



© 2004 Darmawi  
Pengantar Falsafah Sains (PPS702)  
Program Pascasarjana/S3  
Institut Pertanian Bogor

Posted: 25 Desember 2004

*Dosen :*

Prof. Dr. Ir. Rudy C. Tarumingkeng, M.F (Penanggung Jawab)

Prof. Dr. Ir. Zahrial Coto, M.Sc

Dr. Ir. Hardjanto, M.S

## **AKTIVITAS TOKSIN *Clostridium perfringens* DAN PENCEGAHANNYA PADA AYAM**

Oleh:

**Darmawi**

B063040071/ SVT

E-mail: [d\\_darmawi@yahoo.com](mailto:d_darmawi@yahoo.com)

### **PENDAHULUAN**

*Clostridium perfringens* merupakan bagian dari flora bakteri normal di dalam traktus intestinal. Secara normal jumlah *C. perfringens* di dalam saluran intestinal adalah rendah. Dalam keadaan tertentu *C. perfringens* bermultiplikasi dan menyebabkan penyakit enterik (Elwinger *et al.* 1998). Organisme ini tersebar di mana-mana, dan kadang-kadang ditemukan di dalam saluran intestinal ayam yang sehat (Lovland dan Kaldhusdal 2001).

Kebanyakan penyakit bakterial dimulai dengan kolonisasi bakteri. Pengecualian terhadap cara ini adalah pada bakteri yang menyebabkan penyakit dengan menghasilkan eksotoksin ketika perkembangannya. Eksotoksin teringesti dan bertanggungjawab terhadap gejala penyakit. Contoh bakteri yang menimbulkan penyakit tanpa dimulai dengan kolonisasi adalah *C. perfringens* (Salyers dan Whitt 1994), dimana bakteri teringesti bersama makanan terkontaminasi dan menghasilkan eksotoksin ketika mengalami sporulasi di dalam intestinal. Sporulasi merupakan respon umum dari pembentukan spora terhadap tekanan dan lingkungan asam (McClane 2000).

*C. perfringens* bersifat anaerob, positif gram, batang yang membentuk spora. *C. perfringens* tumbuh dengan cepat di dalam pakan, terutama pakan asal hewan. Bakteri ini tidak menghasilkan toksin ketika tumbuh di dalam pakan, tetapi hanya setelah terangsang untuk bersporulasi oleh lingkungan asam. Toksin berinteraksi dengan mukosa intestinal, menyebabkan diare (Turcsan *et al.* 2001). Tidak semua kasus diare *C. perfringens* disebabkan oleh pakan yang terkontaminasi. Penggunaan antibiotik dapat mengganggu koloni mikroflora dan memberi kesempatan kepada *C. perfringens* untuk berkembang pada level yang lebih tinggi (Elwinger *et al.* 1998).

*C. perfringens* merupakan salah satu bakteri yang dapat membawa dampak terhadap masalah kesehatan dan kerugian ekonomi dalam produksi ayam terutama disebabkan oleh diare, nekrotik enteritis, hepatitis, dan renitis (Lovland dan Kaldhusdal 2001). Untuk mendapatkan metode pengendalian dan pencegahan infeksi suatu penyakit haruslah diketahui interaksi antara agen penyebab infeksi dengan hospes. Oleh karena itu tujuan penulisan makalah ini adalah untuk memberikan informasi yang tepat dan akurat tentang mekanisme interaksi antara *C. perfringens* dengan ayam. Permasalahan yang dibahas adalah interaksi *C. perfringens* pada saluran cerna ayam melalui pengeluaran toksin dan aktivitasnya yang berakibat pada kerusakan jaringan hospes. Permasalahan lainnya yang dibahas adalah kejadian resistensi terhadap antibiotik pada bakteri *C. perfringens* dan metode pengendalian serta pencegahannya.

