

***Clostridium perfringens* e a enterite necrótica em frangos: principais fatores de virulência, genéticos e moleculares**

Clostridium perfringens and necrotic enteritis in poultry: virulence, genetic and molecular factors

Luis Antonio Llanco ALBORNOZ¹; Viviane NAKANO¹; Mario Julio AVILA-CAMPOS¹

¹ Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Anaeróbios, São Paulo – SP, Brasil

Resumo

Clostridium perfringens é o causador da enterite necrótica que afeta a produção de frangos de corte no mundo todo. Essa bactéria produz diversas toxinas e causa lesões no intestino, tendo como consequências a elevada mortalidade e perdas econômicas devido à baixa produtividade. Nesta revisão são apresentados os principais fatores de virulência, a susceptibilidade aos antimicrobianos e a diversidade genética de *C. perfringens* isolados de frangos com enterite necrótica.

Palavras-chave: *Clostridium perfringens*. Enterite necrótica. Fatores de virulência. Susceptibilidade aos antimicrobianos.

Abstract

Clostridium perfringens cause necrotic enteritis affecting the poultry production worldwide. This bacterium produces various toxins and causes lesions in the intestine producing high mortality and economic loss due to the low productivity. In this review, the major virulence factors, antimicrobial susceptibility and genetic diversity of *C. perfringens* from chickens with necrotic enteritis are showed.

Keywords: *Clostridium perfringens*. Necrotic enteritis. Virulence factors. Antimicrobial susceptibility.

Introdução

Dentre os micro-organismos anaeróbios que colonizam o trato intestinal do homem e dos animais, destaca-se o gênero *Clostridium* constituído por aproximadamente 150 espécies (GARRITY et al., 2007). Bactérias desse gênero produzem esporos e fermentam diversos compostos orgânicos, participam ativamente da degradação final de alguns nutrientes no ecossistema gastrointestinal, assim como do processo de renovação da biomassa quando habitam solos e esgotos, cumprindo um importante papel ecológico (SONGER, 1996).

A maioria das espécies do gênero *Clostridium* é comensal, entretanto, aproximadamente 10% delas possuem elevada patogenicidade, devido à produção de potentes toxinas (POPOF; BOUVET, 2013). *Clostridium perfringens* é a mais isolada de casos de enterites, abscessos e toxemias, entre outros; sendo o principal responsável pela gangrena gasosa, intoxicações alimentares e diarreias associadas ao uso de antibió-

ticos em humanos (ROOD et al., 1997). Também têm sido isoladas de doenças inflamatórias crônicas, como colite ulcerativa e doença de Crohn, e mais recentemente, em casos de câncer de cólon (PRUTEANU et al., 2011; PRUTEANU; SHANAHAN, 2013).

O *C. perfringens* também causa a enterite necrótica (EN), morte súbita na forma aguda e baixo rendimento produtivo na forma subclínica em aves, ocasionando enormes perdas econômicas em países exportadores de carne de aves, principalmente frangos (IMMERSEL et al., 2009).

Clostridium perfringens é capaz de produzir mais de quinze toxinas que se constituem os principais fatores

Correspondência para:

Mario Julio Avila-Campos
Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas,
Departamento de Microbiologia, Laboratório de Anaeróbios
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – sala 242 – Cidade Universitária
CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brasil
e-mail: mariojac@usp.br

Recebido: 06/09/2013
Aprovado: 12/06/2014

de virulência, sendo α , β , ϵ e ι , consideradas letais e utilizadas para classificar essa espécie em cinco toxintipos: A, B, C, D, e E, de importância na medicina humana e veterinária (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999; SONGER, 1996). Na tabela 1 são apresentadas as características dos toxintipos de *C. perfringens*.

Tabela 1 – Características dos toxintipos de *Clostridium perfringens*

Tipos	Toxinas	Genes	Propriedades
A	alfa	<i>Plc</i>	hemólise (fosfolipase C)
B	alfa, beta, épsilon	<i>plc, cpb, etx</i>	hemólise, necrotizante, permease
C	alfa, beta	<i>plc, cpb</i>	hemólise, necrotizante
D	alfa, épsilon	<i>plc, etx</i>	hemólise, permease
E	alfa, iota	<i>plc, iap</i>	hemólise, necrotizante

A toxina α é o fator de virulência mais estudado devido ao seu rápido efeito letal em animais de experimentação, à ampla distribuição de seus receptores e substratos na superfície de células eucarióticas, e à sua relação com doenças severas (GOÑI; MONTES; ALONSO, 2012). O gene *plc* codifica a produção dessa toxina, localizado próximo da origem de replicação do genoma, sendo considerado de origem cromossomal (MYERS et al., 2006).

Na EN ocorre a degradação das células eucarióticas intestinais, pela toxina α (fosfolipase tipo C), e a inativação da toxina α diminui a severidade das lesões, o que sugere a participação de outros fatores envolvidos neste processo infeccioso (KEYBURN et al., 2006).

Em 2008, Keyburn et al. (2008) relataram a presença de uma nova toxina, a NetB, de origem plasmidial e com atividade de formação de poros na membrana de células eucarióticas. A toxina NetB é considerada a mais recentemente descrita em *C. perfringens*, e também é sugerida sua participação nas lesões iniciais da EN. Lepp et al. (2010), analisando a origem plasmidial do gene *netB*, identificaram três *loci* de patogenicidade: *locus 1*, *locus 2* e *locus 3*. Os *loci 1* e *3* são de origem plasmidial, o gene *netB* encontra-se localizado no *locus 1*. O *locus 2* é de origem cromossomal que ao lado do *locus 3* (plasmidial) carregam genes relacionados

com o metabolismo bacteriano e a produção de adesinas. Esses três *loci* são observados apenas em estirpes patogênicas.

A prevalência do gene *netB* em *C. perfringens* de diferentes origens é baixa e é mais frequentemente observada em isolados bacterianos de animais sadios do que em doentes. Isto sugere que a presença da toxina NetB não seja suficiente para iniciar o processo infeccioso (ABILDGAARD et al., 2010).

A toxina TpeL é classificada como membro da família das Grandes Citotoxinas Clostridiais (LCT), ao lado das toxinas A e B de *C. difficile*, toxina letal de *C. sporogenes*, e toxina alfa de *C. novyi*. Essas toxinas LCT são importantes fatores de virulência envolvidos em doenças entéricas de interesse médico-veterinário (AKTORIES et al., 2012; BUSCH; AKTORIES, 2000).

A toxina TpeL tem atividade glicosilante nas proteínas Rho-Ras GTPases, modifica a estrutura da actina e afeta a fisiologia das células epiteliais, particularmente, das células Vero (rim de macaco verde) e atua no agravamento das lesões, aumentando a mortalidade por EN em animais de experimentação (CARTER; ROOD; LYRAS, 2012; COURSDON et al., 2012; NAGAHAMA et al., 2011).

O processo de adesão ao epitélio intestinal é a etapa mais importante para a colonização bacteriana, que pode ser mediada por estruturas fimbriais e não fimbriais (PARKER; SPERANDIO, 2009). *C. perfringens* tem a capacidade de produzir biofilmes, sendo favorecido pela presença de pili tipo IV e pela produção de sialidases (McCLANE, 2010).

A EN é considerada um processo infeccioso que causa perdas econômicas de aproximadamente U\$ 2 bilhões de dólares por ano, no mundo todo, e é causada pelas toxinas produzidas por *C. perfringens*. Alguns antimicrobianos vêm sendo utilizados como promotores de crescimento de aves, trazendo como consequência o surgimento de bactérias resistentes às múltiplas drogas antimicrobianas, o que dificulta o tratamento de vários processos infecciosos de interesse na medicina veterinária (IMMERSEEL et al., 2009).

A presença de estirpes bacterianas multirresistentes constitui um sério risco para a saúde humana, uma vez que esses animais são utilizados na alimentação do homem (KATHER; MARKS; FOLEY, 2006).

A susceptibilidade de *C. perfringens* aos antimicrobianos ainda não foi suficientemente investigada, principalmente no que se refere à avaliação comparativa dos perfis de resistência entre localidades e granjas de criação avícola (IMMERSEEL et al., 2004). Drogas como penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, bacitracina e ionóforos vêm sendo utilizadas para o tratamento e prevenção da EN em países como Índia, Argentina e Brasil. Entretanto, na atualidade, nos Estados Unidos, Canadá e países europeus, o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento é proibido.

