp isolados das amostras de raspado das aves e identificadas pelo sequenciamento, conforme a tabela 1.

Tabela 1. Teste de resistência a diferentes tempos e temperaturas de quatro cepas de campo de *Enterococcus* spp, confirmados por sequenciamento e que cresceram como colônias sulfito redutoras no agar SPS.

CEPAS	TEMPO	50°C	60°C	70°C	80°C	90°C	100°C
Cepas 1-2-3-4	10 min	++++	++++	++++	++++	++	+
	20 min	++++	++++	++++	++	++	+
	30 min	++++	++++	++++	++	+	
	40 min	++++	++++	++++	++	+	
	50 min	++++	++++	++++	++	+	
	60 min	++++	++++	++++	++		

+ Cepas de campo isoladas durante o experimento e confirmadas por sequenciamento

As amostras positivas para a Hidrólise da esculina na presença de bile e a avaliação do crescimento em caldo contendo cloreto de sódio (NaCl) a 6,5% (Figura 9) foram passados os primers de resistência a vancomicina, vanA e vanB (Figura 10).

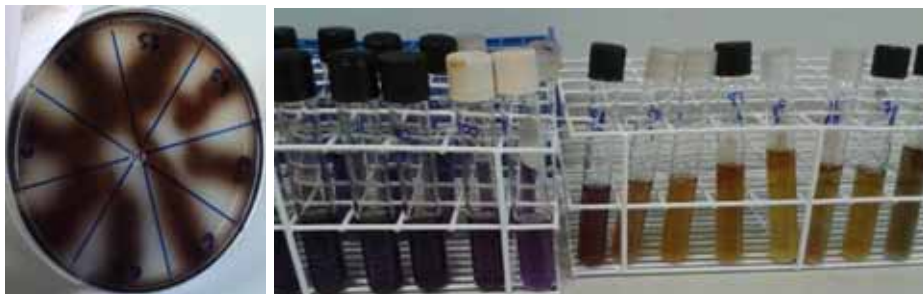


Figura 9. Prova do crescimento em caldo contendo cloreto de sódio (NaCl) a 6,5% e da hidrólise da esculina na presença de bile.

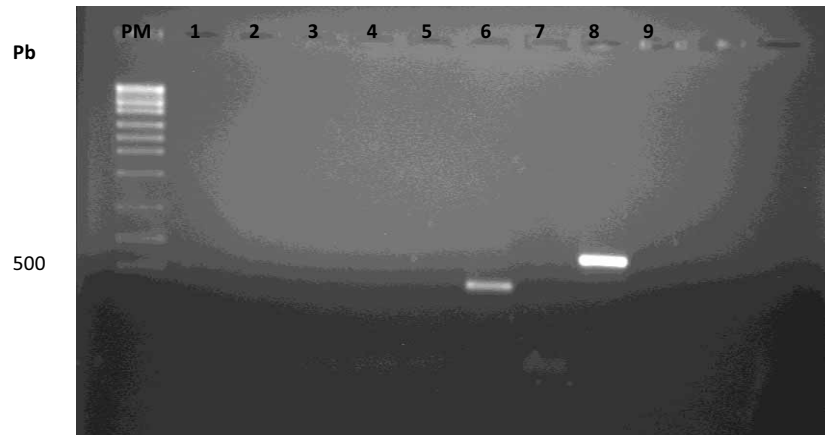


Figura 10. Produto da amplificação dos genes de resistência de *Enterococcus* spp, referentes aos padrões dos genes VanA (399pb), linha 6 e VanB (589pb), linha 8. Linhas 1-5: Amostras negativas para os genes VanA e VanB. Linhas 7 e 9: controle negativo (mix sem DNA) para o gene VanA (CNA) e VanB (CNB). PM: padrão de tamanho molecular 1kb DNA Ladder.

5. DISCUSSÃO

A presença de microrganismos resistentes em animais produtores de alimentos e a possível contaminação de sua carcaça são aspectos importantes em termos de sanidade animal e de saúde pública (MORENO et al., 2006, XAVIER, et al., 2008).