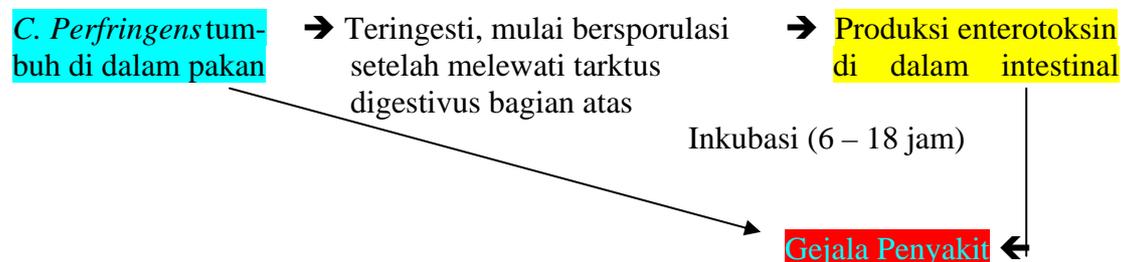
## **PEMBAHASAN**

Langkah pertama yang dibutuhkan *C. perfringens* adalah mengkontaminasi pakan dan termakan oleh ayam. Kebanyakan bakteri vegetatif yang teringesti terbunuh oleh pH asam, akan tetapi tingkat kontaminan yang tinggi di dalam pakan ( $>10^6 - 10^7$  sel/gram pakan) dari *C. perfringens* vegetatif, beberapa diantaranya masih survive luput dari pH asam sehingga sampai ke intestinal (McClane 2000).

Sekali hadir di dalam intestinal, sel-sel vegetatif *C. perfringens* yang survive segera bermultiplikasi, kemudian mengalami sporulasi (Turcsan *et al.* 2001). Sporulasi *C. perfringens* di dalam intestinal mungkin dipicu oleh kondisi asam atau oleh garam empedu di dalam intestinal. Penelitian mutakhir mengindikasikan bahwa kedua isolat *C. perfringens* enterotoksin (CPE)-positif dan CPE-negatif dapat

menghasilkan suatu faktor resisten asam dan panas yang merangsang sporulasi *C. perfringens* (McClane 2000).

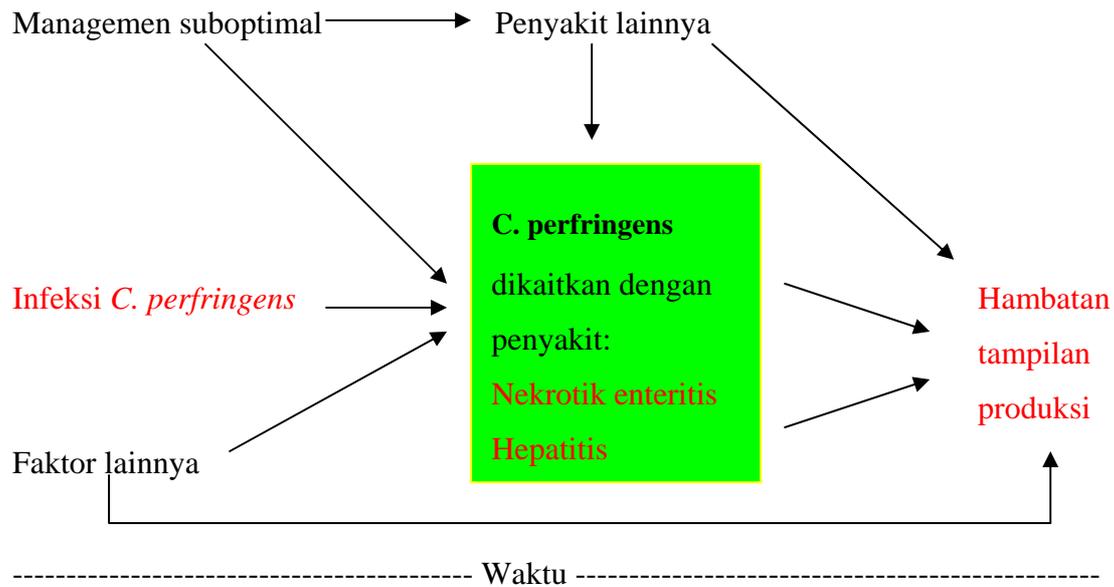
Turcsan *et al.* (2001), CPE yang dihasilkan berakumulasi di dalam sitoplasma sel host hingga dilepaskan ke dalam lumen intestinal. Sekali hadir di dalam lumen, CPE dengan cepat terikat dengan reseptor pada epitel intestinal dan menyebabkan deskuamasi epitel intestinal. McClane (2000), perkembangan CPE yang menyebabkan kerusakan jaringan intestinal sangat erat korelasinya dengan *onset* symptom fisiologik seperti kehilangan cairan/elektrolit (suatu efek yang berhubungan dengan diare secara klinik). Dilaporkan juga bahwa CPE memiliki aktifitas superantigenik yang mempunyai kontribusi terhadap inflamasi.



