

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

Creación de un banco de cepas compatibles con *Clostridium perfringens*, aisladas de gallinas de postura comercial, con diagnóstico clínico de enteritis necrótica

Modalidad: Proyecto de Graduación

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico
de Licenciatura en Medicina Veterinaria**


Luis Diego Abarca Blanco

Campus Presbítero Benjamín Núñez

2009

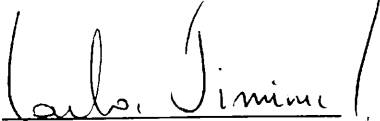
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Creación de un banco de cepas compatibles con *Clostridium perfringens*, aisladas de gallinas de postura comercial, con diagnóstico clínico de enteritis necrótica



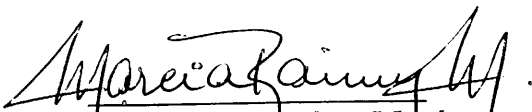
Dr. Jorge Edo. Quíros Arce
Decano

Facultad de Ciencias de la Salud



Dr. Carlos Jiménez Sánchez
Director

Escuela de Medicina Veterinaria



Dra. Marcia Ramírez Marín
Tutora



Dr. Elías Barquero Calvo
Lector

Adriana Blanco R.
Ing. Adriana Blanco Rojas
Lectora

09 de marzo de 2009

DEDICATORIA

A mis padres Luis y Ana que han sido siempre mi ejemplo, mi apoyo y mi guía...

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradecerle a Dios por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo, así como por la ayuda, paciencia y perseverancia brindada durante el mismo.

A mis padres Luis y Ana, mis hermanos Jorge y Ana, mi abuelita Marielena y demás familiares por el apoyo y aliento brindado, especialmente en los momentos de angustia.

A mi novia Merilyn por todo su apoyo, comprensión y ayuda, sin la cual todo hubiera sido mucho más difícil, por aguantarme en momentos difíciles y siempre ofrecerme su mano, así como también por todo el aliento y la motivación brindada.

A la Dra. Marcia Ramírez y al Dr. Elías Barquero por el apoyo, consejos, indicaciones y continuas correcciones, las cuales fueron indispensables para la conclusión de mi trabajo, el cual más que un título, me deja muchas lecciones y herramientas necesarias para un buen desempeño como profesional y como persona. También agradecerles por haber confiado en mí para llevar a cabo esta parte del proyecto.

A Adriana Blanco, por su ayuda en la lectura del trabajo así como por sus consejos y ayuda brindada.

A Carlos Zúñiga por su apoyo, colaboración y supervisión brindados durante la realización de este trabajo.

A Lourdes Fuentes y Laura Orozco por la colaboración ofrecida con el procesamiento de muestras y demás.

A la Corporación PIPASA que proporcionó las aves y me brindó la oportunidad de realizar este trabajo, así como la oportunidad de formarme más en mi área de interés y específicamente al Ing. Ignacio Sibaja, persona que me atendió y colaboró de manera desinteresada durante varias de las visitas a campo realizadas, igualmente a los doctores Julio Barbosa y Tania Román por la ayuda y facilidades brindadas.

A los doctores Marietta Flores y Alberto Alape por haberme tomado en cuenta.

A la Ing. Laura Alvarado por su apoyo consejos y continua oración para que todo me saliera bien. Muchas gracias!

A la Dra. Jacqueline de Oliveira por su apoyo y aliento durante la elaboración del trabajo, e igualmente lo hago extensivo a todas las personas que de una u otra manera intervinieron en este trabajo ya sea directa o indirectamente con su apoyo y motivación

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Justificación.....	4
1.2.1 Importancia.....	4
1.3. Objetivos.....	5
1.3.1. Objetivo general.....	5
1.3.2. Objetivos específicos.....	5
2. METODOLOGÍA: MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
2.1. Lugar de estudio.....	6
2.2. Selección de las aves enfermas y recolección de las muestras de alimento, materias primas y agua.....	6
2.3. Necropsia y toma de muestras.....	6
2.4. Procesamiento bacteriológico.....	6

2.5. Visita a lotes sanos para la toma de aves al azar, recolección de alimento, materias primas y agua.....	7
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
3.1. Selección de aves enfermas.....	8
3.2. Necropsia de las aves clínicamente enfermas	8
3.3. Resultados del procedimiento bacteriológico.....	10
3.3.1. Muestras a partir de aves clínicamente enfermas, de los alimentos y agua consumidos durante los brotes clínicos.....	10
3.4. Necropsia de las aves clínicamente sanas.....	11
3.5. Resultados del procesamiento bacteriológico a partir del contenido intestinal e hígado, de las aves clínicamente sanas, así como de los alimentos y el agua.....	11
3.6. Características especiales de algunos aislamientos compatibles con <i>C. perfringens</i>.....	11
4. CONCLUSIONES.....	13
5. RECOMENDACIONES.....	14
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Hallazgos anatomopatológicos en las aves clínicamente enfermas.....	9
Figura 2: Lesiones anatomopatológicas en el hígado de las aves enfermas.....	10

ABREVIATURAS

BHI: infusión cerebro corazón.

ELISA: inmunoensayos con enzimas asociadas.

EMV: Escuela de Medicina Veterinaria.

FBA: fructuosa 1,6-bifosfato aldolasa.

GPD: gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa.

HP: proteína hipotética.

OPSP: oleandomicina-polimixina-sulfadiazina-perfringens.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PFOR: piruvato: ferredoxina oxidoreductasa

PRAS: tubos pre-reducidos para el cultivo de bacterias anaeróbias.

UNA: Universidad Nacional.

RESUMEN

El presente estudio constituye la primera parte del proyecto de investigación “Desarrollo e implementación de métodos para diagnosticar enteritis necrotizante causada por *C. perfringens* en aves de corral”, inscrito en la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional, bajo el código IFEG 40.

La enteritis necrótica es una enfermedad producida por *C. perfringens* que ocasiona pérdidas millonarias en la industria avícola a nivel mundial, además del impacto sobre el bienestar animal, ya que la morbilidad puede alcanzar el 80% y ante la falta de un diagnóstico de laboratorio rápido y certero, la mortalidad puede oscilar entre un 35% a 50%. En nuestro país el *C. perfringens* ocasiona problemas principalmente en gallinas de postura comercial y en reproductoras pesadas, asociados principalmente al estrés de la producción.

Este estudio tuvo como objetivo la creación de un banco de aislamientos bacteriológicos compatibles con *C. perfringens*, a partir de brotes clínicamente sospechosos de la enfermedad, para lo cual se estandarizó un protocolo bacteriológico específico.

Durante el estudio se atendieron siete brotes, seis en aves de postura comercial entre las 61 y 70 semanas y solamente uno en aves reproductoras pesadas de 40 semanas. Asimismo y con el objetivo de manejar muestras procedentes de aves clínicamente sanas, se visitaron dos lotes de aves de postura comercial entre las 21 a 29 semanas de edad.

En cada uno de los casos clínicos se recolectaron cinco aves vivas y utilizando un guante plástico estéril, se tomó 1.5 kilos de alimento. La muestra del agua fue depositada en una bolsa plástica estéril. Tanto las aves como las muestras del alimento y el agua, fueron trasladadas a los laboratorios de Patología Aviar y Bacteriología, de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

Se siguió el mismo procedimiento cuando se visitó los dos lotes de aves de postura comercial clínicamente sanas, a excepción del número de aves vivas, que en este caso fue de dos.