Microbiota residente intestinal aviária

A microbiota residente que coloniza o TGI de aves é composta por diversos gêneros bacterianos, facultativos e anaeróbios estritos, tais como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium* e *Escherichia*. Assim, a microbiota residente exerce influência direta na fisiologia intestinal aumentando a velocidade de trânsito alimentar, regulando a atividade enzimática e a renovação dos enterócitos, além de favorecer a absorção de água e eletrólitos, entre outros componentes (SAVAGE, 1986).

Os produtos metabólicos produzidos pelas bactérias anaeróbias no intestino das aves, como ácido butírico, colaboram com a resistência das células intestinais às agressões alimentares e bacterianas, preservando a integridade e funcionalidade do cólon (ARVANS et al., 2005). Em frangos, foi demonstrado que a microbiota residente em equilíbrio, principalmente na região do ceco, representa um requisito importante para a proteção contra o desenvolvimento de infecções bacterianas, bem como produz uma intensa fermentação de nutrientes que não contém amido, o que favorece a absorção alimentar (ANGELAKIS; RAOULT, 2010).

A microbiota intestinal do frango torna-se instável devido às alterações causadas pela idade, dieta, antimicrobianos, e pelos movimentos retrógrados intestinais. Após a eclosão dos ovos, os pintinhos apresentam seu TGI livre de micro-organismos, mas nas próximas duas a quatro horas algumas bactérias como *Streptococcus faecalis* e *E. coli* tornam-se prevalentes. Após a primeira semana, espécies de *Lactobacillus* predominam no intestino delgado; enquanto no ceco ocorre a colonização de anaeróbios estritos gram negativos, como *Bacteroides* e *Fusobacterium*, e gram positivos, como *Bifidobacterium*, *Eubacterium* e *Clostridium* (MEAD; ADAMS, 1975; SHANE et al., 1984). No frango adulto, a microbiota intestinal é composta por aproximadamente 10^{13} bactérias diferentes, sendo que os micro-organismos anaeróbios excedem aos aeróbios por pelo menos em 10^2 bactérias/gramas de fezes (SALANITRO et al., 1978).

As técnicas de cultivo bacteriano têm sido pouco eficazes para determinar as alterações que podem ocorrer na microbiota intestinal dos frangos. Entretanto, com o surgimento das técnicas moleculares tornou-se possível a melhor avaliação da diversidade, distribuição, filogenia e sucessão desses importantes micro-organismos que habitam o ecossistema intestinal de aves (ANGELAKIS; RAOULT, 2010; STANLEY et al., 2012).

Espécies do gênero *Clostridium* estão entre as primeiras bactérias a colonizar o ceco de frangos (LEV; BRIGGS, 1956); entretanto, no intestino delgado sua presença é baixa, devido ao pH ácido e à elevada concentração de O_2 , que não permitem o seu crescimento intenso (ADAMS, 2006). Assim, *C. perfringens* como parte da microbiota intestinal residente de frangos é observado em números inferiores a 10^2 bactérias/g de fezes (PEDERSEN et al., 2003).

Clostridium perfringens

Aspectos taxonômicos, ecológicos e fisiológicos

Classicamente, o gênero *Clostridium* é constituído por micro-organismos anaeróbios gram positivos, es-

porulados, e que não reduzem sulfato. Com as técnicas de sequenciamento de DNA, foram reclassificados antigos membros em outros gêneros e identificadas novas espécies (DWORKIN et al., 2006).

Clostridium perfringens foi isolado, pela primeira vez, por Welch e Nuttall (1892) de tecido necrótico de cadáver humano em estado de decomposição, sendo denominado inicialmente como *Bacillus aerogenes capsulatus*. Posteriormente, outras denominações foram atribuídas, tais como: *Bacillus phlegmones emphysematosae* (FRAENKEL, 1893), *Bacillus enteritidis sporogenes* (KLEIN, 1895), *Bacillus perfringens* (VEILLON; ZUBER, 1898), *Bacillus welchii* (MIGULA, 1900), *Bacillus saccharobutyricus immobilis* (SCHATTENFROH; GRASSBERGER, 1900), *Welchillus aerogenes* (HELLER, 1922) e *Welchia perfringens* (PRÉVOT, 1938). Finalmente, na 5ª edição do Manual de Bergey's (1939), foi designada oficialmente como *C. perfringens* (SKERMAN; MCGOWAN; SNEATH, 1980).

No último Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey (VOS et al., 2009), *C. perfringens* está classificado como pertencente ao Filo *Firmicutes* (com baixo conteúdo de G-C), Classe *Clostridia*, Ordem *Clostridiales*, Família *Clostridiaceae* e Gênero *Clostridium* (GARRITY et al., 2007). Análises de hibridização e sequenciamento de DNA (COLLINS et al., 1994; STACKEBRANDT et al., 1999) indicaram que a maioria das espécies do gênero *Clostridium* possui elevada diversidade genotípica e não representam um táxon uniforme.

Em termos de importância na clínica médica, *C. perfringens* está subdividido em 5 toxintipos (A-E), baseado na produção de quatro principais toxinas letais (α , β , ϵ , ι), que determinam o potencial patogênico de cada isolado (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999; SMEDLEY et al., 2004). Para se estabelecerem em um determinado nicho ecológico, as bactérias secretam peptídeos com atividade antimicrobiana, denominados bacteriocinas, que têm limitado espectro de atividade e afetam consideravelmente a composição

de algumas comunidades bacterianas que habitam o intestino (CZÁRÁN; HOEKSTRA; PAGIE, 2002; GILLOR; ETZION; RILEY, 2008).

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

Clostridium perfringens é caracterizado pela formação de dupla zona de hemólise em ágar sangue de carneiro, coelho ou humano, devido à ação das toxinas teta (Φ) e alfa (α); à atividade lecitinase em ágar gema de ovo, e produzir a fermentação tormentosa no leite. Esse micro-organismo é resistente à bile (20%) e NaCl (2%), e apresenta temperatura ótima de crescimento variando de 20°C a 50°C; suportando também variações de pH entre 5,5 e 8,0. É capaz de fermentar diferentes açúcares, aminoácidos e ácidos nucleicos, tendo como produtos finais do metabolismo a produção de H₂, CO₂, ácidos graxos de baixo peso molecular (principalmente ácido acético e butírico) e álcool (GARRITY et al., 2007).

Lepp et al. (2013) identificaram genes envolvidos na aquisição de ferro e no metabolismo de alguns carboidratos, que podem conferir vantagens na capacidade patogênica de *C. perfringens* para causar doenças. Quanto à capacidade de esporular, é dificilmente observado “in vitro” precisando de meios de cultivo suplementados com amido, dextrina, carbono ativado, tripticaseína e sais, como Na₂HPO₄-7H₂O para estimular a formação de esporos em quantidades significativas (DUNCAN; STRONG, 1968). O papel que os esporos cumprem nas intoxicações alimentares está

bem elucidado, mas isso não é observado em doenças que afetam aves, como a enterite necrótica.

Aspectos genéticos

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

Nesse genoma são observados genes que participam da produção de enzimas importantes na fermentação anaeróbia, tais como *pgi* (glicose-6-fosfato isomerase), *fba* (frutose-1,6-bisfosfato aldolase), *gap* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *eno* (enolase), *pykA* (piruvato kinase), *ldh* (L-lactato desidrogenase) e *pfo* (piruvato ferredoxina oxidoreductase), entre outros. Entretanto, não são observados genes que participam da biossíntese de aminoácidos, tais como histidina (*hisABDFGHI*), leucina (*leuABCD, thrC*), arginina (*argCJ*), glicina (*glnA*), triptofano (*trpABCDF*) e isoleucina-valina (*ilvDN*). Devido à falta desses genes, *C. perfringens* utiliza proteínas transportadoras de arginina (ArgW), peptídeos transportadores de carbono durante a escassez (CstA) para a captação de ferro iônico (FeoB), transportador/captador de vitaminas (VUT ou ECF) e exportador de treonina/serina (Thre). Também este micro-organismo pode ter seu crescimento afetado na ausência desses aminoácidos, e é sugerido que ao produzir a lise das células eucarióticas haja a consequente liberação dos aminoácidos necessários para o seu crescimento (ACINAS et al., 2004).