Gambar 1. Patogenesis keracunan pakan oleh *C. perfringens*

Secara klinis keracunan pakan yang disebabkan oleh *C. perfringens* dikarakterisasikan oleh diare dan kram abdominal yang muncul kira-kira 6 – 18 jam setelah memakan makanan kontaminan (Gambar 1). Periode inkubasi ini dibutuhkan oleh *C. perfringens* untuk sporulasi *in vivo* (McClane 2000).

Lovland dan Kaldhusdal (2001) melaporkan bahwa nekrotik enteritis dan hepatitis akibat infeksi *C. perfringens* akan memperlambat tampilan produksi ayam (Gambar 2) yang mencapai 25 sampai 43%. Penyakit berjalan secara subklinis sulit terdeteksi dan ayam tetap terpelihara di dalam *flock* meskipun dengan ratio konversi pakan yang rendah. Manajemen yang tidak optimal dan infeksi oleh agen lain juga dapat menyebabkan ayam terinfeksi oleh *C. perfringens* yang pada akhirnya memperlambat tampilan produksi. Faktor lainnya seperti kesulitan melakukan eradikasi spora *C. perfringens*, hygiene secara rutin, dan faktor manajemen yang umum lainnya turut membentuk suatu jaring-jaring infeksi oleh bakteri tersebut.



Gambar 2. Jaringan penyebab terhambatnya tampilan produksi dikaitkan dengan infeksi *C. perfringens*.

#### Mekanisme Aktifitas Toksin

Kloning dari gen *cpe intact* pada genetik clostridial sudah dapat memberi pengetahuan tentang genetik *cpe*. Gen *cpe* hanya terdapat pada fraksi kecil (<5%) dari populasi global *C. perfringens*. Kebanyakan strain membawa sebuah salinan kromosom tunggal *cpe*. Selanjutnya gen *cpe* dari strain (kebanyakan derivat dari strain NCTC 8797) sudah berhasil dipetakan pada suatu daerah variabel kromosom, bahwa *cpe* terletak pada elemen genetik aktif (McClane 2000).

CPE diekspresikan melalui dua mekanisme. Pertama, ekspresi CPE dengan pengaturan yang sangat ketat, karena erat kaitannya dengan sporulasi. *C. perfringens* peracun makanan strain NCTC 8239 menghasilkan >1000 kali lipat lebih banyak selama sporulasi dibanding pertumbuhan sel vegetatif. Ekspresi CPE juga berhubungan dengan isolat *C. perfringens* tipe A *cpe*-positif, tanpa memperhatikan mengapa isolat membawa suatu plasmid-borne atau suatu gen *cpe* kromosomal. Kedua, ekspresi CPE berkaitan dengan pertanda jumlah besar enterotoksin yang terbuat oleh kultur sporulasi kebanyakan *C. perfringens*. CPE dapat dihitung 15% dari total protein dalam *C. perfringens* yang mengalami sporulasi (McClane 2000).

Mekanisme molekuler CPE penyebab kerusakan jaringan intestinal ayam dilihat dengan menggunakan mikroskop elektron dengan percobaan pemberian CPE pada sel-sel epitel intestinal. Penelitian Kaldhusdal *et al.* (1995) menunjukkan pengembangan perubahan yang ekstensif. Karena kerusakan ini terlebih dahulu dapat

dideteksi pada orgalla sel, maka terkesan bahwa CPE mungkin membunuh sel sensitif dengan merusak membran plasmanya.

