

VERA LÚCIA JANEIRO DA SILVA

**Deteção e Quantificação Precoce de *Clostridium*
perfringens em Frangos de Crescimento Rápido e de
Plumagem Branca na Região de Lisboa e Vale do Tejo**

Orientador: Dr. João Correia Rasquilho Raposo

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2012

VERA LÚCIA JANEIRO DA SILVA

**Deteção e Quantificação Precoce de *Clostridium*
perfringens em Frangos de Crescimento Rápido e de
Plumagem Branca na Região de Lisboa e Vale do Tejo**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em
Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em
Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de
Humanidades e Tecnologias

Orientador: Dr. João Correia Rasquilho Raposo

Co – Orientador: Prof.^a Dr.^a Cláudia Sofia Antunes Ferreira

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2012

DEDICATÓRIA

*Desfiz-me em esforço,
E acabei recompensado
Quem cumpre um sonho
Sabe bem o valor do que quer,
Basta Querer!*

Diogo Dias (letra da música “*Calma*” dos Klepht)

Aos meus pais Dolores e Jerónimo,
pois sem eles e apesar do meu querer,
este sonho não teria sido realizado,
agradecidamente
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação, que representa o culminar do meu percurso académico, não seria possível sem a colaboração e o apoio de um conjunto de instituições e pessoas às quais qualquer agradecimento será curto e insuficiente, pela importância individual de cada um.

Começo por referir o apoio institucional da Elanco Animal Health, nas pessoas do Dr. João Margalho e Dr. Rui Gabriel, através da cedência dos kits Clostridium FirstTest™ (BioX Diagnostics) para realização deste estudo; bem como ao Laboratório Socampestre, na pessoa da Eng.^a Inês Cruz, não só pela comparticipação das análises microbiológicas, como também pela amizade, conselhos e ensinamentos transmitidos nas longas horas passadas juntas.

Devo um agradecimento ao Sr. Fernando Correia, Administrador Executivo da Interaves – Sociedade Agropecuária S.A., por ter aceitado a realização do meu estágio curricular na sua empresa, bem como aos Assistentes Técnicos de Produção: Nuno Afonso, Eng.^o Júlio Osório e João Paulo Frazão pelo apoio, conhecimentos transmitidos e acompanhamento durante as visitas aos criadores integrados. Assim como a todos os outros colaboradores.

Sem qualquer ordem de importância, porque tal seria injusto da minha parte, um Muito Obrigada às pessoas que fazem parte deste trabalho e desta minha caminhada:

Ao meu orientador de estágio, Dr. João Raposo, gostaria de expressar a minha elevada estima, consideração e apreço, pelo seu tempo dispensado, trabalho, dedicação e apoio incondicional, desde o primeiro contacto, e pelos vastos conhecimentos e ensinamentos profissionais e humanitários, transmitidos durante o período de estágio e elaboração desta dissertação. Por tudo isto queria expressar o meu mais sincero agradecimento.

À minha co-orientadora académica, Dr.^a Professora Cláudia Ferreira, que durante o tempo do estágio curricular, e após este, durante a composição da dissertação, se mostrou sempre disponível para esclarecer dúvidas para que conseguíssemos chegar aos objetivos propostos.

Ao Dr. Prof. Mauro Bragança pela preciosa disponibilidade para auxílio na análise estatística, fundamental para esta dissertação.

Ao Dr. David Ferreira pela disposição e colaboração na revisão desta tese de mestrado.

Ao Dr. Jorge Mineiro, que foi sem dúvida uma peça fundamental nas minhas tomadas de decisões sobre qual o melhor caminho a seguir durante esta longa caminhada. É um exemplo como profissional e na sua paixão pelos animais. Agradeço a amizade ao longo destes anos, quando ainda respondia “quero ser médica veterinária!”, à questão “o que queres ser quando fores grande?”. *“Um dia vamos ser colegas”* ... E esse dia está a chegar!

Aos meus colegas de curso, e grupo de trabalho, Ana Pereira, André Gonçalves, Fábio Pontes e Luís Duarte, pelos muitos momentos partilhados, gargalhadas, ansiedades, horas de estudo e de pesquisa, cusquices e amizade. Fomos sem dúvida uma grande equipa.

Ao Tiago, pois chegar até aqui não foi fácil, mas a caminhada tornou-se mais agradável por ter ao meu lado a pessoa que amo. Tantas vezes gastei o nosso tempo a falar de problemas, chorando pela sensação de não dar conta e tu estiveste sempre ao meu lado com um abraço acolhedor. Talvez nesta caminhada juntos não tenha dado o devido valor às tuas atitudes, mas queria deixar aqui a minha gratidão. Sei que posso confiar em ti, porque te interessas pela minha vida, buscas o meu crescimento, sonhas junto comigo. Obrigada por compreenderes todos os momentos de ausência e seres a minha felicidade.

Aos meus Pais, que abdicaram de muito para tornar esta aspiração uma realidade, cedendo os seus sonhos em prol dos meus. Obrigada pelo amor incondicional, pela paciência, pelo respeito, pelo silêncio carinhoso, pelas repreensões tempestivas, pelo amparo nas horas difíceis. Obrigado por acreditarem e investirem no meu potencial, por me oferecerem os elementos fundamentais para crescer e construir, assim, a minha própria história. Dedico-vos todos os aplausos que recebo por esta vitória e agradeço, por quem sou, pelo que alcancei e pela base que me deram para ser cada vez melhor. Obrigada, acima de tudo, pelo sonho que realizo hoje, pois tudo que conquistei e, principalmente, o que sou, devo-o a vocês.

Aos meus meninos Winnie e Pooh e os seus bebés, Bolota e Capote, Star, Nicky, Jacó, Igor, Zé e Maria, o meu mini zoo, que são companheiros de vida e todos os dias a motivação e razão pela qual lutei para realizar o sonho de ser Médica Veterinária!

Deteção e Quantificação Precoce de *Clostridium perfringens* em Frangos de Crescimento Rápido e de Plumagem Branca na Região de Lisboa e Vale do Tejo

RESUMO

Clostridium perfringens é uma bactéria anaeróbia Gram positiva, formadora de esporos e produtora de toxinas capazes de causar um amplo espectro de doenças em humanos e animais. Em frangos de crescimento rápido e de plumagem branca pode causar lesões e manifestações clínicas severas como enterite necrótica aviária (ENA), associada a uma baixa eficiência produtiva e avultadas perdas económicas.

Neste estudo pretendeu-se avaliar a utilização de um teste de ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral, o Clostridium FirstTest™, para deteção e quantificação precoce de *C. perfringens* em frangos de crescimento rápido e plumagem branca e posterior relação entre a presença do agente e as características dos bandos (peso médio à chegada, idade dos bandos à amostragem), fatores ambientais (densidade populacional, temperatura ambiente, humidade da cama) e os indicadores de produção (ganho médio diário, Índice de Conversão Alimentar e percentagem de mortalidade). Para tal, foram analisadas amostras fecais de trinta bandos, em dezoito explorações integradas, na Região de Lisboa e Vale do Tejo. De acordo com a classificação do Clostridium FirstTest™, dos trinta bandos amostrados entre o décimo primeiro e o décimo quinto dia de vida, 30 % foram classificados como “Positivo” (n=9) e 10 % foram classificados como “Muito Positivo” (n=3); apresentando concentrações médias de *C. perfringens* de 0,1322 ng/ml e 0,3267 ng/ml, respectivamente. Os restantes bandos, 60% (n=18), foram considerados “Normal” e apresentaram concentrações médias de *C. perfringens* de 0,0283 ng/ml. As amostras fecais dos bandos classificados de “Positivo” e “Muito Positivo” foram posteriormente sujeitas a análise microbiológica apresentando ambos os grupos unidades formadoras de colónias (UFC), identificadas como *C. perfringens*. Verificou-se que não existe relação entre os resultados do Clostridium FirstTest™ e as características dos bandos, os fatores ambientais e os indicadores de produção. Verificou-se uma diminuição dos níveis de *C. perfringens* nos bandos sujeitos a tratamento.

Palavras-Chave: *Clostridium perfringens*, Clostridium FirstTest™, enterite necrótica aviária, deteção e quantificação precoce, frango de crescimento rápido e plumagem branca.

Early Detection and Quantification of *Clostridium perfringens* in Broilers in the Region of Lisbon and Tagus Valley

ABSTRACT

Clostridium perfringens is an anaerobic Gram-positive, spore-forming bacterium, which produces toxins that can cause a wide spectrum of diseases in humans and animals. In broilers may cause injuries and severe clinical manifestations, as avian necrotic enteritis (ANE), associated with a reduction in production efficiency and an increase in economic losses.

In this study we evaluated the use of a test lateral flow immunochromatographic assay, Clostridium FirstTest™ for detection and quantification of *C. perfringens* in broilers. We also analyzed the effect of *C. perfringens* overgrow and some characteristics of the flock such as: weight on arrival and age of birds during the analysis, environmental factors such as: population density, temperature, wet litter, and indicators of production such as: average daily gain, feed conversion ratio and percentage of mortality. Towards this, fecal samples of thirty broiler chicken groups were analyzed in eighteen farms in the Region of Lisbon and Tagus Valley. According to the Clostridium FirstTest™ classification, out of the thirty flocks sampled between the eleventh and the fifteenth day of age, 30% were classified as "Positive" (n=9) and 10% were classified as "High Positive" (n=3). According to the test, the groups classified as "Positive" and "High Positive" showed concentrations of *C. perfringens* of 0.1322 ng/ml and 0.3267 ng/ml, respectively. Sixty percent (n=18) were considered "Normal" and showed an average concentration of *C. perfringens* of 0.0283 ng/ml. The fecal samples from flocks classified as "Positive" and "High Positive" were subjected to microbiological analysis and both groups showed colony-forming units (CFU), identified as *C. perfringens*. It was found that there is no relationship between the results of Clostridium FirstTest™ and the characteristics of the flocks, environmental factors and production efficiency indicators. However, there was a decrease in the levels of *C. perfringens* in the flocks that received treatment.

Keywords: *Clostridium perfringens*, Clostridium FirstTest™, avian necrotic enteritis, early detection and quantification, broilers.

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C – graus centígrados

> – maior

≥ – maior ou igual

< – menor

® – Marca Registada

™ – Trademark

% – percentagem

C. perfringens – *Clostridium perfringens*

ELISA – Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay

ENA – Enterite Necrótica Aviária

g – grama

i.c. – Índice de Conversão Alimentar

I.Cf. – intervalo de confiança

Interaves - Sociedade Agropecuária, S.A. – Interaves - Sociedade Agropecuária, Sociedade Anónima

kg – quilograma

km - quilometro

l – litro

ml - mililitro

LFDs – Low-cost lateral-flow assays

ng - nanograma

Obs. – observações

PCR – Polymerase Chain Reaction

RLVT – Região de Lisboa e Vale do Tejo

UFC – Unidade Formadora de Colónia

USB – Universal Serial Bus

vs - *versus*

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA	2
AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	5
ABSTRACT	6
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	7
ÍNDICE GERAL	8
ÍNDICE DE TABELAS	11
ÍNDICE DE GRÁFICOS	12
ÍNDICE DE FIGURAS	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>	16
1.1.1. <i>Características Morfológicas e Físico-Químicas</i>	16
1.1.2. <i>Características das Toxinas Clostridiais</i>	17
1.1.3. <i>Isolamento e Identificação</i>	18
1.1.3.1. <i>Análise Microbiológica</i>	19
1.1.3.2. <i>ELISA</i>	19
1.1.3.3. <i>PCR</i>	19
1.1.3.4. <i>Imunoensaio de Fluxo Lateral</i>	19
1.1.4. <i>Suscetibilidade Antimicrobiana</i>	22
1.1.5. <i>Patologias Provocadas pelo Clostridium perfringens</i>	23
1.1.5.1. <i>Enterite Necrótica Aviária</i>	23
1.1.5.2. <i>Colangiohepatite</i>	29
1.1.5.3. <i>Síndrome de Erosões e Úlceras da Moela</i>	30
1.1.5.4. <i>Dermatite Gangrenosa</i>	31
1.1.6. <i>Prevenção e Controlo das infeções por C. perfringens em avicultura</i>	32
2. OBJETIVOS	35
2.1. <i>OBJETIVO GERAL</i>	35
2.2. <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1. <i>CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRAGEM</i>	36
3.2. <i>ELABORAÇÃO DE FOLHETO DE INFORMAÇÃO AO CRIADOR</i>	36
3.3. <i>FLUXOGRAMA DO ESTUDO</i>	37
3.4. <i>PRIMEIRA VISITA - RECEPÇÃO DE PINTOS DO DIA</i>	37
3.5. <i>SEGUNDA VISITA</i>	37
3.6. <i>TERCEIRA VISITA</i>	38

3.7. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS FECAIS.....	38
3.7.1. Procedimento experimental	38
3.7.2. Análise Microbiológica - Cultura em Agar Sangue.....	39
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	40
4. RESULTADOS	41
4.1. EXPOSIÇÃO DOS RESULTADOS.....	41
4.1.1. Primeira Visita - Recepção de pintos do dia.....	41
4.1.1.1. Densidade Populacional – Total de Pintos Recebidos	41
4.1.1.2. Peso Médio à Chegada	41
4.1.2. Segunda Visita – 1ª Amostragem	42
4.1.2.1. Idade dos bandos	42
4.1.2.2. Temperatura Ambiente.....	42
4.1.2.3. Humidade da Cama	43
4.1.3. Resultados do Clostridium FirstTest™	43
4.1.4. Resultados da Análise Microbiológica	44
4.1.5. Tratamento Farmacológico	45
4.1.6. Terceira Visita – Nova colheita após tratamento	45
4.1.6.1. Idade dos Bandos.....	45
4.1.6.2. Resultados do Clostridium FirstTest™	46
4.1.6.3. Resultados da Análise Microbiológica	46
4.1.7. Indicadores de Produção – Fecho de Bando.....	47
4.1.7.1. Ganho Médio Diário.....	47
4.1.7.2. Índice de Conversão Alimentar	48
4.1.7.3. Baixas totais - % de Mortalidade.....	48
4.2. CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS EXPOSTOS ANTERIORMENTE E O RESULTADO DO CLOSTRIDIUM FIRSTTEST™	49
4.2.1. Níveis de Concentração de <i>C. perfringens</i> – Segunda Visita.....	49
4.2.2. Relação do resultado do Clostridium FirstTest™ com as características dos bandos.....	49
4.2.2.1. Peso Médio à Chegada	49
4.2.2.2. Idade dos Bandos à Segunda Visita.....	50
4.2.3. Relação do resultado do Clostridium FirstTest™ com fatores de manejo e instalações.....	51
4.2.3.1. Densidade Populacional - Nº total de pintos recebidos.....	51
4.2.3.2. Temperatura Ambiente (°C) à Segunda Visita.....	51
4.2.4. Relação entre o resultado da Humidade da Cama à Segunda Visita e o resultado do Clostridium FirstTest™	52
4.2.5. Concordância entre o resultado do Clostridium FirstTest™ com o resultado da Análise Microbiológica.....	53
4.2.6. Tratamento Farmacológico - Resultado Clostridium FirstTest™ antes e depois.....	54
4.2.7. Relação do resultado do Clostridium FirstTest™ com os Indicadores de Produção	54
4.2.7.1. Ganho Médio Diário.....	54
4.2.7.2. Índice de Conversão Alimentar	55

4.2.6.3. % de Mortalidade – Baixas Totais.....	56
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÕES	65
7. BIBLIOGRAFIA	67
APÊNDICES.....	I
APÊNDICE I - FOLHETO DE INFORMAÇÃO AOS CRIADORES	II
APÊNDICE II - REGISTOS DOS DADOS OBTIDOS DURANTE O ESTUDO.....	IV

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – As toxinas produzidas pelo <i>Clostridium perfringens</i> , a localização dos seus genes codificados e a sua atividade biológica	18
Tabela 2 – As toxinas principais e doenças correlacionadas com os diferentes biótopos de <i>C. perfringens</i>	18
Tabela 3 - Análise estatística descritiva do número de pintos do dia recebidos	41
Tabela 4 – Análise estatística descritiva do peso médio à chegada dos pintos recebidos	41
Tabela 5 - Análise estatística descritiva da “idade dos frangos” aquando da segunda visita...42	
Tabela 6 - Análise estatística descritiva a sobre a variável “temperatura à segunda visita”. ...43	
Tabela 7 – Número de amostras distribuídas pelas classificações do Clostridium FirstTest™ (descritivo e percentual)	44
Tabela 8 - Os valores registados pelo Clostridium FirstTest™: Resultados “vs” Concentração de <i>C. perfringens</i>	44
Tabela 9 – Resultados da Análise Microbiológica	45
Tabela 10 – Análise estatística descritiva dos valores da variável “idade à terceira visita”46	
Tabela 11 - Os valores das variáveis “resultado” vs “concentração”	46
Tabela 12 – Resultados da Análise Microbiológica	47
Tabela 13 - Resultados Clostridium FirstTest™ “vs” Resultados Análise Microbiológica.....47	
Tabela 14 – Análise estatística descritiva sobre a variável “ganho médio diário (g)”	48
Tabela 15 - Valores da análise estatística descritiva sobre a variável “Índice de Conversão Alimentar”	48
Tabela 16 - Análise Estatística Descritiva sobre a variável "Baixas totais - % de mortalidade"	48
Tabela 17 - Distribuição do resultado da humidade das camas pelos resultados do Clostridium FirstTest™	53
Tabela 18 - Relação entre o resultado do Clostridium FirstTest™ e o resultado de Análise Microbiológica	53
Tabela 19 – Registos dos dados obtidos no decorrer do estudo	IV

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Percentagem de amostras inseridas em cada faixa etária.....	42
Gráfico 2 - Representação gráfica sobre a distribuição dos 30 bandos amostrados relativamente à variável “cama húmida”.....	43
Gráfico 3 - Representação gráfica dos resultados da análise microbiológica	45
Gráfico 4 - Representação gráfica dos níveis médios de concentração de <i>C. perfringens</i> na 2ªVisita.....	49
Gráfico 5 - Representação gráfica da relação do peso médio (g) à chegada com o resultado do Clostridium FirstTest™	50
Gráfico 6 - Representação gráfica da relação da idade à segunda visita com o resultado do Clostridium FirstTest™	50
Gráfico 7 - Representação gráfica da Relação da Densidade Populacional com o resultado do Clostridium FirstTest™	51
Gráfico 8 - Representação gráfica da Relação da Temperatura Ambiente à Segunda Visita com o resultado do Clostridium FirstTest™	52
Gráfico 9 - Representação Gráfica da Relação entre o resultado do Clostridium FirstTest™ e o resultado da Análise Microbiológica.....	53
Gráfico 10 - Representação gráfica do Resultado do Clostridium FirstTest™ antes do tratamento	54
Gráfico 11 - Representação gráfica do Resultado do Clostridium FirstTest™ depois do tratamento	54
Gráfico 12 - Representação gráfica da Ganho Médio Diário (g) com o resultado do Clostridium FirstTest™	55
Gráfico 13 - Representação gráfica da relação do Índice de Conversão Alimentar com o resultado do Clostridium FirstTest™	55
Gráfico 14 - Representação gráfica da Relação da % de mortalidade com o resultado do Clostridium FirstTest™	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - A bactéria <i>Clostridium perfringens</i> .	16
Figura 2 - <i>Clostridium spp.</i> : cultivo em anaerobiose em colônia de agar sangue.	17
Figura 3 - Kit Clostridium FirstTest™ e leitor ESE-Quant Lateral Flow (Foto obtida pela autora da dissertação).	20
Figura 4 - Da amostra até ao resultado (valor meramente exemplificativo)	21
Figura 5 – Representação dos factores com relevância na patogenia da ENA.	24
Figura 6 – Lesões Intestinais características de ENA.	28
Figura 7 – Lesões Microscópicas ENA.	28
Figura 8 - Fígado hiperplásico com coloração amarela e pequenos focos esverdeados (seta). (Fonte: Dinev, 2007)	30
Figura 9 - Vesícula biliar com parede espessada e com matéria biliar densa (seta). (Fonte: Dinev, 2007)	30
Figura 10 - Moelas abertas.	31
Figura 11 - Dermatite necrótica em frangos de crescimento rápido e plumagem branca induzida experimentalmente.	32
Figura 12 - Dermatite necrótica em frangos de crescimento rápido e plumagem branca induzida experimentalmente.	32
Figura 13 - Passo 1: retirar amostra de fezes homogeneizada com colher de medição do frasco com tampão.	38
Figura 14 - Passo 2: colocar amostra de fezes no frasco com tampão	38
Figura 15 - Passo 3: fechar e agitar o frasco para dissolver a amostra.	38
Figura 16 - Passo 4: pipetar o líquido sobrenadante com pipeta de Pasteur	39
Figura 17 - Passo 5: encher o orifício da cassete.	39
Figura 18 - Passo 6: aguardar 15 minutos, para migração da amostra	39
Figura 19 - Passo 7: interpretação visual do resultado	39
Figura 20 - Passo 8: interpretação do resultado com o leitor	39
Figura 21 - Material necessário para análise microbiológica	40

1. INTRODUÇÃO

C. perfringens, uma bactéria anaeróbica Gram positiva, formadora de esporos, é considerada o maior patógeno na indústria avícola, sendo responsável por causar lesões e manifestações clínicas severas, incluindo enterite necrótica aviária (ENA), dermatite gangrenosa, colangiohepatite e erosões e úlceras na moela (Brennan *et al.*, 2003; Lovland *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2006). Estas patologias, e em especial a enterite necrótica, causam perdas significativas na indústria avícola, nomeadamente, um aumento da mortalidade das aves afetadas, diminuição do ganho médio diário, aumento dos gastos em terapêutica, aumento dos índices de conversão, bem como o aumento do risco de contaminação dos produtos avícolas que se destinam ao consumo humano (Hafez, 2011; Timbermont, 2011).

