

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DA IMUNOCOMPETÊNCIA E ALTERNATIVAS PARA A  
MODULAÇÃO NUTRICIONAL DE FRANGOS DE CORTE**

LILIAN KRATZ VOGT  
MsC Zootecnia (UFPEL)

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de Doutor em  
Zootecnia  
Área de Concentração Produção Animal

Porto Alegre, RS, Brasil  
Outubro de 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DA IMUNOCOMPETÊNCIA E ALTERNATIVAS PARA A  
MODULAÇÃO NUTRICIONAL DE FRANGOS DE CORTE**

LILIAN KRATZ VOGT  
MsC Zootecnia (UFPEL)

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de Doutor em  
Zootecnia  
Área de Concentração Produção Animal

Porto Alegre, RS, Brasil  
Outubro de 2005

# AVALIAÇÃO DA IMUNOCOMPETÊNCIA E ALTERNATIVAS PARA A MODULAÇÃO NUTRICIONAL DE FRANGOS DE CORTE<sup>1</sup>

Autora: Lilian Kratz Vogt

Orientadora: Andrea Machado Leal Ribeiro

Co-orientador: Cláudio Wageck Canal

## RESUMO

O objetivo da indústria avícola, que era a máxima produção, vem sendo substituído pela maior qualidade e inocuidade dos produtos, em função da exigência dos consumidores. A menor imunocompetência apresentada pelos frangos das linhagens modernas também desperta preocupação. Condições ambientais estressantes prejudicam o desempenho da ave e sua capacidade para superar infecções bacterianas, fúngicas, por protozoários e virais. Para apresentar alternativas a estes problemas, foram realizados dois experimentos (EXP). O primeiro EXP teve como objetivos avaliar o efeito da suplementação com vitamina C (300 ppm/kg de ração) e vitamina E (100 UI/kg de ração) e minerais complexados zinco (40 ppm/kg de ração) e selênio (0,3 ppm/kg de ração) sobre parâmetros imunológicos de frangos de corte submetidos a estresse cíclico por calor (25-32°C) e inoculados com albumina sérica bovina (BSA) para medir a imunidade humoral. O segundo EXP teve como objetivo a avaliação do uso de um prebiótico (mananoligossacarídeo) e um probiótico (*Lactobacillus*) em frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis (SE), em substituição a antimicrobianos promotores de crescimento (Avilamicina), sobre a colonização bacteriana, a produção de anticorpos, a morfometria intestinal e o desempenho das aves. No primeiro EXP, foi observado que a suplementação com vitaminas e minerais não influenciou a produção de anticorpos em frangos de corte inoculados com BSA. O estresse por calor provocou uma maior produção de anticorpos anti-BSA, independentemente da dieta utilizada. A inoculação com BSA foi uma boa ferramenta para avaliar imunidade humoral de frangos, visto que as aves responderam ao seu desafio com aumento na produção de anticorpos e tamanho de bursa, embora tenha havido enorme variabilidade individual. No segundo EXP, o uso de prebiótico e probiótico não influenciou o desempenho de aves desafiadas com SE. A produção de anticorpos em aves desafiadas com SE mostrou ser maior nas aves que receberam prebiótico aos 15 dias de idade, porém não aos 29 dias. A morfometria intestinal e a mortalidade não foram influenciadas pela suplementação com prebiótico, probiótico ou antimicrobiano. O uso de antimicrobiano aumentou a colonização por SE no ceco, enquanto prebiótico e probiótico diminuíram a colonização.

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, (151p.) Outubro de 2005.

# EVALUATION OF IMMUNOCOMPETENCE AND ALTERNATIVES TO NUTRITIONAL MODULATION OF BROILER CHICKEN<sup>1</sup>

Author: Lilian Kratz Vogt  
Adviser: Andrea Machado Leal Ribeiro  
Co-Adviser: Cláudio Wageck Canal

## ABSTRACT

The priority of poultry industry for maximum performance has been substituted by consumer demand for quality e safety products. The decreased immunocompetence presented by modern broiler strains also concerns. Environmental stress conditions reduce performance and broiler ability to overcome bacterial, fungal, protozoal and viral infections. Two experiments (EXP) were carried out to present alternatives to this problems. The first EXP aimed to verify the effect of diets supplemented with vitamin C (300 ppm/kg feed) and vitamin E (100 UI/kg feed) and complexed minerals zinc (40 ppm/kg feed) and selenium (0,3 ppm/kg feed) on immunological parameters of cyclic heat stressed broilers (25-32°C) and inoculated with bovine serum albumin (BSA) to determine humoral immunity. The second EXP aimed to verify the use of a prebiotic (mannanoligosaccharides) and a probiotic (*Lactobacillus*) in *Salmonella* Enteritidis (SE) challenged broilers, in substitution to growth promoters antimicrobians (Avilamicin), on bacterial colonization, antibody production, intestinal morphometry and broiler performance. In the first EXP it was observed that supplemented vitamins and minerals did not influence antibody production from broilers challenged with bovine serum albumin (BSA). Heat stress improved antibody production regardless of the diet. BSA inoculation was a good strategy to evaluate humoral immunity, since the birds improved antibody production and increased bursal weight in response to the challenge, although the enormous individual variation. In the second EXP performance of broilers challenged with SE was not affected by prebiotic and probiotic use. Broilers challenged with SE and receiving prebiotic showed increased antibody production on day 15 but not on day 29. Intestinal morphometry and mortality were not influenced by supplementation with prebiotic, probiotic or antimicrobial. The use of antimicrobial improved SE colonization in the cecum, while prebiotic and probiotic reduced colonization.

<sup>1</sup> Doctoral thesis in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, (151p.) October, 2005.

## SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	1
1.1 Sistema Imune .....	5
1.2 Antígeno e resposta imune .....	7
1.3 <i>Salmonella</i> Enteritidis .....	9
1.4 Órgãos linfóides .....	11
1.5 Parâmetros hematológicos .....	14
1.6 Vilosidades intestinais .....	16
1.7 Vitaminas na função imune e em situações de estresse .....	18
1.8 Minerais na função imune e em situações de estresse .....	21
1.9 Probióticos, prebióticos e antimicrobianos sobre desempenho e sistema imunológico .....	25
CAPÍTULO 2 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINAS E MINERAIS COMPLEXADOS SOBRE A IMUNOCOMPETÊNCIA DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A ESTRESSE POR CALOR	
2.1 INTRODUÇÃO .....	29
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	32
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
2.3.1 Desempenho das aves .....	39
2.3.2 Viabilidade .....	41
2.3.3 Quantificação de anticorpos .....	43
2.3.4 Peso e rendimento de órgãos linfóides .....	46
2.3.5 Contagem de leucócitos .....	48
2.4 CONCLUSÕES .....	51
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DO USO DE PREBIÓTICO E PROBIÓTICO SOBRE A COLONIZAÇÃO E A RESPOSTA IMUNE DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM <i>Salmonella</i> Enteritidis	
3.1 INTRODUÇÃO .....	52
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	57
3.2.1 Aves utilizadas e manejo experimental .....	57
3.2.2 Cepa utilizada e experimento piloto .....	57
3.2.3 Tratamentos .....	58
3.2.4 Inoculação e coleta de amostras para contagem bacteriana .....	60
3.2.5 Quantificação de anticorpos .....	61
3.2.6 Medida de vilosidades intestinais .....	62
3.2.7 Análise estatística .....	64
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	65
3.3.1 Dados de desempenho .....	65
3.3.2 Dados de contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis .....	67
3.3.2.1 Ceco .....	67
3.3.2.2 Fígado .....	73
3.3.3 Quantificação de anticorpos .....	74
3.3.4 Medidas de vilosidades intestinais .....	78

3.3.5 Viabilidade .....	82
3.4 CONCLUSÕES .....	84
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	85
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88
6. APÊNDICES .....	105
7. VITA.....	110
8. DADOS ORIGINAIS .....	111

## LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2	
1. Descrição da temperatura e umidade relativa nos ambientes ATN e EPC .....	34
2. Composição nutricional e de ingredientes das rações controle inicial e crescimento utilizadas no experimento .....	35
3. Ganho médio de peso (GMP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de aves submetidas a quatro tipos de dietas, dois ambientes e inoculação com BSA, no período de 1 a 35 dias .....	41
4. Viabilidade de frangos de corte desafiados ou não com BSA criados em dois ambientes e suplementados com diferentes níveis de vitaminas e minerais durante o período de 1 a 35 dias .....	42
5. Valores de densidade ótica de anticorpos anti-BSA (transformados pelo BoxCox) no soro de frangos de 35 dias inoculados ou não com BSA, criados em dois ambientes e suplementados com diferentes níveis de vitaminas e minerais .....	46
6. Peso e rendimento de baço e bursa de frangos de 35 dias inoculados ou não com BSA, criados em dois ambientes e suplementados com diferentes níveis de vitaminas e minerais .....	47
7. Valores de heterófilos, linfócitos e relação H/L de frangos de 35 dias inoculados ou não com BSA, criados em dois ambientes e suplementados com diferentes níveis de vitaminas e minerais .....	50
CAPÍTULO 3	
1. Composição nutricional das rações inicial e crescimento utilizadas no experimento .....	59
2. Composição dos tratamentos dos grupos experimentais .....	60
3. Desempenho de frangos desafiados com <i>Salmonella</i> Enteritidis e alimentados com dietas variando em aditivos alimentares, no período de 1 a 28 dias .....	66
4. Frequências observadas (%) da presença (contagem) de <i>Salmonella</i> no ceco distribuídas em cinco classes de acordo com o aditivo alimentar utilizado na dieta de frangos de corte .....	68
5. Contrastes entre os tratamentos para contagem de <i>Salmonella</i> no ceco .....	70
6. Frequências observadas (%) de presença e ausência de <i>Salmonella</i> no fígado .....	73
7. Contrastes entre os tratamentos (fígado) .....	74
8. Valores transformados de densidade ótica (DO) em soros de frangos de corte desafiados com <i>S. Enteritidis</i> recebendo diferentes aditivos alimentares .....	75
9. Medidas de altura de vilosidades (AV) e profundidade de cripta (PC) no duodeno de frangos de corte aos 15 e 29 dias, desafiados com <i>S. Enteritidis</i> recebendo diferentes aditivos alimentares .....	79
10. Viabilidade de frangos de corte desafiados com <i>S. Enteritidis</i> , durante o período experimental de 1 a 28 dias, recebendo diferentes aditivos alimentares .....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

m <sup>2</sup>	Metro quadrado
H/L ou H:L	Relação heterófilo: linfócito
°C	Graus Celsius
NK	<i>Natural killer</i>
Ig	Imunoglobulina
T <sub>H</sub>	<i>T helper</i>
APC's	Células apresentadoras de antígeno
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
UI	Unidades internacionais
mg	Miligramas
kg	Quilogramas
g	Gramas
ppm	Partes por milhão
Zn	Zinco
Se	Selênio
vit	Vitamina
FOS	Frutoligossacarídeos
MOS	Mananoligossacarídeos
GOS	Glucoligossacarídeos
BSA	Albumina sérica bovina
ATN	Ambiente termoneutro
EPC	Estresse por calor
EM	Energia metabolizável
PB	Proteína bruta
Ca	Cálcio
Pdisp	Fósforo disponível
mL	Mililitros
PBS	Solução tampão fosfato
EDTA	Etilenodiaminotetracético sal dissódico
μL	Microlitros
GP	Ganho de peso
CR	Consumo de ração
CA	Conversão alimentar
Prob	Probabilidade
CV %	Coefficiente de variação em porcentagem
DO	Densidade ótica
Het	Heterófilo
Linf	Linfócito
vs	Versus
SE	<i>Salmonella</i> Enteritidis
UFC	Unidades formadoras de colônias
Met + cis	Metionina + cistina