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

Patogenicidade e virulência de *Clostridium perfringens*

Os mecanismos de virulência de *C. perfringens* estão relacionados principalmente à produção de potentes toxinas e enzimas codificadas por genes localizados no cromossomo ou em plasmídios (SAWIRES; SONGER, 2006). Assim, *C. perfringens* produz mais de quinze toxinas que podem causar lesões necróticas na parede intestinal, alterações nos rins, destruir o tecido muscular e danificar as células nervosas, que podem levar o hospedeiro à morte (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999). Na tabela 2, são relacionadas algumas características fenotípicas e genotípicas de *C. perfringens* isolados de frangos com EN.

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

A toxina α tem a capacidade de causar hemólise intravascular, aumentar a permeabilidade capilar e ativar a agregação plaquetária, assim como diminuir as contrações cardíacas (SAKURAI; NAGAHAMA; ODA, 2004; TITBALL; NAYLOR; BASAK, 1999). A produção dessa toxina é considerada indutiva durante a fase de crescimento exponencial, e sua produção é um importante requisito para o desenvolvimento da EN, pela sua associação com a severidade das lesões (SI et al., 2007).

A toxina NetB, constituída por 370 aminoácidos, apresenta o peso molecular de 33 kDa e caracteriza-se por formar poros na membrana celular, entretanto, sua mera presença no ecossistema intestinal não garante o desenvolvimento da EN (ABILDGAARD et al., 2010).

Tabela 2 – Algumas características fenotípicas e genotípicas de *C. perfringens* isolados de frangos com enterite necrótica (LLANCO, 2014)

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

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

A toxina TpeL, inicialmente detectada em *C. perfringens* tipo C de origem suína, é letal para camundongos e produz alterações citotóxicas em células Vero (NAGA-HAMA et al., 2011). Essa toxina também é produzida durante o processo de esporulação, da mesma forma que ocorre com a enterotoxina (PAREDES-SABJA; SARKER; SARKER, 2011). A toxina TpeL (PM = 191 kDa) apresenta conformação DXD com triptofano em posições conservadas, essenciais para a atividade glicosil-transferase (GUTTENBERG et al., 2012; NAGA-HAMA et al., 2011). Essa toxina também causa citotoxicidade e apoptose em células epiteliais.

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

Outras toxinas produzidas por *C. perfringens* são consideradas de importância na patogênese de di-

versos processos infecciosos em animais. A toxina β parece estar associada a processos de EN; enquanto a β 2 tem uma predisposição para agravar processos infecciosos em suínos (HERHOLZ et al., 1999).

A toxina iota frequentemente detectada em processos toxêmicos, produz alterações na morfologia celular e bloqueia a ativação de leucócitos (AKTORIES et al., 2012). Essa toxina tem dois componentes que servem de ligação ao receptor celular, permitindo a transposição do outro componente que possui o sítio ativo, e atuam desorganizando a actina (TSURUMURA et al., 2013).

A enterotoxina (CPE) produz diarreias em diferentes animais, incluindo o homem (STRONG; DUNCAN; PERNA, 1971). Sua ação é caracterizada pela formação de poros na membrana celular, e o gene *cpe* está localizado em transposon conjugativo (IS 1470) (BRYNESTAD; SYNSTAD; GRANUM, 1997). Na figura 1, estão representadas as principais toxinas produzidas pelo *C. perfringens* e seus mecanismos de ação.

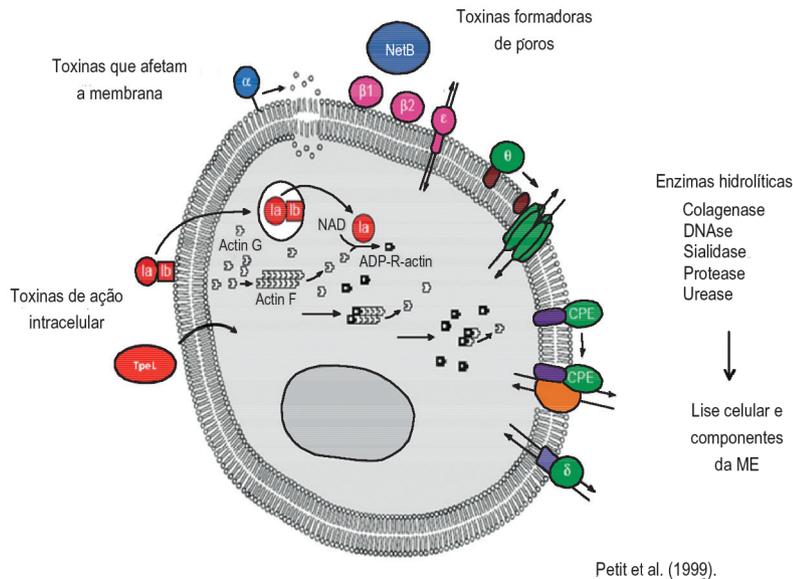


Figura 1 – Mecanismo de ação das principais toxinas de *C. perfringens*
 Fonte: (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999)

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

Sialidasas ou neuraminidasas são enzimas que hidrolisam as ligações α -(2 \rightarrow 3)-, α -(2 \rightarrow 6)- ou α -(2 \rightarrow 8)-glicosídicos de ácidos siálicos presentes na região terminal de oligossacarídeos, glicoproteínas, glicolipídeos, ácido colômico e substratos sintéticos (CABEZAS, 1991; NAKANO; FONTES; AVILA-CAMPOS, 2006).

A neuraminidase de *C. perfringens* degrada a camada protetora de mucina do cólon humano (SALYERS et al., 1977), como ocorre na enterite necrótica neonatal em humanos (POPOFF; DODIN, 1985), em infecções entéricas (CORFIELD, 1992), e durante a patogênese da gangrena gasosa (FRASER, 1978). Neuraminidasas NanI e NanJ (enzimas extracelulares com ampla

especificidade por substratos), e NanH (enzima intracelular com preferência por oligossacarídeos curtos), assim como a liase (NanA) e epimerase (NanE), que metabolizam o ácido siálico até piruvato e N-acetil-glicosamina-6-fosfato, utilizados como fonte de energia ou na síntese de outras moléculas estruturais (WALTERS; STIREWALT; MELVILLE, 1999). Na estrutura de NanJ produzida por *C. perfringens* existem receptores específicos para a ligação de fibronectina e coesina, que atuam recrutando hidrolases e outras toxinas, favorecendo, com isto, a potencialização da toxina α na atividade necrótica (BORASTON; FICKO-BLEAN; HEALEY, 2007).

A adesão é o passo inicial para a colonização e patogênese de infecções intestinais humanas e animais. Esse processo favorece o contato íntimo entre as bactérias e a mucosa intestinal, a formação do biofilme, e a ação das toxinas. Também *C. perfringens* invade tecidos nas fases finais de algumas enterotoxemias e gangrena gasosa, embora tenha sido demonstrada sua capacidade em degradar mucina que recobre o epitélio intestinal e os componentes da matriz extracelular, tais como elastina e colágeno tipo I e IV; as características de adesão e invasão deste micro-organismo

são pouco estudadas e novas pesquisas devem ser desenvolvidas para verificar a participação desses fatores na EN (PRUTEANU et al., 2011; PRUTEANU; SHANAHAN, 2013).

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

Importância clínica de *Clostridium perfringens* na enterite necrótica

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

Clostridium perfringens é causador de doenças aviárias, como a enterite necrótica em corvos, colangio-hepatite e celulite em perus, galinhas de reposição e em pintinhos (ASAOKA et al., 2004; THACHIL et al., 2010).

A EN foi descrita pela primeira vez por Parish (1961), na Inglaterra, e desde então, já foi reportada em diferentes países onde a avicultura é uma importante atividade econômica, como na Austrália (NAIRN; BAMFORD, 1967), USA (BERNIER; FILION, 1971), Perú (JOHNSON; PINEDO, 1971), Canadá (LONG, 1973), Dinamarca (MORCH, 1974), Alemanha (KOHLENER et al., 1974), China (TSAI; TUNG, 1981), Índia

(CHAKRABORTY et al., 1984) e Brasil (BALDASSI et al., 1995).