Apesar da importância crescente do *C. perfringens* e dos seus efeitos ao nível da indústria avícola mundial, uma vez que se estimam perdas económicas associadas aos surtos de ENA com valores superiores a dois milhões de dólares por ano (Van der Sluis, 2000), a metodologia para deteção e quantificação deste agente é ainda incipiente. No entanto, o interesse científico sobre este assunto tem vindo a crescer e novos fatores de virulência de *C. perfringens* foram descobertos (Keyburn *et al.* 2008; Timbermont, 2011).

Nas últimas décadas o controlo da ENA foi baseado na administração, no alimento, de antibióticos promotores de crescimento (Engberg *et al.*, 2000; Brennan *et al.*, 2001a; 2003). Contudo, e devido à preocupação crescente com a propagação da resistência antimicrobiana, o seu uso foi interdito pela União Europeia, o que tem contribuído para um aumento da prevalência de doenças economicamente importantes (Van Immerseel *et al.*, 2009). É por isso cada vez mais importante uma deteção e quantificação dos níveis de *C. perfringens* precocemente, a fim de uma atuação terapêutica que ajude no controlo dos índices de produção e menores perdas económicas.

A presente dissertação foi desenvolvida durante o Estágio Curricular de conclusão do Curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT).

O estágio decorreu na empresa Interaves – Sociedade Agropecuária, S.A. no período de tempo entre 3 de Outubro de 2011 e 3 Fevereiro de 2012, tendo sido supervisionado pelo Dr. João Correia Rasquilho Raposo, que ali desempenha função de Médico Veterinário, dando assistência à produção avícola.

O presente estudo tem como objetivo geral determinar se o Clostridium FirstTest™, um teste imunocromatográfico de fluxo lateral “on farm”, é um instrumento útil para deteção e quantificação precoce de *C. perfringens* em amostras fecais de frangos de crescimento rápido e plumagem branca, e desta forma vantajoso para a produção avícola. Pretendeu-se também determinar se as diferenças das concentrações de *C. perfringens* detetadas pelo Clostridium FirstTest™ têm impacto nos indicadores de produção (ganho médio diário, Índice de Conversão Alimentar e percentagem de mortalidade); caracterizar os bandos de acordo com as suas características (peso médio à chegada, idade dos bandos à amostragem) e fatores ambientais (densidade populacional, temperatura ambiente, humidade da cama) e avaliar a existência ou não de uma relação com a presença de *C. perfringens*; e pretendeu-se ainda avaliar a concordância do Clostridium FirstTest™ com a análise microbiológica.

Tencionou-se com os objetivos deste estudo, responder à seguinte questão de investigação: “Será a metodologia Clostridium FirstTest™ útil para a produção primária de frangos de crescimento rápido e plumagem branca?”

Para que tal fosse possível, foi contactada a Lilly Portugal (Elanco Animal Health) – empresa distribuidora do Clostridium FirstTest™ (BioX Diagnostics e Elanco Animal Health), que se disponibilizou a colaborar, bem como o Laboratório Socampestre que comparticipou as análises microbiológicas.

A realização deste estudo envolveu trabalho de campo, começando pela receção dos pintos do dia e a sua pesagem à chegada, a recolha de amostras fecais entre os 11 e os 15 dias, nova recolha de amostras fecais entre os 26-28 dias em bandos cujo resultado foi “Positivo” (30%) ou “Muito Positivo” (10%); trabalho de laboratório através da realização dos ensaios imunocromatográficos de fluxo lateral com Clostridium FirstTest™ (BioX Diagnostics e Elanco Animal Health) e análises microbiológicas às amostras fecais colhidas entre os 11 e 15, e os 26 e 28 dias com resultado “Positivo” ou “Muito Positivo” e o tratamento e a análise dos dados obtidos para elaboração da presente dissertação.

Foram acompanhados no total 30 bandos de frango de crescimento rápido e de plumagem branca em dezoito explorações integradas da Interaves – Sociedade Agropecuária, S.A. na Região de Lisboa e Vale do Tejo, num total de 617 600 aves.

1.1. *Clostridium perfringens*

1.1.1. Características Morfológicas e Físico-Químicas

Clostridium perfringens é uma bactéria Gram positiva em forma de bastonete (Figura 1), anaeróbica, formadora de esporos, encapsulada e imóvel (Cato *et al.*, 1986). É uma bactéria ubiquitária que pode ser encontrada no solo, na poeira, nas fezes, nos alimentos, na cama utilizada na avicultura, nos intestinos da maioria dos animais saudáveis e dos seres humanos (Opengart, 2008).

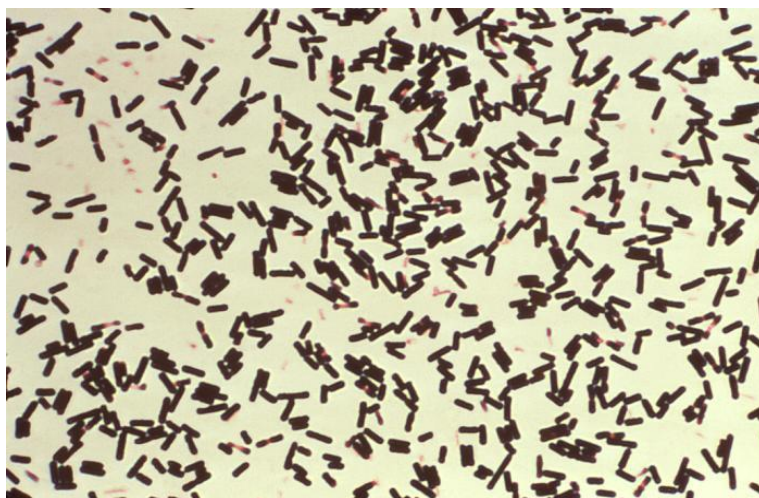


Figura 1 - A bactéria *Clostridium perfringens*.

Esta fotomicrografia revela um número de bactérias de *Clostridium perfringens* que foram cultivadas em meio Schaedler, e subsequentemente coradas com o método Gram [1000 X].

(Fonte: <http://www.ppdictionary.com/bacteria/gpbac/perfringens.jpg>; Acedido em Janeiro de 2011)

O seu crescimento ocorre dentro de intervalo de temperatura de 12-50°C e o pH entre 6,0 e 7,0 (Adams e Moss, 2008). Nas condições ideais de temperatura entre 43 e 47°C, *C. perfringens* cresce de forma extremamente rápida, com um tempo de geração de 8-10 min e acompanhado por produção abundante de gás (Bryant e Stevens, 2002).

C. perfringens forma por diferenciação da célula bacteriana vegetativa, esporos resistentes, associados a maior resistência e baixo metabolismo da bactéria, que lhe permite sobreviver em condições extremas e físico-químicas adversas como variações de temperatura, dissecação e acidez do meio (Cato *et al.*, 1986).

C. perfringens apesar de ser classificado como microrganismo anaeróbio pode sobreviver e crescer na presença de oxigênio. Em meio de agar sangue, as unidades formadoras de colônias (UFC's) formam colônias arredondadas, umbilicadas e brilhantes. As colônias são circundadas por um halo interno de hemólise incompleta causada pela toxina theta e outra zona externa de hemólise completa causada pela toxina alfa (Quinn *et al.*, 2005) (Figura 2).

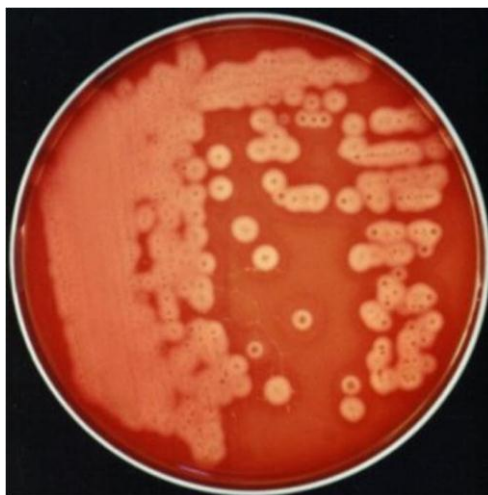


Figura 2 - *Clostridium spp.*: cultivo em anaerobiose em colônia de agar sangue.

As colônias podem apresentar um aspeto pleomórfico, sendo possível observar o halo interno de hemólise incompleta e a zona externa da hemólise completa.

(Fonte: http://fundacionio.org/img/bacteriology/img/clostridium_02.jpg, Acedido em Janeiro de 2011)

1.1.2. Características das Toxinas Clostridiais

C. perfringens é dividido em 5 biótipos A, B, C, D, e E com base na síntese de quatro principais toxinas letais: alfa, beta, épsilon e iota. Juntamente com estas quatro toxinas principais, *C. perfringens* também produz a enterotoxina (*cpe*) e a toxina beta2 (*cpb2*) que são consideradas importantes para doenças entéricas (McDonel, 1986; Songer, 1996; Waters *et al.*, 2003, Smedley *et al.*, 2004, McClane *et al.*, 2006).

Os genes codificadores das toxinas do *C. perfringens* apresentam localização cromossômica ou plasmídica. Os genes codificadores das toxinas alfa (*cpa*) e theta (*pfoA*) são de localização cromossômica, porém o gene da enterotoxina (*cpe*) pode ser cromossômico ou plasmídico. Os genes das restantes toxinas principais são plasmídicos (Petit *et al.*, 1999) (Tabela 1).

Tabela 1 – Toxinas produzidas pelo *Clostridium perfringens*, a localização dos seus genes codificantes e a sua atividade biológica (Fonte: Petit et al. 1999)

Toxina	Gene	Localização	Atividade Biológica
Alfa	<i>Cpa</i>	Cromossômica	Citolítica, hemolítica, dermonecrótica, letal
Beta	<i>Cpb</i>	Plasmídica	Citolítica, dermonecrótica, letal
Épsilon	<i>Etx</i>	Plasmídica	Edema em vários órgãos: fígado, rins e sistema nervoso central
Iota	<i>iA</i>	Plasmídica	Rutura do citoesqueleto de actina e perda da integridade celular.
Beta2	<i>cpb2</i>	Plasmídica	Citolítica, letal
Enterotoxina	<i>Cpe</i>	Cromossômica/Plasmídica	Citolítica, letal, causa diarreia pela perda de água e iões
Theta	<i>pfoA</i>	Cromossômica	Hemólise e modulação da resposta inflamatória do hospedeiro

C. perfringens é considerado um dos agentes com maior número de toxinas produzidas e um dos mais importantes em função do grau de toxicidade e da atividade letal (Songer, 1996). A Tabela 2 apresenta as principais toxinas produzidas e as doenças associadas a cada biótipo de *C. perfringens*.

Tabela 2 – As toxinas principais e doenças correlacionadas com os diferentes biótipos de *C. perfringens* (Fonte: Petit et al. 1999)

Biótipos	Toxinas	Doenças associadas a <i>C. perfringens</i>
A	Alfa	Gangrena e gastroenterite em humanos. Enterite necrótica aviária . Enterite neonatal suína. Enterite em equinos. Enterotoxemia em cordeiros. Enterite hemorrágica neonatal bovina.
B	Alfa, beta, epsilon	Disenteria e enterite necrótica em cordeiros.
C	Alfa, beta	Enterite necrótica e hemorrágica em leitões, cordeiros, bezerros, caprinos e potros. Enterite necrótica aviária . Enterite em humanos.
D	Alfa, epsilon	Enterotoxemia em ovinos (doença do rim polposos).
E	alfa, iota	Enterotoxemia em cordeiros, bezerros e coelhos.
A / cpb2	Alfa	Enterocolite em cavalos. Enterite necrótica em leitões.
A / cpe	Alfa	Intoxicação alimentar em humanos.

Como *C. perfringens* é normalmente encontrado na flora intestinal dos humanos e animais sadios, o aparecimento de patologias provocadas por este agente depende de circunstâncias que favoreçam o seu sobrecrecimento e a sua produção de toxinas.

1.1.3. Isolamento e Identificação

Para o isolamento de bactérias do género *Clostridium*, podem usar-se amostras fecais e amostras de porção de intestino. As amostras de porção de intestino devem ser colhidas

imediatamente após a morte dos animais, para evitar contaminação com outras bactérias anaeróbias estritas ou facultativas (Quinn *et al.*, 2005).

1.1.3.1. Análise Microbiológica

C. perfringens pode ser isolado em placas de agar sangue em atmosfera de anaerobiose a 37°C durante 18 a 24 horas. Para a identificação morfológica e fenotípica são utilizadas a coloração de Gram, provas bioquímicas como a fermentação de lactose, glucose, maltose, a hidrólise de gelatina, a redução do nitrato e a reação de lecitinase em agar gema de ovo (Sebald e Petit, 1997).

Através de testes laboratoriais, a tipificação do *C. perfringens* pode ser realizada com base nas propriedades fenotípicas ou genotípicas do agente.

1.1.3.2. ELISA

Além dos métodos microbiológicos, a tipificação do *C. perfringens* pode ser realizada pela detecção de algumas das suas toxinas nas fezes através de métodos imunológicos, como a técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) (Moller e Ahrens, 1996). Muito embora o teste de ELISA seja capaz de realizar a tipificação do *C. perfringens*, as opções para subtipagens ficam limitadas, uma vez que o teste não detecta toxinas como a beta2 (Baums *et al.*, 2004). Além disso, níveis elevados de enterotoxina parecem estar presentes apenas durante a esporulação, dificultando a sua detecção utilizando esta técnica (Baums *et al.*, 2004).

1.1.3.3. PCR

Atualmente, a técnica de PCR (*Reação em Cadeia de Polimerase*) proposta por Yoo *et al.* (1997) está a ser utilizada para genotipificação através da amplificação dos genes que codificam as toxinas principais: *cpa* (toxina alfa), *cpb* (toxina beta), *etx* (toxina épsilon) e *iA* (toxina iota) e de outros genes de virulência nomeadamente *cpe* (enterotoxina) e *cpb2* (toxina beta2) (Gomes *et al.*, 2008).

1.1.3.4. Imunoensaio de Fluxo Lateral

As técnicas de ELISA e de PCR múltipla são sensíveis, contudo são morosas e requerem instrumentação cara. Por isso, nos últimos anos tem surgido um interesse crescente no desenvolvimento de ensaios de fluxo lateral, de baixo custo (LFDs - low-cost lateral-flow assays), para uma rápida identificação dos analitos e dos agentes patogénicos (Sharma, 2005).

Segundo Banada e Bhunia (2008), o imunoenensaio de fluxo lateral (ILF) é atualmente um dos mais atraentes e amplamente utilizados métodos de imunoenensaio. Neste ensaio, o anticorpo conjugado com ouro coloidal ou partículas de látex, é colocado num poço de aplicação da amostra. A membrana absorvente localizada na extremidade oposta ao poço facilita o movimento do fluido da amostra. Quando uma amostra de bactérias, toxinas ou antígenos suspensos em líquido é aplicada no poço, esta liga-se ao anticorpo conjugado. De seguida, o complexo antígeno-anticorpo migra lateralmente por ação capilar para a extremidade oposta, através de uma membrana porosa que contém duas zonas de captura, uma específica para o agente patogénico bacteriano e um outra específica para os anticorpos não ligados acoplados ao ouro ou látex (linha de controlo) (Banada e Bhunia, 2008). A presença de apenas uma linha (de controlo) indica uma amostra negativa, e na presença de duas linhas indica um resultado positivo. Este resultado é visualizado dentro 5-10 min. Uma desvantagem deste método é que é menos sensível do que os ensaios ELISA e requer para uma reação positiva uma concentração de células bacterianas de 10^7 - 10^9 . Outra limitação é o facto de o teste ser apenas qualitativo. Nos últimos anos têm sido feitas tentativas para melhorar a sensibilidade do ensaio, através da introdução de um leitor automático, que evitará a ambiguidade na leitura das bandas reativas positivas a olho nu, e através da introdução de quimiluminescência baseada na deteção do complexo antígeno-anticorpo sobre a membrana (Banada e Bhunia, 2008).

1.1.3.4.1. Clostridium FirstTest™

O Clostridium FirstTest™ desenvolvido pela BioX Diagnostics e Elanco Animal Health, um ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral, é uma ferramenta que fornece uma deteção e quantificação imediata dos níveis de *Clostridium perfringens* em fezes de frangos de crescimento rápido e de plumagem branca (Figura 3).

Este teste é um ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral, revestido com reagentes coloridos de ouro coloidal marcados com anticorpos monoclonais específicos para *C. perfringens*, que utiliza um leitor que



Figura 3 - Kit Clostridium FirstTest™ e leitor ESE-Quant Lateral Flow (Foto obtida pela autora da dissertação)

usa a emitância de um marcador fluorescente para conjugar partículas. Existem duas regiões, uma região de teste e uma região de controlo, sobre a membrana da tira de teste. A primeira linha (linha T) desenvolver-se-á rapidamente quando *C. perfringens* está presente na amostra, contrariamente não se desenvolverá. A linha de controlo (linha C) deve aparecer sempre independentemente da presença de bactérias e serve como um controlo qualitativo interno do sistema de teste (Figura 4).

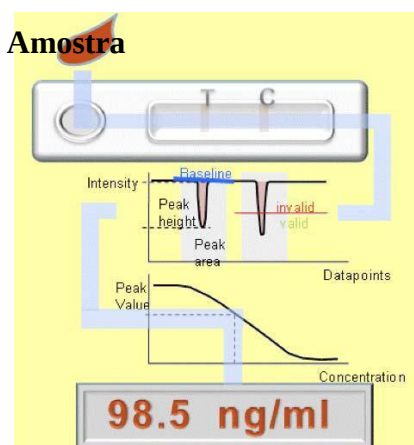


Figura 4 - Da amostra até ao resultado (valor meramente exemplificativo)

(Fonte: Manual Lateral Flow Control / Manage – Kit Clostridium FirstTest™)

A interpretação deve ser feita imediatamente após os 15 minutos da migração, visualmente ou com o leitor.

Dentro do leitor ESE-Quant Lateral Flow, as tiras de teste são lidas correspondentemente a um processo de digitalização. O detetor ótico move-se ao longo da tira de teste, e continuamente, há gravação dos dados da medição.

O leitor tem detetores colorimétricos e detetores baseados na fluorescência:

Testes colorimétricos: Em testes colorimétricos, o controlo e as linhas de teste são visivelmente coloridas e podem, em princípio, ser avaliadas a olho nu. Isto é, naturalmente, apenas quantitativo. Não é possível desta forma alcançar quaisquer conclusões quantitativas. Com o leitor ESE-Quant Lateral Flow, as tiras de teste são irradiadas com luz e a reflexão é medida. Os pontos onde a linha de teste muda de cor absorvem os raios de luz e, deste modo, o sinal de reflexão está diminuído (Manual Lateral Flow Control / Manage – Kit Clostridium FirstTest™).

Testes Fluorescência: Nos testes baseados na fluorescência, as linhas de teste não são visíveis a olho nu. Um dispositivo de leitura é, portanto, absolutamente necessário.

Com o leitor ESE-Quant Lateral Flow, as tiras de teste são irradiadas com luz de alta intensidade. As linhas de teste recebem partículas fluorescentes, que, de acordo com a concentração do material a ser testado, libertam mais ou menos luz. A luz emitida tem um outro comprimento de onda, que é medido pelo detetor (Manual Lateral Flow Control / Manage – Kit Clostridium FirstTest™).

De acordo com Saggiorato *et al.* (2010), níveis de 1 milhão de *C. perfringens* são considerados normais, indicado um perfil bacteriológico intestinal normal. Níveis superiores a 10 milhões podem indicar um resultado muito positivo.

1.1.4. Suscetibilidade Antimicrobiana

Existem vários estudos que documentam a suscetibilidade do *C. perfringens* a diversos antibióticos. Tratamentos com antibióticos como a penicilina, a amoxicilina, a eritromicina, a diidroestreptomicina, e a tetraciclina promovem uma resposta clínica satisfatória contra *C. perfringens* (Hafez, 2001).

C. perfringens demonstrou elevada sensibilidade à penicilina e a narasina - coccidiostático ionóforo – amplamente utilizado no controle da Enterite Necrótica Aviária clínica e subclínica (Martel *et al.*, 2004). Brennan *et al.* (2001) demonstraram que a narasina, quando administrada a 70 ppm na alimentação a partir do dia 0 ao 41 evita a morbidade, mortalidade e atraso no crescimento e conversão alimentar associado à ENA em frangos de crescimento rápido e de plumagem branca.

Watkins *et al.*, (1997) documentaram que *C. perfringens* apresenta grau de sensibilidade intermediária à ampicilina.

A resistência à tetraciclina é o fenótipo de resistência a antibióticos mais comum encontrado em *C. perfringens*. Segundo Lyras e Rood (1996), dos agentes antimicrobianos testados, a resistência à tetraciclina é comum, porque *C. perfringens* tem no seu genoma os genes *tetA(P)*, *tetB(P)*, *tetA408(P)*, *tetM*, *tetQ*, que estão relacionados com a resistência à tetraciclina.