Los principales signos clínicos observados en las aves enfermas fueron depresión, deshidratación, diarrea y plumas erizadas. A la necropsia los hallazgos anatomopatológicos más relevantes fueron el daño a la mucosa intestinal en un 81% de las aves procesadas y la presencia de gas en intestino delgado en un 28%. Mientras que las aves clínicamente sanas únicamente presentaron a nivel intestinal hiperemia y leve daño a la mucosa.

De cada una de las aves se extrajo y analizó el contenido intestinal (yeyuno-ileon y ciegos) y el hígado, las cuales junto a las muestras de alimento y agua fueron procesadas en el Laboratorio de Bacteriología.

Se logró un total de 40 aislamientos compatibles con *C. perfringens* a partir de las aves clínicamente enfermas, de los cuales 27 fueron a partir de intestino y 13 a partir de hígado. Además se obtuvo seis aislamientos provenientes de los alimentos consumidos durante los brotes. Las muestras de agua fueron todas negativas.

De las visitas a los lotes clínicamente sanos, se logró un total de 19 aislamientos de los cuales trece se aislaron a partir del contenido intestinal, y seis de hígado. A partir de los alimentos; nueve aislamientos y de las muestras de agua, otros seis aislamientos compatibles con *C. perfringens*.

En total se logró obtener y dejar un banco de 61 aislamientos compatibles con *C. perfringens*.

ABSTRACT

This study is the first part of the research project "Development and implementation of methods to diagnose necrotizing enteritis caused by *C. perfringens* in poultry", inscribed on the Vicerrectoría de Investigación of Universidad Nacional, under the code IFEG 40.

Necrotic enteritis is a disease caused by *C. Perfringens*, causing millions in losses to the poultry industry worldwide, as well as the impact on animal welfare, since the morbidity of the disease may reach 80%, and in the absence of a rapid and accurate laboratory diagnosis, mortality ranges may oscillate between 35 % to 50%. In our country, the *C. perfringens* causes problems mainly in commercial egg laying birds in posture and heavy breeders, mainly associated with stress of production.

The objective of this study was to create a bank of bacteriological isolates compatible with *C. pefringens*, from clinically suspected outbreaks of the disease, for this we standardized specific bacteriological protocol.

During the study there were seven outbreaks in poultry in six egg laying birds between 61 and 70 weeks and only one in heavy breeding birds in 40 weeks. Likewise, with the objective to study samples from clinically healthy birds were visited two lots of egg laying birds between 21 to 29 weeks of age.

In each of the clinical cases were collected five live birds and using a sterile plastic glove, we took 1.5 kilograms of food. The water sample was placed in a sterile plastic bag. Both birds as samples of food and water, were transferred to Avian Pathology and Bacteriology laboratories, of Escuela de Medicina Veterinaria of Universidad Nacional.

The same procedure was followed when we visited the two lots of clinically healthy egg laying birds, with the exception of the number of live birds, which in this case was two.

The main clinical signs observed in diseased birds were depression, decay, dehydration, diarrhea and disorganized feathers. In the necropsy the principal anatomopathological findings in these birds were the damage at the gut mucosa by 81% of the processed birds, and the presence of gas in small gut by 28%. While the healthy clinically birds only presented hyperaemia and a mild damage in the gut mucosa.

Of every one bird was extracted and analyzed the intestinal contents (jejunum – ileum and caecum) and liver, which along with food and water samples were processed at the Laboratory of Bacteriology.

We achieved a total of 40 isolates compatible with *C. perfringens* from clinically diseased birds, 27 of which were from gut, and 13 from liver. In addition, we obtained six isolates from foods consumed during outbreaks. Water samples were all negative.

Of visits to healthy lots, we achieved a total of 19 isolates of which 13 were isolated from intestinal contents, and six of the liver. From food, nine isolates and from water samples, six isolates compatible with *C. perfringens*.

In total we achieved to obtain and leave a bank 61 isolates compatible with *C. perfringens*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes.

Regularmente las infecciones clostridiales en aves se asocian con cuatro padecimientos principales: la enteritis ulcerativa causada por *Clostridium colinum*, enteritis necrótica producida por *C. perfringens*, la dermatitis gangrenosa que se asocia con *C. perfringens* y *C. septicum*; y el agente etiológico del botulismo causado por *C. botulinum* (Barnes *et al.*, 2003).

C. perfringens ha sido asociado con erosiones en la molleja en pollos jóvenes (Barnes *et al.*, 2003) y otras patologías en aves incluyendo enfermedad maligna aviar y dermatitis gangrenosa entre otras (Craven *et al.*, 2001). Además se han aislado otras especies de *Clostridium* spp. esporádicamente, incluyéndose *C. difficile*, *C. fallax*, *C. novyi*, *C. chauvoei*, *C. sordellii* y *C. sporogenes* (Barnes *et al.*, 2003).

En las enfermedades clostridiales, las toxinas producidas son generalmente las responsables de la presentación patológica (Barnes *et al.*, 2003; Universidad de Mississippi, [s.f]). En otros casos, el organismo es relativamente inocuo a menos que existan cofactores tales como: ingredientes de la dieta o cambios de estos, estrés, coccidiosis, o infecciones inmunosupresoras como infección de la Bursa (Enfermedad de Gumboro), Anemia Infecciosa Aviar u otros agentes infecciosos (Garlich, 1999; Barnes *et al.*, 2003, Universidad de Mississippi, [s.f]). Igualmente el uso de drogas depresoras del sistema inmune como la ciclofosfamida, pueden incrementar la susceptibilidad en animales durante la fase de levante (Cowen *et al.*, 1987). Un desequilibrio de este tipo propicia la proliferación acelerada de las bacterias en cuestión de días (Garlich, 1999).

Algunos estudios han encontrado que *C. perfringens* es la principal bacteria anaerobia obligada en el intestino de las aves, encontrándose principalmente en ciego e intestino delgado en cantidades variables; sin embargo otros trabajos solo la han reportado esporádicamente (Shane *et al.*, 1984; Garlich, 1999; Barnes *et al.*, 2003). Además, el agente se ha detectado en molleja, buche y saco vitelino indicando esto la posibilidad de una transmisión vertical (Shane *et al.*, 1984; Garlich, 1999).

La enteritis necrótica fue descrita por primera vez por Parish en 1961 y desde entonces ha sido reportada en la mayoría de las producciones avícolas alrededor del mundo (Keyburn *et al.*, 2006). Esta es una enfermedad esporádica en pollos de engorde (Cowen *et al.*, 1987), ponedoras, reproductoras y pavos (Butcher *et al.*, 2003; Engström *et al.*, 2006); causada por *C. perfringens*, una bacteria en forma de bastón, no mótil, formadora de esporas y relativamente aerotolerante (Quinn *et al.*, 2004; Universidad de Mississippi, [s.f]), la cual se divide en cinco serotipos (A,B,C,D,E) según las toxinas producidas (McCourt *et al.*, 2005), siendo el principal serotipo el A y en menor importancia el C (Kaldhusdal *et al.*, 2001, Keyburn *et al.*, 2006), aunque también ha sido aislado el tipo D (Heikinheimo y Korkeala, 2005).