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

A infecção por *C. perfringens* em aves apresenta-se nas formas clínica aguda e subclínica. A forma aguda da doença caracteriza-se por surtos com elevada mortalidade e perdas de até 1% ao dia, e que durante as últimas semanas do período de finalização para ser atingido o ponto de abate pode chegar a até 40% (KALDHUSDAL; LOVLAND, 2000). Durante os surtos, as aves apresentam-se deprimidas e amontoadas, com as penas eriçadas, apresentando diarreia e anorexia, sendo que na maioria das vezes a mortalidade é súbita. Na forma subclínica, a EN causa lesões na mucosa intestinal que diminuem a digestão e absorção, reduzindo o ganho de peso e aumentando a taxa de conversão alimentar. Devido à estrutura anatômica e ao pH intestinal, as lesões ocorrem principalmente no jejuno. A característica histopatológica das lesões mostra uma severa necrose coagulativa aguda da mucosa, usualmente com hemorragia e muito severa (FICKEN; WAGES, 1997).

A enterite necrótica afeta frangos entre duas a seis semanas de idade e sua prevalência varia no mundo todo, sendo mais elevada em países onde o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento tem sido proibido (GRAVE et al., 2006). O controle da EN é realizado minimizando os fatores de risco pelo uso de antibióticos, probióticos e óleos essenciais, entre outros (WILSON et al., 2005). Essa é uma doença característica de sistemas intensivos de criação, em que os animais vivem em espaços reduzidos, com uma elevada densidade populacional e são alimentados com dietas que visam o rápido crescimento e ganho de massa muscular.

Os eventos que desencadeiam a patogênese do *C. perfringens* incluem a ingestão de esporos e a colonização intestinal por células vegetativas em condições de anaerobiose e baixo potencial Redox, seguido pela produção de toxinas que atingem rapidamente a circulação sanguínea (KONEMAN et al., 2004).

As regiões do jejuno e íleo, onde as lesões da EN são mais evidentes, normalmente são habitadas por *Lactobacillus* spp. (GONG et al., 2007). Por isso, se acredita que, o desenvolvimento da EN não seja uma consequência direta da infecção por *C. perfringens*, e sim, devido a um processo no qual as populações bacterianas se alteram em resposta às mudanças ambientais (WILSON et al., 2005).

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

cereais, que expõem receptores específicos para a colonização de *C. perfringens*, favorece a multiplicação bacteriana excessiva e facilita o início das lesões intestinais (BABA et al., 1997; FICKEN; WAGES, 1997). Na figura 2, estão representados os fatores envolvidos no desenvolvimento experimental da EN.

Susceptibilidade às drogas antimicrobianas

Os antibióticos são utilizados principalmente no tratamento de infecções bacterianas e, desde a década de 1950, como promotores de crescimento, que favorecem o ganho de peso (acima de 8%) em animais jovens. Esses promotores funcionam como um mecanismo de alteração/diminuição da carga bacteriana na região intestinal, para que a mucosa se torne mais permeável e absorva mais nutrientes.

As drogas antimicrobianas exercem um efeito drástico na microbiota intestinal de homens e animais, causando um desequilíbrio entre a microbiota e o hospedeiro, podendo se iniciar com isto diversos processos infecciosos. Durante muitos anos, a utilização de antibióticos em frangos visou principalmente dois aspectos: 1) diminuir ou erradicar as espécies de *Salmonella*, e 2) diminuir ou erradicar *C. perfringens*,

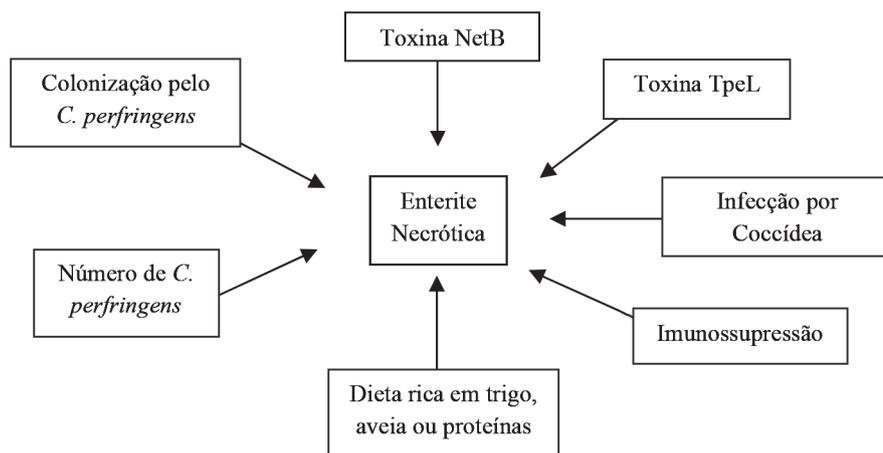


Figura 2 – Fatores críticos para o desenvolvimento experimental da EN
Fonte: (SHOJADOOST; VÍNCIE; PRESCOTT, 2012 – modificado)

bem como induzir uma aparência mais saudável dos intestinos dos animais, obtendo-se melhores parâmetros produtivos (STUTZ; LAWTON, 1984).

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

A primeira evidência de resistência aos antibióticos utilizados pela indústria avícola foi reportada por Starr e Reynolds (1951), quando identificaram que o uso de estreptomicina na ração de perus estava diretamente relacionado à aparição de *E. coli* altamente resistentes a essa droga. O surgimento de estirpes com resistência a múltiplos antimicrobianos tem-se tornado um desafio mundial, e isto tem afetado as medidas terapêuticas tradicionais, sendo obrigatório o monitoramento contínuo da atividade destes fármacos. A presença de estirpes resistentes em animais levou os países europeus e o Canadá proibirem o uso de agentes antimicrobianos como promotores de crescimento (IMMERSEEL et al., 2004).

Nas últimas décadas, os agentes antimicrobianos têm sido utilizados em aves visando ganho de peso e controle de alguns processos infecciosos. Com o aparecimento de estirpes resistentes aos diferentes antibióticos, alguns países começaram a diminuir o seu uso com vistas à saúde humana. Alguns países da América do Norte e da Europa têm banido o uso de antibióticos na produção avícola, mas, isto tem propiciado o desenvolvimento de infecções reemergentes em frangos e, nestes casos, considera-se a utilização das penicilinas como droga de escolha para o tratamento de infecções produzidas por *Clostridium*, particularmente, visando evitar a EN em aves (AGUNOS; LÉGER; CARSON, 2012).

Infelizmente, nos países em desenvolvimento, ainda continuam a ser usadas algumas drogas antimicrobia-

nas para o crescimento e prevenção de infecções em aves, o que reflete a falta de políticas para a prevenção e tratamento dessas doenças.

Diversidade genética

Técnicas moleculares como o *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) têm sido utilizadas na tipagem de *C. perfringens* visando diferenciar estirpes comensais das patogênicas, associadas a surtos de EN (ABILDGAARD et al., 2009). Também tem-se procurado associar determinados genótipos a algumas características fenotípicas importantes, como nível de produção da toxina α , estado de saúde, e habilidade de inibir o crescimento de outros *C. perfringens* comensais (TIMBERMONT et al., 2009).

As análises de diversidade genética das populações intestinais de *C. perfringens* de animais saudáveis e doentes têm mostrado uma elevada heterogeneidade (BARBARA et al., 2008). Com o emprego da técnica de *Multi Locus Sequencing Type* (MLST) foi demonstrado que alguns subtipos de *C. perfringens* tipo C e tipo A (*cpe+*) estariam, respectivamente, associados à EN suína e às intoxicações alimentares em humanos (ROONEY et al., 2006).

A técnica de RAPD-PCR tem sido usada para tipagem de *C. perfringens* e *C. difficile* de origem suína para analisar a diversidade genética destes microrganismos, em diferentes sistemas de produção, com histórico de infecções clostridiais, e em localidades distantes (BAKER et al., 2010). Foi demonstrado que além da elevada prevalência de *C. perfringens* nas fezes de animais diarreicos, também é possível a detecção de alguns clones em diferentes sítios geográficos, o que sugere a associação de tais estirpes com os quadros patológicos produzidos.

Outras técnicas moleculares, como a ribotipagem e *Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis* (MLVA) (SAWIRES; SONGER, 2006), também se têm mostrado eficientes na tipagem e diferenciação de *C. perfringens* de diferentes origens.