Recentemente, Gad *et al.* (2011) determinaram as concentrações inibitórias mínimas de 16 antibióticos para *C. perfringens* em 100 amostras colhidas e isoladas entre 2008 e 2009 a partir de bandos de perus comerciais. Nenhuma das amostras isoladas era resistente a β -lactâmicos (amoxicilina, oxacilina e penicilina), lincospectin, tilosina, doxiciclina,

tetraciclina, enrofloxacina, trimetoprim/ sulfametoxazol, lincomicina e tilmicosina. Foi detectada resistência aos antibióticos eritromicina e tiamulina com 5 e 20%, respectivamente. A espectinomomicina, neomicina e colistina manifestaram maior resistência com 74, 94 e 100%, respectivamente (Gad *et al.*, 2011).

1.1.5. Patologias Provocadas pelo *Clostridium perfringens*

As infecções por *C. perfringens* nas aves podem causar lesões e manifestações clínicas severas, incluindo enterite necrótica aviária, colangiohepatite e erosões e úlceras na moela e dermatite gangrenosa. Contudo, a patologia com maior importância do ponto de vista económico é a enterite necrótica aviária.

1.1.5.1. Enterite Necrótica Aviária

As doenças entéricas são o grupo de patologias com maior importância para a indústria avícola, porque quando presentes causam elevadas perdas económicas, associadas a perdas de produção devido ao aumento da mortalidade, diminuição do ganho médio diário, aumento dos índices de conversão e aumento dos custos em terapêuticas. Concomitantemente estão associadas à diminuição do bem-estar das aves e à possibilidade de contaminação dos produtos avícolas destinados ao consumo humano (Van Immerseel *et al.* 2004).

A enterite necrótica foi descrita pela primeira vez por Parish em 1961. É uma doença generalizada em frangos de crescimento rápido e plumagem branca, impondo um encargo económico significativo na indústria avícola mundial, sendo considerada como a doença entérica bacteriana com maior importância clínica (Timbermont, 2011). Nas últimas décadas o controlo da ENA foi baseado na administração de antibióticos promotores de crescimento no alimento (Engberg *et al.*, 2000; Brennan *et al.*, 2001a; Brennan *et al.*, 2003), contudo o seu uso foi interdito, desde 2006, pela União Europeia (Regulamento (Ce) N.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho), o que tem contribuído para um aumento da prevalência de doenças economicamente importantes, como a ENA, que se tornou a principal causa de morte em frangos de crescimento rápido e plumagem branca (Van Immerseel *et al.*, 2009).

1.1.5.1.1. Patogenia

A ENA pode surgir quando *C. perfringens* tipo A ou C prolifera em grandes quantidades no intestino delgado de frangos de crescimento rápido e plumagem branca (Lovland e Kaldhusdal, 2001). Ambos os sorotipos são capazes de produzir várias toxinas e

enzimas que são responsáveis por lesões e sinais clínicos associados. Especificamente, a alfa-toxina produzida por *C. perfringens* tipos A e B e a beta-toxina produzida pelo *C. perfringens* tipo C são consideradas responsáveis pela necrose da mucosa intestinal comumente associada à ENA (Opengart, 2008).

Mas, ultimamente tem-se adquirido uma nova percepção sobre a patogenia da ENA. Designadamente, novos fatores de virulência têm sido propostos. Recentemente, foi demonstrado que a toxina α não é um fator de virulência essencial na ENA em frangos de crescimento rápido e plumagem branca (Keyburn *et al.*, 2006; Timbermont *et al.*, 2009a), e uma nova toxina foi identificada. Segundo Keyburn *et al.* (2008), a toxina Net B é crucial para a indução de enterite necrótica aviária.

Para além das toxinas, existem outros fatores que têm ganho novo relevo na patogenia da ENA, como as coccídeas, as estirpes patogênicas de *C. perfringens*, as enzimas colagenolíticas, as bacteriocinas e a adesão de moléculas de matriz extracelular (Timbermont *et al.*, 2011). As suas formas de atuação serão descritas de seguida, de forma sumaria (Figura 5).

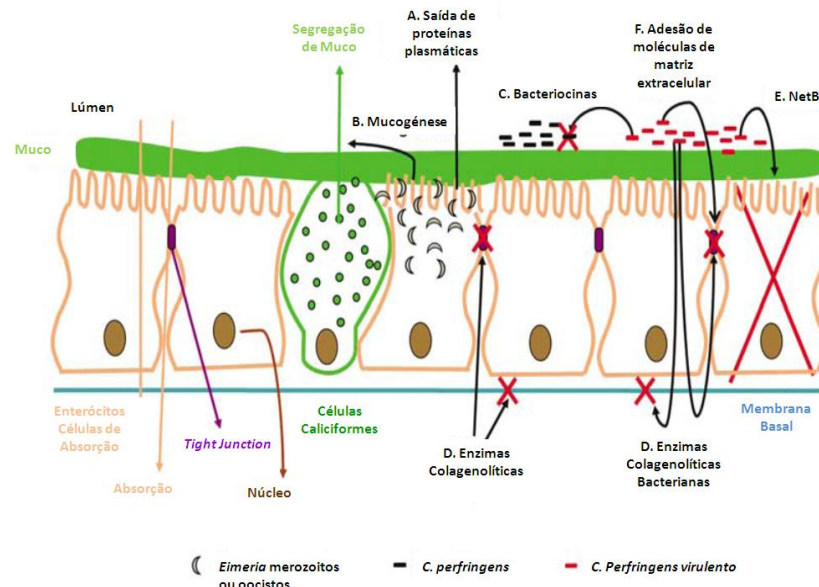


Figura 5 – Representação dos factores com relevância na patogenia da ENA

(Fonte: adaptação de Timbermont *et al.*, 2011)

A ENA é por vezes agravada por coinfeção com coccídeas, que podem proceder ou ocorrer em simultâneo com a ocorrência da doença (Porter, 1998). Devido às etapas intracelulares do seu ciclo de vida, os parasitas *Eimeria* colonizam o intestino delgado das aves e destroem as células epiteliais (Williams, 2005); consequentemente ocorre a saída das proteínas plasmáticas para o lúmen intestinal (Fig. 5, etapa A) (Van Immerseel *et al.*, 2004).

A infecção por coccídeas, também induz uma resposta inflamatória mediada por células T que aumenta a produção de muco intestinal (Figura 5, etapa B) (Collier *et al.*, 2008). Ambos os efeitos proporcionam um aumento dos nutrientes disponíveis, favorecendo a proliferação e crescimento de *C. perfringens* no intestino, uma vez que o agente utiliza o muco como um substrato (Collier *et al.*, 2008; Timbermont *et al.*, 2011).

Timbermont *et al.*, (2009b) propuseram que para além da produção de toxinas, *C. perfringens*, produz bacteriocinas, (definidas por Tagg *et al.*, em 1976, como compostos proteicos, produzidos por bactérias que inibem (efeito bacteriostático) ou destroem (efeito bactericida) espécies relacionadas) que podem ser um traço de virulência que contribui para a capacidade de certas estirpes de *C. perfringens* causarem ENA em frangos de crescimento rápido e plumagem branca (Figura 5, etapa C). Segundo este, as estirpes virulentas de *C. perfringens* que produzem bacteriocinas, e são proporcionalmente em número superior às estirpes do agente que não produzem, inibindo as outras estirpes do agente, têm a capacidade de obter um grande benefício com o aumento da disponibilidade de nutrientes devido à infecção por coccídeas, descrita no parágrafo anterior.

C. perfringens é capaz de segregar enzimas collagenolíticas, cuja ação é consistente com as alterações morfológicas observadas nas fazes iniciais da ENA (Olkowski *et al.*, 2008), em que os danos das vilosidades intestinais ocorrem ao nível da membrana basal e fase lateral dos enterócitos, invadindo progressivamente a lamina própria, levando posteriormente a danos no epitélio (Figura 5, etapa D). A ação destas enzimas é exacerbada quando já existem danos na mucosa intestinal, induzidas por exemplo pelas coccídeas (Olkowski *et al.*, 2008, Timbermont *et al.*, 2011).

Recentemente, foi demonstrado que devido aos danos causados pelas coccídeas, pelas toxinas de *C. perfringens* e pelas enzimas collagenolíticas, as estirpes virulentas de *C. perfringens* são capazes de se ligar a moléculas expostas de matriz extracelular, colonizando o intestino e, assim, causando lesões mais graves (Figura 5, etapa F) (em Timbermont *et al.*, 2011; Martin e Smyth, 2010; Wade *et al.*, 2010).

1.1.5.1.2. Fatores Predisponentes

São vários os fatores que predis põem ao desenvolvimento de ENA em frangos de crescimento rápido e plumagem branca, estando quase sempre associados ao sobre crescimento de *C. perfringens* no seu intestino.

i. Coccidiose: a alteração da integridade intestinal por coccídeas (*Eimeria spp.*) é considerada o fator com maior relevância para o desenvolvimento da ENA (Williams *et al.*, 2005). Ao colonizar o intestino delgado, durante o seu ciclo de vida, especialmente na fase intracelular, *Eimeria spp.* causa a morte de células epiteliais que libertam proteínas plasmáticas para o lúmen, que servirão de substrato ao *C. perfringens* favorecendo a sua proliferação (Van Immerseel *et al.*, 2004), assim como o muco, resultante da mucogénese induzida pelas coccídeas, que também é utilizado pelo agente (Collier *et al.*, 2008).

ii. Nutrição: a natureza da dieta é por vezes, o fator não bacteriano com maior importância para o desenvolvimento da ENA (Cooper e Songer, 2009). Dietas ricas em gordura, em especial a gordura animal (Knarreborg *et al.*, 2002); dietas com altas concentrações de proteína animal, como a farinha de peixe (Drew *et al.*, 2004); a forma física da ração, por exemplo se não for uniforme (Engberg *et al.*, 2002); os ingredientes da ração, como altas concentrações de cevada, aveia, centeio ou trigo (Carven, 2000) contêm níveis elevados de polissacarídeos solúveis em água não digeríveis, que são conhecidos por levar a um aumento da viscosidade da digesta, diminuído a taxa de passagem da digesta e digestibilidade de nutriente (Van Immerseel *et al.*, 2004), são tudo fatores que contribuem para o desenvolvimento de *C. perfringens* e consequentemente para a doença. O stress associado à nutrição, aquando da transição de rações de iniciação para as rações de crescimento, também é um fator predisponente.

iii. Fatores ambientais: a qualidade da cama, a densidade populacional e as condições do pavilhão, como a ventilação, temperatura ambiente ou a humidade relativa ambiente, são fatores indiretos com grande importância na multiplicação do *C. perfringens*, porque são suscetíveis de causar stress às aves, diminuindo a sua resistência à infeção (McDevitt *et al.*, 2006; Omeira *et al.*, 2006).

iv. Imunossupressão: a coinfeção em frangos de crescimento rápido e plumagem branca de *C. perfringens* e de vírus imunossupressores, tais como o vírus da doença bursal infecciosa (Gumboro), vírus da anemia do pinto, e vírus da doença de Marek, promove o desenvolvimento da ENA (Timbermont *et al.*, 2009). O vírus da doença bursal infecciosa é considerado um dos fatores que mais contribuí para o progresso da doença, uma vez que afeta as células linfóides e visa especificamente a bolsa de *Fabricsius*, que é responsável pelo desenvolvimento da imunidade humoral (Lee *et al.*, 2011).

1.1.5.1.3. Sinais Clínicos

A ENA é uma enterotoxemia aguda, que pode apresentar-se em duas formas clínicas diferentes: doença clínica aguda ou doença subclínica (Van Immerseel *et al.*, 2004).

Aparece subitamente e principalmente em animais jovens, entre as duas e as cinco semanas de vida, geralmente associada a imunossupressão, provocando morte rápida com elevada prevalência (Santos *et al.*, 2008).

i. Doença clínica aguda: a característica mais proeminente desta forma da doença é o aumento súbito da mortalidade do bando, muitas vezes em apenas 1 a 2 h, com taxas de mortalidade que podem atingir os 50% do bando (Riddell e Kong, 1992). Os sinais clínicos mais comuns são a depressão, desidratação, prostração, penas eriçadas, diarreia e falta de apetite. O percurso clínico da doença nesta fase é curto, sendo as aves muitas das vezes encontradas já mortas sem terem manifestado qualquer sinal clínico, e por isto a existência de cama molhada nos pavilhões, pode ser o único sinal premonitório (Opengart, 2008; Van Immerseel *et al.*, 2009).

ii. Doença subclínica: esta é a forma clínica com maior relevância uma vez que, como não apresenta sinais clínicos evidentes e normalmente não ocorre um pico da mortalidade, pode persistir nos bandos sem outras manifestações clínicas, e deste modo não é diagnosticada e não é aplicado tratamento ao bando, havendo um agravamento das lesões da mucosa intestinal que levam à diminuição do desempenho por má digestão e má absorção, redução do ganho médio diário e aumento do Índice de Conversão Alimentar (Van Immerseel *et al.*, 2009).

iii. Achados *post-mortem*

Lesões macroscópicas: na necropsia são observadas lesões essencialmente no intestino delgado, mas também podem ser observadas noutros órgãos, como fígado, rim e ceco. O duodeno, jejuno, íleo e por vezes o ceco, encontram-se dilatados, cheios de gás, e com paredes finas e friáveis. A mucosa intestinal está coberta com uma pseudomembrana amarela-acastanhada ou uma membrana difteroides verde acastanhada (Figura 6), composta por células epiteliais degeneradas, células necrosadas, eritrócitos, linfócitos, fibrina e inúmeras colónias bacterianas suspensas em muco. Também se podem observar variáveis graus de descamação da mucosa de vido à necrose (Figura 6 - A) e, à medida que a doença progride, toda a superfície é afetada, com uma necrose extensa em todo o lúmen (Figura 6 - B) (Broussard *et al.*, 1986; Van Immerseel *et al.*, 2004; Lorenzoni, 2010).

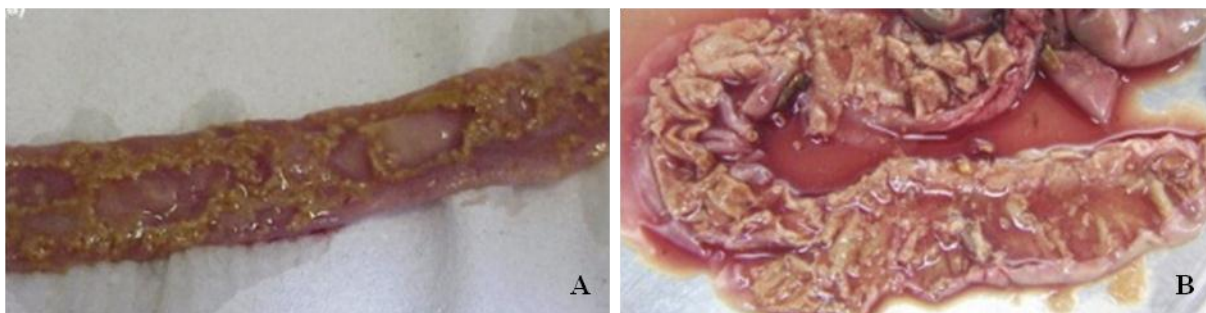


Figura 6 – Lesões Intestinais características de ENA

A. Zonas de necrose severa no jejuno de frangos de crescimento rápido e plumagem branca. B. Zonas extensas de necrose no lúmen intestinal. Em ambos é visível a mucosa intestinal coberta com membrana difteróide.

(Fonte: adaptação de Van Immerseel *et al.*, 2009)

São várias as escalas de classificação da gravidade das lesões na mucosa intestinal, e por isso mesmo, a comparação direta das lesões de acordo com as diferentes escalas pode não ser significativa. Desse modo, é geralmente aceite que a gravidade das lesões da ENA está relacionada com o ganho médio diário e a mortalidade (Lee *et al.*, 2011).

Lesões Microscópicas: o exame microscópico revela uma extensa necrose que se inicia nas vilosidades intestinais, e degeneração celular que pode estender-se à submucosa e às camadas musculares. É comum ver-se nos ápices das vilosidades, necrose de coagulação, com uma linha de demarcação entre o tecido necrosado e o tecido viável e um acúmulo de células mononucleares nas junções celulares. São observados nas zonas de necrose, grandes bastonetes Gram positivos, compatíveis com *C. perfringens* (Figura 7) (Opengart, 2008; Cooper e Songer, 2009).

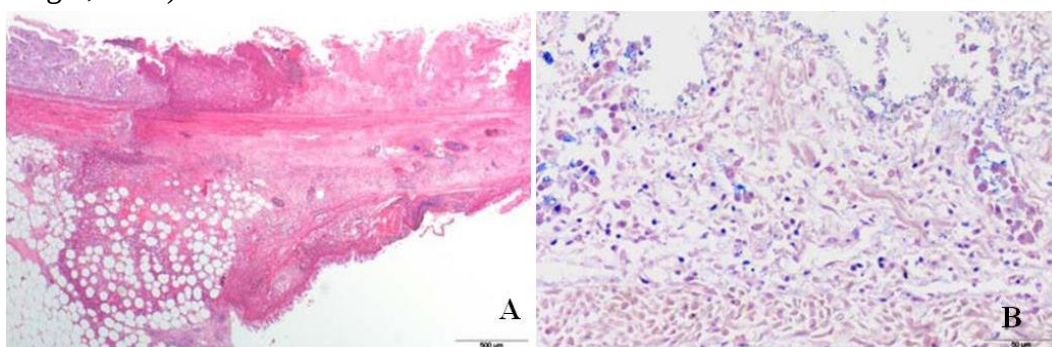


Figura 7 – Lesões Microscópicas ENA.

A – Enterite necrótica aguda grave com grande disseminação transmural (Hematoxilina e eosina, 20x)

B – ENA com elevado número de bacilos Gram-positivos, localizados multifocalmente nas lesões (Gram, 200x)

(Fonte: adaptação de Hafez, 2011)

1.1.5.2. Colangiohepatite

As lesões intestinais presentes na ENA subclínica permitem que as bactérias alcancem o canal biliar e a corrente sanguínea portal. A colonização do fígado pelo elevado número de *C. perfringens* resulta em colangiohepatite (Onderka *et al.*, 1990; Lovland e Kaldhusdal, 1999).

Geralmente, os sinais clínicos não são observados. O aumento da mortalidade diária é insignificante, embora em alguns frangos, um atraso do crescimento e a desidratação possam estar presentes. Em algumas aves, a gordura subcutânea e a gordura corporal têm uma coloração ictérica (Dinev, 2007). A doença é detectada na última fase do período de engorda ou no matadouro. É possível observar a colangiohepatite como uma doença isolada ou associada à ENA.

A colangiohepatite em frangos de crescimento rápido e plumagem branca é caracterizada por alterações distróficas inflamatórias e proliferativas das vias biliares e do parênquima hepático. Têm sido descritas, dois tipos de lesões no fígado associadas à colangiohepatite (Onderka *et al.*, 1990, Lovland e Kaldhusdal, 1999). Uma inflamação que afeta a árvore biliar (colangiohepatite) é o tipo mais comum de lesão. A parte intra-hepática da árvore biliar é mais frequentemente afetada, mas alterações extra-hepáticas da vesícula biliar e dos ductos biliares também podem ser encontradas. Outro tipo de lesão hepática associada à colangiohepatite por *C. perfringens* é a hepatite multifocal, histologicamente caracterizada por necrose fibrinóide com ou sem uma resposta inflamatória (Kaldhusdall e Lovland, 2001).

Na colangiohepatite, o fígado fica aumentado e com uma cor mais clara e amarela. Em alguns casos, a sua superfície tem uma aparência característica de ácinos e noutros é manchado com múltiplos pequenos focos brancos acinzentados ou esverdeados (Dinev, 2007) (Figura 8).

As paredes da vesícula biliar são espessadas, por vezes até 5-6 cm, e opacas e pode estar preenchida com uma secreção biliar espessa ou uma matéria densa com uma cor cremosa (Dinev, 2007) (Figura 9).

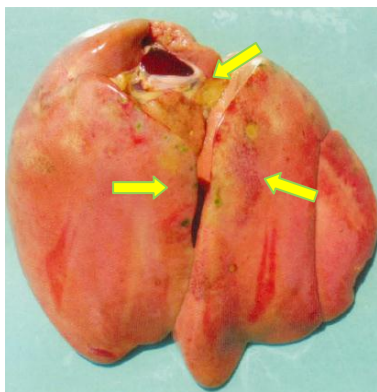


Figura 8 - Fígado hiperplásico com coloração amarela e pequenos focos esverdeados (seta). (Fonte: Dinev, 2007)

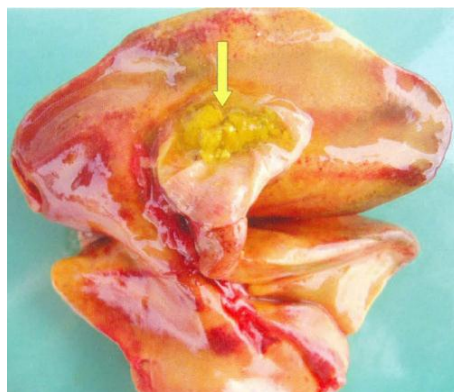


Figura 9 - Vesícula biliar com parede espessada e com matéria biliar densa (seta). (Fonte: Dinev, 2007)

As lesões histopatológicas consistem em hiperplasia do ducto biliar, necrose fibrinóide, colangite e, ocasionalmente, inflamação granulomatosa focal (Onderka *et al.*, 1990; Lovland e Kaldhusdal, 1999).