C. perfringens puede ser encontrado en heces, piso, tierra contaminada, agua (Jordan, 2002; Barnes *et al.*, 2003; Butcher *et al.*, 2003) y alimento, donde la presencia de ciertos ingredientes como harina de pescado, trigo o centeno facilitan la aparición del padecimiento (Takeda *et al.*, 1995). Presenta una gran resistencia a desinfectantes y químicos dada su capacidad para esporular y la resistencia de las esporas. Algunas combinaciones de químicos han demostrado ser más eficientes en su control que el uso de los productos de manera individual, por lo que en conjunto con buenos programas de sanidad, podrían ser una opción para el control eficiente de este agente (Craven *et al.*, 2001).

Las cuatro principales toxinas producidas por *C. perfringens* son α , β , ϵ , y ι , asimismo se ha reportado la producción de otras toxinas (Keyburn *et al.*, 2006). La toxina alfa es una zinc-metaloenzima la cual tiene tanto actividad fosfolipasa C como actividad esfingomielinasa, y es la principal toxina en la gangrena gaseosa en humanos (Keyburn *et al.*, 2006). Todos los serotipos de *C. perfringens* portan y expresan el gen estructural de la alfa toxina; no obstante su papel en la enfermedad no es del todo claro (Keyburn *et al.*, 2006), sin embargo se sabe que es un importante inmunógeno, asimismo se ha demostrado la existencia de otros factores capaces de levantar una adecuada inmunidad (Thompson *et al.*, 2005). Kulkarni *et al.* (2007) encontraron que las proteínas piruvato: ferredoxina oxidoreductasa (PFOR), fructuosa 1,6-bifosfato aldolasa (FBA) y la gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (GPD), así como la proteína HP (proteína hipotética), son capaces de inducir inmunidad al inocularlas en pollos de engorde.

La enteritis necrótica ocurre cuando el *C. perfringens* prolifera en un alto número en el intestino delgado produciendo un exceso de toxinas extracelulares (Thompson *et al.*, 2005; Keyburn *et al.*, 2006). En su estudio Barbara *et al.*, (2007) encontraron que las especies de *C. perfringens* productoras de enteritis necrótica, desplazan a las no productoras de la enfermedad, esto según parece es causado por bacteriocinas inhibitorias, así como por mayor capacidad de adherencia, multiplicación más rápida y producción de toxinas específicas.

En la presentación aguda de la enfermedad generalmente no se observan signos clínicos, mientras que en las formas menos agresivas se ve depresión, diarrea, anorexia, deshidratación, animales amontonados, plumas erizadas, polidipsia, aumento en la mortalidad y baja en la producción. Asimismo, en la necropsia se observa principalmente en intestino delgado, una enteritis con focos necróticos, úlceras, pseudomembranas, gas, catarro y hemorragias, además de colangiohepatitis en algunos casos (Jordan, 2002; Butcher *et al.*, 2003; Biarnés *et al.*, 2006)

El diagnóstico de la enteritis necrótica se basa en los hallazgos de necropsia típicos de la enfermedad, verificando las lesiones en el intestino tanto macro como microscópicamente (Glenn Songer y Post, 2005; Biarnés *et al.*, 2006). Igualmente resulta de utilidad realizar una tinción de Gram para verificar la presencia de gran cantidad de bacilos Gram positivos, aunque se debe tomar en cuenta que en condiciones normales siempre se aprecia cierto número de estos organismos (Biarnés *et al.*, 2006). El aislamiento bacteriológico se realiza en medios de cultivo en anaerobiosis (Biarnés *et al.*, 2006). La identificación de las cepas aisladas se basa en la producción de una zona de doble hemólisis en agar sangre (Barnes *et al.*, 2003, Glenn Songer y Post, 2005), la presencia de actividad lecitinasa (Biarnés *et al.*, 2006) vista en agar yema de huevo (Barnes *et al.*, 2003), así como la inhibición con sueros anti toxina y la capacidad para fermentar algunos azúcares (Quinn *et al.*, 2004; Biarnés *et al.*, 2006).

Por su parte Labbé (2000) citado por Heikinheimo (2008), menciona que la relativa resistencia que tiene *C. perfringens* ante ciertos compuestos como sulfadiazina, neomicina entre otros, ha facilitado la creación de ciertos medios para el cultivo y aislamiento entre los que se menciona el denominado oleandomicina-polimixina-sulfadiazina-perfringens (OPSP). De la misma forma, cita a Smith (1975) el cual menciona que un corto tiempo de incubación con una temperatura entre 43 – 45 °C, facilita el aislamiento entre sus competidores.

Para la detección de anticuerpos contra las enterotoxinas del *C. perfringens*, existen la pruebas de aglutinación en placa y ensayos comerciales de diagnóstico como los inmunoensayos con Enzimas Asociadas (ELISA), los cuales utilizan el sobrenadante de cultivos celulares y las heces, para realizar el diagnóstico (Biarnés *et al.*, 2006). Igualmente, la

genotipificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), puede ser usada como complemento de otras técnicas diagnósticas (Glenn Songer y Post, 2005).

Para su prevención resulta de utilidad mantener un estricto control sobre las materias primas utilizadas en el alimento, evitar al máximo el estrés sobre los animales (temperatura, ventilación, humedad), un programa de control de la coccidiosis, así como la estricta vacunación contra enfermedades inmunosupresoras tales como: Gumboro, Marek o Anemia Infecciosa (Butcher *et al.*, 2003; Biarnés, 2006).

En cuanto al tratamiento, *C. perfringens* es sensible a antibióticos como los beta-lactámicos (principalmente penicilina y amoxicilina), tetraciclinas (especialmente doxiciclina y oxitetraciclina), macrólidos (lincomicina, tilosina, tiamulina o eritromicina), sulfamidas y aminoglicósidos (como la neomicina) (Butcher *et al.*, 2003; Biarnés *et al.*, 2006).

En Costa Rica la enteritis necrótica se previene mediante el consumo constante en el alimento de bacitracina-zinc, un antibiótico utilizado como promotor de crecimiento, lo que significa un gasto considerable (Ramírez, 2008); sin embargo esta práctica se ha ido restringiendo en varios países incluyendo la Unión Europea (Thompson *et al.*, 2005; Norton, [s.f.]), tomando en consideración la edad de las aves y su finalidad zootécnica (Miller Publishing Company, 2006).

La bacitracina es un antibiótico polipeptídico producido por la bacteria *Bacillus subtilis*, resistente a los ácidos gástricos (Fuentes, 1992), con efecto bactericida dependiente de la dosis. Actúa inhibiendo la síntesis de peptoglicanos por un bloqueo no específico de la reacción de fosforilación, algunas de las cuales ocurren en la pared celular (Spoo y Riviere, 1995); produce alteraciones de esta última que hacen a las bacterias más sensibles a otros antimicrobianos. Su espectro es muy similar al de la penicilina (Fuentes, 1992) y se limita a gram positivos incluyendo los penicilinoresistentes, logrando inhibir bacterias como *Clostridium* spp. Actúa también como promotor de crecimiento ya que el desarrollo de resistencia bacteriana es raro y se produce muy lentamente, no induce resistencia cruzada con otros antibióticos, es de poco uso en medicina humana y no se absorbe a nivel gastrointestinal (Sumano, 1997).

También se utilizan prebióticos y probióticos como alternativa a los antibióticos en la prevención de la enteritis necrótica (Quiroz, 1987; Ramírez, 2008), o en conjunto a ellos. Los prebióticos y probióticos mejoran las condiciones de la flora intestinal (Cortés *et al.*, 2000, Santin *et al.*, 2001), compiten por espacio en lo que se denomina exclusión competitiva (Santin *et al.*, 2001; Pérez, [s.f.]), disminuyendo las poblaciones de *C. perfringens* y de *Eimeria* spp. (Cowen *et al.* 1987 ; Kaldhusdal *et al.* 2001; Jackson *et al.*, 2003; Gil de los Santos y Gil Tunes. 2005; McCann *et al.*, 2006).