Considerações finais e perspectivas

A presença de *C. perfringens* tem recebido enorme importância na indústria avícola devido às perdas econômicas causadas pelos processos infecciosos que este microrganismo produz em frangos de corte. Essa bactéria causa a EN que afeta fatalmente uma enorme população de aves em diferentes partes do mundo, incluindo o Brasil. As investigações da prevalência e a patogênese desse processo infeccioso na avicultura industrial nacional ainda são escassas, talvez devido à necessidade da utilização de técnicas de anaerobiose para o cultivo desses microrganismos.

Llanco et al. (2012) mostraram que de 96 amostras de segmento intestinal examinadas, em apenas 10% foram confirmadas a presença de *C. perfringens*, e essa baixa frequência pode ser explicada pelos antimicrobianos a que esses animais comumente são submetidos, o que infelizmente, em alguns países, incluindo o Brasil, ainda é uma prática comum nas indústrias avícolas.

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

A Food and Drug Administration (FDA, 2012), tem indicado a restrição de antimicrobianos como promotores de crescimento (em doses subterapêuticas); permitindo a sua utilização na prevenção, controle e tratamento de doenças, desde que de forma supervisionada e prescrita por médicos veterinários, sendo contudo restringido o uso de algumas drogas, como quinolonas de 3ª geração e cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, indicadas para o uso na medicina humana.

Assim, a FDA tem promovido à adesão voluntária dos produtores pecuários a essas normativas, sendo fundamentadas em estudos previamente desenvolvidos pela Organização Mundial da Saúde desde 1997, os quais vêm comprovando que os alimentos de origem animal são um dos principais veículos de transmissão de bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos para o homem (GILCHRIST et al., 2007).

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

A portaria Nº 808 descreve à utilização de algumas drogas, como bacitracina, espiranicina, virginamicina e tilosina, nas rações para animais (BRASIL, 1999). É necessário observar que o MAPA procura adaptar suas disposições segundo as normas internacionais (MERCOSUL, CODEX, OMC, FAO, OIE e WHO) para não afetar a exportação da carne de frango e, nesse sentido, desde 1988, as penicilinas, sulfonamidas, cloranfenicol e tetraciclinas estão banidas da indústria avícola brasileira.

A utilização da bacitracina para o tratamento da EN ou como promotor de crescimento é matéria de discussão, uma vez que a utilização ou não desta droga pode trazer consequências econômicas e de saúde pública na maioria dos países, particularmente, nos exportadores desses animais. Isto alerta para a reflexão das autoridades sobre a criação de políticas adequadas à realidade de cada país.

Referências

- ABILDGAARD, L.; ENGBERG, R. M.; PEDERSEN, K.; SCHRAMM, A.; HOJBERG, O. Sequence variation in the α -toxin encoding plc gene of *Clostridium perfringens* strains isolated from diseased and healthy chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 3-4, p. 293-299, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113508005269>>. Acesso em: 10 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.001>.
- ABILDGAARD, L.; SONDERGAARD, T. E.; ENGBERG, R. M.; SCHRAMM, A.; HØJBERG, O. *In vitro* production of necrotic enteritis toxin B, NetB, by *netB*-positive and *netB*-negative *Clostridium perfringens* originating from healthy and diseased broiler chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 144, n. 1-2, p. 231-235, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113510000088>>. Acesso em: 8 jan. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.036>.
- ACINAS, S. G.; MARCELINO, L. A.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M. F. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2629-2635, 2004. Disponível em: <<http://j.b.asm.org/content/186/9/2629>>. Acesso em: 13 jan. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JB.186.9.2629-2635.2004>.
- ADAMS, C. A. Nutrition-based health in animal production. **Nutrition Research Reviews**, v. 19, n. 1, p. 79-89, 2006. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=608748&fileId=S0954422406000072>>. Acesso em: 14 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1079/NRR2005115>.
- AGUNOS, A.; LÉGER, D.; CARSON, C. Review of antimicrobial therapy of selected bacterial diseases in broiler chickens in Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 53, n. 12, p. 1289-1300, 2012.
- AKTORIES, K.; SCHWAN, C.; PAPATHEODOROU, P.; LANG, A. E. Bidirectional attack on the actin cytoskeleton. Bacterial protein toxins causing polymerization or depolymerization of actin. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 572-581, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101011200445X>>. Acesso em: 17 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.338>.
- ALLAART, J. G.; ASTEN A. J. van; GRÖNE, A. Predisposing factors and prevention of *Clostridium perfringens* associated enteritis. **Comparative Immunology Microbiology Infectious Diseases**, v. 36, n. 5, p. 449-64, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147957113000386>>. Acesso em: 23 jan. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2013.05.001>.
- AL-SHEIKHLY, F.; AL-SAIEG, A. Role of Coccidia in the occurrence of necrotic enteritis of chickens. **Avian Diseases**, v. 24, n. 2, p. 324-333, 1980.
- ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. The increase of *Lactobacillus* species in the gut flora of newborn broiler chicks and ducks is associated with weight gain. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10463, 2010. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0010463>>. Acesso em: 24 mar. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010463>.
- ARVANS, D. L.; VAVRICKA, S. R.; REN, H.; MUSCH, M. W.; KANG, L.; ROCHA, F. G.; LUCIONI, A.; TURNER, J. R.; ALVERDY, J.; CHANG, E. B. Luminal bacterial flora determines physiological expression of intestinal epithelial cytoprotective heat shock proteins 25 and 72. **American Journal Physiology - Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 288, n. 4, p. 696-704, 2005.
- ASAOKA, Y.; YANAI, T.; HIRAYAMA, H.; UNE, Y.; SAITO, E.; SAKAI, H.; GORYO, M.; FUKUSHI, H.; MASEGI, T. Fatal necrotic enteritis associated with *Clostridium perfringens* in wild crows (*Corvus macrorhynchos*). **Avian Pathology**, v. 33, n. 1, p. 19-24, 2004. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03079450310001636228#.VCBaR8jdWE4>>. Acesso em: 17 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/03079450310001636228>.
- BABA, E.; IKEMOTO, T.; FUKATA, T.; SASAI, K.; ARAKAWA, A.; McDOUGALD, L. R. Clostridial population and the intestinal lesions in chickens infected with *Clostridium perfringens* and *Eimeria necatrix*. **Veterinary Microbiology**, v. 54, n. 3-4, p. 301-308, 1997.
- BAKER, A. A.; DAVIS, E.; REHBERGER, T.; ROSENER, D. Prevalence and diversity of toxigenic *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* among swine herds in the Midwest. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 9, p. 2961-2967, 2010. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/76/9/2961>>. Acesso em: 25 jan. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02459-09>.
- BALDASSI, L.; CASTRO, A. G. M.; GUERRA, J. L.; PORTUGAL, M. A. S. C.; CALIL, E. M. B.; MACRUZ, R. Necrotic enteritis on broilers in São Paulo state. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 62, n. 1-2, p. 37-43, 1995.
- BARBARA, A. J.; TRINH, H. T.; GLOCK, R. D.; SONGER, J. G. Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 4, p. 377-382, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811350700363X>>. Acesso em: 19 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.07.019>.
- BERNIER, G.; FILION, R. Necrotic enteritis in broiler chickens. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 158, p. 1896-1897, 1971.
- BORASTON, A. B.; FICKO-BLEAN, E.; HEALEY, M. Carbohydrate recognition by a large Sialidase toxin from *Clostridium perfringens*. **Biochemistry**, v. 46, n. 40, p. 11352-11360, 2007. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi701317g>>. Acesso em: 17 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1021/bi701317g>.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa N° 42**. Define os requisitos e critérios específicos para o funcionamento dos laboratórios de Análises de resíduos e Contaminantes em Alimentos integrantes da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. Brasília, DF, 1999.
- BRYNESTAD, S.; SYNSTAD, B.; GRANUM, P. The *Clostridium perfringens* enterotoxin gene is on transposable element in type A human food poisoning strains. **Microbiology**, v. 143, p. 2109-115, 1997. Disponível em: <<http://mic.sgmjournals.org/content/143/7/2109>>. Acesso em: 27 jan. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-143-7-2109>.
- BUSCH, C.; AKTORIES, K. Microbial toxins and the glycosylation of rho family GTPases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 10, n. 5, p. 528-535, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X00001263>>. Acesso em: 17 fev. 2014. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00126-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00126-3).
- CABEZAS, J. A. Some questions and suggestions on the type references of the official nomenclature (IUB) for sialidase(s) and endosialidase. **Biochemistry Journal**, v. 278, p. 311-312, 1991.
- CARTER, G. P.; ROOD, J. I.; LYRAS, D. The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 21-29, 2012.
- CHAKRABORTY, G. C.; CHAKRABORTY, D.; BHATTACHARYYA, D.; BHATTACHARYYA, S.; GOSWAMI, U. N.; BHATTACHARYYA, H. M. Necrotic enteritis in poultry in West Bengal. **Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology Infectious Diseases**, v. 5, p. 54-57, 1984. Disponível em: <<http://www.veterinaryworld.org/Vol.5/June%202012/10.html>>. Acesso em: 4 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.5455/vetworld.2012.365-368>.
- CHEUNG, J. K.; AWAD, M. M.; MCGOWAN, S.; ROOD, J. I. Functional analysis of the VirSR phosphorelay from *Clostridium perfringens*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, p. e5849,