O diagnóstico é baseado nas lesões características macroscópicas e microscópicas.

1.1.5.3. Síndrome de Erosões e Úlceras da Moela

Uma condição designada "erosões da moela" e/ou "ulceração da moela" (GUE) tem sido relatada em frangos de crescimento rápido e plumagem branca associada ao crescimento excessivo de *C. perfringens*. Por outro lado a GUE está associada a condições como: a infecção por adenovírus das aves, a ração contaminada com micotoxinas, a deficiência de vitamina B6, a níveis diminuídos de vitamina E, a níveis inadequados de enxofre em dietas com aminoácidos, a níveis elevados de cobre dietético, a alimentação peletizada, bem como a inclusão de farinhas de peixe nas dietas e consequente presença de histamina (Ono *et al.*, 2003; Novoa-Garrido *et al.*, 2006)

Ono *et al.* (2003) relataram surtos de erosão adenovíral da moela em frangos de crescimento rápido e plumagem branca abatidos no Japão e Novoa-Garrido *et al.* (2006) encontraram uma associação entre lesões da moela e o aumento da contagem de *C. perfringens* cecal em frangos de crescimento rápido e plumagem branca.

A camada *interior* da moela das aves afetadas fica fissurada, espessada, esponjosa e descolorida (Fossum *et al.*, 1988).



Figura 10 - Moelas abertas.

Pode-se comparar a superfície interna lisa de uma moela saudável (A) com as lesões focais superficiais (*) que aparecem na moela afetada moderadamente (B). Na moela gravemente afetada (C), as lesões aparecem como um material esponjoso extensamente (s) e o istmo dilatado (i). (Fonte: Novoa-Garrido et al., 2006)

1.1.5.4. Dermatite Gangrenosa

A dermatite gangrenosa ou dermatite necrótica é uma infecção aguda do tecido subcutâneo de frangos de crescimento rápido e plumagem branca e perus. Tem sido associada a diferentes bactérias isoladas a partir de lesões subcutâneas: *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *S. aureus* e *Escherichia coli* (Ficken, 1991). A dermatite gangrenosa tem sido atribuída à contaminação das lesões cutâneas que são normalmente associadas à quantidade inadequada de comida e a falta de espaço no bebedouro. Também está relacionado com imunossupressão devido a doenças como a infecção por vírus de Gumboro responsável pela doença bursal infecciosa.

Diferentes graus de depressão, ataxia e incoordenação são comuns em aves afetadas com dermatite gangrenosa. O curso da doença é geralmente curto e as aves morrem no prazo de 24 horas após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos (Ficken, 1991; Lorenzoni, 2010)

Os achados de necropsia são caracterizados por áreas de pele emplumada edematosa. As lesões são encontradas normalmente perto da cabeça, sobre o peito e as coxas. Sob a pele o tecido subcutâneo aparece edemaciado e inflamado com exsudato vermelho sanguíneo. Está geralmente presente gás nas lesões subcutâneas (Figura 11 e 12) (Ficken, 1991; Willoughby, 1996; Lorenzoni, 2010).



Figura 11 - Dermatite necrótica em frangos de crescimento rápido e plumagem branca induzida experimentalmente.

(Fonte: Lorenzoni, 2010)

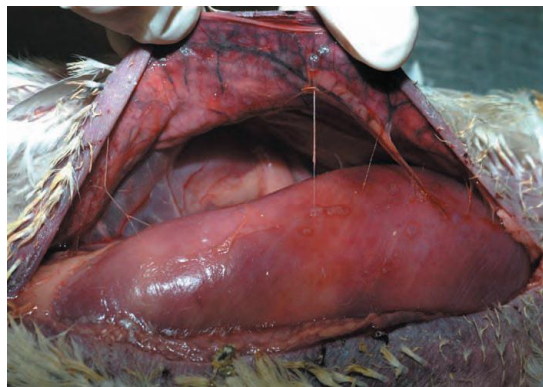


Figura 12 - Dermatite necrótica em frangos de crescimento rápido e plumagem branca induzida experimentalmente.

(Fonte: Lorenzoni, 2010)

A dermatite gangrenosa causa graves prejuízos económicos à indústria avícola.

A penicilina, a clortetraciclina, a oxitetraciclina, e o sulfato de cobre têm sido tradicionalmente utilizados na água para tratar a doença. No caso em que a antibioterapia não reduz a mortalidade deve se ter especial atenção a doenças virais imunes debilitantes (Ficken, 1991; Lorenzoni, 2010).

1.1.6. Prevenção e Controlo das infeções por *C. perfringens* em avicultura

Para a indústria avícola é importante controlar os níveis de *C. perfringens* devido aos custos económicos associados (Kaldhusdal e Lovland, 2000).

Nas últimas décadas o controlo da ENA foi baseado na administração, no alimento, de antibióticos promotores de crescimento (Engberg *et al.*, 2000; Brennan *et al.*, 2001a; 2003). A interdição do seu uso como promotores de crescimento, decretada pela União Europeia, lançou o desafio de criar novas estratégias para controlar a doença e o agente. Surgiu então o interesse em avaliar métodos alternativos de prevenção, como os prebióticos, probióticos, controlo da coccidiose, enzimas, e vacinação.

Os **prebióticos** são definidos como ingredientes alimentares não digeríveis que beneficiam o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de espécies de bactérias do intestino. São capazes de servir como substrato para uma ou mais espécies de bactérias, com um efeito potencialmente benéfico para o hospedeiro (Van Immerseel *et al.*, 2004). Contudo em relação ao *C. perfringens*, nos ensaios experimentais, os resultados têm sido contraditórios. Os fruto-oligossacáridos e mano-oligossacáridos não manifestaram nenhum efeito aparente sobre o ganho de peso, o índice de

conversão alimentar, mortalidade em frangos de crescimento rápido e plumagem branca (Van Immerseel *et al.*, 2004); já a adição de β -mananase na alimentação reduz a gravidade das lesões de ENA e melhora o desempenho (Jackson *et al.*, 2003).

A suplementação dos pintos com **probióticos**, biota alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o hospedeiro, equilibrando a flora intestinal pelo mecanismo de exclusão competitiva, é um mecanismo que permite deprimir a multiplicação de *C. perfringens* (Kaldhusdal *et al.*, 2001). Os probióticos que têm apresentado melhor resultado reduzindo a severidade da ENA, são o *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus faecium* (Van Immerseel *et al.*, 2004).

Heier *et al.* (2001), relataram que frangos de crescimento rápido e plumagem branca com altos títulos de anticorpos maternos contra a toxina α apresentaram taxas de mortalidade inferiores aos bandos com níveis baixos, sugerindo que a **vacinação** com *C. perfringens* pode proporcionar proteção nos pintos contra a ENA. Também Lovland *et al.* (2004) utilizaram vacinas toxoides baseadas em toxoides de *C. perfringens* tipo A e C para vacinar bandos de matrizes com resultados satisfatórios.

Thompson *et al.* (2006), em condições experimentais, demonstraram que a utilização de formulações de vacinas contendo toxoides produzidos por estirpes mutantes de *C. perfringens*, que não continham genes codificadores para a toxina α no seu genoma, resultava na produção de títulos de anticorpos vacinais, conferindo proteção às aves suscetíveis. Estes resultados mostram a importância de outros imunogénios, diferentes da toxina α na imunização profilática dos bandos avícolas.

Em geral nos diversos estudos, as aves vacinadas foram mais resistentes a infeção pelo *C. perfringens* e ao desenvolvimento de ENA experimentalmente, em comparação com os controlos não vacinados. Todas as aves vacinadas produzem antígeno específico IgY no soro e IgY e IgA no intestino, independentemente do seu estado de proteção contra a doença (Lee *et al.*, 2011).

Entretanto, as vacinas comerciais com proteínas recombinantes contra ENA para frangos de crescimento rápido e plumagem branca não estão disponíveis neste momento. Recentemente, Lanckriet *et al.* (2010) relataram que as propriedades dos componentes imunoprotetores secretados por *C. perfringens* são dependentes das estirpes, sugerindo que é necessário uma combinação eficaz de imunogénios para uma proteção total contra a ENA.

Os estudos em curso são dirigidos para avaliar se as proteínas de *C. perfringens*, por si só ou em combinação com adjuvantes novos, podem servir como potenciais vacinas contra ENA. Além disso, como é realizada rotineiramente na indústria de frangos de crescimento rápido e plumagem branca para agentes patogénicos específicos, a administração *in ovo* de vacinas à base de proteínas pode ser um método eficaz para a imunização. Assim, a vacinação de ovos pode ser um método seguro, eficiente e conveniente para administrar um único imunogénio ou uma combinação dos imunogénios contra *C. perfringens* (Lee *et al.*, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é determinar se o Clostridium FirstTest™, teste de imunoensaio de fluxo lateral “*on farm*”, é um instrumento útil para a detecção e quantificação precoce de *C. perfringens* em amostras fecais de frangos de crescimento rápido e plumagem branca, e desta forma vantajoso para a produção avícola.

2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a presença e os níveis de *C. perfringens* em frangos de crescimento rápido e plumagem branca com recurso a um teste “*on farm*” o Clostridium First Test™.
2. Determinar se as diferenças de concentrações de *C. perfringens* detetadas pelo Clostridium FirstTest™ têm impacto nos indicadores de produção (ganho médio diário, Índice de Conversão Alimentar e percentagem de mortalidade);
3. Caracterizar os bandos de acordo com: as características do bando (peso médio à chegada, idade dos bandos à amostragem) e fatores ambientais (densidade populacional, temperatura ambiente, humidade da cama), e avaliar a existência ou não de uma relação com a presença de *C. perfringens*.
4. Avaliar a concordância do Clostridium FirstTest™ com a análise microbiológica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Caracterização da Amostragem

Segundo o Instituto Nacional de Estatística, no último Recenseamento Agrícola realizado em 2009, existiam na RLVT cerca de 14 896 explorações avícolas, das quais 81,5 % são explorações de galinhas poedeiras e reprodutoras (Instituto Nacional de Estatística, 2011).

No presente estudo foram selecionados trinta bandos de frango de crescimento rápido e de plumagem branca distribuídos por 18 explorações integradas. Embora a amostragem das explorações tenha sido por conveniência, a seleção dos bandos foi por amostragem aleatória simples. Assim, procedeu-se à colheita de amostras fecais, nas dezoito explorações da empresa Interaves – Sociedade Agropecuária, S.A. na RLVT, correspondendo a um total de 617 600 aves.

Os critérios de seleção dos bandos para este estudo foram: as explorações estarem localizadas na RLVT e a receção dos pintos do dia decorrer entre o período de tempo de Novembro de 2011 a Janeiro de 2012 (inclusive), permitindo o acompanhamento dos bandos durante o período de estágio na empresa.

Foram efetuadas diversas visitas às explorações de forma a colher dados referentes a:

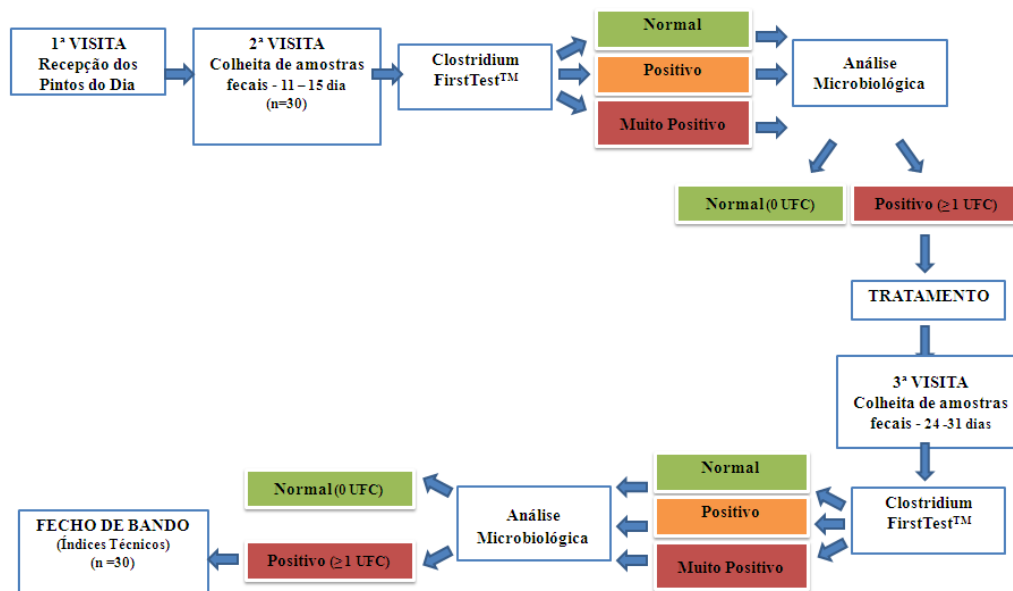
- Amostras fecais: efetuou-se uma primeira colheita a todos os bandos e uma segunda colheita referente apenas aos bandos que testaram positivo para *C. perfringens* e foram sujeitos a tratamento;
- Bando: peso médio à chegada, idade do bando à amostragem;
- Fatores ambientais: densidade populacional (nº pintos recebidos), temperatura ambiente do pavilhão e humidade de cama;
- Indicadores de produção: Índice de Conversão Alimentar, ganho médio diário e percentagem de mortalidade.

3.2. Elaboração de folheto de informação ao criador

Foi elaborado um folheto sobre *C. perfringens* e a enterite necrótica, que foi depois entregue a cada criador das explorações dos bandos em estudo. O folheto tinha como objetivo informar os criadores sobre o estudo a ser realizado e como iriam decorrer as colheitas nas

explorações, para que não surgissem oposições à realização do mesmo. O modelo do folheto está incluído no Apêndice 1 da presente dissertação.

3.3. Fluxograma do Estudo



3.4. Primeira Visita - Recepção de Pintos do Dia

No dia da receção dos pintos do dia foram escolhidos aleatoriamente 30 pintos de cada bando e feitas duas pesagens para obtenção do peso médio.

Foi documentado o nº do bando, o nº total de pintos recebidos e o peso médio.

3.5. Segunda Visita

A segunda visita às explorações, ocorreu entre os 11 e 15 dias de vida das aves. Nesta, foram colhidos aleatoriamente para uma única amostra, 20 a 30 excrementos intestinais em cada bando. Cada amostra foi colocada num saco plástico (incluído na caixa do Kit do Clostridium FirstTest™) e misturou-se, a fim de obter uma amostra tão homogénea quanto possível. O saco de plástico com a amostra foi fechado e identificado com o lote do bando e a data da colheita, e imediatamente armazenado numa caixa térmica durante o transporte, e finalmente, refrigerado a 3-4°C, até à realização das análises.

Foram registados, detalhes do manejo animal e do pavilhão no dia da colheita, incluindo a idade dos animais, a temperatura ambiente do pavilhão e a presença ou não da cama molhada (a presença de humidade anormal da cama por observação direta).

3.6. Terceira Visita

Em todos os bandos das amostras cujo resultado aos 11-15 dias foi “*Positivo*” ou “*Muito Positivo*”, foi efetuado tratamento com Sangrovit® (aditivo estimulante de apetite e de digestão), Paracilina® (trihidrato de amoxicilina), Tylan® (tilosina) ou Lincagro 400 mg/g® (lincomicina). Entre os 24 e 31 dias, estes bandos foram novamente visitados e feita nova colheita de amostras de fezes tal como na 2ª visita.

3.7. Processamento das Amostras Fecais

Todas as amostras foram testadas por técnica imunocromatográfica de fluxo lateral, usando o Clostridium FirstTest™ e as amostras cujo resultado foi “*Positivo*” ou “*Muito Positivo*”, foram analisadas microbiologicamente para contraprova.

3.7.1. Procedimento experimental

No Laboratório Socampestre, o ensaio Clostridium FirstTest™ foi efetuado em 10 passos.

Retirou-se uma amostra de fezes homogeneizada usando a colher de medição do frasco com tampão (referência não fornecida no kit), fornecido no kit Clostridium FirstTest™. É de extrema importância usar o volume de amostra correto (capacidade da colher), caso contrário, podem ocorrer problemas de migração ou a sensibilidade pode ser muito baixa. (Figura 13) De seguida foi colocada a amostra de fezes no frasco tampão (Figura 14), este foi fechado firmemente e foi agitado a fim de dissolver a amostra completamente no tampão (Figura 15).



Figura 13 - Passo 1: retirar amostra de fezes homogeneizada com colher de medição do frasco com tampão.



Figura 14 - Passo 2: colocar amostra de fezes no frasco com tampão

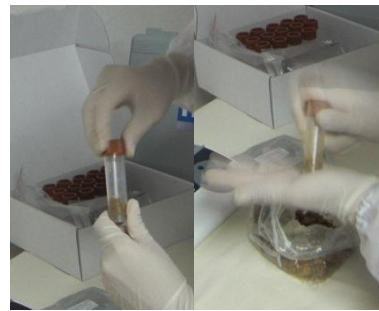


Figura 15 - Passo 3: fechar e agitar o frasco para dissolver a amostra

(Fotos obtidas pela autora da dissertação)

Pipetou-se o líquido sobrenadante com ajuda uma pipeta Pasteur de plástico com muito cuidado (Figura 16) e foram colocadas 3 a 4 gotas no orifício da cassette até enchê-lo (Figura 17). Aguardaram-se 15 minutos, o tempo necessário à migração da amostra (Figura 18).



Figura 16 - Passo 4: pipetar o líquido sobrenadante com pipeta de Pasteur



Figura 17 - Passo 5: encher o orifício da cassette



Figura 18 - Passo 6: aguardar 15 minutos, para migração da amostra

(Fotos obtidas pela autora da dissertação)

Após 15 minutos, fez-se a interpretação do resultado visualmente e/ou com o leitor (Figura 19). Para interpretação pelo leitor, inseriu-se a tira no leitor e leu-se os resultados na tela (“Normal”, “Positivo”, “Muito Positivo” ou “Inválido”) (Figura 20).

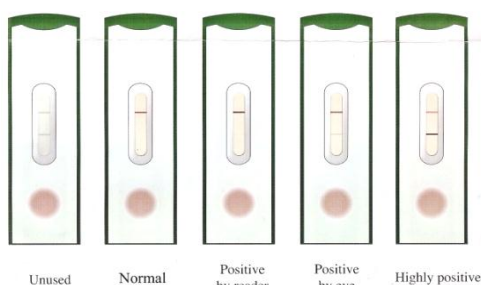


Figura 19 - Passo 7: interpretação visual do resultado

(Fonte: Manual de Instruções incluído no Kit do Clostridium FirstTest™)



Figura 20 - Passo 8: interpretação do resultado com o leitor

(Foto obtida pela autora da dissertação)

Os resultados armazenados no dispositivo foram transmitidos através de um cabo USB para o computador e de seguida exportados para uma base de dados Microsoft® Excel 2007.

3.7.2. Análise Microbiológica - Cultura em Agar Sangue

Todas as amostras cujo resultado do Clostridium FirstTest™ foi “Positivo” ou “Muito Positivo” foram semeadas com uma zaragatoa estéril numa placa de meio agar sangue que foi depois colocada em meio anaeróbio e incubada em estufa a 37°C durante 24 horas (Figura 21).



Figura 21 - Material necessário para análise microbiológica

(A) placa de agar sangue, (B) zaragatoa esteril, (C) jarra de anaerobiose, (D) meio gerador de anaerobiose, (*) saco com amostra fecal. *(Foto obtida pela autora da dissertação)*

Após o período de incubação as placas foram analisadas e as UFC foram identificadas de acordo com a sua morfologia (o halo interno de hemólise incompleta e a zona externa da hemólise completa) como sendo *C. perfringens*.

3.8. Análise Estatística dos Resultados

Para toda a análise estatística, processamento de dados e elaboração de gráficos e tabelas, recorreu-se ao Microsoft® Office Excel 2007 e ao software estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS® versão 19). As variáveis numéricas foram analisadas por estatística descritiva, tendo sido calculadas medidas de tendência central (média e mediana) e medidas de dispersão (desvio padrão). Para a análise de grupos, realizou-se o teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade da amostra, e o teste ANOVA para sua comparação. Aplicou-se a alternativa não paramétrica, o teste de Kruskal-Wallis, para se analisar a relação entre duas variáveis e preconizou-se ainda, o teste exato do Qui-Quadrado de Pearson. O intervalo de confiança preconizado foi de 95%, sendo considerado significativo quando $p\text{-value} \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Numa primeira parte os resultados serão expostos pela ordem de execução do estudo: primeira visita, segunda visita, tratamento, terceira visita e indicadores de produção dos bandos. Esses resultados serão depois, numa segunda parte correlacionados com os resultados do Clostridium FirstTestTM.

4.1. EXPOSIÇÃO DOS RESULTADOS

4.1.1. Primeira Visita - Recepção de pintos do dia

4.1.1.1. Densidade Populacional – Total de Pintos Recebidos

Foram recebidos um total de 617 600 pintos do dia, distribuídos por um total de 30 bandos. O bando mais pequeno era composto por 3500 pintos do dia, enquanto o bando maior era composto por 52000 pintos do dia, com uma mediana de 18800 pintos, uma média de 20586,67 e um desvio padrão de 13014,488.

Tabela 3 - Análise estatística descritiva do número de pintos do dia recebidos

Recepção de pintos do dia	
n	30
Somatório	617600
Mínimo	3500
Máximo	52000
Média	20586,67
Mediana	18800,00
Desvio padrão	13014,488

4.1.1.2. Peso Médio à Chegada

Os valores da variável do peso médio à chegada oscilam entre 37 e 46 g, com uma média de 42,47 g, uma mediana de 43 g e um desvio padrão de 2,474 g.