1.2 Justificación

Importancia

La enteritis necrótica es una enfermedad compleja que ocurre en todas las producciones avícolas alrededor del mundo (Norton, [s.f.]), tiene un alto impacto sobre la producción y sobre el bienestar animal (Mcdevitt *et al.*, 2006). Se calcula que las pérdidas por esta patología a nivel mundial ascienden a \$2 billones por año (Keyburn *et al.*, 2008), debido a la mortalidad y morbilidad (del 1 a 40%), ya que no siempre se logra un rápido diagnóstico (Jordan *et al.*, 2002, Mcdevitt *et al.*, 2006), así como a los decomisos en la planta de beneficio debido a anomalías hepáticas (Craven *et al.*, 2001).

Durante décadas se pensó que la patología era producida por las toxinas alfa y beta, ésta última producida por el serotipo C (Barnes *et al.*, 2003). Sin embargo Keyburn *et al.* (2006) comprobaron que la toxina alfa no es esencial para la producción de la enfermedad, al reproducirla en aves utilizando bacterias mutantes no productoras de alfa toxina, además utilizó una variedad de *C. perfringens* aislada de humanos, altamente productora de la misma, sin resultados significativos.

Posteriormente, Keyburn *et al.*, (2008) descubrieron un factor de virulencia esencial en esta patología, la proteína Necrotic Enteritis Toxin B-like (NetB), en una cepa de *C. perfringens* aislada en un ave enferma de enteritis necrótica.

La presencia del gen netB en *C. perfringens*, derivados y no derivados de brotes de enteritis necrótica, fue evaluada por medio de la técnica PCR usando imprimadores específicos para dicho gen, encontrando el gen en 14 de 18 cepas aisladas. De las cuatro cepas negativas, tres pertenecían a un mismo brote (Keyburn *et al.*, 2008); por lo que estos datos sugerirían que la presencia de la toxina NetB podría no ser esencial en el establecimiento de la patología, demostrando la necesidad de más estudios para determinar la distribución de la toxina a nivel mundial y su correlación con la enfermedad (Keyburn *et al.*, 2008).

En Costa Rica, *C. perfringens* ocasiona problemas principalmente en gallinas de postura comercial y en reproductoras pesadas, asociados con el estrés fisiológico de la producción y a la calidad de las materias primas utilizadas en la elaboración de los concentrados (maíz, soya) (Ramírez, 2008). Se calcula que la mortalidad durante un brote puede oscilar entre un 0.3% y un 0.5%, llegando incluso a un 2% cuando la respuesta al tratamiento no es buena. Las pérdidas se dan principalmente por la caída de la producción, la cual puede oscilar entre 1 a 10%, más el costo del tratamiento (Ramírez, 2008).

Los brotes de enteritis necrótica en el pollo de engorde son muy esporádicos, ya que en nuestro país la producción de engorde mantiene el uso de los anticoccidiales en la dieta y estos actúan como promotores del crecimiento (Ramírez, 2008).

Este trabajo constituye la primera etapa del proyecto de investigación “Desarrollo e implementación de métodos para diagnosticar enteritis necrotizante causada por *C. perfringens* en aves de corral”, inscrito en la Vicerrectoría de Investigación bajo el código IFEG 40, la cual consiste en la elaboración de un banco de cepas compatibles con *C. perfringens* a partir de aves clínicamente enfermas y sanas, las cuales serán indispensables en etapas posteriores. Las cepas compatibles con *C. perfringens* que se logren obtener del mismo, deben ser verificadas por PCR.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general.

Crear un banco de aquellos aislamientos bacteriológicos compatibles con *C. perfringens*, a partir de aves enfermas con diagnóstico clínico de enteritis necrótica.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Estandarizar la técnica para aislar e identificar presuntivamente cultivos bacteriológicos compatibles con *C. perfringens*.
2. Aislar *C. perfringens* en intestino e hígado de las aves clínicamente enfermas y sanas.
3. Aislar *C. perfringens* en el agua y el alimento, consumidos por las aves, durante el brote.
4. Identificar las principales lesiones anatomopatológicas en las aves clínicamente enfermas.
5. Contribuir al bienestar animal, mediante un diagnóstico rápido y certero de la enfermedad, lo que ayudaría a disminuir la morbilidad y mortalidad presente en las aves involucradas.

2. METODOLOGÍA: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Lugar de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en una empresa avícola nacional, la cual cuenta con ocho granjas de postura comercial ubicadas en la provincia de Alajuela.

Estas granjas trabajan bajo el sistema de “producción integrada” y albergan un máximo de dos lotes, lo cual representa una población de 30 a 60 000 aves por granja.

2.2 Selección de aves enfermas y recolección de muestras de alimento, materias primas y agua

Se trabajó con aquellos lotes en los cuales se realizó un diagnóstico clínico previo de “enteritis necrótica”, por parte del Médico Veterinario de la empresa avícola y responsable del área de postura comercial.

De cada lote clínicamente afectado se seleccionaron cinco aves enfermas, tomando en consideración los signos de decaimiento, postración, crestas cianóticas y diarrea. Simultáneamente y utilizando guantes estériles, se tomó en diferentes puntos del comedero, una muestra de 1.5 kilogramos de alimento, y se depositaron en una bolsa plástica estéril con cierre hermético. Simultáneamente, para los análisis bacteriológicos correspondientes, se solicitó a la planta de alimentos de la misma empresa, las materias primas de maíz, soya y semolina,

La muestra de agua (sin ningún medicamento), se tomó desde la fuente principal y se recolectó en cuatro frascos estériles de 100 ml cada uno.

Tanto las aves como las muestras de alimento y agua, se trasladaron de inmediato a los respectivos laboratorios de la Escuela de Medicina Veterinaria (EMV) de la Universidad Nacional (UNA).

2.3 Necropsias y toma de muestras

Cada ave fue debidamente identificada con el número del lote y se le asignó una clave específica antes de ser procesada en el laboratorio de Patología Aviar de la EMV, según el protocolo de Ramírez (1990). Se anotaron los hallazgos anatomopatológicos por individuo y se recolectaron en forma aséptica el hígado y una muestra del contenido intestinal (yeyuno-íleon y ciegos), la cual se depositó en tubos estériles de 4 ml. Las muestras se trasladaron de inmediato al Laboratorio de Bacteriología para su procesamiento.

2.4 Procesamiento bacteriológico.

El protocolo para el aislamiento de bacterias compatibles con *C. perfringens* mediante pruebas presuntivas, se basó en los protocolos sugeridos por Quinn *et al.* (1994 y 2004) y Rodríguez y Quesada (2008).

El hígado fue flameado, para eliminar la contaminación externa, y se maceró manualmente en una bolsa estéril.

Aproximadamente 1 gramo de cada una de la muestras de heces se diluyó con caldo tioglicolato (OXOID), y se inoculó 0.3 ml de esta suspensión en tubos pre-reducidos de medio de carne cocinada (Laboratorio de Anaerobios de la Universidad de Costa Rica) para el

cultivo de bacterias anaerobias (PRAS). Se realizó el mismo procedimiento con las muestras de hígado y de alimento.