CPE merupakan suatu toksin membran-aktif, dimana toksin menyebabkan perubahan sifat permeabilitas sel sensitif sehingga meningkatkan permeabilitas terhadap kation, anion, dan molekul organik kecil seperti asam amino. Permeabilitas molekul kecil ini mengubah kontribusi terhadap toksisitas CPE melalui dua cara (McClane 2000). Pertama, CPE penyebab perubahan permeabilitas membran plasma sangat mengganggu genangan sitoplasma dari molekul kecil, segera menyebabkan terhentinya proses vital metabolik seperti sintesis makromolekuler. Kedua, perubahan permeabilitas akan mengganggu equilibrium tekanan osmotik dimana secara signifikan akan menyebabkan masuknya air ke dalam sel. Masuknya air akan memperlonggar membran plasma sehingga langsung menyebabkan lisis sel.

Ada empat tahap mekanisme kerja CPE. Sel-sel sensitif mengekspresikan Claudin yang dapat berfungsi sebagai reseptor dan mampu memperantarai sitotoksitas CPE (McClane 2000).

#### 1. Pengikatan CPE pada reseptornya

Claudin dapat menyelenggarakan fungsi reseptor CPE. Paling tidak ada tiga kemungkinan skenario pengikatan: (1) Hanya Claudin sebagai fungsional reseptor CPE yang digunakan oleh semua sel pengikat CPE. (2) Reseptor CPE tersedia dalam tipe ganda. Sel mengekspresikan dua kelas reseptor CPE dengan afinitas yang sangat berbeda, yaitu Claudin dan protein membran 40-50 kDa yang menyelenggarakan fungsional reseptor CPE. (3) Claudin dan protein 40-50 kDa tersedia sebagai co-reseptor untuk pengikat CPE. Respon sitotoksik diawali ketika CPE mengikat pada Claudin dan protein membran 40-50 kDa.

#### 2. Perubahan fisik CPE pasca pengikatan

Taraf perubahan fisik pasca pengikatan dalam aksi CPE berhubungan dengan formasi kompleks kecil. Sebagai contoh, jika CPE hanya menggunakan reseptor Claudin, yang diakibatkan oleh CPE adalah kompleks Claudin kemudian berinteraksi dengan protein membran 40-50 kDa membentuk kompleks kecil. Formasi kompleks kecil secara efektif dapat mengunci CPE pada permukaan membran plasma. Jika reseptor CPE tipe ganda yang bekerja, maka CPE terikat pada tipe reseptor pertama kemudian berinteraksi dengan reseptor kedua membentuk kompleks kecil. Jika CPE

terikat secara simultan pada co-reseptor, taraf perubahan pasca pengikatan CPE secara efektif kompleks co-reseptor mengunci CPE pada permukaan membran.

### 3. Formasi kompleks besar CPE

Sel-sel sensitif CPE membentuk kompleks kecil dan kompleks besar dimana formasi kompleks kecil mendahului formasi kompleks besar. Ini berarti formasi kompleks besar merupakan hasil interaksi antara perubahan fisik kompleks kecil dan sebelumnya protein membran mengikat pada kompleks besar. Hambatan yang kuat formasi kompleks besar diamati pada temperatur rendah terkesan bahwa interaksi antara perubahan fisik kompleks kecil dan protein 70 kDa memerlukan difusi protein membran melalui membran lipid bilayer.

### 4. Onset perubahan permeabilitas molekul kecil

Kompleks besar menghubungkan struktur pori yang memberikan jalan bebas molekul kecil menyebrang membran plasma. Kompleks besar akan berperan sebagai suatu struktur pori yang luar biasa terdiri dari campuran heterogen protein pro- dan eukaryot. Struktur pori merupakan hasil dari CPE yang menyisip kedalam membran.

## Kerusakan yang Ditimbulkan

Menurut Henderson *et al.* (2000) toksin dari *C. perfringens* adalah alfa toksin yang mempunyai aktifitas seperti fosfolipase C – suatu enzim yang dapat merusak membran sel hewan. Lovland dan Kaldhusdal (2001), nekrotik enteritis adalah suatu kerusakan intestinal yang terjadi akibat infeksi *C. perfringens* tipe A atau C toksigenik yang berproliferasi dalam jumlah besar di dalam usus halus. Alfa toksin yang dihasilkan oleh *C. perfringens* menyebabkan nekrosa pada mukosa intestinal yang diawali dari ujung villi. Lesi nekrotik akan menyebar secara luas dengan membran dipteritik dan disfungsi yang hebat intestinal. Toksaemia juga terjadi yang bersama-sama dengan lesi intestinal menyumbangkan gejala klinis penyakit, bahkan dalam beberapa kasus menyebabkan kematian.