NAGF	Flora aviária intestinal normal
g	Gravidade
prob	Probiótico
preb	Prebiótico
atb	Antibiótico
µm	Micrômetros
CV	Comprimento de vilosidade
PC	Profundidade de cripta
nm	Nanômetros
ONPG	ortonitrofenilbetaDgalactopiranosídeo
FA	Fenilalanina
OF	Oxidação fermentação
SIM	H <sub>2</sub> S, indol, motilidade
TSI	Triple sugar iron
LIA	Lisina descarboxilase
NRC	National Research Council

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A avicultura brasileira vem apresentando, nos últimos anos, posição de grande destaque no mercado mundial, com progressos bastante evidentes tanto em quantidade quanto em qualidade de seus produtos. Somado a isto, ressalta-se o fato do Brasil produzir o frango com menor custo por ave viva do mundo. No ano de 2004, o crescimento do setor avícola foi de aproximadamente 10% em volume produzido, com uma produção anual de 8,408 milhões de toneladas (Reali, 2005). Em termos de participação no mercado externo, o Brasil apresentou desempenho excelente, exportando 2,42 milhões de toneladas, o que representa um acréscimo de 26% sobre o ano de 2003 (Reali, 2005). Estes números levaram o Brasil a alcançar a primeira posição no “*ranking*” de exportações, ultrapassando os EUA, que atingiram 1,976 milhões de toneladas exportadas em 2004 (Desouza, 2005).

O aumento na produtividade vem sendo alcançado com a utilização de técnicas modernas, principalmente no que diz respeito à genética e nutrição. As linhagens comercializadas e criadas atualmente são geneticamente melhoradas para rápido crescimento e máximo desempenho, os quais

constituem, até o presente momento, o objetivo principal da indústria avícola. Esta priorização do máximo desempenho, possivelmente, poderá ser substituída por outro foco, visto que o mercado consumidor, em especial o externo, vem modificando suas exigências quanto à carne de frangos e seus derivados por eles consumidos.

Os consumidores estão cada vez mais preocupados com a qualidade dos produtos avícolas, não apenas com a qualidade do produto final, mas sim, com aquela referente a todas as etapas de produção. O mercado consumidor quer ter certeza da inocuidade dos produtos e para isto exige conhecimento sobre a origem dos animais, ingredientes utilizados na ração, manejo e, principalmente, sobre a utilização ou não de aditivos alimentares nas rações, especialmente antimicrobianos. Estes passaram a ser vistos como fatores de risco para a saúde humana, em função da possibilidade da existência de resíduos na carne consumida e também pelo possível desenvolvimento de resistência bacteriana (Furlan, 2005).

Muitos países importadores, especialmente os da Comunidade Européia, já baniram ou estão banindo o uso da maioria dos antimicrobianos usados regularmente como promotores de crescimento, o que vem provocando mudanças na produção de frango no Brasil, principalmente nas empresas exportadoras. Estas têm buscado alternativas para tentar manter os índices de produtividade sem o uso dos antimicrobianos como promotores de crescimento.

Outro aspecto importante relacionado às aves modernas, diz respeito à menor imunocompetência apresentada por estes animais. Há

autores que afirmam que a seleção para melhor desempenho e crescimento prejudicou a resposta imune das aves frente a inúmeros patógenos. Qureshi & Harvenstein (1994), comparando duas linhagens comerciais de frangos, uma de 1957 e outra de 1991, relataram que os frangos comerciais mais modernos apresentaram imunidade humoral diminuída, com menor produção de anticorpos quando desafiados com hemácias de ovinos, menor resistência a estresse e maior mortalidade. De forma geral, a elevada produção de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelo sistema imune inato prejudicam o desempenho, enquanto que a seleção de linhagens de frangos para maior produção de anticorpos resulta em aves com crescimento mais lento (Humphrey & Klasing, 2004).

Talvez mais importante do que a imunocompetência diminuída, as condições ambientais estressantes a que as aves são submetidas nas condições de criação moderna (alta densidade aves/m<sup>2</sup>, temperaturas elevadas, qualidade do ar, qualidade da cama, manejo deficiente, etc.) afetam negativamente o animal através da ativação constante do sistema imune, causando um estresse imunológico (Ribeiro & Rudnik, 2003), prejudicando seu desempenho e habilidade para superar infecções bacterianas e virais (Heckert et al., 2002).

Excluído: do animal

Dentro deste contexto, a suplementação de rações com vitaminas e minerais em quantidades acima das exigidas para desempenho e produção vem sendo pesquisada em escala significativa como uma alternativa para atenuar e/ou compensar os efeitos negativos dos diversos agentes de estresse sobre o sistema imune da ave (El-Boushy, 1988; Kidd et al., 1996; Gore &

Qureshi, 1997; Friedman & Sklan, 1997; Erf et al., 1998; Klasing, 1998; Puthongsiriporn et al., 2001).

Segundo Heckert et al. (2002), embora se tenha conhecimento de que o estresse altera o desempenho do sistema imune, a determinação do estado imunológico de frangos comerciais é difícil, e não há um ensaio simples disponível para avaliar a imunocompetência. Medidas de imunidade comumente utilizadas são o peso de órgãos linfóides (Pope, 1991), resposta de anticorpos a antígenos estranhos (Gross & Siegel, 1980, 1990; Montgomery et al., 1991; Scott et al., 1994; Patterson & Siegel, 1998), relação heterófilo:linfócito (H:L) (Gross & Siegel, 1983; Cravener et al., 1992; Al-Murrani et al., 1997; Patterson & Siegel, 1998) e ensaios de blastogênese de linfócitos (Nagano & Lee, 1978; Barta et al., 1992; Cunnick et al., 1994; Talebi et al., 1995; Gogal et al., 1997).

Com a finalidade de obter maiores conhecimentos sobre as formas de avaliação de imunocompetência em frangos de corte, sobre a influência da suplementação vitamínica e mineral no sistema imune e, também, sobre efeitos de aditivos alimentares alternativos aos antimicrobianos em aves desafiadas por patógenos, foram realizados dois experimentos. O primeiro teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação com vitaminas C e E e minerais complexados zinco e selênio sobre parâmetros imunológicos de frangos de corte submetidos a estresse cíclico por calor (25-32°C). O segundo experimento teve como objetivo a avaliação do uso de um prebiótico (mananoligossacarídeo<sup>1</sup>) e um probiótico de exclusão competitiva (*Lactobacillus*<sup>2</sup>), em frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis, em

substituição a antimicrobianos promotores de crescimento. As aves foram avaliadas sob os aspectos imunológico, bacteriológico e de desempenho.

### **1.1 Sistema imune**

Por definição, o sistema imune compreende as moléculas, células, tecidos e órgãos que funcionam conjuntamente para promover imunidade, ou proteção, contra organismos estranhos (Abbas, 2000). O sistema apresenta atividade interna constante, a qual pode ser aumentada através do contato com macromoléculas apresentadas em um “contexto infeccioso”.

A resposta imune geralmente é dividida em duas fases: indutora e efetora. Na fase indutora ocorre a apresentação de um antígeno ao sistema imune (etapa cognitiva) e posterior ativação, proliferação e diferenciação celular (etapa de ativação). Na fase efetora, o sistema imune gera processos humorais e celulares que, normalmente, levam à eliminação do antígeno.

Convencionalmente, a resposta imune pode ser classificada como natural ou inata e adaptativa. A principal diferença entre elas refere-se aos elementos envolvidos: enquanto fagócitos, células *natural killer* (NK) e citocinas derivadas de macrófagos relacionam-se à resposta imune natural, a resposta imune adaptativa envolve principalmente linfócitos T e B e citocinas por eles produzidas (Abbas, 2000).

O sistema imune adaptativo das aves pode ser dividido em imunidade humoral e celular. A imunidade humoral caracteriza-se pela produção de anticorpos em resposta a um antígeno. A imunidade celular envolve mecanismos que permitem a destruição de células infectadas com

agentes estranhos, o que é realizado por um efetor (célula T ativada) em contato com a célula ativada (Weinstock et al., 1989).

A imunidade humoral e a celular atuam conjuntamente para combater o invasor. Os linfócitos B são os produtores de imunoglobulinas (Ig), mas para a produção de uma Ig específica, eles necessitam do auxílio de uma célula T ativada. De acordo com a seqüência de aminoácidos na região constante de sua estrutura, as Ig podem ser classificadas em cinco classes ou isotipos: IgM, IgE, IgD, IgA e IgG, cada uma desempenhando um papel diferente durante a resposta imune. Cada linfócito B pode produzir mais de uma classe de Ig, todas capazes de reconhecer somente um epitopo ou determinante antigênico, que é a parte passível de ser percebida pelo sistema imune (Abbas, 2000). Em aves, a IgY é a imunoglobulina correspondente à IgG dos mamíferos. No entanto ela possui algumas características estruturais que a tornam mais instável e menos flexível que a IgG (Krief et al., 2002).

Na área de imunologia, já se tem conhecimento sobre os componentes do sistema imune, suas funções, origem, forma de apresentação, assim como das interações entre eles, mas ainda há muitos pontos a serem esclarecidos, para que se possa dizer que se conhece o sistema imune como um todo. Isto torna os estudos envolvendo imunologia bastante complexos e, por vezes, com resultados aparentemente difíceis de serem explicados. Outro aspecto importante, também, é que na maioria das vezes, a imunologia é estudada através de seus mecanismos de reação a estímulos provocados artificialmente, o que por si só já torna a situação diferente daquela de ocorrência normal na natureza.

A ativação do sistema imune exerce grande influência sobre a homeostase metabólica e a produtividade de aves, sendo que grandes exposições a desafios microbianos resultam em menores taxas de crescimento e menor deposição em vários tecidos, especialmente o músculo esquelético (Benson et al., 1993).

Durante a resposta imune, alterações importantes acontecem no metabolismo de energia, aminoácidos, lipídios e minerais traço (Humphrey & Klasing, 2004). Estas alterações dependem, fundamentalmente, do antígeno utilizado e do tipo de resposta imune desencadeada (inata ou adaptativa), sendo que a resposta imune inata produz efeitos mais evidentes do que a adaptativa. Quando o sistema imune é ativado, ele torna-se anabólico e sua demanda nutricional é aumentada. Ao mesmo tempo, ocorre uma redução no consumo de alimento e há uma desregulação generalizada da homeostase nutricional em função de alterações em hormônios importantes para esta função, como insulina, glucagon e hormônio do crescimento (Elsasser et al., 2000).