Las muestras de agua se pasaron a través de un filtro de 22 μm (CORNING), el cual se sumergió posteriormente en un recipiente de vidrio conteniendo el caldo infusión cerebro-corazón (OXOID).

Cada una de las muestras se incubó a 44°C por un periodo de 24 horas. Posterior a este proceso de incubación, se extrajo el contenido del caldo con una jeringa para cultivarlo en medios de cultivo sólidos.

De cada una de las muestras se cultivó una gota en agar sangre (OXOID) y agar OPSP (OXOID) y se incubaron por 48 horas en una jarra para anaerobiosis, utilizando las bolsas para generación de atmósfera anaerobia ANAERO-GEN (OXOID). Luego del período de incubación se procedió a la lectura de las placas. Las muestras donde se cultivaron colonias que presentaron doble hemólisis en la placa de agar sangre y colonias negras en el agar OPSP, se pasaron nuevamente a agar sangre y a agar cerebro-corazón (OXOID) con yema de huevo, para verificar nuevamente la doble hemólisis en el agar sangre y la actividad lecitinasa en el agar yema de huevo. Una vez que se obtuvo un cultivo puro, se realizó una prueba de motilidad bacteriana y una tinción de Gram (modificación de Kopeloff-Baerman) (Quinn *et al.*, 1994).

Luego de obtener el cultivo puro de *Clostridium* spp., este se recolectó y se congeló a -20°C en medio de infusión cerebro-corazón (OXOID) más glicerol al 20% (Chalmers *et al.*, 2007).

2.5 Visita a lotes sanos para la toma de aves al azar, recolección de alimento, materias primas y agua

Con el objetivo de manejar muestras procedentes de aves clínicamente sanas, se visitó una finca que alberga dos lotes de aves de postura comercial con una separación de 200 metros entre cada uno de ellos., tomando dos aves en cada visita por lote, así como una muestra de alimento de 1.5 Kg y otra de agua de 400 ml.

El lote A se visitó en dos oportunidades; a las 21 y 29 semanas de edad, mientras que en el caso del lote B, la primera visita se realizó horas antes de que las aves ingresaran a la galera, tomando únicamente muestras de agua y del alimento ya servido en las canaletas. La segunda visita fue realizada a las 24 semanas de edad.

Las aves se llevaron a la Escuela de Medicina Veterinaria donde se les realizó la necropsia correspondiente y las muestras de hígado y contenido intestinal, fueron trasladadas al Laboratorio de Bacteriología, junto con las muestras de alimento y agua, en cada una de las visitas realizadas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Selección de aves enfermas

Durante la ejecución del estudio se atendió siete denuncias de brotes clínicos de enteritis, por parte del Médico Veterinario de la empresa avícola. Pese a que la enteritis necrótica se presenta usualmente en pollo de engorde (Drew *et al.*, 2004) o en las gallinas de postura principalmente entre los tres y seis meses de vida (Sasaki *et al.*, 2003), en este estudio seis de los brotes atendidos fueron en aves de postura comercial entre las 61 a 70 semanas de edad, y solamente un caso correspondió a un lote de reproductores pesados de 40 semanas.

En total se trabajó 32 aves enfermas; en donde los principales signos clínicos fueron diarrea, depresión, plumas erizadas y deshidratación, mismos signos clínicos descritos en la literatura por Jordan (2002); Barnes *et al.* (2003); Butcher *et al.* (2003) y Biarnés *et al.* (2006), para la enfermedad de la enteritis necrótica.

Cabe mencionar que de los siete brotes clínicos atendidos, solamente en uno de ellos, las aves no habían iniciado el tratamiento terapéutico, mientras que en cinco de los brotes se pudo constatar que las aves habían empezado un tratamiento con penicilina-estreptomicina (AV-25 ®), teniendo desde 1 a 5 días de tratamiento al momento de la evaluación. Además en el sexto brote correspondiente a las aves reproductoras pesadas, se reportó que las mismas venían siendo medicadas en los últimos 10 días con fosfomicina y sulfas. Sobre el particular Quinn *et al.* (1994) citan: “Los especímenes deberían ser colectados siempre antes de alguna forma de tratamiento, muestras tomadas desde animales recientemente tratados con antibióticos son de poco valor para el aislamiento bacteriano”.

3.2 Necropsias de las aves clínicamente enfermas

En la Figura 1 se indican los principales hallazgos anatomopatológicos en el intestino de las aves clínicamente enfermas. La lesión descrita como daño a la mucosa intestinal fue considerada para el presente estudio, como todo aquel hallazgo macroscópico que altere la integridad de la misma; por ejemplo desprendimiento o presencia de zonas hiperémicas. Asimismo se consideró como proceso hemorrágico, toda lesión en la cual se produzca la extravasación de sangre (Slauson y Cooper, 2001), y que llegue a formar petequias, úlceras, e incluso, la presencia de sangre a nivel intestinal.

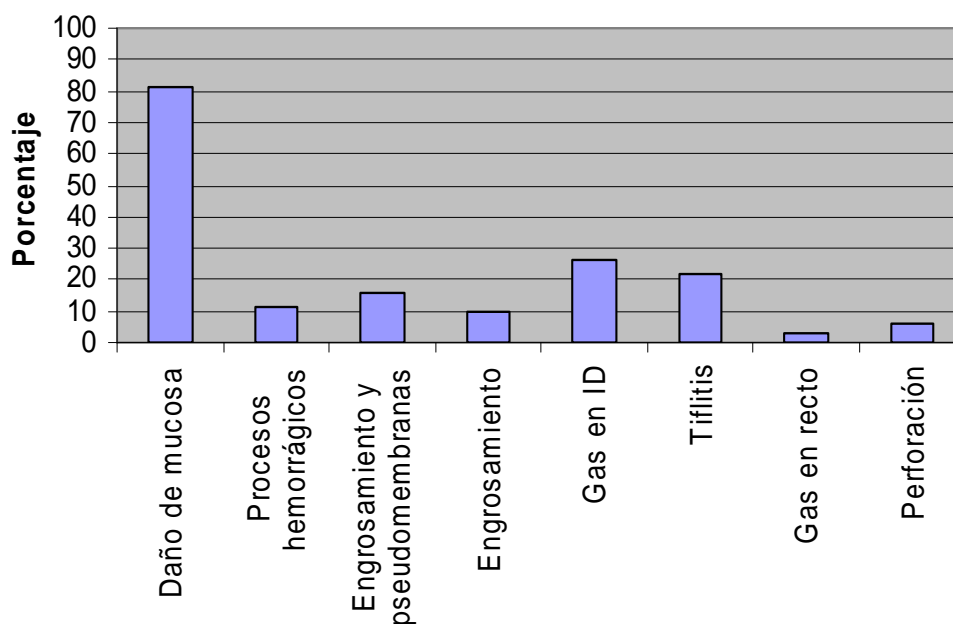


Figura 1. Hallazgos anatomopatológicos en el intestino de las aves clínicamente enfermas.