Enteretoksaemia pada ayam terfokus pada intestinal, tetapi Vissiennon *et al.* (1996) mendemonstrasikan bahwa toksin *C. perfringens* tipe A tidak hanya merusak enterosit sebagai organ target utama, tetapi juga parenkim hati dan sel-sel endotel di dalam hati dan ginjal. Efek patologi utama adalah lesi mitokondria hepatosit dan di dalam sel-sel epitel tubular ginjal dan pembengkakan sitoplasma sel-sel endotel kapiler di dalam kedua organ tersebut. Lesi mitokondria juga terjadi pada kardiomyosit dan juga dijumpai penebalan membran dasar glomerulus. Berdasarkan temuan

tersebut, toksin terutama alfa toksin yang dihasilkan oleh *C. perfringens* di dalam intestinal meneruskan ke sistem sirkulasi melalui mukosa intestinal (=enterotoksaemia) dan mencapai organ-organ lainnya. Setelah diabsorpsi, aktifitas alfa toksin pada ayam akan menghasilkan endotelio-, hepato-, dan nefrotoksik.

Kondisi lain yang berkaitan erat dengan infeksi *C. perfringens* dan nekrotik enteritis pada ayam broiler adalah kolangiohepatitis dan nekrotik hepatitis masif (secara hebat). Hepatitis yang berkenaan dengan *C. perfringens* biasanya ditemukan pada broiler saat pemrosesan karkas dan mungkin terdeteksi dalam *flock* dengan atau tanpa memperlihatkan gejala klinis nekrotik enteritis sebelumnya (Sasaki *et al.* 2000).

Vissiennon *et al.* (1996), CPE pada ayam dapat berakibat fatal dengan dan tanpa disertai nekrotik enteritis. Temuan morfologi dapat meliputi hemoragi dan nekrotik enteritis. Mukosa yang rusak tertutup suatu membran coklat keabuan hingga hijau kekuningan. Temuan nekropsi pada kasus tanpa nekrotik enteritis memperlihatkan diare dan kandungan cairan intestinal bergelembung gas.

Kerusakan lain yang ditimbulkan akibat infeksi *C. perfringens* berupa pembesaran hati, pucat, loreng dengan pola berlobus dan lesi-lesi kecil. Dinding kantong empedu meradang atau nekrotik dan karkas ayam kadang-kadang ikterus (jaundice) (Lovland dan Kaldhusdal 2001). Investigasi mikroskop elektron pada hati dan ginjal yang dilakukan oleh Vissiennon *et al.* (1996) pada ayam broiler yang diinfeksi dengan *C. perfringens* memperlihatkan adanya perubahan pada kedua organ tersebut. Empat belas hari pasca infeksi, sel-sel hati dan sel-sel tubuler ginjal mengalami perubahan berupa lesi mitokondria (bengkak, kristolisis, penjernihan matriks, dan gambaran myelin), kehilangan glikogen, dan pembengkakan sel endotel kapiler pada kedua organ serta pengentalan membran dasar glomerulus.

#### Resistensi Terhadap Antibiotik

Resistensi *C. perfringens* terhadap kloramfenikol diperantarai oleh gen *catD* dan *catP*, dimana keduanya menyandikan kloramfenikol asetiltransferase (Lyras *et al.* 1998). Gen *catP* terletak pada transposon Tn4451 dan Tn4452. Tn4451 ditemukan pada tetrasiklin konjugatif plasmid pIP401 resisten dan tepat memotong pada konjugatif transfer, dimana kehadirannya ada pada plasmid multicopy *C. perfringens* dan *E. coli*. Produk dari kedua potongan adalah identik, yang mengindikasikan bahwa penghilangan yang tepat sama-sama terjadi pada kedua organisme. Transposisi dari Tn4451 sudah dilakukan pada *E. coli* tetapi hanya terjadi dalam frekuensi yang sangat

rendah. Transposisi tidak diperlihatkan pada *C. perfringens* karena kekurangan metode deteksi dengan sensitivitas yang cukup.