## **1.2 Antígenos e Resposta imune**

Os antígenos são moléculas apresentadas ao organismo, capazes de induzir uma resposta imune. Podem ser classificados como endógenos – produzidos dentro de células do hospedeiro (como vírus e parasitas intracelulares), ou exógenos – produzidos fora das células (como bactérias e fungos). Outra classificação importante é quanto à dependência ou não de linfócitos *Helper* ( $T_H$ ) para a produção de anticorpos. Antígenos timo-

dependentes dependem da presença dos linfócitos  $T_H$  para a produção de anticorpos, enquanto que antígenos timo-independentes ativam linfócitos B na ausência de células  $T_H$ , pois sua estrutura é suficiente para gerar um sinal que induz a ativação (Abbas, 2000).

A resposta imune inata inicia quando o antígeno ultrapassa a barreira epitelial entre hospedeiro e ambiente (geralmente, epitélio cutâneo, do trato gastrointestinal e respiratório) e coloniza o hospedeiro. Os fagócitos (neutrófilos e macrófagos incluídos) englobam o antígeno e o destroem, sendo que os macrófagos secretam citocinas que estimulam a inflamação e a resposta imune. Proteínas plasmáticas, como as do sistema complemento, auxiliam o hospedeiro em sua defesa. A resposta inata também estimula a resposta imune adaptativa, através da liberação de sinais essenciais ao início da resposta de linfócitos T e B específicos ao antígeno.

A resposta imune adaptativa inicia nos tecidos linfóides periféricos. Os linfócitos T e B deixam o timo e a medula óssea e circulam por estes tecidos, para onde os antígenos também são transportados. Os antígenos são processados pelas células apresentadoras de antígeno (APC's) gerando peptídeos que são expostos pelas moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Linfócitos  $T_H$ , que expressam o co-receptor  $CD4^+$ , reconhecem peptídeos derivados de antígenos originários do ambiente extracelular, que são expostos ligados a moléculas de MHC classe II. Os linfócitos T que expressam o co-receptor  $CD8^+$  reconhecem peptídeos derivados de antígenos fagocitados e processados no citosol, que são apresentados ligados a moléculas de MHC classe I. Antígenos protéicos são

reconhecidos também pelos linfócitos B nos órgãos linfóides periféricos, da mesma forma que também o são alguns polissacarídeos e outros antígenos não protéicos. Estes são capturados nos órgãos linfóides e reconhecidos apenas pelos linfócitos B. O antígeno e as moléculas produzidas durante a resposta imune inata estimulam a ativação de linfócitos, os quais darão origem a células efetoras, células de memória e anticorpos (Abbas, 2000).

### **1.3 *Salmonella* Enteritidis**

*Salmonella* sp são bactérias Gram negativas muito relacionadas a ocorrências de gastroenterite e febre tifóide. A *S. Enteritidis* é um sorovar não tifóide, que infecta um grande número de hospedeiros, incluindo aves, suínos, bovinos e humanos. Em função do grande número de espécies hospedeiras, que podem atuar como reservatórios, a *Salmonella* possui grande capacidade de sobrevivência. De todos os patógenos causadores de risco à saúde humana, a *Salmonella* parece apresentar a maior capacidade de adaptação aos ciclos de contaminação-infecção-contaminação-infecção (Blaha, 1997).

Infecções agudas por *S. Enteritidis* ocorrem, geralmente, em aves jovens ou sob condições de estresse, raramente em aves adultas. A resistência à salmonelose em aves aumenta com a idade, possivelmente, devido ao desenvolvimento da flora intestinal normal e do sistema imune com o avanço da idade (Corrier et al., 1991; Smith & Tucker, 1980; Ziprin et al., 1989).

A preocupação sobre os efeitos dessa bactéria na perda de produtividade, antigamente o foco da atenção de pesquisadores e produtores, foi substituída por outra com grande importância em saúde pública.

Atualmente, a principal importância no controle e estudo do gênero *Salmonella* está relacionada com seus efeitos sobre a saúde humana, principalmente com a ocorrência de surtos de toxinfecções alimentares a ela relacionados (Nascimento & Santos, 2005).

Embora a *Salmonella* seja uma bactéria onipresente, seu reservatório principal é o trato intestinal de animais e a colonização é favorecida pela produção animal intensiva (Antunes et al., 2003). A *Salmonella* coloniza o epitélio do trato intestinal inferior, especialmente o ceco (Bailey, 1993). Por esta razão, este é um dos locais de eleição para a detecção e identificação da bactéria. Em casos de infecção sistêmica, a bactéria pode ser encontrada em órgãos como fígado, baço e pâncreas.

A bactéria pode invadir o organismo, através do trato intestinal, de duas maneiras diferentes: após a destruição da membrana epitelial pelos produtos bacterianos, ou por transporte através do epitélio intacto (Van Asten et al., 2005). Na membrana mucosa limitante com a superfície interna do intestino podem ser encontrados vários tipos de células – células Goblet, células Paneth, células M, enterócitos e células da cripta, variando em número de acordo com a porção do trato intestinal, espécie, idade, ambiente, etc. (Van Asten et al., 2005). De acordo com os mesmos autores, as células mais importantes na interação bactéria-célula intestinal são as células M e os enterócitos de absorção. A principal função dos enterócitos é a digestão e absorção de nutrientes, eletrólitos e água enquanto que as células M desempenham papel fundamental na resposta imune de mucosa (Neutra et al., 1996; Gebert, 1997).

Em uma infecção por *Salmonella*, o *status* do hospedeiro e da bactéria são decisivos no resultado. Enquanto idade, genética e fatores ambientais determinam principalmente o *status* do hospedeiro, o *status* da bactéria é determinado pelos fatores de virulência (Van Asten & Van Dijk, 2005). Dentre os fatores de virulência já identificados, há os chamados clássicos, que são plasmídeos de virulência, toxinas, fimbrias e flagelos, além de outros descobertos recentemente, como as proteínas efectoras.

Van Asten & Van Dijk (2005) relataram que diferenças nas condições experimentais entre grupos testados com o mesmo sorovar da bactéria podem avaliar a importância dos fatores de virulência e, ao mesmo tempo, estas diferenças podem indicar a flexibilidade da *Salmonella* spp no estabelecimento de infecções.

#### **1.4 Órgãos linfóides**

Os órgãos linfóides podem ser divididos em primários e secundários. Em aves, os órgãos primários, que são aqueles onde são geradas as células do sistema imune, são a medula óssea, o timo e a bolsa de Fabricius. A medula óssea é o principal local da hematopoiese e origina células progenitoras que irão se diferenciar em todas as linhagens hematopoiéticas (Abbas, 2000). Na bolsa de Fabricius, ocorre o desenvolvimento e a diferenciação dos linfócitos B e, no timo, ocorre a maturação dos linfócitos T. O baço é considerado um órgão linfóide secundário, pois é importante, mas não indispensável para o sistema imune. Nele, ocorrem as respostas aos antígenos transportados no sangue (Abbas, 2000).

As aves possuem ainda porções de tecidos linfóides na região óculo nasal, nos brônquios e no trato gastrointestinal, sendo esta última bastante relevante, pois muitos patógenos de importância econômica multiplicam-se no epitélio intestinal das aves.

A bolsa de Fabricius e o timo são fundamentais durante as primeiras semanas pós-eclosão, porém sofrem involução fisiológica à medida que a ave atinge sua maturidade sexual, quando a produção de células nestes locais é substituída pela produção nos sítios periféricos (baço, medula e tecidos linfóides agregados aos sistemas respiratório e digestivo).

Na galinha, os linfócitos do timo podem ser observados no 10º dia de desenvolvimento embrionário e, na bursa, no 14º dia. Nos últimos dias antes do nascimento da ave, as células maduras da bursa e do timo iniciam a migração para os centros periféricos (Glick, 1995).

O peso de órgãos linfóides tem sido utilizado como um parâmetro do *status* imunológico de aves (Pope, 1991), principalmente naquelas submetidas a situações de estresse. As relações entre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e o sistema imune estão no foco dos estudos das interações imuno neuroendócrinas (Heckert et al., 2002). Animais tratados com hormônio adrenocorticotrópico ou submetidos a estresse crônico apresentaram redução no peso de órgãos linfóides primários (Davison et al., 1988; Donker & Beuving, 1989) e secundários (Donker & Beuving, 1989). Segundo Guo et al. (1998), altas temperaturas resultaram em prejuízo ao desenvolvimento de órgãos linfóides em frangos de corte. Rosales et al. (1989) relataram que a liberação de corticosterona poderia ocasionar a involução dos tecidos linfóides como

timo, bolsa de Fabricius e baço e, também, a supressão de imunidade humoral e mediada por células.

Freqüentemente, a hipertrofia adrenal que ocorre com a grande elevação dos níveis séricos de seus hormônios acontece conjuntamente com a involução do sistema linfático, inclusive com atrofia de pâncreas, baço, bolsa de Fabricius e timo, e imunodepressão de duração variável. Neste caso, as aves mais sensíveis são as de maior tamanho e velocidade de crescimento. De acordo com Revidatti et al. (2002), o peso proporcional de órgãos linfóides primários e sua histologia são, freqüentemente, utilizados para avaliar a resposta em casos de estresse.

Donker & Beuving (1989) observaram redução no peso relativo do timo em 71%, da bursa em 57% e do baço em 35%, quando frangos foram submetidos à infusão com corticosterona. Da mesma forma, Puvadolpirod & Thaxton (2000), uma semana após injetarem doses de ACTH em frangos de corte com cinco semanas de idade, observaram redução do peso relativo de timo em 65%, do baço em 27% e da bursa em 43%.

Rendimentos de bursa médios, medidos através da relação percentual entre peso do órgão e peso da ave, de 0,18 a 0,20%, foram relatados por Rosales et al. (1989) em frangos de corte comerciais de quatro a sete semanas de idade. Aves criadas em condições laboratoriais, livres de patógenos, apresentam um rendimento de bursa de 0,44% às quatro semanas de idade. De acordo com Kuney et al. (1981), citados por Revidatti et al. (2002), valores abaixo de 0,15% são considerados muito baixos, podendo indicar atrofia e imunodepressão em frangos comerciais.

### **1.5 Parâmetros hematológicos**

O sangue é constituído de uma parte celular e outra fluida. A parte celular contém os eritrócitos, linfócitos e trombócitos, e seu exame pode fornecer muitas informações sobre o estado geral do animal.

O leucograma é tão importante quanto o eritrograma (Campbell, 1994) e constitui-se na contagem total e diferencial dos leucócitos e avaliação morfológica destes em esfregaço sangüíneo. O leucograma pode fornecer informações importantes em relação à origem de uma possível infecção (viral ou bacteriana) e também sobre o estado geral de um animal (Noriega, 2000).