En la Figura 1 se observa que la principal lesión macroscópica en las aves clínicamente enfermas, fue el daño a la mucosa intestinal en un 81%, seguido de la presencia de gas a nivel de intestino delgado en un 28% y tiflitis en un 22%. Estos hallazgos coinciden con lo descrito por varios autores como Jordan, (2002); Barnes *et al.*, (2003); Butcher *et al.*, (2003); Olkowski *et al.*, (2005); Barbara *et al.*, (2007) y Gholamiandehkordi *et al.*, (2007). En contraposición y aunque las aves recolectadas fueron clínicamente sospechosas de poseer la patología, la presencia de pseudomembranas y el engrosamiento intestinal, que son los hallazgos macroscópicos más relevantes en la literatura para la enfermedad de la enteritis necrótica (Jordan, 2002; Barnes *et al.*, 2003; Biarnés *et al.*, 2006), en este estudio solo se reportan en un 16 y 10% respectivamente, lo cual pudo deberse a que todas las aves enfermas que fueron procesadas estaban bajo tratamiento antibacteriano de al menos un día, además de la gran capacidad regenerativa que existe a nivel de la mucosa intestinal (Lovland *et al.*(2004).

Olkowski *et al.* (2005) así como Gholamiandehkordi *et al.* (2007), reportan que varios de estos hallazgos (hiperemia y daño a la mucosa intestinal), se han ligado a la forma subclínica de la enfermedad, además que la severidad de las lesiones varía según la virulencia de la cepa presente (Barbara *et al.*, 2007),

En la Figura 2 se presentan los principales hallazgos anatomopatológicos a nivel de hígado de las aves clínicamente enfermas.

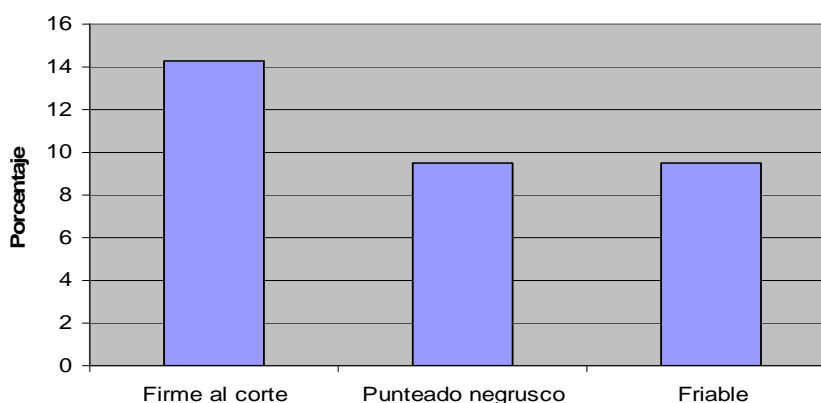


Figura 2. Lesiones anatomopatológicas en el hígado de las aves enfermas.

En la Figura 2 se denota que la principal lesión a nivel hepático fue la firmeza al corte con un 15%, seguido del punteado negruzco (hemorragias focales) en un 9% y el hígado friable en igual cantidad. El compromiso hepático ha sido descrito por varios autores (Cowen *et al.*, 1987; Kaldhusdal *et al.*, 2001; Biarnés *et al.*, 2006) los cuales han mencionado la colangiohepatitis, la consistencia firme, el punteado necrótico y la hipertrofia, como los hallazgos de mayor relevancia (Jordan, 2002; Barnes *et al.*, 2003; Butcher *et al.*, 2003; Biarnés *et al.*, 2006),

Además, el daño hepático ha sido asociado con la forma subclínica de la enfermedad (Van Immerseel *et al.*, 2004), y se cree que el daño a la mucosa intestinal sumado a la replicación masiva de *C. perfringens*, facilita el paso de la bacteria a los ductos biliares, el espacio portal y el hígado (Van Immerseel *et al.*, 2004) vía hematológica o linfática (Sasaki *et al.*, 2003).

3.3 Resultados del procesamiento bacteriológico

3.3.1. Muestras a partir de aves clínicamente enfermas, de los alimentos y agua consumidos durante los brotes clínicos

De las 32 aves clínicamente enfermas, se logró obtener 40 aislamientos bacteriológicos compatibles con *C. perfringens*, de los cuales, 27 (67.5%) fueron aislados a partir del contenido intestinal y 13 (32.5%) a partir de los hígados.

De las seis muestras de alimento recolectadas durante los brotes clínicos, se logró 6 aislamientos compatibles con *C. perfringens*., mientras que de las materias primas utilizadas como parte de los ingredientes mayores en la dieta de estas aves, no se logró ningún aislamiento bacteriológico.

De las seis muestras de agua potable procesadas en cada caso, los resultados también fueron negativos.

La presencia de *C. perfringens* en alimento y agua es ampliamente conocida, y se cree que podría jugar un papel importante en la presentación de la enfermedad (Shane *et al.*, 1984; Cowen *et al.*, 1987; Craven *et al.*, 2001), y aunque se ha catalogado a las materias primas como una fuente de contaminación del alimento (Biarnés *et al.*, 2006), existe también la

probabilidad de que la contaminación se de en la granja dado que este es un patógeno ambiental frecuente (Van Immerseel *et al.*, 2004).

3.4. Necropsias de las aves clínicamente sanas

Se trabajó seis aves clínicamente sanas, en donde las principales lesiones anatomopatológicas fueron hiperemias leves y algunas petequias a nivel de la mucosa intestinal. No se observaron lesiones macroscópicas a nivel hepático.

3.5 Resultados del procesamiento bacteriológico a partir del contenido intestinal e hígado, de las aves clínicamente sanas, así como de los alimentos y el agua

Cabe destacar que aunque eran aves clínicamente sanas entre las 21 a 29 semanas de edad, y que la empresa avícola adiciona un acidificante en el alimento para bajar el pH intestinal y así inhibir la proliferación de bacterias patógenas como *C. perfringens* (López *et al.*, [s.f.]), se logró obtener a partir de tres muestras del contenido intestinal, trece aislamientos bacteriológicos compatibles con *C. perfringens*. Este resultado es semejante a lo reportado por varios autores quienes consideran a *C. perfringens* la principal bacteria anaerobia en el contenido intestinal de las aves, aunque otros difieren de este criterio (Shane *et al.*, 1984; Garlich, 1999; Barnes *et al.*, 2003; Drew *et al.*, 2004).

La presencia del agente en una de las muestras de hígado de estas aves, de la cual se logró seis aislamientos, podría haberse dado por vía hematogena o linfática desde el intestino (Sasaki *et al.*, 2003), ya que en la necropsia se observó un leve daño a la mucosa intestinal.

De las cuatro muestras de alimento recolectadas durante estas visitas, tres fueron positivas, lográndose 9 aislamientos compatibles con *C. perfringens*, mientras que en las muestras del agua únicamente la correspondiente al lote B (previo al recibo), se logró el aislamiento de 6 cepas compatibles con *C. perfringens*.

La presencia de *C. perfringens* en agua ha sido relacionada frecuentemente con contaminación fecal (Heikinheimo, 2008), mientras que la contaminación del alimento al ser negativas las materias primas, probablemente provino de cepas ambientales (Van Immerseel *et al.*, 2004).

3.6. Características especiales de algunos aislamientos compatibles con *C. perfringens*

De todos los aislamientos compatibles con *C. perfringens* solo tres no cumplieron con todas las pruebas, de los cuales dos fallaron en el agar BHI más yema de huevo y una en el agar OPSP, dado que se han encontrado cepas de *C. perfringens* atípicas no productoras de alfa toxina, (Johanson, 2006) y que a lo largo del estudio se notó algunas inconsistencias en el agar OPSP. En este sentido, cabe mencionar que aunque el agar OPSP se ha utilizado en estudios para el aislamiento de *C. perfringens* en muestras fecales, es un medio que está diseñado principalmente para uso en alimentos, en donde se utiliza con una sobrecapa del mismo medio, además, se ha visto que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de algunos *C. perfringens* y que otros grupos bacterianos podrían llegar producir también colonias negras (de Jong *et al.*, 2003). En todo caso es un medio que se debe preparar en el momento de su uso, ya que rápidamente pierde sus propiedades. Debido a que las pruebas realizadas en este estudio son solamente análisis presuntivos se prefirió conservar dichas cepas hasta que se

lleve a cabo la confirmación de cada aislamiento mediante pruebas bioquímicas o por PCR (Heikinheimo, 2008, Johansson, 2006).