Tn4451 berangkai secara sempurna dan mengandung 6 gen. Salah satunya adalah *tnpX* yang menyandi suatu trans-acting site-specific recombinase yang bertanggungjawab terhadap pemisahan Tn4451 pada *C. perfringens* dan *E. coli*. Protein TnpX mengkatalis pemisahan Tn4451 sebagai molekul sirkuler yang berfungsi sebagai transposisi intermediet. Gen lain yang diawa oleh Tn4451 adalah *tnpZ* yang menyandikan protein TnpZ 50-kDa yang mempunyai rangkaian asam amino yang mirip dengan kelompok mobilisasi plasmid dan protein rekombinasi.

Johanesen *et al.* (2001), resistensi *C. perfringens* terhadap tetrasiklin ditentukan oleh faktor dari plasmid R konjugatif pCW3 yang terdiri dari dua gen yaitu tetA(P) dan tetB(P) yang memperantarai resistensi dengan mekanisme yang berbeda. Analisis transkripsi menunjukkan bahwa gen tetA(P) dan tetB(P) terdiri dari suatu operon yang ditranskrip dari promotor tunggal.

#### Pencegahan

Metode pencegahan yang sangat populer digunakan terhadap nekrotik enteritis adalah penambahan antibiotik ke dalam pakan ayam, tetapi para produser semakin tertarik kepada pembuatan dan penggunaan bioproduk yang bukan antibiotik. Penelitian mutakhir menunjukkan bahwa uji produk mikroflora dapat lebih cepat dalam mengurangi pengaruh *C. perfringens* terhadap nekrotik enteritis. Hofacre *et al.* (1998) telah membandingkan dampak pemakaian bioproduk intestinal (Aviguard®) dengan Virginiamycin dan Bacitracin MD, dimana Avigurd® lebih efektif untuk mengurangi kerusakan yang ditimbulkan oleh nekrotik enteritis.

Penggunaan flora normal usus atau probiotik merupakan tindakan alternatif untuk menghindari pemakaian antibiotik. Pemberian flora normal usus secara langsung akan meningkatkan kuantitas flora normal. Sedangkan pemberian probiotik akan memacu perkembangan flora normal yang ada di dalam intestinal. Peningkatan flora normal akan membantu penyerapan zat nutrisi menjadi lebih efisien. Karena beberapa flora normal diketahui mampu mengurai senyawa dengan berat massa yang besar menjadi senyawa lain yang lebih sederhana. Peningkatan flora normal juga dapat menurunkan peluang bagi *C. perfringens* untuk dapat berkembang karena tingkat kompetitif yang lebih tinggi. Walaupun demikian, penggunaan flora normal intestinal atau probiotik masih kurang efektif bila dibandingkan dengan Aviguard®. Dengan kata lain, Aviguard® memiliki tingkat kemanjuran yang cukup signifikan bila

dibandingkan dengan bioproduk intestinal lainnya seperti flora normal usus atau probiotik (Hofacre *et al.*, 1998).

## KESIMPULAN

*C. perfringens* bersifat anaerob, positif gram batang yang membentuk spora. Bakteri dapat tumbuh di dalam pakan yang terkontaminasi dan termakan oleh ayam. Bakteri yang lolos dari pH asam segera bermultiplikasi, kemudian mengalami sporulasi. Toksin berakumulasi di dalam sitoplasma sel host dan dilepaskan ke dalam lumen intestinal, kemudian segera terikat dengan reseptor pada epitel melalui ekspresi Claudin dan protein membran 40 – 50 kDa, sehingga toksin terjatuh diantara keduanya. Toksin yang terjatuh akan membentuk suatu kompleks yang dapat menyebabkan munculnya suatu pori membran, sehingga meningkatkan permeabilitas terhadap kation, anion, dan molekul organik kecil seperti asam amino yang mengganggu proses vital metabolik. Equilibrium tekanan osmotik sel akan terganggu karena masuknya air ke dalam sel dan dapat memperlonggar membran plasma sehingga sel mengalami lisis. Alfa toksin yang dihasilkan oleh *C. perfringens* menyebabkan nekrosis pada mukosa intestinal yang diawali dari ujung villi. Lesi nekrotik akan menyebar secara luas. Toksin *C. perfringens* tipe A tidak hanya merusak enterosit sebagai organ target utama, tetapi juga parenkim hati dan sel-sel endotel di dalam hati dan ginjal. Efek patologi utama adalah lesi mitokondria hepatosit dan di dalam sel-sel epitel tubular ginjal.