Valores normais de leucócitos totais para frangos de corte estão entre 12000 e 30000 (Latimer & Bienzle, 2000), mas estes valores podem variar em função de idade, local de criação, sexo e condições de estresse. Nas contagens diferenciais, em média 60 a 65% do total de leucócitos são linfócitos, 25 a 30% heterófilos, 10% monócitos, 2% eosinófilos e 1,7% basófilos.

Os linfócitos das aves têm papel importante no sistema imunológico, assim como os linfócitos de mamíferos. Eles são essenciais na produção de anticorpos e na imunidade celular do organismo (Jain, 1993).

Os monócitos representam os maiores leucócitos observados em esfregaços de sangue periférico e sua função em aves parece ser semelhante à observada em mamíferos, que é a de auxiliar nos processos inflamatórios (Campbell, 1994).

Os heterófilos têm como principal função a fagocitose (Morgulis, 2002), possuindo também enzimas lisossomais e atividade bactericida (Harmon, 1998; Campbell, 1994).

A relação normalmente encontrada para heterófilos:linfócitos (H/L) é ao redor de 1:2, mas, em condições de estresse, esta relação aumenta em função de um maior número de heterófilos no sangue. A liberação de hormônio ACTH, em situações de estresse, também leva a uma redução no número de linfócitos circulantes, contribuindo para um aumento da relação heterófilo:linfócito (Macari & Luquetti, 2002).

Em situações de estresse, as contagens absoluta e relativa das células brancas do sangue alteram-se significativamente (Gross & Siegel, 1983). A leucocitose, ou aumento do número de leucócitos totais, foi relatada em diversos trabalhos (Coles, 1986; Ruckebush et al., 1994; Cunningham, 1999), onde também se observou que a variação entre os componentes celulares variava conforme as características do quadro.

Em aves submetidas a condições de estresse crônico, em um primeiro momento, observa-se heterofilia e linfopenia e, posteriormente, heteropenia e linfocitose (Perea et al., 1997). Segundo Campbell (1994), uma leucocitose moderada a leve com heterofilia e linfopenia pode ser resultado da presença de glicocorticóides exógenos ou endógenos liberados em resposta ao estresse. Sendo assim, a relação heterófilo:linfócito aumenta em função do aumento de heterófilos e da redução de linfócitos.

A relação H/L diminui conforme a idade da ave. Na primeira semana de vida, aves comerciais apresentam um relação de 1,36, a qual diminui progressivamente, atingindo 0,25 em poedeiras de 20 semanas de idade. Gross & Siegel (1983) relatam valores de relação H/L de 0,45 em frangos de corte com mais de oito semanas de idade.

Davis et al. (2000) relataram aumento na relação H/L associado a situações de estresse agudo, como repentinas restrições de água, alimentos ou luz. Mitchell et al. (1992) avaliando frangos expostos a altas temperaturas e transporte em caminhão por mais de três horas, observaram relações superiores a 0,62. Revidatti et al. (2002) compararam a relação H/L em frangos em três momentos diferentes – zero, quatro e oito dias de idade, tratados ou não com hormônio ACTH. As diferenças significativas encontradas (0,44; 0,50; 0,63 em não tratados, contra 0,31; 2,63; 1,18 em aves tratadas, aos zero, quatro e oito dias, respectivamente) indicaram que o uso desta variável pode ser útil para situações de estresse agudo.

Um aspecto importante é que a alteração da relação H/L em situações de estresse só ocorre na fase inicial. Segundo Gross & Siegel (1983) não há mais alterações significativas após um período prolongado de estresse. Revidatti et al. (2002) apresentaram dados que concordam com esta afirmação. Estes autores submeteram frangos de corte a estresse por manipulações periódicas e, ao final de duas semanas observaram que não houve alterações na relação H/L, embora as aves tenham perdido peso e os órgãos linfóides primários atrofiado. Segundo estes autores as aves podem ter se habituado ao manejo realizado.

### **1.6 Vilosidades intestinais**

A integridade das células da mucosa intestinal é de fundamental importância para a absorção dos nutrientes, visto que os processos de absorção são totalmente dependentes de mecanismos que ocorrem a nível

intestinal. A mucosa intestinal é composta por células denominadas enterócitos, que desenvolvem a capacidade de transportar monômeros para o interior da célula e, então, para a corrente sanguínea, através da membrana basolateral (Furlan, 2005). A maturação dos enterócitos acontece durante a sua migração – da cripta para a extremidade do vilão, e é dependente de estímulos.

O tamanho e o número dos vilões estão diretamente relacionados ao número de células que os compõem. Quanto maior o número de células, maior o tamanho do vilão e, conseqüentemente, maior a área de absorção, teoricamente. Segundo Maiorka (2005) uma maior altura de vilões não necessariamente significa maior absorção, porque apenas a presença do enterócito não garante a absorção. Por outro lado, uma redução na altura de vilões significa menor absorção. O número de microvilos na membrana luminal também é fator importante, pois estes agem aumentando a área de absorção dos nutrientes. Yamauchi & Isshiki (1991) observaram uma redução na densidade vilos/ área com o aumento da idade dos frangos, este resultado indica que, com o aumento da idade do frango, há um aumento no tamanho dos vilões (Furlan, 2005). Ao contrário, Ribeiro et al. (2002) avaliaram granulometrias diferentes em rações de frangos de corte de 21 a 42 dias e observaram aumento no número de vilões por área com o aumento da idade das aves, independente da granulometria utilizada.

Com a finalidade de traçar um perfil de desenvolvimento dos segmentos do trato gastrointestinal, Sell (1996) comparou diversos resultados de diferentes autores e concluiu que o pico de desenvolvimento do intestino

delgado ocorre entre 5 e 7 dias pós-eclosão, mostrando a importância de uma alimentação adequada na primeira semana de vida da ave sobre o seu desempenho posterior.

A integridade das células da mucosa intestinal, além de influenciar os aspectos sanitários da ave, reflete-se também em aspectos econômicos. O *turnover* celular, ou seja, o tempo que uma célula originada por mitose entre cripta-vilo leva até atingir o pico do vilo e descamar para o lúmen intestinal, é de, aproximadamente, 4 dias ( Furlan, 2005).

### **1.7 Vitaminas na função imune e em situações de estresse**

As vitaminas são nutrientes essenciais para o desenvolvimento animal, principalmente porque atuam como cofatores em diversas reações do metabolismo. Podem atuar com imunomoduladoras, melhorando as funções imunológicas e a resistência a infecções, em aves e outros animais domésticos (Rutz, 2004). De modo geral as vitaminas são fornecidas nos níveis mínimos necessários para obter máximo desempenho e lucro, acrescidos de margens de segurança baseadas em experiências práticas (Rutz et al., 2002).

De forma geral, acredita-se que os níveis nutricionais adequados para crescimento não são considerados adequados para ótima resposta imune e resistência a doenças (Nockels, 1988). Também, em situações de estresse ou desafio, freqüentemente são utilizados níveis superiores aos recomendados nas tabelas de exigências. Rostagno et al. (2000) recomendam níveis entre 10 e 20 UI vit E/ kg de ração, mas níveis dez vezes superiores a estes são bastante utilizados na prática. Segundo Miltenburg (1999) a suplementação

vitamínica em níveis 20% superiores aos utilizados na prática melhora o metabolismo protéico, energético e mineral e estimula a imunidade das aves contra eventuais desafios como calor, bactérias e vírus.

A função mais conhecida da vitamina E é a de antioxidante natural, função que ela exerce ativamente em nível de membrana, onde está localizada, em razão de sua natureza lipossolúvel e da constituição lipoprotéica da membrana.

Segundo Tengerdy (1989) a suplementação de vitamina E pode reduzir os efeitos negativos dos corticosteróides liberados durante situações de estresse.

Ferket et al. (1993) observaram maior produção de anticorpos contra hemácias de carneiro em perus suplementados com 300 UI vit E/kg de dieta, comparados com níveis recomendados pelo NRC (1994). Colnago et al. (1984) observaram que pintos suplementados com 100 UI de vit E/kg de dieta apresentaram mortalidade reduzida e maior ganho de peso durante um desafio com coccídios.

Segundo Marsh et al. (1986) os órgãos linfóides primários são os alvos principais para deficiências de vitamina E e selênio e, possivelmente, provêm um mecanismo pelo qual a função imune pode ser afetada.

Erf et al. (1998) suplementaram frangos de corte com quatro níveis de vit E na forma de dl-alfa-tocoferol acetato (0, 17, 46 e 87 mg/kg ração) e observaram seus efeitos sobre a diferenciação e distribuição de células B e T, no timo e no baço. O nível superior (87 mg) proporcionou um aumento no número de linfócitos T maduros no timo e no baço.

Ferket & Qureshi (1992) testaram a suplementação de vitaminas A, D, E e complexo B na água de bebida em animais estressados pelo calor. A suplementação proporcionou um aumento na produção de anticorpos (IgG) contra hemácias de ovinos e macrófagos, embora não tenha sido observado aumento na capacidade fagocítica destes. Os mesmos autores testaram a suplementação com eletrólitos e não observaram nenhum efeito benéfico.

A vitamina E tem se mostrado bastante efetiva para amenizar ou compensar os efeitos causados pelo estresse por calor. Campo & Dávila (2002) observaram diminuição significativa na relação heterófilo:linfócito em galinhas estressadas pelo calor quando estas foram suplementadas com 250 ppm de vitamina E e 250 ppm de niacina (0,43 vs 0,65, para vit E), comparados com níveis propostos pelo NRC (1994).

Os elementos do sistema antioxidante interagem metabolicamente de forma bastante eficiente. Um exemplo é a vitamina C, que melhora a atividade antioxidante da vitamina E, pois reduz os radicais tocoferoxila para a forma ativa de vitamina E (Jacob, 1995) ou então poupa a vitamina E disponível (Retsky & Frei, 1995). A relação da vitamina C com o sistema imune tem sido estudada em diversos trabalhos. A utilização de ácido ascórbico e desidroascórbico é aumentada durante a fagocitose por neutrófilos, fato que indica sua importância na primeira linha de defesa do organismo. Também, depleções de ácido ascórbico em leucócitos são observadas durante a ocorrência de infecções virais, resultando em vários graus de imunodepressão não específica (Thomas & Holt, 1978, citados por Rutz et al., 2002).

A combinação de 200 ppm de vitamina C e 75 UI/kg de vitamina E proporcionou maiores níveis de anticorpos produzidos contra *Brucella abortus* e contra vírus vivo e inativado de Doença de Newcastle (Gonzalez-Veja-Aguirre et al., 1995).

Puthongsiriporn et al. (2001) observaram aumento na proliferação de linfócitos em poedeiras submetidas a estresse por calor e suplementadas com 65 UI vit E/kg dieta. Quando foram adicionados 1000 ppm de vitamina C a esta suplementação, a melhora foi ainda mais significativa, havendo também aumento na produção de ovos.