Os Clostrídios encontrados em conteúdo intestinal, na maioria das vezes são transitórios, ou seja, podem ser encontradas na forma esporulada ou mesmo como células bacterianas, porém dessa maneira, eles precisam estar em quantidades significativas para causar algum sintoma ou então o animal precisa estar debilitado.

Em raspados intestinais há relatos de *C. perfringens* isolados quando ele está causando sintomas no intestino e não como microbiota residente.

Quando se trata de uma amostra clínica é muito mais fácil o isolamento, pois o microrganismo que causa a infecção prevalece, tornando mais fácil sua

identificação. Já amostras de microbiotas não são simples como se imagina uma vez que os microrganismos presentes coexistem ali da mesma forma.

Santos (2008) relatou que Engström et al. (2003), Nauerby et al. (2003), Johansson et al. (2004), Heikinheimo & Korkeala (2005) e Gholamiandekhordi et al. (2006) detectaram por PCR somente o gene *cpa* de amostras de frangos de corte entre outros, sugerindo que o agente causador da Enterite necrotica é o *C. perfringens* sorotipo A. Trabalhos condizentes a este.

Gomes, et al (2008) isolaram 171 *C. perfringens* de jejuno e íleo de frangos de corte provenientes de um frigorífico da região de Pará de Minas-MG. Foram isolados 62 de 125 amostras de conteúdo luminal de jejunos e em 109 de igual número de íleos dos frangos de corte. A PCR múltiplex mostrou que das 62 estirpes isoladas do jejuno, foram obtidos 42 do tipo A, 17 do tipo C, 1 do tipo D e nenhum do tipo B. Das 109 amostras isolados do íleo foram obtidos 62 do tipo A, 1 do tipo B, 38 do tipo C e 1 do tipo D. Cinco das 171 amostras isoladas não foram tipificadas.

A detecção de tipos e subtipos de toxinas de *C. perfringens* crítica para uma melhor compreensão da epidemiologia das infecções por este agente e pode ser útil no desenvolvimento de medidas preventivas eficazes (BAUMS, 2004).

O Sequenciamento da região 16S rDNA revelou que 17 amostras obteve esses genes com 97% de similaridade com os nucleotídeos de *Clostridium* sp, indicando também outras espécies que não *C. perfringens*. As 22 amostras restantes foram identificadas como não formador de esporos, mas eram bastonetes anaeróbios Gram-positivos (WOO, et al 2005).

O BLAST das sequências de DNA no GenBank apresentou, em sua maioria, Evalue zero, indicando que as mesmas alinharam-se corretamente com as sequências do banco de dados. As cepas apresentaram de 97% a 99% de similaridade com a espécie de *Enterococcus* spp.

A coloração de Gram (figura 7) apresentou uma morfologia pleomórfica, o que não condiz com a de *Enterococcus* spp, sendo muito semelhante a bastonetes Gram positivo. Por esse motivo surgiu à curiosidade de verificar qual microrganismo correspondente ao bastonete presente, e para surpresa, o sequenciamento mostrou o gênero *Enterococcus* spp.

Possivelmente o *Enterococcus* spp não estava em um meio de cultura favorável para seu crescimento o que levou ao pleomorfismo. Visto que se fosse semeado em agar sangue ou no meio próprio para *Enterococcus* spp, a morfologia seria de diplococos.

Enterococos são patógenos oportunistas que habitam a microbiota do homem e de outros animais, incluindo animais de companhia, produtores de alimentos e silvestres (MCDONALD et al., 1997; AARESTRUP et al., 2002) podem causar surtos de infecção hospitalar de difícil controle e disseminar clones epidêmicos (TITZE-DE-ALMEIDA et al., 2006).

Sabe-se que os *Enterococcus* spp. são propensos a sofrer seleção a cada administração de antimicrobiano, levando à formação de um reservatório animal de *Enterococcus* spp. resistentes, que podem infectar os seres humanos tanto por contato direto com animais como através da ingestão de alimentos de origem animal (KASZANYITZKY et al. 2007, OLIVEIRA et al. 2010, VIGNAROLI et al. 2011).