Resistensi *C. perfringens* terhadap kloramfenikol diperantarai oleh gen *catD* dan *catP*, dimana keduanya menyandikan kloramfenikol asetiltransferase. Sedangkan resistensi terhadap tetrasiklin ditentukan oleh faktor dari plasmid R konjugatif pCW3 yang terdiri dari dua gen yaitu tetA(P) dan tetB(P).

Bioproduk intestinal dapat digunakan untuk pencegahan. Penggunaan flora normal usus atau probiotik merupakan tindakan alternatif untuk menghindari pemakaian antibiotik. Pemberian flora normal usus secara langsung akan meningkatkan kuantitas flora normal sehingga mengurangi kesempatan *C. perfringens* untuk bersaing. Sedangkan pemberian probiotik akan memacu perkembangan flora normal yang ada di dalam intestinal. Peningkatan flora normal akan membantu penyerapan zat nutrisi menjadi lebih efisien.

## DAFTAR PUSTAKA

- Elwinger K, Berndtson E, Engstrom B, Fossum O, & Waldenstedt L. 1998. Effect of antibiotic growth promoters and anticoccidials on growth of *Clostridium perfringens* in the caeca and on performance of broiler chickens. *Acta Vet. Scand.* 39: 433 – 441.
- Henderson B, Wilson M, McNab R, & Lax AJ. 2000. Cellular microbiology: bacteria-host interactions in health and disease. *John Wiley & Sons, Inc.*, 605 Third Avenue, New York, NY 10158 - 0012, USA.
- Hofacre CL *et al.* 1998. Use of Aviguard and other intestinal bioproducts in experimental *Clostridium perfringens*-associated necrotizing enteritis in broiler chickens. *Avian Diseases Journal* 42: 579 – 584.
- Johanesen PA, Lyras D, Bannam TL, & Rood JI. 2001. Transcriptional analysis of the tet(P) operon from *Clostridium perfringens*. *Pub Med Journal Bacteriol*, available et <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [4 Mei 2002]
- Kaldhusdal M, Evensen O, & Landsverk T. 1995. *Clostridium perfringens* necrotizing enteritis of the fowl: a light microscopic, immunohistochemical and ultrastructural study of spontaneous disease. *Avian Pathology Journal* 24: 421 – 433.
- Lovland A. & Kaldhusdal M. 2001. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens*-associated hepatitis. *Avian Pathology Journal* 30: 73 – 81.
- Lyras D *et al.* 1998. Chloramphenicol resistance in *Clostridium difficile* is encoded on Tn4453 transposon that are closely related to T n4451 from *Clostridium perfringens*. *Journal of The American Veterinary Medical* 42(7): 1563 – 1567. Available et <http://www.Journals.asm.org/> [4 Mei 2002]
- McClane BA. 2000. The action, Genetics, and synthesis of *C. perfringens* enterotoxin in Microbial foodborne diseases mechanism of pathogenesis and toxin synthesis. 10<sup>th</sup> ed. *Technomic Publishing Company, Inc*, pp.247-267.
- Salyers AA & Whitt DD. 1994. Disease without colonization: food-borne toxinose caused by *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, and *Clostridium perfringens* in Bacterial pathogenesis a molecular approach. *American Society for Microbiology*, Washington, DC 20005. pp. 130-140.
- Sasaki J, Goryo M, & Okada K. 2000. Cholangiohepatitis in chickens induced by bile duct ligations and inoculation of *Clostridium perfringens*. *Avian Pathology Journal* 29: 405 – 410.
- Turcsan J *et al.* 2001. Occurrence of anaerobic bacterial, clostridial, and *Clostridium perfringens* spores in raw goose livers from a poultry processing plant in Hungary. *Journal of Food Protection* 64(8): 1252-1254
- Vissiennon T, Menger S, & Langhof I. 1996. Hepatic and renal ultrastructural lesien in exprimental *Clostridium perfringens* type A enterotoxemia in chickens. *Avian Diseases* 40 (3): 720 – 724, Institute for Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Germany on line available et <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [4 Mei 2002]