McKee & Harrison (1995) observaram redução na relação H/L e também nos níveis de corticosterona plasmática de aves suplementadas com 300 ppm de ácido ascórbico e submetidas a vários agentes de estresse.

Kutlu & Forbes (1993) avaliaram o consumo de ácido ascórbico em aves jovens, em relação com o aumento da temperatura ambiental, e observaram que as aves voluntariamente selecionaram dietas com níveis mais altos de ácido ascórbico, quando a temperatura elevou-se subitamente de 26 para 37° C. De acordo com Furlan & Macari (2002) aves submetidas a um aumento de temperatura de 21° C para 31° C apresentaram redução na sua produção normal de ácido ascórbico, como resultado do fim de suas reservas e das quantidades de vitaminas sintetizadas.

### **1.8 Minerais na função imune e em situações de estresse**

Os minerais estão entre os nutrientes essenciais para o perfeito funcionamento do organismo e podem ser classificados em macro e

microminerais. Os microminerais são utilizados em quantidades diminutas na dieta dos animais e seus estudos envolvem variações também pequenas nos níveis utilizados nas dietas.

A importância dos microminerais baseia-se principalmente na sua atuação como cofatores enzimáticos e como componentes de estruturas protéicas. Sua capacidade de formar quelatos também merece destaque e reflete-se diretamente na sua disponibilidade para ser absorvido. Muitas vezes, os minerais podem se complexar com outras estruturas, como proteínas, carboidratos e outros minerais, o que pode dificultar sua absorção ou torná-los totalmente indisponíveis. Esta formação de quelatos pode ser prejudicial, interferindo na utilização de cátions essenciais, como no caso do ácido fólico+zinco; no entanto pode ser benéfica ao organismo, permitindo que um íon metálico exerça sua função metabólica, como no caso do ferro no grupo heme da hemoglobina; ou permitindo o transporte e armazenamento dos íons metálicos, como no caso de um quelato metal/ aminoácido (Leeson & Summers, 2001).

Na nutrição animal vem crescendo o interesse e a utilização dos minerais complexados com aminoácidos, ou incorporados biossinteticamente em moléculas de aminoácidos, o que aumenta sua biodisponibilidade. Existem diversos minerais sob forma complexada, mas a utilização de zinco, manganês e, principalmente, selênio, merecem destaque por suas funções e aplicabilidades práticas.

A síntese de boa parte das células e moléculas do sistema imune (heterófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos e linfócitos T) é mediada por

enzimas que dependem do zinco (Zn). Durante a reação imunológica, o nível de Zn no sangue decresce drasticamente em função da síntese de metalotioneína no fígado e, em contrapartida, a absorção é aumentada, indicando que ocorre um aumento na exigência deste mineral. Kidd et al. (1994) avaliando os efeitos da suplementação de zinco em dietas de perus recebendo níveis adequados deste mineral, observaram que a adição de 30 ou 45 ppm de zinco a partir da utilização de zinco-metionina, aumentou significativamente a capacidade de resposta imune celular de perus jovens.

Wellington et al. (1997) relataram que a ativação de células T em humanos é criticamente regulada pela concentração plasmática de zinco, pois níveis moderados (2x o nível fisiológico) estimulam a proliferação de células T, entretanto, níveis altos (8x o nível fisiológico) têm efeito inibitório. Os autores destacam também seu efeito controverso em pacientes com infecções sistêmicas causadas por bactérias Gram negativas. Como o zinco interage com o lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias, aumentando sua ação, conseqüentemente ele intensifica a fase aguda da resposta inflamatória. No entanto, foi observado que ele apresenta efeitos benéficos quando administrado profilaticamente, pois suínos sem infecção e que foram suplementados com zinco, apresentaram diminuição da resposta inflamatória quando posteriormente foram estimulados com LPS.

Parece haver uma redistribuição do zinco durante o estresse imunológico. Klasing (1994) observou uma redução extrema do zinco plasmático, enquanto o zinco hepático foi encontrado em níveis quatro vezes maiores que a quantidade diminuída no plasma.

O zinco é bastante utilizado em leitões para melhorar o desempenho e reduzir a ocorrência de diarreia (Mullan et al., 2002), em função de seu efeito positivo sobre a resposta imune a patógenos e na manutenção da integridade intestinal.

Hegazy & Adachi (2000) avaliaram o uso de dietas suplementadas com zinco (40 ppm) e selênio (1 ppm), separados e conjuntamente, em aves desafiadas com *Salmonella Typhimurium* e aflatoxina B1. Os resultados encontrados indicaram maior ganho de peso e melhor conversão alimentar com a suplementação de zinco, e melhor resposta imune, representada por títulos de anticorpos, nas aves suplementadas com selênio. Resultados semelhantes foram encontrados por Larsen et al. (1997), que relataram um aumento no título de anticorpos contra hemácias de carneiro (2,2 para 3,9 log<sub>2</sub>) quando níveis entre 0,1 e 0,8 foram suplementados na dieta de poedeiras.

O selênio tem importante função como antioxidante, pois é um componente da glutathione peroxidase, enzima importante para impedir a peroxidação em nível de membrana celular. Sua ação em conjunto com a vitamina E já foi proposta em diversos estudos e a indicação é de que a vitamina E tenha função antioxidante em nível de membrana celular e o selênio no citosol (Rutz, 2001).

Os efeitos da suplementação de selênio também já foram estudados em aspectos reprodutivos de aves. Galos suplementados com selênio sob forma complexada (0,2 ppm) e selênio inorgânico (0,2 ppm) foram comparados com outros sem suplementação, quanto ao início da produção de sêmen e número de anormalidades espermáticas (Edens, 2002). Os galos

suplementados com as duas formas de selênio apresentaram produção de sêmen mais precoce do que o grupo controle e, o selênio complexado proporcionou, também, menor número de anormalidades espermáticas quando comparado com a fonte inorgânica e o grupo controle ( $P < 0,05$ ). O uso de selênio inorgânico forneceu valores intermediários de anormalidades espermáticas, ficando entre o selênio complexado (melhor) e o controle (pior).

### **1.9 Probióticos, prebióticos e antimicrobianos sobre desempenho e sistema imunológico**

As doenças entéricas são fonte de preocupação para a indústria avícola mundial em razão da perda de produtividade, aumento de mortalidade e contaminação de produtos avícolas para o consumo humano. A possibilidade de resistência bacteriana causada pelos antimicrobianos e a crescente proibição de seu uso pelos países europeus, vêm aumentando o interesse sobre alternativas aos antimicrobianos na produção de aves (Patterson & Burkholder, 2003).

Com o objetivo de auxiliar na prevenção da contaminação de carcaças e na eliminação dos patógenos já presentes no organismo das aves, visando um incremento no desempenho e, muitas vezes, na resposta imune da ave, o uso de prebióticos e probióticos vêm sendo testado em diversos experimentos em diferentes condições (La Ragione & Woodward, 1994; Palmu & Camelin, 1997; Spring et. al, 2000; Zulkifli et. al, 2000; Huang, et. al, 2004;).

Fuller (1989) definiu o conceito de probiótico como sendo “um suplemento alimentar constituído de microrganismos vivos capazes de

beneficiar o hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal” e, segundo este mesmo autor, para ser considerado um probiótico, o microrganismo deveria ser produzido em grande escala, permanecer viável e estável durante o período de estocagem, ser capaz de sobreviver no ambiente intestinal e beneficiar o organismo com a sua presença. Existem no mercado probióticos compostos por diferentes microrganismos e, além disso, quando um mesmo microrganismo é utilizado em diferentes produtos, ainda assim, as cepas utilizadas podem ser diferentes. Segundo Tournut (1998), a eficácia do probiótico depende estritamente da quantidade e das características das cepas do microrganismo utilizado na elaboração do produto.

O mecanismo de ação dos probióticos está relacionado com a competição por sítios de ligação ou exclusão competitiva, onde as bactérias do probiótico ocupam os sítios de ligação na mucosa intestinal e impedem a fixação das bactérias patogênicas, através de uma barreira física (Furlan, 2005). As fímbrias são estruturas fosfoglicoproteicas que possuem importância bastante conhecida para a aderência bacteriana. Elas possuem afinidade por receptores específicos que variam quanto à sua presença entre as espécies de aves e também entre as porções do trato intestinal. Segundo Dobrogosz et al. (1991) e Tournut (1998), algumas bactérias podem se aderir à superfície superior dos enterócitos, enquanto outras podem residir nas criptas onde são produzidas as novas células epiteliais que, posteriormente, migrarão para o topo das vilosidades.

Outras funções dos probióticos são produção de substâncias antibacterianas e enzimas, como também, estímulo do sistema imune, por

aumentarem o número e a atividade das células fagocíticas do hospedeiro. As placas de Peyer, as tonsilas cecais e a bolsa de Fabrício são locais de acúmulo de tecido linfático no organismo das aves, os quais captam antígenos disponibilizados no trato digestório que estimulam as células B e as células T do sistema imune para desenvolvimento de uma imunidade geral e inespecífica. Com o estímulo imunológico da mucosa, ocorre a produção de anticorpos do tipo IgA, os quais reduzem o número de bactérias patogênicas na luz intestinal, além de produzirem ativação de macrófagos e proliferação de células T (Silva, 2000).

Huang et al. (2004) avaliaram o desempenho e a resposta imune de frangos de corte suplementados com probióticos inativados (*Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*) e observaram benefícios sobre peso corporal e ganho de peso nas aves suplementadas, em relação ao grupo controle. Não foi observada diferença significativa para títulos de anticorpos (IgG e IgA) contra o antígeno com que as aves foram desafiadas (KLH). Panda et al. (2000), ao contrário, indicaram diferenças significativas na produção de anticorpos contra hemácias de carneiro em frangos e poedeiras suplementadas com um probiótico comercial à base de *Lactobacillus spp.*

Gibson & Roberfroid (1995) definiram prebióticos como “ingredientes alimentares que não são digeridos na porção proximal do trato gastrintestinal e, que proporcionam efeito benéfico no hospedeiro por estimularem seletivamente o crescimento e/ou metabolismo de um limitado grupo de bactérias no cólon”. Também, segundo os mesmo autores, um prebiótico não pode ser hidrolisado ou absorvido no intestino delgado, deve ser um substrato seletivo para

determinado grupo de bactérias comensais benéficas, e deve ser capaz de alterar a microbiota intestinal e induzir efeitos luminais ou sistêmicos, benéficos ao hospedeiro.

Entre as substâncias mais estudadas como prebióticos estão os oligossacarídeos, carboidratos não digeríveis, mais especialmente os frutoligossacarídeos (FOS), os glucoligossacarídeos (GOS) e os mananoligossacarídeos (MOS). O prebiótico pode alterar a microbiota intestinal de duas maneiras: fornecendo nutrientes para as bactérias desejáveis ou através do reconhecimento, pelas bactérias patogênicas, dos sítios de ligação nos oligossacarídeos como sendo da mucosa intestinal, reduzindo a colonização intestinal indesejável, resultando em menor incidência de infecções e melhor integridade da mucosa intestinal (Iji & Tivey, 1998). Os mananoligossacarídeos são capazes de bloquear a aderência dos patógenos e evitar a colonização, pois, na sua presença, as bactérias ligam-se a eles através de suas fimbrias e não à mucosa intestinal, passando, juntamente com a digesta, sem causar problemas aos animais (Collett, 2000; Close, 2001).