Os valores obtidos na análise estatística descritiva efectuada sobre os dados, número de pintos do dia recebidos e o seu peso médio à chegada são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Análise estatística descritiva do peso médio à chegada dos pintos recebidos

Peso médio à chegada (g)	
n	30
Somatório	1274
Mínimo	37
Máximo	46
Média	42,47
Mediana	43,00
Desvio padrão	2,474

4.1.2. Segunda Visita – 1ª Amostragem

4.1.2.1. Idade dos bandos

A segunda visita às explorações ocorreu entre os 11 e os 15 dias de idade dos frangos. Sendo que a média registada foi 13,6 dias, mediana 14 dias e desvio padrão 1,499.

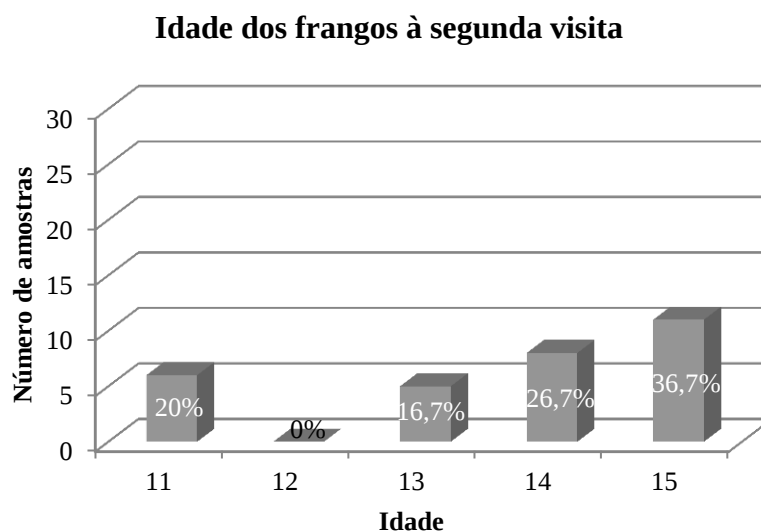
Os valores obtidos na análise estatística descritiva efectuada sobre a variável idade à primeira amostragem são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Análise estatística descritiva da “idade dos frangos” aquando da segunda visita

Idade dos frangos à segunda visita (dias)	
n	30
Mínimo	11
Máximo	15
Média	13,6
Mediana	14
Desvio padrão	1,499

A faixa etária dos 15 dias foi a mais representativa com 11 amostras (36,7%) seguindo-se 14 dias (26,7%), 13 dias (16,7%) e 11 dias (20%). Não foram registadas amostras de frangos com 12 dias de idade à segunda visita. A distribuição das idades pelas amostras encontra-se esquematizada no gráfico 1.

Gráfico 1 – Percentagem de amostras inseridas em cada faixa etária



4.1.2.2. Temperatura Ambiente

Os valores da variável temperatura, situam-se entre os 21°C e os 29°C. A temperatura média registada na primeira amostragem foi 26,2°C, a mediana foi 26°C e o desvio padrão 1,6°C.

Os valores da análise estatística descritiva obtidos sobre a variável temperatura à segunda semana estão inseridos na tabela 6.

Tabela 6 - Análise estatística descritiva sobre a variável “temperatura à segunda visita”.

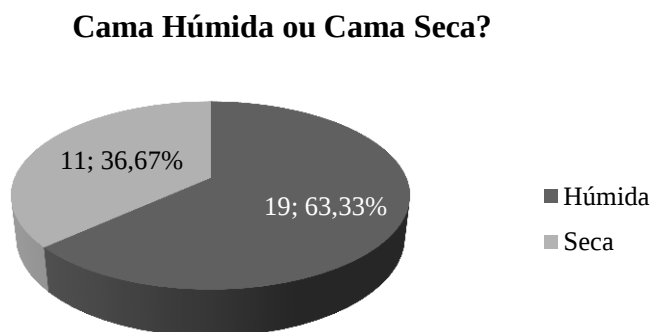
	Temperatura regista na segunda visita (°C)
n	20
Mínimo	21
Máximo	29
Média	26,243
Mediana	26
Desvio Padrão	1,5811

4.1.2.3. Humidade da Cama

Uma das variáveis tidas em conta aquando das colheitas das amostras foi o facto das camas se encontrarem ou não húmidas, uma vez que camas húmidas podem significar um crescimento intestinal excessivo de *C. perfringens*. A avaliação foi feita pela observação direta da consistência das camas e das fezes. Não foi, no entanto, realizada qualquer medição da percentagem de água nas camas.

Desde modo, verificou-se que dos 30 bandos amostrados, 63,33% (n=19) apresentavam cama húmida e 36,67% (n=11) apresentavam cama seca (gráfico 2).

Gráfico 2 - Representação gráfica sobre a distribuição dos 30 bandos amostrados relativamente à variável “cama húmida”



4.1.3. Resultados do Clostridium FirstTest™

Os resultados dos testes Clostridium FirstTest™ efetuados a partir das amostras fecais, indicam níveis de concentração do agente em 40% (n=12) das amostras. 30% (n=9) classificaram-se de “Positivas” e 10% (n=3) das amostras classificaram-se “Muito Positivas” (tabela 7).

Tabela 7 – Número de amostras distribuídas pelas classificações do Clostridium FirstTest™ (descritivo e percentual)

	n	% de níveis de concentração
Normal	18	60%
Positivo	9	30%
Muito Positivo	3	10%
Total	30	100%

Os valores registados pelo Clostridium FirstTest™ demonstram que para o resultado “Normal”, os valores de concentração se situam entre 0 e 0,07 ng/ml; para o resultado “Positivo” entre 0,09 e 0,16 ng/ml e para o resultado “Muito Positivo” entre 0,31 e 0,36 ng/ml.

A relação entre os resultados e a concentração pode ser observada na tabela 8.

Tabela 8 - Os valores registados pelo Clostridium FirstTest™: Resultados “vs” Concentração de *C. perfringens*

			Concentração de <i>C. perfringens</i> no Clostridium FirstTest™ (ng/ml)															Total
			0,00	0,01	0,03	0,04	0,06	0,07	0,09	0,10	0,11	0,12	0,13	0,16	0,27	0,31	0,36	
Resultado Clostridium FirstTest™	Normal	Nº de Amostras	6	2	1	5	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18
		%	33,3	11,1	5,6	27,8	11,1	11,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,0%
	Positivo	Nº de Amostras	0	0	0	0	0	0	2	1	1	2	1	1	1	0	0	9
		%	0	0	0	0	0	0	22,2	11,1	11,1	22,2	11,1	11,1	11,1	0	0	100,0%
	Muito Positivo	Nº de Amostras	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	3
		%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	66,7	33,3	100,0%
Total			Nº de Amostras	6	2	1	5	2	2	2	1	1	2	1	1	2	1	30
			%	20,0	6,7	3,3	16,7	6,7	6,7	6,7	3,3	3,3	6,7	3,3	3,3	6,7	3,3	100,0%

4.1.4. Resultados da Análise Microbiológica

Todas as amostras em que resultado do Clostridium FirstTest™ foi “Positivo” ou “Muito Positivo” foram sujeitas a análise microbiológica, cujos resultados estão representados na tabela 9 e no gráfico 3.

Consideraram-se amostras positivas aquelas em que houve crescimento de pelo menos uma UFC e amostras negativas (“Normal”) aquelas em que não se verificou o crescimento de qualquer UFC.

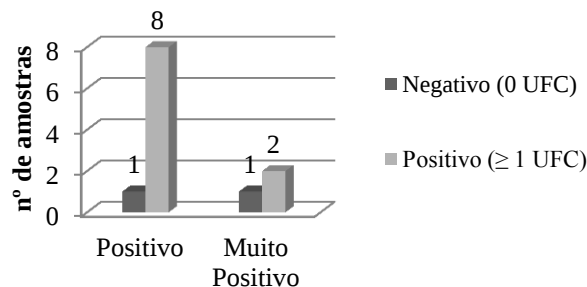
Das nove amostras cujo resultado do Clostridium FirstTest™ foi “Positivo”, uma amostra foi “Normal” (sem crescimento de UFC) (11,1%) e oito amostras “Positivas” (crescimento de uma ou mais UFC) (88,9%), e das três amostras cujo resultado do

Clostridium FirstTest™ foi “*Muito Positivo*”, numa amostra não houve crescimento de UFC (33,3%) e nas outras duas amostras houve crescimento (66,7%).

Tabela 9 – Resultados da Análise Microbiológica

			Análise Microbiológica		Total
			Negativo (0 UFC)	Positivo (≥ 1 UFC)	
Resultado Clostridium FirstTest™	Positivo	Nº de amostras	1	8	9
		%	11,1	88,9	100,0%
	Muito Positivo	Nº de amostras	1	2	3
		%	33,3	66,7	100,0%
Total		Nº de amostras	2	10	12
		%	16,6	83,4	100,0%

Gráfico 3 – Representação gráfica dos resultados da análise microbiológica



Resultado do Clostridium FirstTest™

4.1.5. Tratamento Farmacológico

Todos os bandos, cujas amostras fecais evidenciaram resultado do Clostridium FirstTest™ “*Positivo*” ou “*Muito Positivo*” e cuja análise microbiológica confirmou a presença de *Clostridium perfringens* foram sujeitos a tratamento.

Dos nove bandos com amostra com resultado “*Positivo*” um bando foi tratado com sangrovit (Sangrovit® 30g/l) do 21º ao 28º dia, um bando com trihidrato de amoxicilina (Paracilina®) e tilosina (Tylan®) do 22º ao 25º dia, um bando com oxitetraciclina (Oxitetraciclina® 50%) e enrofloxacina (Colmyc P® 10%) do 16º ao 19º dia, e cinco bandos com lincomicina (Lincagro® 400 mg/g): dois do 16º ao 19º dia, um do 17º ao 20º dia e dois do 24 ao 27º dia.

Os dois bandos com resultado “*Muito Positivo*” foram tratados do seguinte modo: um bando com trihidrato de amoxicilina (Paracilina®) e tilosina (Tylan®) e lincomicina (Lincagro® 400 mg/g), do 22º ao 25º dia e do 16º ao 19º dia, respectivamente.

4.1.6. Terceira Visita – Nova colheita após tratamento

4.1.6.1. Idade dos Bandos

A terceira visita as explorações dos dez bandos (n=10) que foram tratados ocorreu entre os 24 e os 31 dias dos frangos. A idade mínima foi 24 dias e a máxima 31 dias. A média das idades foi de 27,60, a mediana foi 27 e o desvio padrão 1,897.

Os valores obtidos na análise estatística descritiva podem ser observados na tabela 10.

Tabela 10 – Análise estatística descritiva dos valores da variável “idade à terceira visita”

Idade à terceira visita (dias)	
n	10
Mínimo	24
Máximo	31
Média	27,60
Mediana	27
Desvio Padrão	1,897

4.1.6.2. Resultados do Clostridium FirstTest™

Foram repetidos os testes do Clostridium FirstTest™ de novas amostras fecais dos bandos em que foi administrado tratamento.

Das 10 amostras testadas (n=10), 7 obtiveram resultado “Normal” (70%), 1 resultado “Positivo” (10%) e 2 resultados “Muito Positivo” (20%).

Os valores da concentração das amostras com resultado “Normal” (n=7), situam-se entre os 0 e 0,06 ng/ml, a amostra com resultado “Positivo” (n=1) o valor da concentração foi de 0,25 ng/ml e ambas as amostras com resultado “Muito Positivo” (n=2), registaram uma concentração 0,31 ng/ml. Os valores das variáveis “resultado” e “concentração” estão inseridos na tabela 11.

Tabela 11 - Os valores das variáveis “resultado” vs “concentração”

			Concentração de <i>C. perfringens</i> no Clostridium FirstTest™ (ng/ml)					Total
			0,00	0,02	0,06	0,25	0,31	
Resultado Clostridium FirstTest™	Normal	Nº de amostras	4	2	1	0	0	7
		%	57,1	28,6	14,3	0	0	100,0%
	Positivo	Nº de amostras	0	0	0	1	0	1
		%	0	0	0	100	0	100,0%
	Muito Positivo	Nº de amostras	0	0	0	0	2	2
		%	0	0	0	0	100	100,0%
Total		Nº de amostras	4	2	1	1	2	10
		%	40	20	10	10	20	100,0%

4.1.6.3. Resultados da Análise Microbiológica

As dez amostras (n=10) foram sujeitas a análise microbiológica. As amostras em que cresceu pelo menos uma unidade formadora de colónias de *C. perfringens* foram consideradas positivas. Desde modo, em seis placas (60%) não se registou qualquer crescimento e em

apenas 4 placas (40%) verificou-se o crescimento de unidades formadoras de colónias de *Clostridium perfringens* (tabela 12).

Tabela 12 – Resultados da Análise Microbiológica

Resultado	n	Percentagem
Negativo	6	60%
Positivo	4	40%
Total	10	100%

5.1.6.3.1. Resultados *Clostridium* FirstTest™ “vs” Resultados Análise Microbiológica

Comparando os resultados do *Clostridium* FirstTest™ com os resultados da análise microbiológica verificam-se contrariedades. Das sete amostras “*Normais*” dos *Clostridium* FirstTest™, cinco amostras confirmaram-se negativas (71,4%) e em duas (28,6%) verificou-se o crescimento de unidades formadoras de colónias de *C. perfringens*, considerando-se assim positivas.

O resultado do *Clostridium* FirstTest™ da amostra “*Positiva*” confirmou-se através da análise microbiológica cujo resultado foi positivo.

Das duas amostras “*Muito Positivas*” do *Clostridium* FirstTest™, uma o resultado da análise microbiológica foi negativo (50%) e a outra o resultado foi positivo (50%).

Esta comparação de resultados está representada na tabela 13.

Tabela 13 - Resultados *Clostridium* FirstTest™ “vs” Resultados Análise Microbiológica

			Análise Microbiológica		Total
			Negativo	Positivo	
Resultado <i>Clostridium</i> FirstTest™	<i>Normal</i>	Nº de amostras	5	2	7
		%	71,4%	28,6%	100,0%
	<i>Positivo</i>	Nº de amostras	0	1	1
		%	0	100,0%	100,0%
	<i>Muito Positivo</i>	Nº de amostras	1	1	2
		%	50,0%	50,0%	100,0%
Total		Nº de amostras	6	4	10
		%	60	40	100,0%

4.1.7. Indicadores de Produção – Fecho de Bando

4.1.7.1. Ganho Médio Diário

Após o fecho do bando registaram-se os dados técnicos dos 30 bandos amostrados.

O ganho médio diário registou-se entre 44,6g e 66,5g. O valor mínimo registado foi 44,6 g e o valor máximo 66,5g. A média registada foi 53,6g, a mediana foi 54,4 g e o desvio padrão 4,2 g (tabela 14).

Tabela 14 – Análise estatística descritiva sobre a variável “ganho médio diário (g)”

Ganho Médio Diário (g)	
n	30
Mínimo	44,6
Máximo	66,5
Média	53,6
Mediana	54,4
Desvio Padrão	4,2

4.1.7.2. Índice de Conversão Alimentar

O Índice de Conversão Alimentar registado variou entre 1,432 e 1,895, sendo 1,432 o valor mínimo e 1,895, o valor máximo. O valor médio foi 1,677,33, o valor da mediana foi 1,656 de e o desvio padrão foi 0,113.

Os valores da análise estatística descritiva sobre a variável “Índice de Conversão Alimentar” encontram-se na tabela 15.

Tabela 15 - Valores da análise estatística descritiva sobre a variável “Índice de Conversão Alimentar”

Índice de Conversão Alimentar	
n	30
Mínimo	1,432
Máximo	1,895
Média	1,677
Mediana	1,656
Desvio Padrão	0,113

4.1.7.3. Baixas totais - % de Mortalidade

A taxa de mortalidade de frangos de crescimento rápido e plumagem branca encontra-se documentada na tabela 16. O valor mínimo de % de mortalidade foi 1,30 % e o valor máximo foi 10,10 %. Registou-se uma média de 3,85, uma mediana de 2,5 e um desvio padrão de 2,71.

Tabela 16 - Análise Estatística Descritiva sobre a variável "Baixas totais - % de mortalidade"

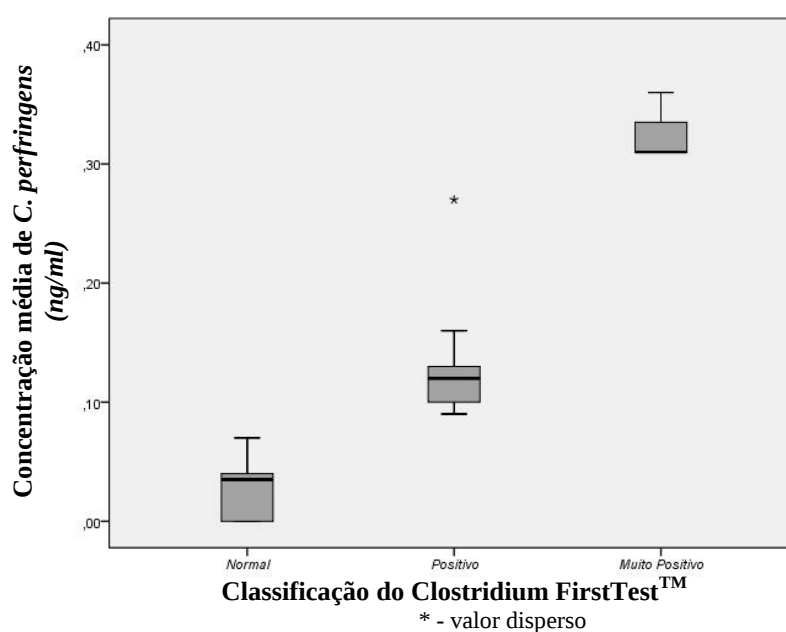
Baixas totais - % de Mortalidade	
n	30
Mínimo	1,30
Máximo	10,10
Média	3,85
Mediana	2,5
Desvio Padrão	2,71

4.2. CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS EXPOSTOS ANTERIORMENTE E O RESULTADO DO CLOSTRIDIUM FIRSTTEST™

4.2.1. Níveis de Concentração de *C. perfringens* – Segunda Visita

De acordo com a primeira medição efectuada nos 30 bandos, verificou-se que a média da concentração de *C. perfringens* nos bandos “*Normais*” foi 0,0283 ng/ml. Nos bandos “*Positivos*” e “*Muito Positivos*” a média de concentração do agente foi 0,1322 ng/ml e 0,3267 ng/ml, respectivamente (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Representação gráfica dos níveis médios de concentração de *C. perfringens* na 2ªVisita

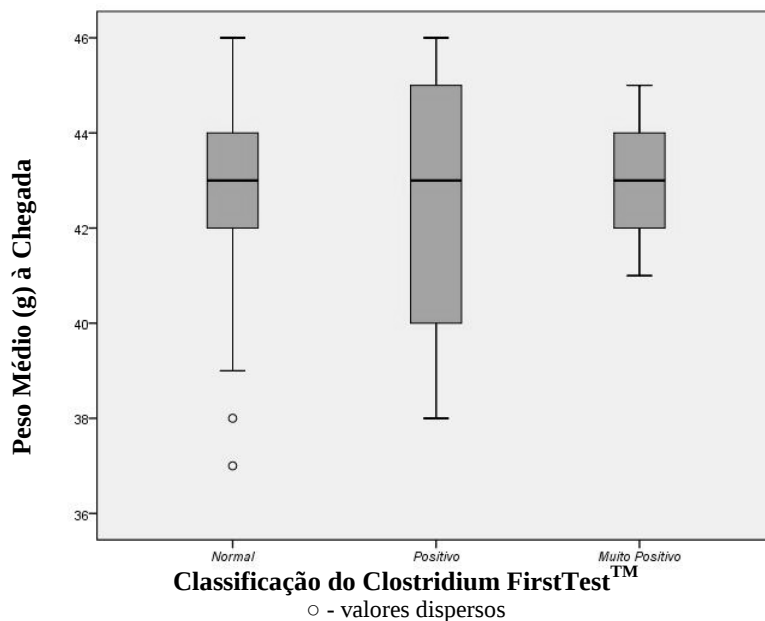


4.2.2. Relação do resultado do Clostridium FirstTest™ com as características dos bandos

4.2.2.1. Peso Médio à Chegada

De acordo com a primeira medição efectuada nos 30 bandos, verificou-se que a média do peso médio à chegada nos bandos “*Normais*” é de 42,33g. Nos bandos “*Positivos*” e “*Muito Positivos*” a média do peso médio à chegada é 42,56g e 43,00g respectivamente (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Representação gráfica da relação do peso médio (g) à chegada com o resultado do Clostridium FirstTest™

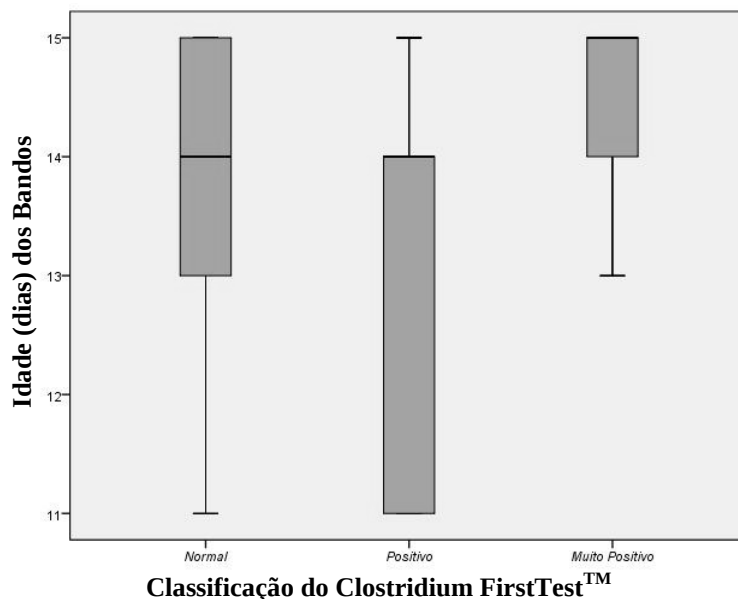


Pelo teste de Kruskal-Wallis verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre o peso médio à chegada nas três classes de classificação do Clostridium FirstTest™ “Normal”, “Positivo” e “Muito Positivo” ($p\text{-value}=0,932$).