Santos et al. (2009) descreve que 52,5% das amostras de alimentos analisadas por eles foram positivas para os enterococos, com maior prevalência em queijos (83,3%) e produtos carneos (60,0%). As espécies mais comuns encontrados nestes tipos de produtos alimentares foram *E. faecium* e *E. faecalis*, enquanto *E. casseliflavus* prevaleceu em vegetais. A prevalência destas duas espécies em alimentos também tem sido reportada em outros estudos (PAVIA et al, 2000, GELSOMINO et al, 2002; SAAVEDRA et al, 2003). Uma maior prevalência de enterococos em alimentos processados pode ser atribuída à sua resistência ao calor, salinidade extrema e condições adversas durante o amadurecimento de alimentos fermentados (GIRAFFA, 2002; FRANZ et al, 2003;. GIRAFFA, 2003;. JURKOVIC et al, 2006). Para aplicações de enterococos em alimentos, a resistência aos antibióticos é uma preocupação especial, pois os determinantes genéticos de resistência destas bactérias são geralmente localizados em plasmídeos ou transposons conjugativos, propensas a troca de material genético (HASMAN et al, 2005; ZANELLA et al., 2006). Multi-resistência tem sido mais comumente relatados por *E. faecalis*, devido à sua notória capacidade de adquirir e transferir genes de resistência a antibióticos (C-ITAK et al, 2004; MCBRIDE et al, 2007).

Campos, et al (2013), relata que das 50 cepas de *Enterococcus* spp. isolados, 21 foram identificadas como *E. faecalis* e uma como *E. faecium*, sendo que as outras 28 foram consideradas como *Enterococcus* spp. Resultados similares foram verificados por Fracalanza et al. (2007), em que detectaram 85 cepas de *E. faecalis* e cinco de *E. faecium* em amostras de carne de frangos do Rio de Janeiro. Riboldi et al. (2009) detectaram 27 cepas de *E. faecalis*, 23 de *E. faecium* e seis de *Enterococcus* spp. isolados de diversos alimentos na região Sul do Brasil. Na pesquisa do PREBAF (BRASIL 2008), foi verificada a presença de 61,4% de *E. faecalis* e 2,2% de *E. faecium*.

Chan et al. (2008), também relataram *Enterococcus* spp. em amostras de fezes de frangos e amostras de água provenientes de criação de frangos, em Kelantan na Malásia, observaram 47 cepas de *E. faecalis* e 22 de *E. faecium*.

A demonstração da resistência a temperaturas de até 100°C durante 1 hora, algo totalmente inusitado já que até então Ogier e Serror, 2008, Sood et al., 2008, Fisher e Phillips, 2009 relataram que organismos desse gênero só seriam capazes de sobreviver a 60°C durante 30 minutos.

Murray, 1990, Facklam *et al.*, 2002, Giraffa, 2003, Foulquié Moreno *et al.*, 2006, Ogier e Serror, 2008, Fisher e Phillips, 2009 descrevem que os *Enterococcus* spp são bactérias anaeróbias facultativas, catalase negativa, oxidase negativa, hidrolisam a esculina na presença de 40% de sais biliares e realizam fermentação láctica. A temperatura ótima de crescimento situa-se entre 35°C e 37°C, no entanto podem crescer a temperaturas entre 10 e 45°C.

Giraffa (2002) e Saavedra et al. (2003) relataram que as estirpes de enterococos isolados de alimento eram resistentes aos antibióticos. Dessa forma, foi realizada a prova da esculina e a avaliação do crescimento em caldo contendo cloreto de sódio (NaCl) a 6,5%. As cepas (60 isolados) que foram positivas para essas duas provas foram submetidas a PCR para avaliação do gene de resistência a Vancomicina A e B (genes *vanA* e *VanB*). Entretanto, nenhuma das amostras foi positiva para os genes de resistência.