Os resultados encontrados em estudos com pro e prebióticos são muitas vezes contraditórios e entre as razões para isto, estão diferenças no microrganismo utilizado, na dose, nas condições ambientais e de estresse e na forma de armazenamento dos produtos, nos diferentes experimentos realizados. O conhecimento existente até o momento indica que as respostas obtidas com o uso de probióticos ou prebióticos específicos não podem ser generalizadas, representando apenas os resultados nas condições em que foi testado.

## **CAPÍTULO 2**

### **EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINAS E MINERAIS COMPLEXADOS SOBRE A IMUNOCOMPETÊNCIA DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A ESTRESSE POR CALOR**

#### **2.1 INTRODUÇÃO**

A avicultura, atualmente, ocupa um lugar de destaque dentro das atividades do setor agropecuário mundial, com índices de produção em constante crescimento. O grande aumento na produção de carne de frango foi conseqüência de grandes avanços em genética, nutrição, sanidade e manejo, fazendo com que a atividade atingisse níveis de produtividade inimagináveis há alguns anos atrás. Todos estes avanços resultaram em índices elevados de desempenho, porém, alguns aspectos, como bem-estar e imunocompetência das aves, foram menosprezados.

O frango moderno tem pouca capacidade de responder a situações de estresse como, por exemplo, calor, frio, vento, fome e alta densidade. A capacidade de adaptação do animal a estas diversas circunstâncias determina ou não o estado de estresse. Quanto à

temperatura, o frango moderno tem pouca capacidade de termorregulação, sendo bem mais sensível ao calor do que ao frio. Segundo Ferket & Qureshi (1992), muitas das produções de frango no mundo estão situadas em locais onde o estresse causado pelas altas temperaturas ambientais impede um melhor desempenho e a resistência a doenças das aves. Aves submetidas ao estresse ambiental, geralmente, apresentam função imune deprimida (Thaxton & Siegel, 1970; Brake, 1989; Siegel, 1989; Miller & Qureshi, 1991).

Alguns dos parâmetros que têm sido comumente utilizados para estimar a imunidade de aves são: peso de órgãos linfóides (Pope, 1991), resposta de anticorpos a antígenos estranhos (Gross & Siegel, 1980, 1990; Montgomery et al., 1991; Patterson & Siegel, 1998; Scott et al., 1994), relação heterófilo: linfócito (H:L) (Gross & Siegel, 1983; Cravener et al., 1992; Patterson & Siegel, 1998; Al-Murrani et al., 1997) e ensaios de blastogênese de linfócitos (Nagano & Lee 1978; Barta et al., 1992; Cunnick et al., 1994; Talebi et al., 1995; Gogal et al., 1997). O peso de órgãos linfóides é facilmente medido e reflete a capacidade do organismo de produzir células linfóides durante uma resposta imune. McFarlane & Curtis (1989) observaram que pintos de corte expostos a múltiplos agentes de estresse, como amônia, choque elétrico e estresse por calor, tiveram aumento significativo da relação H:L.

Zulkifli et al. (1994) relataram que o estresse ambiental pode deprimir a função imune de aves, diminuindo a produção de anticorpos e uma efetiva imunidade mediada por células. Segundo Guo et al. (1998), altas temperaturas resultaram em impedimento do desenvolvimento dos

órgãos do sistema imunológico de frangos. Thaxton & Siegel (1970, 1972, 1973) observaram um efeito depressivo do estresse por calor na produção de anticorpos. Regnier et al. (1980), ao contrário, não observaram nenhum efeito depressivo do estresse por calor, assim como Donker et al. (1990) que concluíram que a produção de anticorpos não era consistentemente influenciada pelo estresse por calor.

Não se sabe ao certo se o efeito prejudicial do estresse por calor na função imune de aves pode ser compensado pela utilização de nutrientes. Ferket & Qureshi (1992) observaram que a suplementação vitamínica (vitaminas A, D, E e complexo B), durante um estresse por calor episódico, foi benéfica para os estágios de indução e maturação da resposta de síntese de anticorpos.

Características de desempenho e função imune de aves que sofreram estresse por calor mostraram ser significativamente beneficiadas por um aumento nos níveis de vitamina C (Pardue & Thaxton, 1984; Pardue et al., 1985), vitamina E (El-Boushy, 1988) e piridoxina (Blalock et al., 1984). Níveis moderados de vitamina E na dieta (50 UI/kg) de aves elevaram a produção de anticorpos para eritrócitos ovinos, enquanto o mesmo não foi observado com níveis mais altos (100 e 200 UI/kg) (Leshchinsky & Klasing, 1998). O selênio também faz parte do sistema antioxidante natural, poupando a vitamina E, de forma que patos recebendo dietas suplementadas com selênio apresentaram concentrações mais elevadas de vitamina E no plasma (Combs et al., 1975). Thornton (1961) relatou que os níveis de ácido ascórbico sanguíneo em aves estressadas por calor foram

marcadamente reduzidos e sugeriu que o estresse poderia criar uma exigência de suplementação com vitamina C.

Também o zinco (Zn) é um nutriente a ser considerado. Durante a reação imunológica, o nível de Zn no sangue decresce drasticamente em função da síntese de metalotioneína no fígado e, em contrapartida, a absorção é aumentada, indicando que ocorre um aumento na exigência deste mineral. Kidd et al. (1994), avaliando os efeitos da suplementação de zinco em dietas de perus recebendo níveis adequados deste mineral, observaram que a adição de 30 ou 45 ppm de Zn a partir da utilização de Zn-metionina, aumentou significativamente a capacidade de resposta imune celular de perus jovens.

Os objetivos deste trabalho foram: avaliar os efeitos da suplementação das vitaminas E e C, dos minerais complexados Zn e Se e da temperatura ambiental na imunidade humoral de frangos de corte inoculados com albumina sérica bovina (BSA); avaliar a inoculação com BSA como ferramenta para medir a imunidade humoral e, secundariamente, avaliar o efeito da inoculação de BSA no desempenho de frangos de corte

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Ensino Zootécnico (LEZO), do Departamento de Zootecnia, da Faculdade de Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de novembro a dezembro de 2003.

Foram utilizados 468 pintos de corte machos, da linhagem Ross 308, com 1 dia de idade e peso inicial médio de 44 g. As aves foram criadas no período inicial, até os 14 dias, em 78 gaiolas metálicas de 0,36 m<sup>2</sup>, em sala climatizada, com temperatura inicial de 31±1°C, decrescendo gradativamente até atingir cerca de 24±1°C aos 14 dias. No período inicial, as aves foram distribuídas aleatoriamente (seis em cada gaiola) e divididas em quatro tratamentos que diferiram entre si apenas na suplementação de vitaminas e/ou minerais. Os tratamentos foram assim distribuídos: T1- dieta controle (níveis vitamínico e minerais contidos no premix); T2- suplementação vitamínica de 100 UI vit E e 300 ppm vit C/kg de ração; T3- suplementação mineral de 40 ppm Zn e 0,3 ppm Se/kg de ração; T4- suplementação vitamínico-mineral nos níveis de T2 + T3.

A vitamina E foi suplementada na forma de acetato dl- $\alpha$  tocoferol (Roche®) e a vitamina C na forma de ácido ascórbico (Roche®). O zinco e o selênio foram suplementados na forma orgânica (Zinpro®).

Aos 14 dias, 272 aves (quatro aves por gaiola) selecionadas aleatoriamente foram distribuídas em 68 gaiolas de 0,45 m<sup>2</sup>, em dois ambientes – termoneutro (ATN) e estresse por calor (EPC), com oito repetições/ tipo de suplementação no EPC e nove repetições/ tipo de suplementação no ATN.

Foi considerado EPC, 12 horas de temperatura a 25°C, três horas de 25 a 32°C, seis horas a 32°C e três horas de 32 a 25°C, diariamente, e por ATN, temperaturas diárias na faixa de 21 a 25°C, conforme indicado na Tabela 1. A umidade relativa do ar ficou em torno de 70% nos dois ambientes. O monitoramento da temperatura e da umidade relativa do ar, de cada ambiente,

foi feito por termômetro de bulbo seco e bulbo úmido e de máxima e mínima, colocados à altura média das gaiolas. O programa de luz adotado, durante o experimento, foi contínuo (24 horas de luz artificial/dia). As aves receberam ração e água à vontade e o mesmo manejo durante todo o período experimental.

TABELA 1. Descrição da temperatura e umidade relativa nos ambientes ATN e EPC

Ambiente	ATN	EPC			
Tempo de exposição por dia (h)	24	12	3	6	3
Temperatura (°C)	21-25	25	25-32	32	32-25
Umidade relativa (%)	70	70	70	70	70

A composição nutricional e os ingredientes utilizados nas dietas do período inicial e de crescimento foram calculados baseados em Rostagno (2000) e encontram-se na Tabela 2. As aves receberam a ração inicial no período de 1 a 21 dias e de 21 a 35 receberam a ração crescimento.

Frangos de seis repetições/tratamento das aves no EPC e cinco repetições/tratamento das aves no ATN foram inoculados com albumina sérica bovina (BSA) diluída em solução de tampão fosfato (PBS) aos 12 e aos 24 dias de idade, para posterior medida de anticorpos produzida contra este antígeno, constituindo-se, a inoculação, no terceiro fator do modelo estudado, o qual foi composto, ao final, por um fatorial 4 x 2 x 2 (4 tipos de suplementação vitamínico-mineral; 2 ambientes; inoculação ou não de BSA). As aves restantes foram inoculadas com solução tampão fosfato (PBS), como controle negativo.

TABELA 2. Composição nutricional e de ingredientes das rações controle inicial e crescimento utilizadas no experimento

DIETA	INICIAL (1-21 dias)	CRESCIMENTO (21-42dias)
INGREDIENTES	COMPOSIÇÃO (%)	
Milho	56,88	60,61
Farelo de soja (46% PB)	36,08	31,61
Gordura (óleo de soja)	2,78	3,67
Fosfato	1,80	1,68
Calcário	1,43	1,39
Sal	0,47	0,47
DL metionina	0,23	0,25
Lisina	0,12	0,09
Premix vitamínico <sup>1</sup>	0,05	0,05
Premix mineral <sup>2</sup>	0,10	0,10
Colina	0,03	0,03
Anticoccidiano	0,025	0,05
NÍVEIS NUTRICIONAIS		
EMAn (kcal/kg)	3000	3100
PB (%)	21,5	19,50
Ca (%)	10,	0,95
Pdisp. (%)	0,45	0,42
Lisina (%)	1,25	1,14
Metionina + Cistina (%)	0,90	0,83

<sup>1</sup> Premix inicial: vit. A 10.000 UI; vit. D3 3000 UI; vit. E 60 mg; vit. K3 3 mg; vit. B1 3 mg; vit. B2 8 mg; vit. B6 4 mg; vit.