4.2.2.2. Idade dos Bandos à Segunda Visita

De acordo com a primeira medição efectuada nos 30 bandos, verificou-se que a média das idades à segunda visita, nos bandos “Normais” foi de 13,89. Nos bandos “Positivos” e “Muito Positivos” a média das idades à segunda visita foi 12,78 e 14,33, respectivamente (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Representação gráfica da relação da idade à segunda visita com o resultado do Clostridium FirstTest™



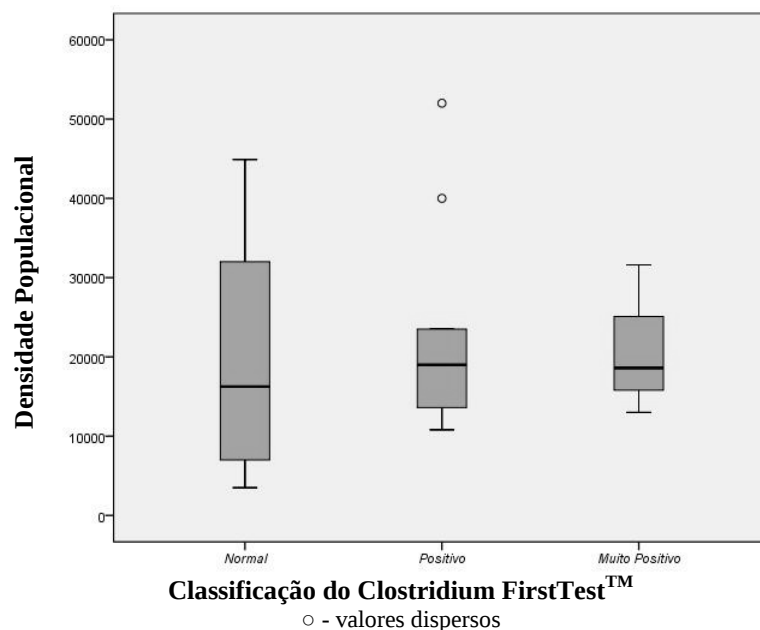
Verificou-se, pelo teste de Kruskal-Wallis, que não existem diferenças estatisticamente significativas entre a idade dos bandos à segunda visita nas três classes de classificação do Clostridium FirstTest™ “Normal”, “Positivo” e “Muito Positivo” ($p\text{-value}=0,168$).

4.2.3. Relação do resultado do Clostridium FirstTest™ com fatores de manejo e instalações

4.2.2.1. Densidade Populacional - Nº total de pintos recebidos

De acordo com a primeira medição efectuada nos 30 bandos, verificou-se que a média da densidade populacional nos bandos “Normais” foi 19077,78. Nos bandos “Positivos” e “Muito Positivos” a média de densidade populacional foi 23444,44 e 21066,67, respectivamente (Gráfico 7)

Gráfico 7 - Representação gráfica da Relação da Densidade Populacional com o resultado do Clostridium FirstTest™



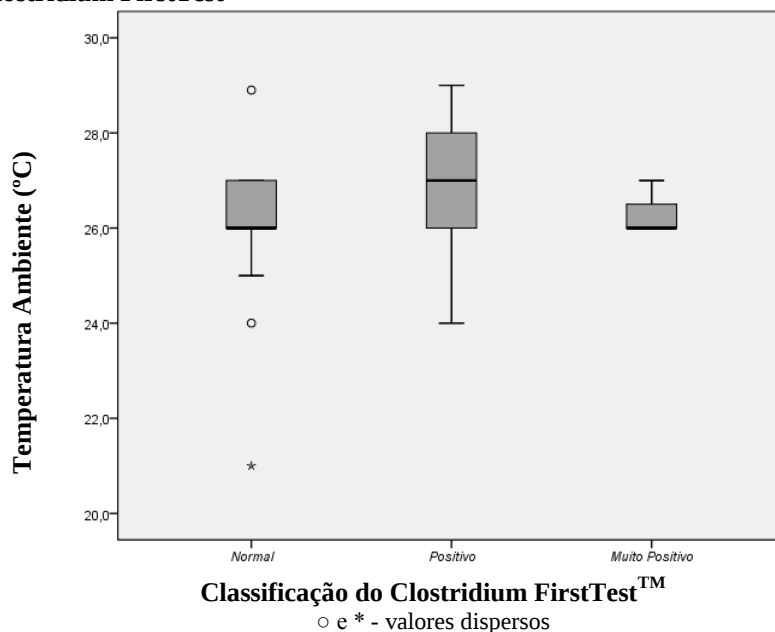
Pelo teste de Kruskal-Wallis verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre a densidade populacional nas três classes de classificação do Clostridium FirstTest™ “Normal”, “Positivo” e “Muito Positivo” ($p\text{-value}=0,562$).

4.2.3.2. Temperatura Ambiente (°C) à Segunda Visita

De acordo com a primeira medição efectuada nos 30 bandos, verificou-se que a média da temperatura ambiente à segunda visita nos bandos “Normais” foi de 25,9°C. Nos bandos

“Positivos” e “Muito Positivos” a média da temperatura ambiente à segunda visita foi 26,8°C e 26,3°C, respectivamente (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Representação gráfica da Relação da Temperatura Ambiente à Segunda Visita com o resultado do Clostridium FirstTest™



Verificou-se, pelo teste de Kruskal-Wallis, que não existem diferenças estatisticamente significativas entre a temperatura ambiente à segunda visita nas três classes de classificação do Clostridium FirstTest™ “Normal”, “Positivo” e “Muito Positivo” ($p\text{-value}=0,290$).

4.3.3. Relação entre o resultado da Humidade da Cama à Segunda Visita e o resultado do Clostridium FirstTest™

Para relacionar a humidade da cama com o resultado do Clostridium FirstTest™, reduziram-se as classificações apenas para duas: bando “Normais” e bandos “Positivos” que inclui os resultados dos bandos “positivos” e “muito positivos”.

De acordo com a medição efectuada nos 30 bandos, verificou-se nos 18 bandos “Normais”, metade apresentam cama seca e a outra metade cama húmida, nos restantes 12 bandos “Positivos”, 10 bandos apresentam cama húmida e os outros 2 bandos, apresentam a cama seca.

Tabela 17 - Distribuição do resultado da humidade das camas pelos resultados do Clostridium FirstTest™

		Resultado Clostridium FirstTest™		Total
		Normal	Positivo	
Humidade da Cama	Seca	9	2	11
	Húmida	9	10	19
Total		18	12	30

Utilizando o teste do Qui-Quadrado de Pearson para comparar a associação entre a humidade da cama e as duas classes de classificações, verificou-se que não existe uma relação entre a humidade da cama e a presença de *C. perfringens* ($p\text{-value}=0,063$).

4.2.4. Concordância entre o resultado do Clostridium FirstTest™ com o resultado da Análise Microbiológica

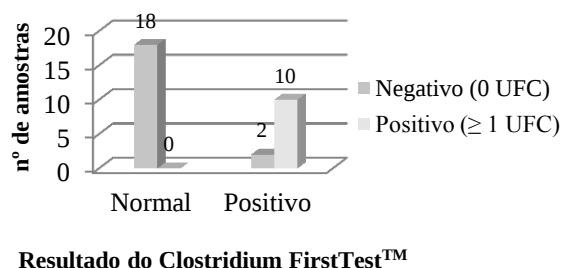
Para relacionar o resultado da análise microbiológica com o resultado do Clostridium FirstTest™, reduziram-se as classificações referente aos níveis de *C. perfringens* apenas para duas: bando “Normais” e bandos “Positivos” que inclui os resultados dos bandos “Positivos” e “Muito Positivos”.

De acordo com a medição efectuada nos 30 bandos, não se verificou nos 18 bandos “Normais” o crescimento de UFC na análise microbiológica, sendo o seu resultado negativo. Nos restantes 12 bandos “Positivos”, em 10 bandos houve crescimento de UFC, sendo resultado da análise microbiológica positivo, e em apenas 2 bandos, o resultado foi negativo por não ter havido crescimento de nenhuma UFC (Tabela 18 e Gráfico 9).

Tabela 18 - Relação entre o resultado do Clostridium FirstTest™ e o resultado de Análise Microbiológica

		Análise Microbiológica		Total
		Negativo (0 UFC)	Positivo (≥ 1 UFC)	
Resultado Clostridium FirstTest™	Normal	18	0	18
	Positivo	2	10	12
Total		20	10	30

Gráfico 9 – Representação Gráfica da Relação entre o resultado do Clostridium FirstTest™ e o resultado da Análise Microbiológica



Utilizando-se o teste exato do Qui-Quadrado de Pearson para avaliar a concordância dos resultados do Clostridium FirstTest™ com os resultados na análise microbiológica, concluiu-se que existe concordância ($p\text{-value} < 0,001$).

4.2.5. Tratamento Farmacológico - Resultado Clostridium FirstTest™ antes e depois

Após a análise da evolução da concentração de *C. perfringens* nos bandos após o tratamento verificou-se que 70 % (n=7) diminuiu a concentração, 20 % (n=2) aumentou e 10 % (n=1) manteve a concentração do agente. (Gráficos 10 e 11)

Gráfico 10 - Representação gráfica do Resultado do Clostridium FirstTest™ antes do tratamento

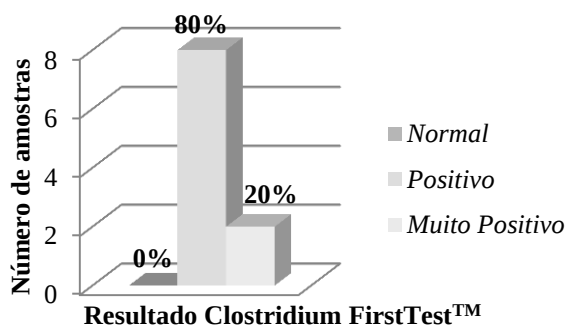
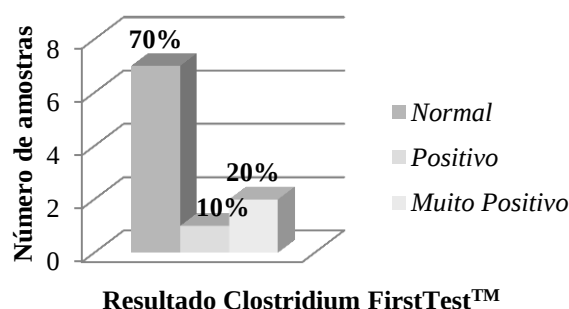


Gráfico 11 - Representação gráfica do Resultado do Clostridium FirstTest™ depois do tratamento



Através do teste de Pearson verificou-se uma associação positiva e significativa entre o resultado do Clostridium FirstTest™ antes e depois do tratamento ($R = 0,310$, $p\text{-value} < 0,05$, $n = 10$).

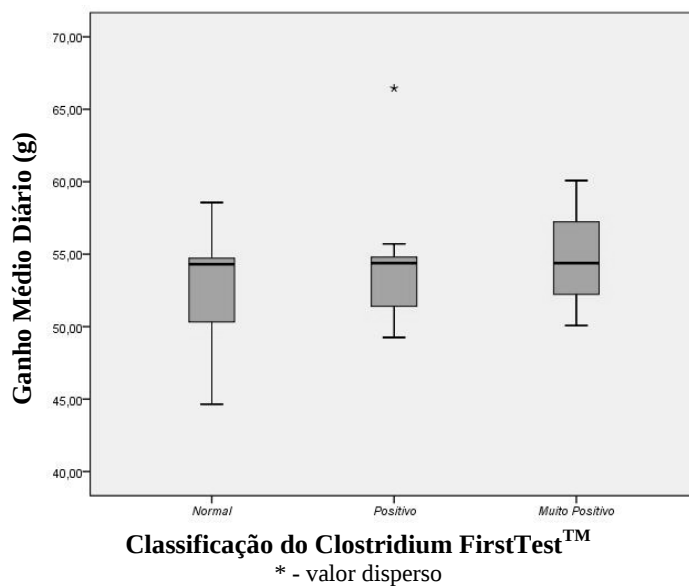
4.2.6. Relação do resultado do Clostridium FirstTest™ com os Indicadores de Produção

4.2.6.1. Ganho Médio Diário

De acordo com a primeira medição efectuada nos 30 bandos, verificou-se que a média do ganho médio diário nos bandos “Normais” foi 52,85g. Nos bandos “Positivos” e “Muito Positivos” a média do ganho médio diário foi 54,53g e 54,84g (Gráfico 12).

Pelo teste de Kruskal-Wallis verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre o ganho médio diário nas três classes de classificação do Clostridium FirstTest™ “Normal”, “Positivo” e “Muito Positivo” ($p\text{-value} = 0,128$).

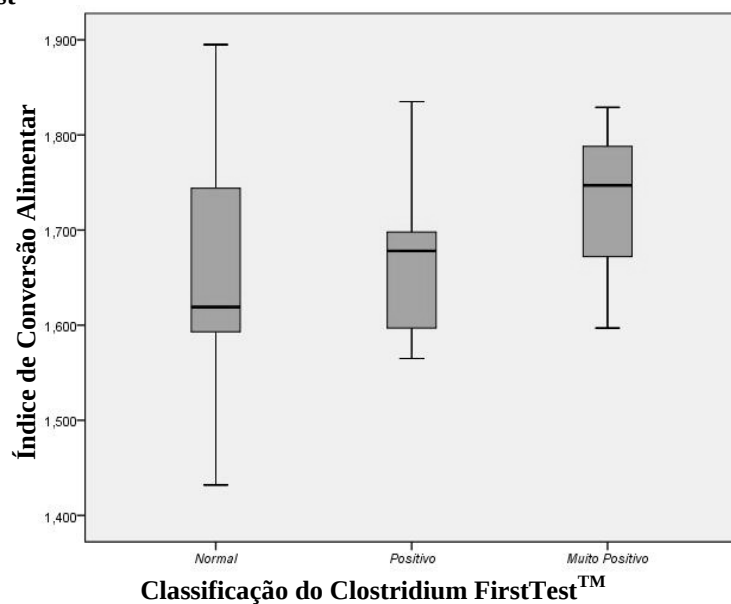
Gráfico 12 - Representação gráfica da Ganho Médio Diário (g) com o resultado do Clostridium FirstTest™



4.2.6.2. Índice de Conversão Alimentar

De acordo com a primeira medição efectuada nos 30 bandos, verificou-se que a média do Índice de Conversão Alimentar nos bandos “*Normais*” foi 1,670. Nos bandos “*Positivos*” e “*Muito Positivos*” a média do Índice de Conversão Alimentar foi 1,675 e 1,724, respectivamente (Gráfica 13).

Gráfico 13 - Representação gráfica da relação do Índice de Conversão Alimentar com o resultado do Clostridium FirstTest™

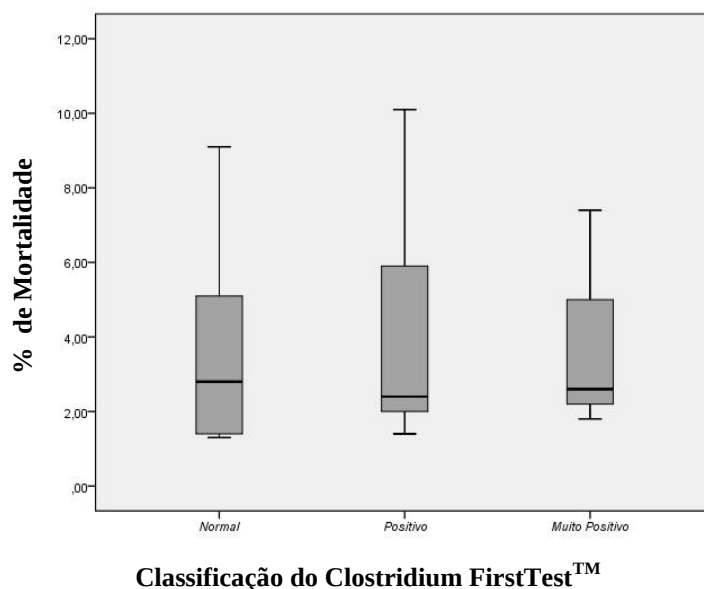


Verificou-se, pelo teste de Kruskal-Wallis, que não existem diferenças estatisticamente significativas entre o Índice de Conversão Alimentar nas três classes de classificação do Clostridium FirstTest™ “Normal”, “Positivo” e “Muito Positivo” ($p\text{-value}=0,643$).

4.2.6.3. % de Mortalidade – Baixas Totais

De acordo com a primeira medição efectuada nos 30 bandos, verificou-se que a média da % de mortalidade nos bandos “Normais” foi 3,66%. Nos bandos “Positivos” e “Muito Positivos” a média da % de mortalidade foi 4,20% e 3,93%, respectivamente (Gráfico 14).

Gráfico 14 - Representação gráfica da Relação da % de mortalidade com o resultado do Clostridium FirstTest™



Pelo teste de Kruskal-Wallis verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre a % de mortalidade nas três classes de classificação do Clostridium FirstTest™ “Normal”, “Positivo” e “Muito Positivo” ($p\text{-value}=0,671$).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo pretendeu-se avaliar a utilização de um teste de ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral, o Clostridium FirstTest™, para deteção e quantificação de *C. perfringens* em frangos de crescimento rápido e plumagem branca.

Simultaneamente, relacionaram-se as concentrações de *C. perfringens*, detetadas através do Clostridium FirstTest™, com as características dos bandos (peso médio à chegada, idade dos bandos à amostragem), os fatores ambientais (densidade populacional, temperatura ambiente, humidade da cama) e os indicadores de produção (ganho médio diário, Índice de Conversão Alimentar e % de mortalidade). Avaliou-se, também, a concordância dos resultados do Clostridium FirstTest™ com os resultados da análise microbiológica.

Foram selecionados trinta bandos de frango de crescimento rápido e plumagem branca, que foram divididos em grupos de acordo com os níveis de concentração de *C. perfringens* detetados pelo Clostridium FirstTest™. Assim, 30% (n=9) dos bandos foram classificados como “Positivo” e 10% (n=3) foram classificados como “Muito Positivo”. Os restantes 60% (n=18) dos bandos apresentaram níveis “Normais” de *C. perfringens*. Estes resultados são concordantes com os resultados obtidos por Saggiorato em 2009 (comunicação pessoal, 2011, dados não publicados), em que de 98 amostras testadas, 69% apresentavam resultado “Normal”, 25% apresentavam resultado “Positivo” e 6% apresentavam resultado “Muito Positivo”.

Os níveis de concentração de *C. perfringens* registados pelo Clostridium FirstTest™ demonstram que para o resultado “Normal”, a média da concentração foi 0,0283 ng/ml, para o resultado “Positivo” a média de concentração do agente foi 0,1322 ng/ml e para o resultado “Muito Positivo” a média da concentração foi 0,3267 ng/ml. Tal como seria de esperar os níveis de concentração do *C. perfringens* aumentam ao longo das classes de classificação do Clostridium FirstTest™, porque quando maior a concentração de agente em ng/ml, maior será a sua classificação (“Normal”, “Positivo”, “Muito Positivo”) Segundo Saggiorato *et al.* (2010), níveis de 1 milhão *C. perfringens* são considerados normais, indicado um perfil bacteriológico intestinal “Normal”. Níveis superiores a 10 milhões podem indicar um resultado “Muito Positivo”. No entanto, esses valores não foram possíveis de obter através do Clostridium FirstTest™ neste estudo, uma vez que os valores são apresentados em concentração de *C. perfringens* em ng/ml e não em número de bactérias. É preciso ter em

conta que o intervalo de confiança para a deteção do teste não foi conhecido aquando da realização do estudo.

O crescimento excessivo de *C. perfringens* está associada ao desenvolvimento de patologias graves que afetam a saúde do bando. Entre elas destaca-se a ENA responsável por avultadas perdas económicas.

Por forma a avaliar a utilidade do Clostridium FirstTest™, pretendeu-se relacionar as características dos bandos (peso médio à chegada, idade dos bandos à amostragem), os fatores ambientais (densidade populacional, temperatura ambiente, humidade da cama), e os indicadores de produção (ganho médio diário, Índice de Conversão Alimentar e % de mortalidade) com os níveis de *C. perfringens* presentes nos bandos.

O estudo começou pela receção dos pintos do dia. No total foram recebidos 617 600 pintos, distribuídos por 30 bandos, sendo a densidade populacional mínima de 3500 pintos e a maior de 52 000 pintos.