4. CONCLUSIONES

- Los signos clínicos observados en los brotes fueron inespecíficos, lo que demanda un correcto abordaje del caso clínico y el correspondiente aislamiento bacteriológico.
- Durante los ocho meses del estudio se reportaron problemas clínicos asociados a una clostridiosis intestinal, principalmente en aves adultas de postura comercial.
- Los hallazgos anatomopatológicos más relevantes a nivel intestinal fueron el daño sobre la mucosa y la presencia de gas en intestino delgado.
- Se logró establecer un protocolo bacteriológico para el correcto aislamiento de cepas compatibles con *C. perfringes*.
- La incubación de los tubos PRAS así como el de los agares por un periodo de 24 horas a una temperatura de 44°C, resultó suficiente para un buen crecimiento del agente.
- Se obtuvo un total de 61 aislamientos compatibles con *C. perfringes*, de los cuales 27 fueron a partir de aves clínicamente enfermas y 34 de aves sanas.
- A partir del contenido intestinal se logró obtener 27 aislamientos, mientras que a partir de las muestras de hígado, 13 aislamientos compatibles con *C. perfringens*.
- La contaminación del alimento o del agua no demostró ser un factor crucial para la instauración del brote, al menos en este estudio.
- Las materias primas de maíz, soya y semolina, no fueron fuente de contaminación para el alimento terminado.
- Para una correcta identificación de aislamientos compatibles con *C. perfringes*, se requiere realizar varias pruebas preliminares, sin ser ninguna de ellas concluyente, para su posterior confirmación, mediante pruebas bioquímicas o PCR.
- La enteritis necrótica es un problema multifactorial, en el que convergen el daño a la mucosa intestinal, el mal manejo de la higiene, el estrés y una masiva proliferación del agente, entre otros.

5. RECOMENDACIONES

- Se aconseja realizar un estudio epidemiológico de cada uno de los brotes para tratar de identificar el o los factores desencadenantes de los mismos para su posterior prevención.
- Darle continuidad al muestreo de más brotes con el fin de ampliar el banco de aislamientos compatibles con *C. perfringens* y así contar con más cepas para las diferentes etapas del proyecto.
- Continuar con el seguimiento que se le ha dado a los lotes clínicamente sanos con el fin de conocer el comportamiento de *C. perfringens* en la flora intestinal de estos animales.
- Realizar un estudio de prevalencia de *C. perfringens* en agua, alimento así como en las principales materias primas utilizadas en nuestro país.
- Asimismo se sugiere mantener una buena comunicación con las empresas avícola y acudir de inmediato ante un posible brote clínico y recolectar las muestras antes de cualquier tratamiento.
- Someter cada uno de los aislamientos a un análisis molecular de PCR para determinar si son Net-B positivos, lo que permitiría un diagnóstico rápido y certero y como consecuencia un mejor manejo de los antibióticos en cada uno de los desafíos.
- Realizar una prueba de campo, posterior a la prueba de PCR, con el fin de comprobar la virulencia de los aislamientos provenientes de brotes y comparar el resultado con el PCR.
- Estudiar si los aislamientos Net-B negativos son potenciados por daños severos en la mucosa y por ende serían capaces de producir la enfermedad.
- Probar a futuro la utilización de otro medio selectivo para el aislamiento de *C. perfringens* como el TSC con el propósito de mejorar los inconvenientes que presentó el medio OPSP.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbara, A., H. Truh, R. Glock. & J. Glenn. 2007. Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. *Vet. Microbiol.* 126:4. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17850994. (Consulta: 2 jun. 2008)
- Barnes, J., D. Wages, K. Opengart, & J. Dohms. 2003. Clostridial diseases. p. 775-784. *In.* J. Barnes, 11 ed. *Poultry disease*. Iowa State Press, USA.
- Biernés, S., J. Valls, F. Bartes, C. Masgrau, N. Casamitjana, J. Girón, G. Ordóñez, A. Pagès, M. Pontes. & J. Segura. 2006. Higiene y patología aviar. 2ed. Real Escuela de Avicultura, España.
- Butcher, G., J. Jacob, & F. Mather. 2003. Common poultry diseases [en línea]. University of Florida, Florida, USA. . www.edis.ifas.ufl.edu/PS044. (Consulta: 17 jun. 2007)
- Chalmers, D., S. Martin, D. Hunter, J. Prescott, L. Weber. & P. Boerlin. 2007. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chickens at a comercial farm. *Vet. Microbiol.* 127: 116-27.
- Cortés, A., E. Ávila, M. Casaubon. & S. Carrillo. 2000. El efecto del *Bacillus toyoi* en el comportamiento productivo en pollos de engorda [en línea]. *Vet. Méx.* 31:4 www.ejournal.unam.mx/vet_mex/vol31-04/RVM31405.pdf- (Consulta: 05 mar. 2007)
- Cowen, B., L. Schwartz, A. Wilson. & S. Ambrus. 1987. Experimentally induced necrotic in chickens. *Avian. Dis.* 31: 904-906.
- Craven, S., N. Cox, N. Stern. & M. Mauldin. 2001. Prevalence of *Clostridium perfringens* in commercial broiler hatcheries. *Avian. Dis.* 45: 1050-1053.
- Del Cacho, E., M. Sierra. & C. Sánchez. 2002. Parasitosis del aparato digestivo. p. 763. *In.* M. Cordero, *Parasitología veterinaria*. McGraw-Hill-Interamericana, España.
- Drew, M., N. Syed, B. Goldade, B. Laarveld. & G. Van Kessel. 2004. Effects of dietary protein source and level on intestinal populations of *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Poult. Sci.* 83: 414-420.
- Egström, B., M. Kaldusdal. & K. Pedersen. 2006. Enteritis and enterotoxemia in birds. p. 92-94. *In.* J. Mainel (ed). *Genus Clostridium: Clostridia in medical veterinary and food microbiology*. European Communities.
- Fuentes, V. 1992. *Farmacología y terapéutica veterinaria*. 2 ed. Interamericana-McGraw-Hill, México.
- Garlich, J. 1999. Microbiología del tracto gastrointestinal aviar1 2. p.110-120. *In* XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura. Sep. 24, Perú.