B12 0,014 mg; ác. pantotênico 20 mg; niacina 60 mg; ac. fólico 2,5 mg; biotina 0,24 mg. Premix crescimento: vit. A 8000 UI; vit. D3 2000 UI; vit. E 30 mg; vit. K3 2 mg; vit. B1 2 mg; vit. B2 6 mg; vit. B6 2,5 mg; vit. B12 0,012 mg; ác. pantotênico 15 mg; niacina 35 mg; ac. fólico 1 mg; biotina 0,08 mg (por kg de dieta).

<sup>2</sup> Premix inicial e crescimento: ferro 40 mg; zinco 80 mg; manganês 80 mg; cobre 10 mg; iodo 0,7 mg; selênio 0,3 mg (por kg de dieta)

O preparo do inóculo de BSA ocorreu da seguinte forma: inicialmente, foi preparada uma solução mãe, contendo 16 mg BSA/mL. A partir desta, fez-se uma solução diluída, utilizando 1mL da solução mãe em 15 mL de PBS. Esta solução foi então misturada com um mesmo volume de adjuvante incompleto, composto de 85% óleo mineral e 15% lanolina. A mistura foi agitada em um agitador em baixa velocidade, até que adquirisse a consistência de emulsão. O inóculo foi aplicado na dose de 0,4 mL por ave, via intramuscular, no músculo do peito.

As aves foram pesadas no início do período experimental e semanalmente para determinação do ganho de peso. O consumo de ração foi calculado considerando a ração fornecida e as sobras nos comedouros e desperdícios. A conversão alimentar foi calculada pela relação entre o consumo de ração e o ganho de peso das aves.

A mortalidade, durante todo o período experimental, foi calculada e a partir dela, obteve-se os valores de viabilidade (100% vivos – mortalidade), os quais foram utilizados para análise estatística

As aves foram abatidas aos 35 dias de idade através de deslocamento cervical. A seguir, foram feitos sangria, escaldagem, depenagem, evisceração e resfriamento em *chiller* por 40 minutos. Baço e bursa foram coletados durante a evisceração, secos em papel toalha e pesados em balança de precisão. Para o cálculo de seus rendimentos, dividiu-se o peso do órgão pelo peso da ave.

No momento da sangria, foram coletadas amostras de sangue de todas as aves para análise de anticorpos no soro e contagem de leucócitos no sangue total. Para a quantificação de anticorpos, foram coletadas amostras de  $\pm 3$  mL. Para as análises hematológicas (contagem de leucócitos), foram coletados  $\pm 5$  mL em tubos com o anticoagulante etilenodiaminotetracético sal dissódico (EDTA).

As amostras de sangue para sorologia foram coletadas sem anticoagulante e deixadas em temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ), por cerca de três horas, para permitir a separação do soro. Os soros foram centrifugados a 5000 rpm durante 7 minutos e congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , em tubos de 1,5 mL identificados,

e foram analisados no Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

Para a análise de anticorpos, estabeleceu-se um protocolo de ELISA, baseado em outros trabalhos utilizando albumina sérica bovina como antígeno (Parmentier et al., 1994; Bar-Shira et al., 2002; Gutierrez et al., 2002). O protocolo compreendeu as seguintes etapas:

- 1º – Sensibilizar as placas de Elisa (Falcon, Becton Dickinson, cat. núm. 353912) com 100 µL/ poço do antígeno diluído em solução tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 na concentração de 500 µg/mL. Deixar de um dia para o outro em câmara úmida a 4°C;
- 2º - Lavar a placa 3x com 100 µL/ poço de solução contendo PBS, 5% de leite em pó desnatado e 0,05% de Tween 20<sup>®</sup> (chamada de Blotto), deixando a solução por 3 minutos na placa em cada lavagem;
- 3º - Bloquear a placa durante 1 h com 100 µL de Blotto/poço;
- 4º - Retirar o Blotto da placa e colocar os soros a serem testados (100 µL/poço), na diluição de 1:640 (diluídos em solução de PBS + 0,05% Tween 20<sup>®</sup>), deixando por 1 h em temperatura ambiente;
- 5º - Retirar os soros e lavar a placa 3x com 100 µL de Blotto por poço, esperando 3 minutos em cada lavagem;
- 6º - Colocar 100 µL/poço de conjugado anti IgG de galinhas contra cadeia pesada e leve, marcado com peroxidase - KPL<sup>®</sup>) diluído 1:2000 com o Blotto e deixar por 1 h em temperatura ambiente;
- 7º - Lavar a placa 3x com 100 µL/ poço de solução de PBS + Tween 20<sup>®</sup>;
- 8º - Colocar a solução de revelação (20 mL tampão citrato fosfato + 10 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 volumes + 6,8 mg OPD), 100 µL/ poço e armazenar em câmara escura por ±15 minutos;
- 9º - Parar a reação adicionando

50  $\mu\text{L}$ /poço de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (12,5%); 10° - Fazer a leitura em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 495 nm.

Os soros das aves foram analisados individualmente e os resultados foram as médias das duplicatas de cada soro, expressos como unidades de absorvância (valores de densidade ótica).

As contagens total e diferencial de leucócitos foram realizadas através de esfregaços sanguíneos corados com corante de “Wright”, no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da UFRGS, com o objetivo de medir a relação heterófilo:linfócito.

Os dados de hematologia, rendimento de órgãos linfóides e desempenho foram analisados pelo GLM do programa SAS (1998). Na presença de um F significativo foi usado o Lsmeans para testar as diferenças entre as médias. Os dados de sorologia (quantificação de anticorpos) foram, inicialmente, testados para verificar se apresentavam distribuição normal, o que não ocorreu. Com a ausência de normalidade, a transformação utilizada foi a Box-Cox, a qual permitiu que fosse realizada a análise de variância pelo GLM do SAS. Esta transformação foi realizada a partir de valores médios de densidade ótica de cada tratamento. Efetuou-se também outra análise estatística com o uso de um teste não paramétrico – teste de Kruskal-Wallis. Os resultados encontrados foram semelhantes àqueles obtidos com a transformação e análise de variância, o que proporcionou maior segurança nos resultados encontrados.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Desempenho das aves

Observou-se que a inoculação com BSA não causou efeito significativo sobre o desempenho das aves durante o período experimental, de 1 a 35 dias. Durante a resposta imune, alterações importantes acontecem no metabolismo de energia, aminoácidos, lipídios e minerais traço (Humphrey & Klasing, 2004). Estas alterações dependem, fundamentalmente, do antígeno utilizado e do tipo de resposta imune desencadeada (inata ou adaptativa), sendo que a resposta imune inata produz efeitos mais evidentes do que a adaptativa. Antígenos proteicos purificados, como a BSA, estimulam a resposta imune adaptativa, particularmente a produção de anticorpos, com pouco ou nenhum efeito sobre a resposta imune inata, que é onde ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias, as quais liberadas em grande quantidade são responsáveis pela redução no desempenho. A BSA sendo um antígeno timo-dependente, requer a presença de linfócitos  $T_H$  para induzir a produção de anticorpos. A função efetora dos linfócitos  $T_H$  consiste basicamente na produção de citocinas em tipos e quantidades dependentes da forma de apresentação do antígeno e dos sinais co-estimulatórios.

Quando o sistema imune é ativado, ele torna-se anabólico e sua demanda nutricional é aumentada. Ao mesmo tempo, ocorre uma redução no consumo de alimento e há uma desregulação generalizada da homeostase nutricional em função de alterações em hormônios importantes para esta função, como insulina, glucagon e hormônio do crescimento (Elsasser et al., 2000). O impacto mais importante no crescimento durante um desafio

infeccioso é a redução no consumo de alimento, responsável por 70% da redução na taxa de crescimento (Klasing, et al., 1987). Os restantes 30% ocorrem devido a ineficiências no metabolismo nutricional induzidas pelo sistema imune (Klasing, et al., 1987).

Quanto aos demais fatores estudados no modelo, observa-se, na Tabela 3, que o tipo de dieta influenciou significativamente o consumo de ração ( $P \leq 0,007$ ) e a conversão alimentar ( $P \leq 0,0001$ ), tendo a dieta controle (T1) proporcionado maior consumo de ração e pior conversão alimentar do que as demais. Para o fator ambiente, observou-se que as ave em EPC tiveram menor ganho de peso ( $P \leq 0,0001$ ) e menor consumo de ração ( $P \leq 0,0001$ ) do que aquelas em ATN, resultados estes esperados e referenciados em vários trabalhos pesquisados (Austic, 1985; Howliger & Rose, 1987; Czarick & Tison, 1990; Smith, 1993; Bonnet et al., 1997; Plavnik & Yahav, 1998; Temim et al., 2000; Laganá, 2005). Não houve interação significativa ( $P > 0,05$ ) entre os fatores estudados.

TABELA 3. Ganho médio de peso (GMP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) de aves submetidas a quatro tipos de dietas, dois ambientes e inoculação com BSA, no período de 1 a 35 dias

	<b>GMP (kg)</b>	<b>CR (kg)</b>	<b>CA (kg/kg)</b>
<b>Dieta</b>			
Dieta basal	2,099	3,426a	1,63b
Dieta basal+vit	2,109	3,319b	1,57a
Dieta basal+min	2,079	3,303b	1,59a
Dieta basal+vit+min	2,115	3,304b	1,56a
Prob	0,669	0,003	<0,0001
<b>Ambiente</b>			
ATN	2,170a	3,432a	1,58
EPC	2,031b	3,244b	1,60
Prob	<0,0001	<0,0001	0,142
<b>Inoculação</b>			
Inoc	2,093	3,318	1,59
Não inoc	2,108	3,358	1,58
Prob	0,501	0,146	0,603
CV %	3,91	2,84	2,47

### 2.3.2 Viabilidade

Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos para a variável viabilidade no período de 1 a 35 dias (Tabela 4). A BSA, por ser um antígeno protéico purificado, estimula a resposta imune adaptativa, mas, praticamente, não têm efeito sobre o sistema imune inato (Humphrey & Klasing, 2004), que é o responsável pela produção de citocinas pró-inflamatórias. Estas são responsáveis pelas alterações mais evidentes de uma resposta imune, como redução de consumo, febre e alterações na homeostase

metabólica (Humphrey & Klasing, 2004), que podem contribuir para o aumento da mortalidade, o que não é esperado com a resposta imune adaptativa.

Como o calor ocorreu de forma cíclica, as aves puderam se adaptar comendo menos durante os períodos de alta temperatura, o que se refletiu em um menor consumo de ração e não influenciou na mortalidade. Teeter et al. (1984) observaram que um aumento no nível de alimentação de frangos em estresse por calor reduziu a sobrevivência em 14%. Cooper & Washburn (1998) e Laganá (2005) mostraram que a exposição de frangos a temperaturas de 32° C durante algumas horas do dia não influenciou a mortalidade.