A densidade populacional está relacionada com o espaço de que cada animal dispõe e consequentemente o acesso à comida e bebida. Uma densidade populacional muito elevada está associada a um aumento do stress por parte dos animais, e consequente aumento da suscetibilidade da integridade intestinal. Neste estudo verificou-se que a média da densidade populacional nos bandos “Normais” foi 19077,78. Nos bandos “Positivos” e “Muito Positivos” a média de densidade populacional foi 23444,44 e 21066,67, respectivamente, e esperar-se-ia um resultado contrário. Não se verificou a existência de uma relação entre os níveis de *C. perfringens* e a densidade populacional. Seria de esperar que bandos com níveis de *C. perfringens* mais elevados correspondessem a bandos cuja densidade populacional fosse mais elevada. Uma das possibilidades é que o número de bandos cujo resultado é “Muito Positivo” é inferior às outras classes e por isso a média seja mais baixa. Contudo verifica-se um aumento na média da densidade populacional dos bandos “Normais” para os bandos “Positivos”, o que pode sugerir que com o aumento da densidade populacional os níveis de concentração do *C. perfringens* aumentam. Outra justificação é que o crescimento de *C. perfringens* pode ser multifactorial. McDevitt *et al.* (2006) relacionaram o aumento da incidência de ENA à maior densidade populacional, devido ao aumento da concentração de esporos e à baixa qualidade da cama (humidade e altos níveis de compostos nitrogenados), além do risco de dispersão por contacto direto ou aerossol.

Aquando da receção todos os bandos foram pesados. O peso médio à chegada registou-se entre 37g e 46g, sendo a média de 42,47g. Relacionou-se o peso médio à chegada com o resultado do Clostridium FirstTest™ e verificou-se que a média do peso médio à chegada nos bandos “Normais” foi 42,33g. Nos bandos “Positivos” e “Muito Positivos” a média do peso médio à chegada foi 42,56g e 43g, respectivamente. Não se encontraram diferenças entre o peso médio à chegada nas três classes de classificação ($p\text{-value}=0,932$). Podemos concluir que o peso médio à chegada dos pintos não tem qualquer influência no crescimento de *C. perfringens*.

Estudos realizados por Apajalahti (2007), Lee (2007) e Lange (2007) demonstraram que a flora microbiana dos pintos está formada nos primeiros 7-14 dias da vida. A flora microbiana intestinal equilibrada é importante, impedindo o crescimento excessivo de *C. perfringens*. A colheita das amostras fecais, na segunda visita, para realização do Clostridium FirstTest™ ocorreu quando os frangos tinham entre 11 e 15 dias de idade. A faixa etária dos 15 dias foi a mais representativa com 11 amostras (36,7%) seguindo-se 14 dias (26,7%), 13 dias (16,7%) e 11 dias (20%). Quando relacionada a idade à segunda visita e o resultado do Clostridium FirstTest™ verificou-se que a média das idades, nos bandos “Normais” foi 13,89. Nos bandos “Positivos” e “Muito Positivos” a média das idades foi 12,78 e 14,33, respectivamente. Não se encontraram diferenças entre idade à segunda visita nas três classes de classificação ($p\text{-value}=0,168$), o que pode ser justificado pela flora microbiana intestinal já estar plenamente formada e equilibrada, não favorecendo o sobrecrecimento de *C. perfringens*. Pois, e segundo a bibliografia, o facto de as aves passarem por uma fase adaptativa de transição do sistema imunitário por volta dos dias 10-14 e 30-35, pode levar a uma redução de imunidade da mucosa intestinal e, subsequentemente, a perda da integridade intestinal, o que favoreceria a colonização (Saggiorato *et al.*, 2010).

Um estudo realizado por Saggiorato *et al.* (2010) mostra que a incidência elevada de cama húmida em pavilhões com frangos com menos de 10 dias de idade, leva à perda de eficiência digestiva e a pobres performances, sugerindo que a avaliação da flora bacteriana intestinal ao décimo dia poderia ser um indicador para o resto da vida das aves. Quando foram recolhidas as amostras fecais, foi analisada a qualidade das camas, ou seja se se encontravam húmidas ou não húmidas. Verificou-se que dos 30 bandos amostrados, 19 (63,33%) apresentavam cama húmida e 11 (36,67%) apresentavam cama seca. Para relacionar a humidade da cama com o resultado do Clostridium FirstTest™, reduziram-se as classificações apenas para duas: bando “Normais” e bandos “Positivos” que inclui os resultados dos bandos

“Positivos” e “Muito Positivos”. Não se verificou qualquer associação entre a humidade da cama e os níveis de *C. perfringens*. Isto pode indicar que no momento da colheita os níveis de concentração de *C. perfringens* não eram suficientes para serem considerados positivos pelo kit comercial, no entanto eram suficientes para que a qualidade das fezes estivesse afetada e consequentemente as camas estivessem molhadas. Outra razão, é que nem sempre a origem da cama húmida está relacionada com infeções clostridiais. O derrame de bebedores, as dietas ricas em sódio, potássio, ou gordura saturada, as micotoxinas, a temperatura ambiente, a falta de ventilação, a má absorção do material usado nas camas, as infeções com outras bactérias, vírus ou protozoários bem como uma elevada densidade populacional, são fatores que também contribuem para o aumento da humidade das camas (Williams, 2005). No estudo realizado por Saggiorato *et al.* (2010) 42,1% dos bandos cujo resultado foi “Normal” no Clostridium FirstTest™ apresentavam cama seca, e apenas 15,4% dos bandos com resultado “Muito Positivo” apresentavam cama seca. Nesse estudo, a percentagem de camas húmidas também aumenta com o aumento da concentração de *C. perfringens*, obtida pelo Clostridium FirstTest™ ao dia 10 de vida dos bandos, sendo a percentagem de camas húmidas de 57,9%, 63,6% e 84,6%, para um resultado do Clostridium FirstTest™ “Normal”, “Positivo” e “Muito Positivo”, respectivamente. Para além de ser um meio propício ao desenvolvimento de *C. perfringens*, as camas húmidas, levam a um aumento de lesões nas patas (pododermatites), lesões nos joelhos e calos no peito, resultando em níveis mais altos de rejeição nas unidades de transformação, logo maiores perdas económicas, o que neste estudo se verificou em alguns bandos com cama húmida.

A temperatura corporal normal de um pinto é aproximadamente 41°C. Quando a temperatura ambiental supera os 35°C, é provável que o frango sofra stress por calor (Manual de Manejo del Pollo de carne Ross – Aviagen, 2010). Quando as aves estão sujeitas a temperaturas elevadas durante longos períodos, maior será o stress e os seus efeitos, como por exemplo, maior é a suscetibilidade da mucosa intestinal e maior o risco de crescimento excessivo de *C. perfringens*. De acordo com a primeira medição efectuada nos 30 bandos, verificou-se que a temperatura média ambiente à segunda visita nos bandos “Normais” foi de 25,9°C. Nos bandos “Positivos” e “Muito Positivos” a média da temperatura ambiente à segunda visita foi 26,8°C e 26,3°C, respectivamente. As temperaturas registadas são inferiores à temperatura mínima (35° C) suscetível a provocar stress nos frangos, por isso os níveis de *C. perfringens* registados pelo Clostridium FirstTest™ não estão relacionados com stress por calor. No entanto, é preciso ter em conta que as temperaturas ambientais tidas em

consideração foram apenas pontuais, ou seja, registadas no exato momento da colheita das amostras na primeira amostragem às explorações e não as temperaturas ambientais registadas até à data, uma vez que esse registo não é feito nas explorações, o que não invalida que em algum momento da vida destes frangos não tenha ocorrido uma variação brusca da temperatura que os possa ter colocado em stress e contribuído para a proliferação de *C. perfringens*, por isso seria também interessante seguir a evolução da temperatura ambiente do pavilhão ao longo do tempo de vida dos bandos.

Foi realizada uma análise microbiológica em todas as amostras cujo resultado do Clostridium FirstTest™ foi “Positivo” ou “Muito Positivo”. As placas onde ocorreu crescimento bacteriano (UFC ≥ 1) foram contabilizadas como positivas naquelas em que não ocorreu crescimento bacteriano foram consideradas negativas. Das nove amostras cujo resultado do Clostridium FirstTest™ foi “Positivo” em uma amostra não se verificou crescimento de UFC (11,1%) e oito amostras ocorreu crescimento bacteriano (88,9%), e das três amostras cujo resultado do Clostridium FirstTest™ foi “Muito Positivo”, numa amostra não se verificou crescimento de UFC (33,3%) e nas outras duas amostras verificou-se crescimento (66,7%). Para relacionar a o resultado da análise microbiológica com o resultado do Clostridium FirstTest™, reduziram-se as classificações apenas para duas: bando “Normais” e bandos “Positivos” que inclui os resultados dos bandos “Positivos” e “Muito Positivos”. De acordo com a medição efectuada nos 30 bandos, não se verificou nos 18 bandos “Normais” o crescimento de UFC na análise microbiológica, sendo o seu resultado negativo. Nos restantes 12 bandos “Positivos”, em 10 bandos houve crescimento de UFC, sendo resultado da análise microbiológica positivo, e em apenas 2 bandos, o resultado foi negativo por não ter havido crescimento de nenhuma UFC. A análise estatística efectuada sugere que existe concordância dos resultados do Clostridium FirstTest™ com os resultados na análise microbiológica. No entanto num estudo futuro dever-se-ia realizar duplicados ou triplicados das placas para evitar resultados incompreensíveis e possíveis erros associados.

Após a confirmação da presença de *Clostridium perfringens* pela análise microbiológica, os bandos, cujas amostras fecais evidenciaram resultado do Clostridium FirstTest™ “Positivo” ou “Muito Positivo” foram sujeitos a tratamento. Dos nove bandos com amostra com resultado “Positivo” um bando foi tratado com sangrovit (Sangrovit® 30 g/l) do 21º ao 28º dia, um bando com trihidrato de amoxicilina (Paracilina®) e tilosina (Tylan®) do 22º ao 25º dia, um bando com oxitetraciclina (Oxitetraciclina® 50%) e

enrofloxacin (Colmyc P® 10%) do 16º ao 19º dia, e cinco bandos com lincomicina (Lincagro® 400 mg/g): dois do 16º ao 19º dia, um do 17º ao 20º dia e dois do 24 ao 27º dia.

Os dois bandos com resultado “*Muito Positivo*” foram tratados do seguinte modo: um bando com trihidrato de amoxicilina (Paracilina®) e tilosina (Tylan®) e lincomicina (Lincagro® 400 mg/g), do 22º ao 25º dia e do 16º ao 19º dia, respectivamente. Após o tratamento, os bandos foram sujeitos a nova colheita de amostras fecais numa segunda amostragem. Estas amostras foram testadas no Clostridium FirstTest™ e foi analisada a concentração dos níveis de *Clostridium perfringens* antes e depois do tratamento. A evolução da concentração de *C. perfringens* após o tratamento demonstrou variabilidade individual: 70 % (n=7) dos bandos apresentaram uma diminuição na concentração de *C. perfringens*, 20 % (n=2) apresentaram um aumento e 10 % (n=1) mantiveram a concentração do agente. Verifica-se uma associação positiva e significativa entre o resultado do Clostridium FirstTest™ antes e depois do tratamento.

Os sete bandos cuja concentração de *C. perfringens* diminuiu foram tratados com: um bando foi tratado com Sangrovit® 30 g/l, dois bandos com trihidrato de amoxicilina (Paracilina®) e tilosina (Tylan®), um bando com oxitetraciclina (Oxitetraciclina® 50%) e enrofloxacin (Colmyc P® 10%) e três bandos com lincomicina (Lincagro® 400 mg/g). Os dois bandos cuja concentração de *C. perfringens* aumentou e o bando cuja concentração se manteve foram tratados com lincomicina (Lincagro® 400 mg/g). O tratamento com antibióticos tais como a penicilina, a amoxicilina, a ampicilina, a eritromicina, a diidroestreptomicina e a tetraciclina promovem uma resposta clínica satisfatória contra o *C. perfringens*. A penicilina é conhecida por ser particularmente ativa contra o *C. perfringens*. A resistência à penicilina é muito rara e a resistência às β -lactamases não tem sido demonstrada. De acordo com a Brennan *et al.* (2000) a administração de dieta com Tilosina (Tylan®) por sete dias consecutivos após a confirmação de ENA, reduziu a mortalidade e os graus de lesão e melhorou o crescimento global, bem como a conversão alimentar em frangos de crescimento rápido e plumagem branca. Os resultados obtidos neste estudo são corroborados pela bibliografia. Uma das razões para que os três bandos tratados com lincomicina não tenham diminuído a concentração de *C. perfringens*, pode relacionar-se com possível resistência desses bandos aos antibióticos aplicados. Outra razão pode ser a ocorrência de outros fatores que afetem a integridade da mucosa intestinal permitindo a propagação de *C. perfringens*.

Neste estudo, quando comparados os indicadores de produção (Índice de Conversão Alimentar, ganho médio diário e percentagem de mortalidade) com os resultados do Clostridium FirstTest™, verificou-se que a média do ganho médio diário nos bandos “Normais” foi 52,85g. Nos bandos “Positivos” e “Muito Positivos” a média do ganho médio diário foi 54,53g e 54,84g, respectivamente. Verificou-se que não existem diferenças entre o ganho médio diário nas três classes de classificação. O que indica que o tratamento permitiu melhorar o ganho médio diário, contrariamente ao que seria de esperar se não fosse aplicado tratamento.

Verificou-se que a média do Índice de Conversão Alimentar nos bandos “Normais” é de 1,670. Nos bandos “Positivos” e “Muito Positivos” a média do Índice de Conversão Alimentar é 1,675 e 1,724, respectivamente. Não se verificaram diferenças entre o Índice de Conversão Alimentar nas três classes de classificação. Ou seja o tratamento, também evitou que o Índice Conversão Alimentar fosse pior nos bandos cujo resultado do Clostridium FirstTest™ foi “Positivo” ou “Muito Positivo”.

A média da % de mortalidade nos bandos “Normais” foi 3,66%. Nos bandos “Positivos” e “Muito Positivos” a média da % de mortalidade foi 4,20% e 3,93%, respectivamente. Verificou-se que não existe relação entre a média da % de mortalidade nas três classes de classificação, Ou seja a % de mortalidade não foi afetada pelos níveis de concentração de *C. perfringens*, e o tratamento pode ter contribuído para isso.

Todos estes factos podem sugerir que devido a uma deteção precoce dos níveis de *C. perfringens* através do Clostridium FirstTest™ e a sua confirmação através da análise microbiológica, seguidas da correta aplicação de tratamento, reduziu-se o risco de desenvolvimento de uma patologia entérica, como a ENA e todas as consequências, tais como uma redução do ganho médio diário, um aumento da percentagem de mortalidade e do Índice de Conversão Alimentar.

Entre os fatores predisponentes importantes à ENA, a infeção por coccídeas favorece a colonização e a multiplicação de *C. perfringens* no trato intestinal devido aos danos causados na mucosa (McDougald, 2003). A gravidade das lesões depende principalmente do grau de exposição ou do número de oocistos ingeridos pelo hospedeiro (Williams, 2005). Riddell e Kong (1992), ao estudarem a influência da dieta na ENA, demonstraram que o tipo de alimento utilizado na ração é um fator correlacionado com a incidência da ENA e a percentagem de mortalidade em frangos de crescimento rápido e plumagem branca. Estes fatores predisponentes não foram tidos em consideração na presente dissertação. Seria

interessante complementar este estudo com a avaliação da influência da coccidiose e do tipo de alimento na dieta nas concentrações de *C. perfringens*, para uma melhor compreensão acerca da epidemiologia do *C. perfringens*, dado que nas pesquisas realizadas, não foi encontrado qualquer estudo sobre epidemiologia e a prevalência do *C. perfringens* nas explorações avícolas portuguesas.

Quanto ao folheto criado exclusivamente para este estudo e dirigido aos criadores, teve pela parte destes uma excelente aceitação, uma vez que não estavam alertas para a possível presença do *C. perfringens* nos seus bandos, e as consequências que isso acarreta.

6. CONCLUSÕES

A presença de *C. perfringens* no trato intestinal, pode não significar necessariamente o desenvolvimento de ENA e de outras doenças como a dermatite gangrenosa, colangiohepatite e erosões e úlceras na moela. Um ou vários fatores de predisposição podem ser necessários para eliciar os sinais clínicos e as lesões. Fatores como coinfeções com coccídeas, o genótipo e a idade do frango, o consumo de dietas ricas em energia, proteína, e farinha de peixe, elevada densidade populacional, alterações bruscas das condições climatéricas, como ventilação, temperatura e a condição da cama e todos outros distúrbios que possam causar situações de stress e reduzir a resistência das aves, aumentam a suscetibilidade a infeções.

A saúde intestinal das aves é fundamental para o sucesso da produção. Quaisquer alterações nesta fase, devido a perturbações mecânicas, químicas ou biológicas do sistema digestivo (enterite), estão associadas a elevadas perdas económicas devido ao aumento da percentagem de mortalidade, diminuição do ganho médio diário, aumento dos índices de conversão e aumento dos custos com antibioterapia. O impacto económico de alterações na integridade intestinal e consequentes alterações a nível de produção é elevado na indústria avícola, pelo que conhecimento da sua epidemiologia no nosso país poderá ser um contributo para a competitividade produtiva do sector em Portugal.

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a aplicabilidade e validade de um teste de imunoensaio de fluxo lateral “on farm” para deteção e quantificação de *C. perfringens* em fezes de frangos de crescimento rápido e plumagem branca, o Clostridium FirstTest™. O teste mostrou-se uma ferramenta útil para deteção e quantificação dos níveis de *C. perfringens* em aves. A deteção precoce dos níveis de concentração de *C. perfringens* permite prever o estado de saúde dos animais e preconizar um tratamento atempado.

Apesar de se ter em conta que a amostra é reduzida, uma vez que foi recolhida apenas na Região de Lisboa e Vale do Tejo, e que as condições avícolas não são uniformes no nosso país, pensa-se que se conseguiu responder ao objetivo inicial de determinar se o Clostridium FirstTest™ é um instrumento útil para a produção primária de frangos de crescimento rápido e plumagem branca. Uma vez que este teste “on farm” permite um diagnóstico qualitativo e quantitativo dos níveis de *C. perfringens* em amostras de fezes em apenas 15 minutos, e que os seus resultados são corroborados pelos resultados da análise microbiológica, desta forma fidedignos, consequentemente, pode ser proposta uma intervenção imediata para otimizar o bem-estar das aves e minimizar o impacto económico da doença.

Pretendeu-se também correlacionar os níveis de *C. perfringens* com as características dos bandos (idade, peso médio à chegada), os fatores ambientais (densidade populacional, temperatura ambiente, humidade da cama), e os indicadores de produção (ganho médio diário, Índice de Conversão Alimentar e % de mortalidade). Contrariamente, e de acordo com a bibliografia, ao que seria de esperar, verificou-se que não existe relação entre os resultados do Clostridium FirstTestTM e as características dos bandos, os fatores ambientais, e os indicadores de produção. Contudo, verificou-se melhoria na maioria dos níveis do agente nos bandos sujeitos a tratamento, e que existe concordância entre os resultados do teste e a análise microbiológica

Os níveis de concentração de *C. perfringens* encontrados neste estudo, sugerem que este é um agente importante a considerar nas explorações avícolas portuguesas, ainda que o seu papel patogénico pareça estar dependente da interação com outros fatores ou microrganismos. Nesse sentido, uma deteção precoce dos níveis de *C. perfringens* nas fezes dos frangos de crescimento rápido e de plumagem branca, por exemplo com recurso ao kit Clostridium FirstTestTM (BioX Diagnostics and Elanco Animal Health), a utilização de probióticos, de antibioterapia com espectro de ação sobre a bactéria, a vacinação, a nutrição adequada e o controlo de fatores imunossupressores, conjuntamente com um eficiente programa de biossegurança, são essenciais para manter a presença do agente a níveis compatíveis com a saúde e com a economia da exploração integrada.

7. BIBLIOGRAFIA

- Adams, M. R. & Moss, M. O. (2008) *Clostridium perfringens*. In: Bacterial agents of foodborne illness. (3^aEd, pp. 211) Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Barbara, A. J.; Trinh, H. T.; Glock, R. D. & Songer, J. G. (2008) Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace nonnecrotic enteritis strains from the gut of chicks. *Veterinary Microbiology*, 126(4): 377-82.
- Baums, C. G.; Schotte, U.; Amtsberg, G. & Goethe, R. (2004) Diagnostic multiplex PCR for Toxin Genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet. Microbiol.*, 100: 11-16.
- Brennan, J.; Moore, G.; Poe, S.; Vessie, G.; Wilson, J.; Barnum, D. A., *et al.* (2000) Efficacy of dietary tylosin phosphate (Tylan®) for control of necrotic enteritis in broiler chickens. 89th Meeting Poultry Science Assoc., Montreal, Canada, [Abstract].
- Brennan, J.; Moore, G.; Poe, S.; Vessie, G.; Wilson, J.; Barnum, D. A., *et al.* (2001a) Efficacy of in-feed tylosin phosphate for the treatment of Necrotic Enteritis in broiler chickens. *Poultry Science*, 80: 1451-1454.
- Brennan, J.; Bagg, R.; Barnum, D. A.; Wislon, J. & Dick, P. (2001b) Efficacy of Narasin in the prevention of necrotic enteritis in broiler chicks. *Avian Dis*, 45:210-214.
- Brennan, J.; Skinner, J.; Barnum, D. A. & Wilson, J. (2003) The efficacy of bacitracin methylene disalicylate when fed in combination with narasin in the management of Necrotic Enteritis in broiler chickens. *Poultry Science*, 82: 360-363.
- Bryant, A. E. & Stevens, L. S. (2002) The Pathogenesis of Gas Gangrene. *Clinical Infectious Diseases*, 35 (1): 93–100.
- Cato, E. P.; George, W. L.; Finegold, S.M. (1986) Genus *Clostridium*. In: Sneath, P. (ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams e Wilkins. 2: 1179-1182.
- Craven, S. E. (2000) Colonization of the intestinal tract by *Clostridium perfringens* and fecal shedding in diet-stressed and unstressed broiler chickens. *Poultry Science*, 79: 843-849.