2009. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0005849>>. Acesso em: 25 jan. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005849>.
- COLLINS, M. D.; LAWSON, P. A.; WILLEMS, A.; CORDOBA, J. J.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.; GARCIA, P.; CAI, J.; HIPPE, H.; FARROW, J. A. E. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 4, p. 812-826, 1994.
- CORFIELD, T. Bacterial sialidase roles in pathogenicity and nutrition. **Glycobiology**, v. 2, p. 509-521, 1992.
- COURSODON, C. F.; GLOCK, R. D.; MOORE, K. L.; COOPER, K. K.; SONGER, J. G. TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A are highly virulent for broiler chicks. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 117-121, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996411001983>>. Acesso em: 17 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.10.001>.
- CZÁRÁN, T. L.; HOEKSTRA, R. F.; PAGIE, L. Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 2, p. 786-790, 2002. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/99/2/786.abstract>>. Acesso em: 15 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.012399899>.
- DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, v. 84, n. 4, p. 634-643, 2005. Disponível em: <<http://ps.oxfordjournals.org/content/84/4/634.short?rss=1&source=mfc>>. Acesso em: 24 mar. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/ps/84.4.634>.
- DJOUDE, N.; PREPENS, U.; AKTORIES, K.; CAVALIE, A. Inhibition of calcium release-activated calcium current by rac/cdc42-inactivating clostridial cytotoxins in RBL cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 25, p. 18732-18738, 2000. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/275/25/18732.abstract>>. Acesso em: 17 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M001425200>.
- DUNCAN, C. L.; STRONG, D. H. Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. **Applied in Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 82-89, 1968.
- DWORKIN, M. M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria**. 3rd. ed. New York: Springer, 2006. p. 654-678. Disponível em: <<http://link.springer.com/book/10.1007%2F0-387-30745-1>>. Acesso em: 26 jan. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/0-387-30745-1>.
- FICKEN, M. D.; WAGES, D. P. Necrotic enteritis. In: CALNEK, B.W. (Ed.). **Diseases of poultry**. 10th ed. Ames: Mosby-Wolfe, 1997. p. 261-264.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Antimicrobial resistance: US FDA takes steps to reduce use of antibiotic growth promoters. **Veterinary Records**, v. 170, n. 16, p. 404, 2012. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/170/16/404.1>>. Acesso em: 14 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1136/vr.e2793>.
- FRAENKEL, E. *Bacillus phlegmonis emphysematosae*. Ueber die Aetiologie der Gasphegmonen (Phlegmone emphytematosa). **Zentralblatt Für Bakteriologie und Parasitenkunde**, v. 13, p. 13-16, 1893.
- FRASER, A. G. Neuraminidase production by Clostridia. **Journal of Medical Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 269-280, 1978.
- GARRITY, G. M.; LILBURN, T. G.; COLE, J. R.; HARRISON, S. H.; EUZÉBY, J.; TITDALL, B. J. **Taxonomic outline of the bacteria and archaea**: release 7.7. East Lansing: Michigan State University Board of Trustees, 2007. 628 p.
- GILCHRIST, M. J.; GREKO, C.; WALLINGA, D. B.; BERAN, G.W.; RILEY, D. G.; THORNE, P. S. The potential role of concentrated animal feeding operations in infectious disease epidemics and antibiotic resistance. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 2, p. 313-316, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1817683/>>. Acesso em: 14 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.8837>.
- GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 591-606, 2008.
- GONG, J.; SI, W.; FORSTER, R.; HUANG, R.; YU, H.; YIN, Y.; YANG, C.; HAN, Y. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 59, n. 1, p. 147-157, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6941.2006.00193.x/abstract>>. Acesso em: 15 jan. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00193.x>.
- GOŃI, F. M.; MONTES, L. R.; ALONSO, A. Phospholipases C and sphingomyelinases: lipids as substrates and modulators of enzyme activity. **Progress in Lipid Research**, v. 51, n. 3, p. 238-266, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163782712000203>>. Acesso em: 16 mar. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2012.03.002>.
- GRAVE, K.; JENSEN, V.F.; ODENSVIK, K.; WIERUP, M.; BANGEN, M. Usage of veterinary therapeutic antimicrobials in Denmark, Norway and Sweden following termination of antimicrobial growth promoter use. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 75, n. 1-2, p. 123-132, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587706000559>>. Acesso em: 30 jan. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.02.003>.
- GUTTENBERG, G.; HORNEI, S.; JANK, T.; SCHWAN, C.; LÜ, W.; EINSLE, O.; PAPTAEODOROU, P.; AKTORIES, K. Molecular characteristics of *Clostridium perfringens* TpeL toxin and consequences of mono-O-GlcNAcylation of Ras in living cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 30, p. 24929-24940, 2012. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/287/30/24929>>. Acesso em: 18 jan. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.347773>.
- HELLER, H. H. Certain genera of the *Clostridiaceae*: studies in pathogenic anaerobes. **Journal of Bacteriology**, v. 7, n. 1, p. 1-38, 1922.
- HERHOLZ, C.; MISEREZ, R.; NICOLET, J.; FREY, J.; POPOFF, M.; GIBERT, M.; GERBER, H.; STRAUB, R. Prevalence of β -toxicogenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 358-361, 1999.
- IMMERSEEL, F. van; BUCK, J. de; PASMANS, F.; HUYGHEBAERT, G.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian Pathology**, v. 33, n. 6, p. 537-549, 2004. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03079450400013162#.VCL_p5RdWE4>. Acesso em: 23 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/03079450400013162>.
- IMMERSEEL, F. van; ROOD, J. I.; MOORE, R. J.; TITBALL, R. W. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 32-36, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X08002266>>. Acesso em: 17 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2008.09.005>.
- JOHNSON, C.; PINEDO, C. Gizzard erosion and ulceration in Peru broilers. **Avian Diseases**, v. 15, n. 4, p. 835-837, 1971. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/1588874>>. Acesso em: 21 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.2307/1588874>.