6. CONCLUSÃO

A PCR multiplex provou ser uma técnica muito eficaz e rápida para o diagnóstico, auxiliando no processo de triagem antes do isolamento das cepas de *C. perfringens*, além de analisar os cinco tipos de uma só vez.

Algumas cepas de *Enterococcus* spp estão sobrevivendo em condições de temperaturas que só esporulados suportariam.

A presença de *Enterococcus* spp requer atenção uma vez que ele é resistente ao calor e principalmente propensos a sofrer seleção quando administrados antimicrobianos.

7. REFERENCIAS

AARESTRUP, F. M. 2000. Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark. **APMIS Suppl.** 101:1–48.

ANONYMOUS, 2007. Antimicrobial resistance: implication for food system. Institute of Food Technologists Expert Panel. Comp. **Rev. Food Sci. Safety** 5:71–137.

APAJALAHTI, J., A. KETTUNEN, AND H. GRAHAM. 2004. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to chicken. **World's Poult. Sci. J.** 60:223–232.

BATES, E.M.; JORDENS, J.Z.; GRIFFITS, D.T. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin resistant enterococcal infections in man. **J. Antimicrobiol. Chemother.**, v.34, p.507-516, 1994.

BOOGAARD, A.E.; WILLEMS, R.; LONDON, N. et al. Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughters. **Antimicrobiol. Agents Chemother.**, v.49, p.497-505, 2002.

BUTAYE, P., DEVRIESE, L.A. and HAESEBROUCK, F. 2003. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. **Clin. Microbiol. Rev.** 16:175–188.

COLLIER, C. T., J. D. VAN DER KLIS, B. DEPLANCKE, D. B. ANDERSON, and H. R. GASKINS. 2003. Effects of tylosin on bacterial mucolysis, *Clostridium perfringens* colonization, and intestinal barrier function in a chick model of necrotic enteritis. **Antimicrob. Agents Chemother.** 47:3311–3317.

DEVRIESE, L.A., VAN DE KERCKHOVE, I, A., KILPPER-BALZ, R. and SCHLEIFER, K.H.; **International Journal of Systematic Bacteriology**, July 1987, p. 257-259, Vol. 37, No. 3

DIARRA et al 2007 - Impact of Feed Supplementation with Antimicrobial Agents on Growth Performance of Broiler Chickens, *Clostridium perfringens* and Enterococcus Counts, and Antibiotic Resistance Phenotypes and Distribution of Antimicrobial Resistance Determinants in Escherichia coli Isolates. **Applied and environmental microbiology**. Oct. 2007, p. 6566–6576 Vol. 73, No. 20.

GIRAFFA, G. 2002. Enterococci from foods. **FEMS Microbiol. Rev.** 26:163–171.

GORBACH, S. L. 2001. Antimicrobial use in animal feed—time to stop. **N. Engl. J. Med.** 345:1202–1203.

KNARREBORG, A., M. A. SIMON, R. M. ENGBERG, B. B. JENSEN, AND G. W. TANNOCK. 2002. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. **Appl. Environ. Microbiol.** 68:5918–5924.

HAYES et al. 2003 - Prevalence and antimicrobial resistance of *enterococcus* species isolated from retail meats. **Applied and Environmental Microbiology**, dec. 2003, p. 7153–7160 vol. 69.

O'CONNELL, N. H., AND H. HUMPHREYS. 2000. Intensive care unit design and environmental factors in the acquisition of infection. **J. Hosp. Infect.** 45:255–262.

POETA, P., ANTUNES, T., RODRIGUES, J. 2005. *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina isolados de fezes de frangos, pombos, gamos e ratos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.3, p.412-414.

SINGER, R. S., AND C. L. HOFACRE. 2006. Potential impacts of antibiotic use in poultry production. **Avian Dis.** 50:161–172.

TAVARES W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 33:281-301, mai-jun, 2000.

TORRES, C.; TENÓRIO, M.; ZARAZAGA, M. et al. Impacto medioambiental del consumo de antibióticos en el desarrollo de mecanismos de resistência. **Zubía**, n.8, p.275-286, 1996.