- Collier, C. T.; Hofacre, C. L.; Payne, A. M.; Anderson, D. B.; Kaiser, P., Mackie, R. I., *et al.* (2008) Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 122: 104-115.
- Dinev, Ivan Ivanov (2007) Disease of Poultry: A color atlas. (1ªEd., pp.50-52), Ceva Sante Animal, Bulgaria.
- Drew, M. D.; Syed, N. A.; Goldade, B. G.; Laarveld, B. & Van Kessel A. G. (2004) Effects of dietary protein source and level on intestinal populations of *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Poultry Science*, 83(3): 414-420.
- Elwinger, K.; Schneitz, C.; Berndtson, E.; Fossum, O.; Teglöf, B. & Engström, B. (1992) Factors affecting the incidence of necrotic enteritis, caecal carriage of *Clostridium perfringens* and bird performance in broiler chicks. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 33: 369-378.
- Engberg, R. M.; Hedemann, M. S.; Leser T. D. & Jensen, B. B. (2000) Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. *Poultry Science*, 79: 1311-1319.
- Engberg, R. M.; Hedemann, M. S. & Jensen, B. B. (2002). The influence of grinding and pelleting of feed on the microbial composition and activity in the digestive tract of broiler chickens. *British Poultry Science*, 43: 569-579.
- Ficken, M. D. (1991) Gangrenous dermatitis. *In: Diseases of Poultry* (9ªEd, pp. 268-270), Iowa: Iowa State University Press.
- Fossum, O.; Sandstedt, K. & Engström, B. E. (1988) Gizzard erosions as a cause of mortality in white leghorn chickens. *Avian Pathology*, 17: 519-525.
- Gad, W.; Hauck, R.; Krüger, M. & Hafez, H. M. (2011) Determination of antibiotic sensitivities of *Clostridium perfringens* isolates from comercial turkeys in Germany in vitro. *Archiv für Geflügelkunde*, 75: 80-83
- Gomes, A. M.; Lobato, F. C.; Martins, N. R. S. & Assis, R. A. (2008) Genotipificação de *Clostridium perfringens* isolados de frangos de corte através da PCR múltipla. *Cienc. Rural* 38 (7) 1943-1947.

- Heier B. T.; Lovland, A.; Soleim, K. B.; Kaldhusdal, M. & Jarp, J. (2001) A field study of naturally occurring specific antibodies against *Clostridium perfringens* alpha toxin in Norwegian broiler flocks. *Avian Disease*, 45: 724-732.
- Instituto Nacional de Estatística (2011), Recenseamento Agrícola 2009 - Análise dos principais resultados. Acedido em 21 de Março de 2012 http://ra09.ine.pt/xportal/xmain?xpid=RA2009andxpgid=ine_ra2009_publicacao_detadndcontexto=puandPUBLICACOESpub_boui=119564579andPUBLICACOESmodo=2andselTab=tab1andpra2009=70305248
- Jackson, M. E.; Anderson, D. M.; Hsiao, H. Y.; Mathis, G. F. & Fodge D. W. (2003) Beneficial effect of beta-mannanase feed enzyme on performance of chicks challenged with *Eimeria* sp. and *Clostridium perfringens*. *Avian Disease*; 47(3):759–63.
- Kaldhusdal, M.; Schneitz, C.; Hofshagen, M. & Skjerve, E. (2001) Reduced incidence of *Clostridium perfringens*-associated lesions and improved performance in broiler chickens treated with normal intestinal bacteria from adult fowl. *Avian Diseases*, 45: 149-156.
- Keyburn, A. L.; Sheedy, S.A.; Ford, M. E.; Williamson, M. M.; Awad, M. M.; Rood, J. I., *et al.* (2006) Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in Necrotic Enteritis in chickens. *Infection and Immunity*, 74 (11): 6496-6500.
- Keyburn A. L.; Boyce J. D.; Vaz, P.; Bannam, T. L.; Ford, M. E. & Parker, D. (2008) NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog* 4(2).
- Knarreborg, A.; Simon, M. A.; Engberg, R. M.; Jensen, B. B. & Tannock, G. W. (2002) Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5918-5924.
- Lanckriet, A.; Timbermont, V.; Eeckhaut, F.; Haesebrouck, R.; Ducatelle, & Van Immerseel. F, (2010) Variable protection after vaccination of broiler chickens against necrotic enteritis using supernatants of different *Clostridium perfringens* strains. *Vaccine* 28:5920–5923.

- Lee, K. W.; Lillehoj, H. S.; Jeong, W.; Jeoung, H. Y. & Na, D. J. (2011) Avian necrotic enteritis: experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. *Poult Sci.* 90(7):1381-90.
- Lyras, D. & Rood, J. I. (1996) Genetic organization and distribution of tetracycline resistance determinants in *Clostridium perfringens*. *Antimicrobiol. Agents Chemo.*, 40: 2500-2504.
- Lorenzoni, G. (2010) Poultry Diseases Influenced By Gastrointestinal Health: Traditional Treatments And Innovative Solutions. (1ªEd., pp. 57-61) Austria: Nottingham University Press.
- Lovland, A. & Kaldhusdal, M. (1999) Liver lesions seen at slaughter as an indicator of necrotic enteritis in broiler flocks. *FEMS Microbiol Med Microbiol*, 24: 345-351.
- Lovland, A. & Kaldhusdal, M. (2001) Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens*-associated hepatitis. *Avian Pathology*, 30: 73-81.
- Lovland, A.; Kaldhusdal, M.; Redhead, K.; Skjerve, E. & Lillehaug, A. (2004) Maternal vaccination against subclinical necrotic enteritis in broilers. *Avian Path*, 33: 81-92.
- Manual de Manejo del Pollo de carne Ross – Aviagen, (2010) Acedido em 5 de Fevereiro de 2012:
http://pt.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Spanish_Tech_Docs/Manual-del-pollo-Ross.pdf
- Martel, A.; Devriese, L. A.; Cauwerts, K.; Gussem, K.; Decostere, A. & Haesebrouck, F. (2004) Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Path*, 33: 3-7.
- Martin, T. G. & Smyth, J. A. (2010) The ability of disease and nondisease producing strains of *Clostridium perfringens* from chickens to 346 L. Timbermont *et al.* *Avian Pathology*. 40:341-347.
- McClane, B. A.; Uzal, F. A.; Miyakawa, M.; Lyerly, D. & Wilkins, T. (2006) The Enterotoxigenic *Clostridia*. In: *The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria*. (3ªEd. pp. 763-778) Dworkin M and Falkow S. eds. Springer.

- McDonel, J. L., (1986) Toxins of *Clostridium perfringens* types A, B, C, D, and E. In: Pharmacology of Bacterial toxins (1ªEd., pp. 477-571) Dorner F. and Drews H, eds. Oxford Pergamon Press.
- McDougald, L. R. (2003) Coccidiosis. In: Diseases of Poultry (11ªEd., pp. 974-991) USA: Iowa State University Press.
- Novoa-Garrido, M; Larsen S. & Kaldhusdal, M. (2006): Association between gizzard lesions and increased caecal *Clostridium perfringens* counts in broiler chickens, Avian Pathology, 35 (5): 367-372
- Onderka, D. K.; Langevin, C. C. & Hanson, J. A. (1990). Fibrosing cholehepatitis in broiler chickens induced by bile duct ligations or inoculation of *Clostridium perfringens*. Canadian Journal of Veterinary Research, 54: 285-290.
- Omeira, N.; Barbour, E. K.; Nehme, P. A.; Hamadeh, S. K.; Zurayk, R. & Bashour, I. (2006). Microbiological and chemical properties of litter from different chicken types and production systems. Science of the Total Environment, 367: 156-162.
- Ono, M.; Okuda, Y.; Yazawa, S.; Imai, Y.; Shibata, I.; Sato, S. *et al* (2003). Adenoviral gizzard erosion in commercial broiler chickens. Veterinary Pathology, 40:294-303.
- Opengart, K. (2008) Necrotic enteritis. In: Diseases of Poultry (12ª Ed., pp. 872-879) USA: Iowa State University Press.
- Petit, L.; Gibert M; & Popoff M. R., (1999). *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends in Microbiology, 7(3): 104-110.
- Porter, R. E. (1998). Bacterial enteritides of poultry. Poultry Science, 77: 1159-1165.
- Quinn, P. J.; Carter, M. J.; Donnelly, W. J. & Leonard, F. C. (2005) Género *Clostridium*. In: *Clinical Veterinary Microbiology* (1ªEd., pp. 94-105). London: Wolfe Publishing.
- Regulamento (Ce) N.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho. Acedido em 17 de Fevereiro de 2012: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:268:0029:0043:pt:PDF>
- Riddell, C. & Kong, X. M. (1992) The influence of diet on necrotic enteritis in broiler chickens. Avian Dis. 36:499–503.

- Saggiorato, M.; Bostvironnois, C.; Ginter, A. & Coppe, P. (2010) Can We Predict Early The Performance of a Broiler Flock? Experience From Clostridium Firsttest. XIIIth European Poultry Conference, Tours - France.
- Santos, J.; Conceição, F. R. & Gil-Turnes, C. (2008) Enterite necrótica aviária. *Cienc. Rural* 38(7): 2076-2082.
- Sharma, S. K.; Eblen, B. S.; Bull, R. L.; Burr, D. H. & Whiting, R. C. (2005) Evaluation of lateral-flow Clostridium botulinum neurotoxin detection kits for food analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(7): 3935-3941
- Sebald, M. & Petit, J. C. (1997) Identification des *Clostridium* species. In: *Méthodes de laboratoire bactéries anaérobies et leur identification* (2^aEd., pp. 262-263) Paris: Institut Pasteur.
- Smedley, J. G.; Fisher, D. J.; Sayeed, S.; Chakrabarti, G. & McClane, B. A. (2004) The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev Phys Biochem Pharm*, 152: 183-204.
- Songer, J. G. (1996) Clostridial enteric diseases of domestic animals. *C Microb Rev*, 9: 216-234.
- Van der Sluis, W. (2000) Clostridial enteritis is an often underestimated problem. *World Poultry*, 16: 42-43.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Huyghebaert, G., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. (2004) *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathology*, 33(6): 537-549.
- Van Immerseel, F.; Rood, J. I.; Moore, R. J. & Titball, R. W. (2009) Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in broilers. *Trends in Microbiology*, 17: 32-36.
- Tagg, J. R.; Dajani A. S. & Wannamaker L. W. (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40: 722-756.
- Timbermont, L.; Lanckriet, A.; Gholamiandehkordi, A. R.; Pasmans, F., Martel, A.; Haesebrouck, F., *et al.* (2009) Origin of *Clostridium perfringens* isolates determines the ability to induce necrotic enteritis in broilers. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 32: 503-512.

- Thompson, D. R.; Parreira, V. R.; Kulkarni, R. R. & Prescott, J. F. (2006) Live attenuated vaccine-based control of necrotic enteritis of broiler chickens. *Veterinary Microbiology*, 113(1-2): 25-34.
- Wade, B.; Keyburn, A. L.; Ford, M. E.; Rood, J. I. & Moore, R. J. (2010) *Clostridium perfringens* genes with implications for both virulence and colonization during necrotic enteritis. In *Proceedings of the Prato Conference on the Pathogenesis of Bacterial Diseases of Animals*. Prato, Italy, 72.
- Waters, M.; Savoie, A.; Garmory, H. S.; Bueschel, D.; Popoff, M. R.; Songer, J. G., *et al.* (2003) Genotyping and phenotyping of beta-2 toxigenic *Clostridium perfringens* faecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets. *J Clin Microb*, 41: 3584-3591.
- Watkins, K. L.; Shryock, T. R.; Dearth, R. N. & Saif, Y. M. (1997) In vitro antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. *Vet Microbiol*, 54: 195-200.
- Williams, R. B. (2005) Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathology*, 34(3): 159-180.
- Willoughby, D. H.; Bickford, A. A.; Cooper, G. L. & Charlton. B. R. (1996) Periodic recurrence of gangrenous dermatitis associated with *Clostridium septicum* in a broiler chicken operation. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8: 259-261.

APÊNDICES

APÊNDICE I - Folheto de informação aos criadores

Introdução

Clostridium perfringens é uma bactéria Gram positiva, anaeróbia, de forma cilíndrica, produtora de toxinas capazes de causar um amplo espectro de doenças em humanos e animais. Em frangos intensivos, a *C. perfringens* está associada a enterite necrótica (ENA), porque o seu crescimento excessivo no trato intestinal pode levar à produção de toxinas, que, por sua vez, podem causar lesões do intestino.

Há indicações dadas de que a enterite por *C. perfringens* é sub-diagnosticada e tratada tarde demais. Quando o conteúdo intestinal aquoso e a cama molhada são observados, o *Clostridium* já teve a oportunidade de proliferar.

Se a ENA não for diagnosticada e tratada antecipadamente leva a um aumento da mortalidade das aves e / ou rejeição do fígado no matadouro, diminuição da eficiência produtiva e consequentes perdas económicas. É por isso da maior importância a deteção precoce e um tratamento profilático eficaz.



Legenda:

A - Intestino e fígado de frango saudável

B - Intestino e fígado de frango contaminado com *C. perfringens*

 **Interaves**
Sociedade Agro-Pecuária, S.A.

 **Socampestre**
Associação Nacional de Criadores de Aves Compostas

 **Elanco**

Patrocinadores:

Vera Lúcia Janeiro da Silva

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária
Estágio Curricular em Avicultura

UNIVERSIDADE LUSÓFONA
I Faculdade de Medicina Veterinária

Deteção e Quantificação Precoce de *Clostridium perfringens* em Frangos de Crescimento Rápido e Plumagem Branca



Informações ao Criador

Deteção e Quantificação Precoce de *Clostridium perfringens* em Frangos de Crescimento Rápido e Plumagem Branca na Região de Lisboa e Vale do Tejo

Objectivo

Este estudo surge no âmbito da realização do estágio curricular em avicultura, sob orientação do Dr. João Correia Rasquilho Raposo, para conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária.

A comunidade científica internacional tem vindo a discutir o papel, impacto e importância de *Clostridium perfringens* como agente patogénico envolvido na enterite necrótica em frangos de corte.

Em Portugal tem sido esporadicamente descrita a sua presença em bandos de frango intensivo contudo não é conhecida a epidemiologia do agente nas condições avícolas portuguesas.

O objetivo do presente estudo é no sentido, obter uma visão inicial sobre o grau de exposição dos frangos de corte ao agente em criadores integrados da Interaves S.A. na Região de Lisboa e Vale do Tejo, para que de futuro exista uma base de trabalho orientadora sobre *Clostridium perfringens* e o seu papel na doença entérica necrótica aviária no nosso país.

Material e Métodos

Para minimizar os problemas intestinais e económicos é importante conhecer antecipadamente os níveis de *Clostridium perfringens* nas fezes dos frangos intensivos e aplicar um tratamento profilático efetivo.

Serão acompanhados cerca de 30 lotes de frango intensivo de diferentes integrações da Região de Lisboa e Vale do Tejo (distritos de Leiria, Lisboa, Santarém e Setúbal).

Nas integrações selecionadas aleatoriamente nesta região serão colhidas, entre os 11 e 15 dias de idade, amostras de fezes que posteriormente serão testadas no Clostridium FirtTest™.

Nos lotes com resultados positivos da presença do agente, será realização de contra prova em laboratório; aplicado tratamento e feita uma nova colheita de amostra de fezes para realização de novo teste após o termino do tratamento.

Uma vez que a presença de *C. perfringens* está correlacionada com a diminuição da eficiência produtiva será tido em conta o ganho médio diário das aves através do registo de peso:

- À chegada
- Entre os 11 e 15 dias (colheita de amostras de fezes)
- Entre 24 e 31 dias (nova colheita de amostras de fezes após tratamento)
- Ao abate

Adicionalmente, e como aspetos comuns, como a temperatura, a qualidade da cama, a densidade e qualidade do bando, a qualidade dos pintos do dia, podem desempenhar um papel importante nas doenças entéricas, serão tidas em conta durante a realização do estudo.



Clostridium FirtTest™ determina os níveis de *Clostridium perfringens* em amostras de fezes em 15 minutos.

Referências Bibliográficas:

- <http://www.worldpoultry.net/necrotic-enteritis-foc-us/>
<http://www.worldpoultry.net/necrotic-enteritis-foc-us/new-clostridium-perfringens-test-indicates-intestinal-contamination-74473.html>
<http://www.worldpoultry.net/necrotic-enteritis-foc-us/necrotic-diseases-with-special-attention-to-clostridium-perfringens-74412.html>

Obrigada pela colaboração!

APÊNDICE II - Registos dos dados obtidos durante o estudo

Tabela 19 – Registos dos dados obtidos no decorrer do estudo

Bando/Amostra	Recepção de pintos do dia		Segunda Visita						Tratamento	Terceira Visita				Indicadores de Produção		
	Nº Total pintos do dia	Peso médio (g)	Idade	Temperatura (°C)	Cama	Resultado Clostridium FirstTest™	Concentração Clostridium FirstTest™	Análise Microbiológica		Idade (dias)	Resultado Clostridium FirstTest™	Concentração Clostridium FirstTest™	Análise Microbiológica	Índice de Conversão Alimentar	Mortalidade (%)	Ganho Médio Diário (g)
1	40.000	40	15	28,0	Húmida	Positivo	0,13	Positivo	com tratamento	28	Normal	0,00	negativo	1.683	2,00	50,26954
2	31.600	41	13	26,0	seca	Muito Positivo	0,36	Positivo	com tratamento	27	Normal	0,00	negativo	1.829	2,60	50,07317
3	52.000	46	11	27,9	seca	Positivo	0,16	positivo	com tratamento	24	Normal	0,06	negativo	1.835	2,40	49,25000
4	10.800	38	14	24,0	Húmida	Positivo	0,11	positivo	com tratamento	31	Muito Positivo	0,31	positivo	1.597	1,80	54,38438
5	13.000	45	15	26,0	Húmida	Muito Positivo	0,31	positivo	com tratamento	30	Muito Positivo	0,31	negativo	1.597	1,80	54,38438
6	44.900	43	13	26,0	Húmida	Normal	0,01	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.597	1,80	54,38438
7	10.000	45	15	24,0	Húmida	Normal	0,00	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.604	3,90	53,58491
8	35.000	43	15	26,5	seca	Normal	0,04	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.763	5,00	50,27100
9	11.500	45	14	24,0	Húmida	Positivo	0,12	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.698	7,90	54,56522
10	23.000	45	14	21,0	Húmida	Normal	0,07	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.604	3,90	53,58491
11	17.400	43	14	29,0	Húmida	Positivo	0,09	positivo	com tratamento	27	Normal	0,00	negativo	1.619	10,10	54,80132
12	20.000	38	14	26,0	seca	Normal	0,06	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.734	5,10	56,20053
13	31.000	37	15	26,0	Húmida	Normal	0,04	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.679	6,40	47,17949
14	33.000	42	15	26,0	Húmida	Normal	0,04	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.740	1,40	56,52956
15	13.500	42	14	26,0	seca	Normal	0,06	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.744	2,40	44,64396
16	32.000	43	14	25,0	Húmida	Normal	0,04	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.822	3,20	54,23684
17	18.600	43	15	27,0	Húmida	Muito Positivo	0,31	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.747	7,40	60,07712
18	23.200	43	11	26,0	Húmida	Positivo	0,27	positivo	com tratamento	27	Positivo	0,25	positivo	1.678	4,30	66,45408
19	13.600	46	11	27,0	Húmida	Positivo	0,10	positivo	com tratamento	27	Normal	0,00	positivo	1.817	5,90	55,71023
20	7.000	46	15	27,0	seca	Normal	0,00	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.593	1,30	54,72669
21	5.000	45	15	26,0	seca	Normal	0,00	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.593	1,30	54,72669
22	7.000	44	15	26,0	seca	Normal	0,03	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.593	1,30	54,72669
23	7.000	43	15	26,0	seca	Normal	0,07	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.593	1,30	54,72669
24	3.500	40	11	26,0	seca	Normal	0,01	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.432	9,10	46,30303
25	19.000	43	13	27,0	seca	Normal	0,00	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.550	1,50	58,56230
26	23.500	42	11	28,0	Húmida	Positivo	0,09	positivo	com tratamento	27	Normal	0,02	positivo	1.565	1,40	51,40575
27	19.000	40	14	27,0	Húmida	Positivo	0,12	positivo	com tratamento	28	Normal	0,02	negativo	1.590	2,00	53,90390
28	7.250	42	13	27,0	Húmida	Normal	0,00	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.895	7,70	50,32500
29	7.250	42	13	27,0	Húmida	Normal	0,00	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.895	7,70	50,32500
30	38.000	39	11	28,9	Húmida	Normal	0,04	negativo	sem tratamento	-	-	-	-	1.634	1,60	56,23932