- KALDHUSDAL, M. I.; LOVLAND, A. Necrotic enteritis (4): the economical impact of *Clostridium perfringens* is greater than anticipated. **World Poultry**, v. 16, n. 8, p. 50-51, 2000.
- KATHER, E. J.; MARKS, S. L.; FOLEY, J. E. Determination of the prevalence of antimicrobial resistance genes in canine *Clostridium perfringens* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 1-2, p. 97-101, 2006.
- KEYBURN, A. L.; BOYCE, J. D.; VAZ, P.; BANNAM, T. L.; FORD, M. E.; PARKER, D.; DI RUBBO, A.; ROOD, J. I.; MOORE, R. J. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 2, p. 1-11, 2008. Disponível em: <<http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.0040026>>. Acesso em: 5 mar. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0040026>.
- KEYBURN, A. L.; SHEEDY, S. A.; FORD, M. E.; WILLIAMSON, M. M.; AWAD, M. M.; ROOD, J. I.; MOORE, R. J. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6496-6500, 2006. Disponível em: <<http://iai.asm.org/content/74/11/6496.abstract>>. Acesso em: 18 jan. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00806-06>.
- KLEIN, E. Ueber einen pathogenen anaeroben Darmbacillus Bacillus enteritidis sporogenes. **Centralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt. I**, v. 18, p. 737-743, 1895.
- KOHLER, B.; MARX, G.; KOLBACH, S.; BOTTCHER, E. Untersuchungen zur nekrotischen enteritis der hühner I. Mitteilung: Diagnostik und Bekämpfung. **Monatsh Veterinaermed**, v. 29, p. 380-384, 1974.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. Diagnóstico microbiológico. 5. ed. Argentina: Panam, 2004. p. 927-954.
- LEPP, D.; GONG, J.; SONGER, J. G.; BOERLIN, P.; PARREIRA, V. R.; PRESCOTT, J. F. Identification of accessory genome regions in poultry *Clostridium perfringens* isolates carrying the *netB* Plasmid. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 6, p. 1152-1166, 2013. Disponível em: <<http://jb.asm.org/content/195/6/1152>>. Acesso em: 24 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01032-12>.
- LEPP, D.; ROXAS, B.; PARREIRA, V. R.; MARRI, P. R.; ROSEY, E. L.; GONG, J.; SONGER, J. G.; VEDANTAM, G.; PRESCOTT, J. F. Identification of novel pathogenicity loci in *Clostridium perfringens* strains that cause avian necrotic enteritis. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10795, 2010. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0010795>>. Acesso em: 13 mar. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010795>.
- LEV, M.; BRIGGS, C. A. E. The gut flora of the chick. I. The flora of newly hatched chicks. **Journal of Applied Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 36-38, 1956. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1956.tb00041.x/abstract>>. Acesso em: 28 jan. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1956.tb00041.x>.
- LONG, J. R. Necrotic enteritis in broiler chickens. I. A review of the literature and the prevalence of the disease in Ontario. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 37, n. 3, p. 302-8, 1973.
- LLANCO, L. A. A. **Caracterização molecular dos principais fatores de virulência e genótipos de *Clostridium perfringens* isolados de frangos com enterite necrótica**. 2014. 109 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- LLANCO, L.; NAKANO, V.; FERREIRA, A. J. P.; AVILA-CAMPOS, M. J. Toxinotyping and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolated from broiled chickens with necrotic enteritis. **International Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 7, p. 290-294, 2012.
- MARKS, S. L.; RANKIN, S. C.; BYRNE, B. A.; WEESE, J. S. Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 6, p. 1195-1208, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2011.00821.x/full>>. Acesso em: 23 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.00821.x>.
- MARTINEZ, F. A.; BALCIUNAS, E. M.; CONVERTI, A.; COTTER, P. D.; SOUZA OLIVEIRA, R. P. de. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp: a review. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 4, p. 482-488, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975013000128>>. Acesso em: 15 mar. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.010>.
- MATSUSHITA, O.; JUNG, C. M.; KATAYAMA, S. I.; MINAMI, J.; TAKAHASHI, Y.; OKABE, A. Gene duplication and multiplicity of collagenases in *Clostridium histolyticum*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 3, p. 923-933, 1999.
- McCLANE, B. A. *Clostridium perfringens* type C isolates rapidly upregulate their toxin production upon contact with host cells. New insights into virulence? **Virulence**, v. 1, n. 2, p. 97-100, 2010. Disponível em: <<https://www.landesbioscience.com/journals/virulence/article/10679/>>. Acesso em: 23 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.4161/viru.1.2.10679>.
- MEAD, G. C.; ADAMS, B. W. Some observations on the caecal microflora of the chick during the first two weeks of life. **British Poultry Science**, v. 16, n. 2, p. 169-176, 1975. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00071667508416174#VCMonZRdWE4>>. Acesso em: 13 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/00071667508416174>.
- MIGULA, W. **System der Bakterien**. Jena: Gustav Fischer, 1900. v. 2, p. 135.
- MORCH, J. Necrotic enteritis in broilers in Denmark. In: WORLD'S POULTRY CONGRESS & EXPOSITIONS, 15., 1974, New Orleans. **Proceedings...** New Orleans: USA Branch; World's Poultry Science Association, 1974, p. 290-292.
- MYERS, G. S.; RASKO, D. A.; CHEUNG, J. K.; RAVEL, J.; SESHADRI, R.; DEBOY, R. T.; REN, Q.; VARGA, J.; AWAD, M. M.; BRINKAC, L. M.; DAUGHERTY, S. C.; HAFT, D. H.; DODSON, R. J.; MADUPU, R.; NELSON, W. C.; ROSOVITZ, M. J.; SULLIVAN, S. A.; KHOURI, H.; DIMITROV, G. I.; WATKINS, K. L.; MULLIGAN, S.; BENTON, J.; RADUNE, D.; FISHER, D. J.; ATKINS, H. S.; HISCOX, T.; JOST, B. H.; BILLINGTON, S. J.; SONGER, J. G.; McCLANE, B. A.; TITBALL, R. W.; ROOD, J. I.; MELVILLE, S. B.; PAULSEN, I. T. Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. **Genome Research**, v. 16, p. 1031-1040, 2006.
- NAGAHAMA, M.; OHKUBO, A.; ODA, M.; KOBAYASHI, K.; AMIMOTO, K.; MIYAMOTO, K.; SAKURAI, J. *Clostridium perfringens* TpeL glycosylates the Rac and Ras subfamily proteins. **Infection Immunity**, v. 79, n. 2, p. 905-910, 2011. Disponível em: <<http://iai.asm.org/content/79/2/905>>. Acesso em: 17 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01019-10>.
- NAIRN, M. E.; BAMFORD, V. W. Necrotic enteritis of broiler chickens in Western Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 43, n. 2, p. 49-54, 1967. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-0813.1967.tb15062.x/abstract>>. Acesso em: 9 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-0813.1967.tb15062.x>.
- NAKANO, V.; FONTES, R.; AVILA-CAMPOS, M. A rapid assay of the sialidase activity in species of the *Bacteroides fragilis* group by using peanut lectin hemagglutination. **Anaerobe**, v. 12, n. 5-6, p. 238-241, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996406000515>>. Acesso em: 22 jan. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2006.07.003>.