- Gil de los Santos, J. & C. Gil-Turnes. 2005. Probióticos em avicultura [en línea]. *Ciência Rural*, Santa María. 35:3. www.scielo.br/pdf/cr/v35n3/a42v35n3.pdf (Consulta: 05 mar. 2007).
- Glenn Songer, J. & K. Post. 2005. *Veterinary microbiology: the genus Clostridium*. USA.
- Gholamiandehkordi, A., L. Timbermont, A. Lanckriet, W. Van Den Broeck, K. Pedersen, J. Dewulf, F. Pasmans, F. Haesebrouck, R. Ducatell & F. Van Immerseel. 2007. Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian. Pathol.* 36:5.
- Heikinheimo, A. & H. Korkeala. 2005. Multiplex PCR assay for toninotyping *Clostridium perfringens* isolates obtained from finnish broiler chickens. *Applied Microbiology.* 40: 407-411.
- Heikinheimo, A. 2008. Diagnostics and molecular epidemiology of *cpe*-positives *Clostridium perfringens* type A. Tesis. Unirversity of Helsinki, Finlandia.
- Jackson, M., D. Anderson, H. Hsiao, G. Mathis. & W. Fodge. 2003. Beneficial effect of β -mannanase feed enzyme on performance of chicks challenged with *Eimeria sp.* and *Clostridium perfringens*. *Avian. Dis.* 47: 759-763
- Johansson, A. *Clostridium perfringens* the causal agent of necrotic enteritis in poultry. Tesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Suecia
- Jordan, F. 2002. Clostridia. p. 158-160. *In* F. Jordan, M. Pattison, D. Alexander. & T. Faragher. *Poultry diseases*. W.B. Saunders, Inglaterra.
- Kaldhusdal, M., C. Schneits, M. Hofshagen, & E. Skjerve. 2001. Reduced incidence of *Clostridium perfringens* associated lesions and improved performance in broiler chickens treated with normal intestinal bacteria from adult fowl. *Avian. Dis.* 45: 149-156.
- Keyburn, A., S. Sheedy, M. Ford, M. Williamson, M. Awad, J. Rood. & R. Moore. 2006. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens [en línea]. *Infect. Immun.* 76:11. www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1695520. (Consulta: 5 may. 2008)
- Keyburn, A., J. Boyce, P. Vaz, T. Bannam, M. Ford, D. Parker, A. Di Rubbo, J. Rood. & R. Moore. 2008. Net-B, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *Plos Pathog.* 4:2. www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2233674. (Consulta: 3 jun. 2008)

- Kulkarni, R., V. Perreira, S. Sharif. & E. Prescott. 2007. Immunization of broiler chicken against *Clostridium perfringens* – induced necrotic enteritis [en línea]. Clin Vaccine Immunol. 14:9. www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2043299 (Consulta: 01 jun. 2008)
- López, C., J. Arce. & E. Ávila. [s.f.]. Mitos y realidades del sistema digestivo y sus implicaciones en la productividad [en línea]. www.wpsa-aeca.com/img/informacion/13_07_21_Mitos_y_realidades_del_sistema_digestivo.pdf. (Consulta: 03 dic. 2008)
- Lovland, A., M. Kaldhusdal, K. Redhead, E. Skjerve. & A. Lillehaug. 2004. Maternal vaccination against subclinical necrotic enteritis in broiler. Avian. Pathol. 33: 1.
- McCann, M., E. Newell, C. Preston. & K. Forbes. 2006. The use of mannan-oligosaccharides and/or tannin in broiler diets [en línea]. Internatinal Journal of Poultry Science. 5:9. www.pjbs.org/ijps/fin593.pdf (Consulta: 07 mar. 2007)
- McCourt, M., D. Finlay, C. Laird, J. Smyth, C. Bell. & H. Ball. 2005. Sándwich ELISA detection of *Clostridium perfringens* cells and α -toxin from field cases of necrotic enteritis of poultry. Vet. Microbiol. 106: 259-264.
- Mcdevitt, R., J. Broker, T. Acamovic. & N. Sparks. 2006. La enteritis necrótica: un reto permanente para la industria avícola [en línea]. World's Poultry Science Journal. 62. www.wpsa-aeca.com/wpsa.php?categoria=98 (Consulta: 15 jun. 2007)
- Miller Publishing Company. 2006. Feed additive compendium, vol. 45: 155-198. Miller Publishing Company, Minnetonka, Minn.
- Norton, R. [s.f.].Enteritis necrótica en pollos [en línea]. Venezuela Avícola. 34: 8. www.pcca.com.ve/va/articulos/va34p8.htm (Consulta: 03 ago. 2007).
- Olkowski, A., C. Wojnarowicz, M. Chirino. & M. Drew. 2006. Responses of broiler chickens orally challenged with *Clostridium perfringens* isolated from field cases of necrotic enteritis. Res. Vet. Sci. 81: 1.
- Pérez, H. [s.f.].La exclusión competitiva en la avicultura [en línea]. Venezuela Avícola. 33: 11. www.pcca.com.ve/va/articulos/va33pll.htm (Consulta: 05 mar. 2007).
- Quinn, P., B. Markey, M. Carter. & G. Carter. 1994. Clinical vetererinary microbiology. Mosby-Wolfe. España.
- Quinn, P., B. Markey, M. Carter, W. Donnelly. & F. Leonard. 2004. Vetererinary microbiology and microbial disease. Blackwell publishing. India.

- Quiroz, C. 1987. Transmisión de las salmonelas en las aves [en línea]. *Veterinaria Tropical*.12:39-45. (Consulta: 05 mar. 2007)
www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasCientificas/VeterinariaTropica/vt12/texto/cquiroz.htm
- Ramírez-Marín, M. 1990. Técnica de necropsia en aves [Material de apoyo del curso de Patobiología].
- Ramírez-Marín, M. 2008. Entrevista con la Dra. Marcia Ramírez Marín. Encargada de la Cátedra de Patología Aviar. Escuela de Medicina Veterinaria de Universidad Nacional, Heredia, C.R. Jun. 17.
- Rodríguez, E. & C. Quesada. 2008. Bacteriología anaerobia: principios clínicos y diagnóstico de laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- Santin, K., A. Maiorka. & M. Macari. 2001. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Appl. Poult. Res.* 10:236-244.
- Sasaki, J., M. Goryo, M. Makara, K. Nakamura. & K. Okada. 2003. Necrotic hepatitis due *Clostridium perfringens* infection newly hatchy broiler chicks. *J. Vet. Med. Sci.* 65:11.
- Slauson, D. & B. Cooper. 2001. *Mechanics of disease*. 3ed. Mosby Inc. USA.
- Shane, S., D. Koetting, & K. Harrington. 1984. The occurrence of *Clostridium perfringens* in the intestine of chicks. *Avian. Dis.* 28: 1120-1124.
- Spoor, J. & J. Riviere. 1995. Chloranfenicol, mocolides, lincosamides, fluoroquinolones and miscellaneous antibiotics. p. 842. *In* R. Adams, *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 7 ed. Iowa State University Press. USA.
- Sumano, H. 1997. *Farmacología veterinaria*. 3 ed. McGraw – Hill, México.
- Universidad de Mississippi. [s.f.] Enfermedades bacterianas. *Venezuela Avícola*. 30: 9.
<http://www.ppca.com.ve/va/index.html>. (Consulta: 02 ago. 2007).
- Takeda, T., T. Fukata, T. Miyamoto, K. Sasai, E. Baba. & A. Arakawa. 1995. The effects of dietary lactose and rye on cecal colonization of *Clostridium perfringens* in chicks. *Avian. Dis.* 39: 375-381.
- Thompson, D., V. Parreira, R. Kulkarni. & J. Prescott. 2005. Live attenuated vaccine-based control of necrotic enteritis of broiler chickens [en línea]. *Vet. Microbiol.* 113:1-2.
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289639. (Consulta: 28 may. 2008).
- Van Immerseel, F., J. De Buck, F. Pasmans, G. Huyghebaert, F. Haesebrouck. & R. Ducatelle. 2004. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian. Pathol.* 33:6.