- OHTANI, K.; HAYASHI, H.; SHIMIZU, T. The luxS gene is involved in cell-cell signaling for toxin production in *Clostridium perfringens*. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 171-179, 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2958.2002.02863.x/abstract>>. Acesso em: 8 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02863.x>.
- PAREDES-SABJA, D.; SARKER, N.; SARKER, M. R. *Clostridium perfringens* tpeL is expressed during sporulation. **Microbial Pathogenesis**, v. 51, n. 5, p. 384-388, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401011001239>>. Acesso em: 21 jan. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2011.05.006>.
- PARISH, W. E. Necrotic enteritis in the fowl. III. The experimental disease. **Journal of Comparative Pathology**, v. 71, p. 405-413, 1961.
- PARKER, C. T.; SPERANDIO, V. Cell-to-cell signalling during pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 363-369, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-5822.2008.01272.x/abstract>>. Acesso em: 5 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01272.x>.
- PEDERSEN, K.; BJERRUM, L.; NAUERBY, B.; MADSEN, M. Experimental infections with rifampicin-resistant *Clostridium perfringens* strains in broiler chickens using isolator facilities. **Avian Pathology**, v. 32, n. 4, p. 403-411, 2003. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0307945031000121158#.VCMcGJRdWE4>>. Acesso em: 2 mar. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/0307945031000121158>.
- PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 104-110, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X98014309>>. Acesso em: 25 mar. 2014. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(98\)01430-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01430-9).
- POPOFF, M. R.; BOUVET, P. Genetic characteristics of toxigenic Clostridia and toxin gene evolution. **Toxicon**, v. 75, n. 1, p. 63-89, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010113001840>>. Acesso em: 17 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.003>.
- POPOFF, M. R.; DODIN, A. Survey of neuraminidase production by *Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii*, and *Clostridium difficile* strains from clinical and nonclinical sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 873-876, 1985.
- PRÉVOT, A. R. Études de systématique bactérienne. IV. Critique de la conception actuelle du genre *Clostridium*. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 61, p. 72-91, 1938.
- PRUTEANU, M.; HYLAND, N. P.; CLARKE, D. J.; KIELY, B.; SHANAHAN, F. Degradation of the extracellular matrix components by bacterial-derived metalloproteases: implications for inflammatory bowel diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, n. 5, p. 1189-1200, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ibd.21475/pdf>>. Acesso em: 17 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/ibd.21475>.
- PRUTEANU, M.; SHANAHAN, F. Digestion of epithelial tight junction proteins by the commensal *Clostridium perfringens*. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 305, n. 10, p. 740-748, 2013. Disponível em: <<http://ajpgi.physiology.org/content/305/10/G740>>. Acesso em: 25 jan. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00316.2012>.
- ROOD, J. I.; McCLANE, B. A.; SONGER, J. G.; TITBALL, R. W. **The Clostridia: molecular biology and pathogenesis**. San Diego: Academic Press, 1997. 533 p.
- ROOD, J.; COLE, S. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. **Microbiological Review**, v. 55, n. 4, p. 621-648, 1991.
- ROONEY, A. P.; SWEZEY, J. L.; FRIEDMAN, R.; HECHT, D. W.; MADDOX, C. W. Analysis of core housekeeping and virulence genes reveals cryptic lineages of *Clostridium perfringens* that are associated with distinct disease presentations. **Genetics**, v. 172, n. 4, p. 2081-2092, 2006. Disponível em: <<http://www.genetics.org/content/172/4/2081>>. Acesso em: 3 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.105.054601>.
- SAKURAI, J.; NAGAHAMA, M.; ODA, M. *Clostridium perfringens* alpha-toxin: characterization and mode of action. **Journal of Biochemistry**, v. 136, n. 5, p. 569-574, 2004. Disponível em: <<http://jb.oxfordjournals.org/content/136/5/569>>. Acesso em: 23 jan. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvh161>.
- SALANITRO, J. P.; BLAKE, I. G.; MUIRHEAD, P. A.; MAGLIO, M.; GOODMAN, J. R. Bacteria isolated from the duodenum, ileum, and cecum of young chicks. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 782-790, 1978.
- SALYERS, A. A.; VERCELLOTTI, J. R.; WEST, S. E. H.; WILKINS, T. D. Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from human colon. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 319-322, 1977.
- SAVAGE, D. C. Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. **Annual Review of Nutrition**, v. 6, p. 155-178, 1986. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.nu.06.070186.001103>>. Acesso em: 17 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nu.06.070186.001103>.
- SAWIRES, S. Y.; SONGER, J. G. *Clostridium perfringens*: insight into virulence evolution and population structure. **Anaerobe**, v. 12, n. 1, p. 23-43, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996405001290>>. Acesso em: 17 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2005.10.002>.
- SCHATTENFROH, A.; GRASSBERGER, R. Ueber butter saurebacillen und ihre beziehungen zu der glazphlegmone. **Munch Med Wochenschr Journal**, v. 47, p. 1033-1035, 1900.
- SHANE, S. M.; KOETTING, D. G.; HARRINGTON, K. S. The occurrence of *Clostridium perfringens* in the intestine of chicks. **Avian Diseases**, v. 28, n. 4, p. 1120-1124, 1984.
- SHOJADOOST, B.; VINCE, A. R.; PRESCOTT, J. F. The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review. **Veterinary Research**, v. 43, n. 74, p. 74-85, 2012. Disponível em: <<http://www.veterinaryresearch.org/content/43/1/74>>. Acesso em: 14 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1297-9716-43-74>.
- SI, W.; GONG, J.; HAN, Y.; YU, H.; BRENNAN, J.; ZHOU, H.; CHEN, S. Quantification of cell proliferation and alpha-toxin gene expression of *Clostridium perfringens* in the development of necrotic enteritis in broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 21, p. 7110-7113, 2007. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/73/21/7110>>. Acesso em: 7 mar. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01108-07>.
- SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. Approved lists of bacterial names. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 225-420, 1980. Disponível em: <<http://ij.sgmjournals.org/content/30/1/225>>. Acesso em: 14 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-30-1-225>.
- SMEDLEY, J. G.; FISHER, D. J.; SAYEED, S.; CHAKRABARTI, G.; McCLANE, B. A. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 152, p. 183-204, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/chapter/10.1007%2Fs10254-004-0036-2>>. Acesso em: 17 jan. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10254-004-0036-2>.
- SONGER, J. G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 216-234, 1996.

- STACKEBRANDT, E.; KRAMER, I.; SWIDERSKI, J.; HIPPE, H. Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 253-258, 1999. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01291.x/abstract;jsessionid=6F5FA5EE8D911B326A6FAAEABB33A3D9.f02t02>>. Acesso em: 20 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01291.x>.
- STANLEY, D.; KEYBURN, A. L.; DENMAN, S. E.; MOORE, R. J. Changes in the caecal microflora of chickens following *Clostridium perfringens* challenge to induce necrotic enteritis. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 1-2, p. 155-162, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811351200199X>>. Acesso em: 14 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.032>.
- STARR, M.; REYNOLDS, D. Streptomycin resistance of coliform bacteria from turkeys fed streptomycin. **American Journal of Public Health**, v. 41, n. 11, p. 1375-1380, 1951.
- STEVENS, D. L.; TROYER, B. E.; MERRICK, D. T.; MITTEN, J. E.; OLSON, R. D. Lethal effects and cardiovascular effects of purified α and θ toxins from *Clostridium perfringens*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 157, n. 2, p. 272-279, 1988.
- STRONG, D. H.; DUNCAN, C. L.; PERNA, G. *Clostridium perfringens* Type A food poisoning II. Response of the rabbit ileum as an indication of enteropathogenicity of strains of *Clostridium perfringens* in human beings. **Infection Immunity**, v. 3, n. 1, p. 171-178, 1971.
- STUTZ, M. W.; LAWTON, G. C. Effects of diet and antimicrobials on growth, feed efficiency, intestinal *Clostridium perfringens*, and ileal weight of broiler chicks. **Poultry Science**, v. 63, n. 10, p. 2036-2042, 1984.
- THACHIL, A. J.; McCOMB, B.; ANDERSEN, M.; SHAW, D.; HALVORSON, D.; NAGARAJA, K. Role of *Clostridium perfringens* and *Clostridium septicum* in causing turkey cellulitis. **Avian Diseases**, v. 54, n. 2, p. 795-801, 2010. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1637/9009-080309-Reg.1>>. Acesso em: 17 mar. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1637/9009-080309-Reg.1>.
- TIMBERMONT, L.; LANCKRIET, A.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; IMMERSEEL, F. van. Intra-species growth-inhibition by *Clostridium perfringens* is a possible virulence trait in necrotic enteritis in broilers. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 3-4, p. 388-391, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113509000455>>. Acesso em: 21 jan. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.017>.
- TITBALL, R. W.; NAYLOR, C. E.; BASAK, A. K. The *Clostridium perfringens* α -toxin. **Anaerobe**, v. 5, n. 2, p. 51-64, 1999.
- TSAI, S. S.; TUNG, M. C. An outbreak of necrotic enteritis in broiler chickens. **Journal of the Chinese Society of Veterinary Science**, v. 7, p. 13-17, 1981.
- TSURUMURA, T.; TSUMORI, Y.; QIU, H.; ODA, M.; SAKURAI, J.; NAGAHAMA, M.; TSUGE, H. Arginine ADP-ribosylation mechanism based on structural snapshots of iota-toxin and actin complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 11, p. 4267-4272, 2013. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/110/11/4267>>. Acesso em: 20 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1217227110>.
- VEILLON, A.; ZUBER, A. Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie. **Archives de Médecine Expérimentale et d'Anatomie Pathologique**, v. 10, p. 517-545, 1898.
- VIDAL, J.; CHEN, J.; LI, J.; McCLANE, B. Use of an EZ-Tn 5-based random mutagenesis system to identify a novel toxin regulatory locus in *Clostridium perfringens* strain 13. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. e6232, 2009. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0006232>>. Acesso em: 17 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006232>.
- VOS, P.; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 2009. 1459 p.
- WALTERS, D. M.; STIREWALT, V. L.; MELVILLE, S. B. Cloning, sequence, and transcriptional regulation of the operon encoding a putative N-Acetylmannosamine-6-Phosphate epimerase (*nanE*) and sialic acid lyase (*nanA*) in *Clostridium perfringens*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 15, p. 4526-4532, 1999.
- WELCH, W. H.; NUTTALL, G. H. F. A gas producing bacillus (*Bacillus aerogenes capsulatus*, nov. spec.) capable of rapid development in the blood vessels after death. **Johns Hopkins Hospital Bulletin**, v. 3, p. 81-91, 1892.
- WILSON, J.; TICE, G.; BRASH, M.; HILAIRE, S. Manifestations of *Clostridium perfringens* and related bacterial enteritis in broiler chickens. **World's Poultry Science Journal**, v. 61, n. 3, p. 435-449, 2005. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=619224&fileId=S0043933905000310>>. Acesso em: 17 fev. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1079/WPS200566>.