TABELA 4. Viabilidade de frangos de corte inoculados ou não com BSA, criados em dois ambientes e suplementados com diferentes níveis de vitaminas e minerais durante o período de 1 a 35 dias

<b>Viabilidade 1 a 35 dias (%)</b>	
<b>FATORES</b>	
<b>Tratamento</b>	
T1 (dieta basal)	96,4
T2 (basal+vit) <sup>1</sup>	98,4
T3 (basal+min) <sup>2</sup>	96,9
T4 (basal+vit+min)	95,5
Prob	0,76
<b>Ambiente</b>	
ATN	97,7
EPC	95,8
Prob	0,34
<b>Inoculação</b>	
Inoc	97,4
Não inoc	96,2
Prob	0,55
<b>CV %</b>	<b>8,44</b>

<sup>1</sup> 100 UI/kg vit E e 300 ppm vit C/kg de ração

<sup>2</sup> 40 ppm zinco e 0,3 ppm selênio

### 2.3.3 Quantificação de anticorpos

Na Tabela 5, são apresentados os valores de produção de anticorpos observados aos 35 dias de idade. Em função da transformação realizada nos dados, os valores tornaram-se negativos e aqueles mais próximos de zero devem ser interpretados como superiores.

As aves que foram inoculadas com BSA apresentaram maior nível de anticorpos do que aquelas não inoculadas ( $P \leq 0,0001$ ), comprovando que as aves apresentaram resposta ao antígeno utilizado.

A quantidade de anticorpos não apresentou diferença significativa entre os tipos de suplementação vitamínico-mineral, porém houve diferenças em relação ao ambiente. As aves em EPC produziram mais anticorpos contra BSA do que aquelas em ATN, independente do tipo de suplementação ( $P < 0,044$ ). O estresse por calor impõe uma restrição alimentar, pois a primeira resposta da ave a este tipo de estresse é o decréscimo no consumo de alimento (Morgan, 1990; Czarick & Tison, 1990). No entanto, a restrição alimentar pode melhorar os índices de conversão alimentar (Plavnik & Hurwitz, 1985; Gonzáles et al. 1994, Cattelan Jr., 1995), principalmente em razão de um menor desperdício de alimento e uma melhor utilização dos nutrientes da dieta, o que também pode ter contribuído positivamente para o sistema imunológico das aves, representado por uma maior produção de anticorpos por parte das aves em EPC.

A maior produção de anticorpos encontrada no ambiente quente é contrária às informações de Zulkifli et al. (1994) e Thaxton & Siegel (1970, 1972, 1973), que indicaram uma redução na produção de anticorpos com o

estresse ambiental. No entanto, Regnier et al. (1980) e Donker et al. (1990) encontraram resultados indicando não haver efeito depressivo do estresse por calor sobre a produção de anticorpos.

É importante ressaltar que cada fonte de estresse pode afetar o organismo do animal de uma forma diferente e principalmente as respostas de parâmetros imunológicos podem ser inconsistentes, especialmente quando há grande variação individual, como nas linhagens comerciais, devido à grande heterozigose. Segundo Heckert et al. (2002) muitas das técnicas comumente utilizadas em laboratório para avaliar imunocompetência são úteis em situações controladas e com aves de uma mesma raça, porém, podem apresentar grande variabilidade quando utilizadas em linhagens comerciais sob condições de campo. Esta variabilidade pode ainda ser aumentada quando os parâmetros ambientais estão além do nível de termotolerância das aves, como ocorre com o estresse por calor.

Em experimentos em que o estresse foi causado pelo frio, os resultados também são bastante conflitantes. Subba Rao & Glick (1977) observaram aumento na produção de anticorpos com temperatura de 7°C. Regnier et al. (1980) relataram pequeno efeito do frio agudo sobre os títulos de anticorpos contra hemácias de carneiro, enquanto Hester et al. (1996) observaram redução na produção de anticorpos após exposição à temperatura de 0°C, apenas em aves alojadas em gaiolas individuais e não naquelas em gaiolas coletivas.

Quanto ao tipo de dieta, alguns trabalhos que mostram respostas positivas da suplementação de vitamina E sobre o sistema imune utilizaram níveis mais altos do que no presente trabalho, como Ferket et al. (1993) que observou maior produção de anticorpos contra hemácias de ovinos com 300 UI vit E/kg ração. Por outro lado, Leshchinsky & Klasing (1998) observaram aumento na produção de anticorpos contra hemácias de ovino com suplementação de vitamina E em níveis médios (50 UI/kg), mas o mesmo não ocorreu quando níveis superiores foram utilizados (100 e 200 UI/kg), da mesma forma que no presente experimento. Diferenças nas condições ambientais, na intensidade dos desafios presentes e também da própria variação individual das aves, podem estar entre as razões para as respostas diferentes encontradas na literatura presente.

Não foi observada interação significativa entre os fatores estudados ( $P > 0,05$ ).

TABELA 5. Valores de densidade ótica de anticorpos anti-BSA (transformados pelo BoxCox) no soro de frangos de 35 dias inoculados ou não com BSA, criados em dois ambientes e suplementados com diferentes níveis de vitaminas e minerais

<b>Fatores</b>	<b>Densidade ótica (DO)</b> (valores transformados)
<b>Tipo de suplementação</b>	
T1 (dieta basal)	-2,19
T2 (basal+vit) <sup>1</sup>	-2,10
T3 (basal+min) <sup>2</sup>	-2,24
T4 (basal+vit+min)	-2,48
Prob	0,1843
<b>Ambiente</b>	
ATN	-2,38b
EPC	-2,12a
Prob	0,0445
<b>Inoculação</b>	
Inoc	-1,84a
Não inoc	-2,66b
Prob	<0,0001
CV %	-24,74

<sup>1</sup> 100 UI/kg vit E e 300 ppm vit C/kg de ração

<sup>2</sup> 40 ppm zinco e 0,3 ppm selênio

### 2.3.4 Peso e rendimento de órgãos linfóides

Na Tabela 6, observa-se que a inoculação com BSA provocou um aumento no peso e no rendimento da bursa que, por ser um órgão linfóide primário, responsável pelo desenvolvimento e proliferação de linfócitos B, pode ter seu tamanho aumentado devido ao estímulo antigênico. Já o peso e o rendimento de baço não foram influenciados pela inoculação. Segundo Abbas (2000), o baço é considerado um órgão linfóide secundário, por ser importante mas não indispensável para o sistema imune. Desta forma, observa-se que

alterações no peso do baço podem não ser tão indicativas do *status* imunológico do animal quanto o peso de bursa.

TABELA 6. Peso e rendimento de baço e bursa de frangos de 35 dias inoculados ou não com BSA, criados em dois ambientes e suplementados com diferentes níveis de vitaminas e minerais

	<b>Peso Bursa (g)</b>	<b>Rend. Bursa (%)</b>	<b>Peso Baço (g)</b>	<b>Rend. Baço (%)</b>
<b>Dieta</b>				
T1 (dieta basal)	4,25	0,19	2,05	0,09
T2 (basal+vit) <sup>1</sup>	4,08	0,18	2,00	0,09
T3 (basal+min) <sup>2</sup>	4,40	0,21	2,00	0,09
T4 (basal+vit+min)	3,74	0,17	2,11	0,09
Prob	0,13	0,09	0,87	0,80
<b>Ambiente</b>				
ATN	4,81a	0,21a	2,37a	0,10a
EPC	3,43b	0,16b	1,72b	0,08b
Prob	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<b>Inoculação</b>				
Inoc	4,44a	0,20a	2,07	0,09
Não inoc	3,79b	0,17b	2,02	0,09
Prob	0,003	0,003	0,68	0,73
CV %	28,12	27,68	31,15	30,67

<sup>1</sup> 100 UI/kg vit E e 300 ppm vit C/kg de ração

<sup>2</sup> 40 ppm zinco e 0,3 ppm selenio

O ambiente influenciou significativamente peso e rendimento de baço e de bursa. As aves em EPC tiveram menor peso absoluto dos órgãos e também pior rendimento, do que aves em ATN. Rosales et al. (1989) observaram que aves em EPC apresentavam atrofia de timo, bursa e baço. Puvadolpirod & Thaxton (2000) observaram peso relativo de baço reduzidos em 27%, de bursa em 43% e de timo em 65%, uma semana após injeção de doses de ACTH em frangos de corte de cinco semanas de idade.

Os dados observados no presente experimento concordam com Donker & Beuving (1989), os quais afirmaram que os índices morfométricos

bursais são bons indicativos de estresse e que este causa involução nos órgãos linfóides primários. Conforme descrito por Laganá (2005), embora as aves tenham sido submetidas ao estresse por apenas três semanas, a involução do sistema linfático já pode ser observada, mesmo em situação de EPC cíclico

Os níveis de suplementação vitamínico-mineral não influenciaram peso e rendimento de bursa e de baço. Bartlett & Smith (2003) também não encontraram diferenças no peso relativo de órgãos linfóides de frangos em EPC cíclico, quando os mesmos foram suplementados com 32, 40 e 100 ppm de zinco.

Não houve interação significativa entre os fatores estudados ( $P > 0,05$ ).

### **2.3.5 Contagem de leucócitos**

Os valores de contagem diferencial de leucócitos estão expressos na Tabela 7, onde constam dados de heterófilos e linfócitos. Não foi observada interação significativa entre os fatores analisados.

A inoculação com BSA não provocou diferenças significativas no número de heterófilos e linfócitos totais, bem como sobre a relação H/L, o que comprova mais uma vez que a inoculação não representou uma causa de estresse para as aves. O ambiente influenciou o número de heterófilos totais ( $P \leq 0,088$ ), assim como a relação H/L ( $P \leq 0,039$ ), tendo as aves em EPC apresentado maior número de heterófilos e uma maior relação H:L do que aquelas em ATN).

Aves expostas a agentes estressantes de diferente natureza (temperatura, trauma, drogas, patógenos, manejo), têm o sistema nervoso ativado, ocorre a liberação de adrenalina e noradrenalina e também de corticosterona, que age para aumentar o suprimento de energia do organismo. Um estresse persistente significa secreção prolongada de corticosterona, o que traz inúmeros prejuízos ao animal, inclusive sobre o sistema imune. Os corticosteróides provocam leucocitose, com neutrofilia e linfopenia e conseqüente aumento na relação neutrófilo:linfócito (Colditz, 2002). Altan et al. (2000) encontraram resultados semelhantes, indicando um aumento de 34% nos heterófilos de frangos de 42 dias expostos a um EPC agudo de 39°C por duas horas. Mitchell et al. (1992) e Laganá (2005) encontraram relações H/L superiores a 0,62 em frangos expostos a altas temperaturas e durante o transporte por mais de três horas.

Os linfócitos não foram influenciados significativamente pelo ambiente ( $P \leq 0,644$ ), embora as aves em EPC tenham apresentado menor número de linfócitos totais. Macari & Luquetti (2002) relataram que em situações de estresse, com a liberação de ACTH, ocorre redução do número de linfócitos circulantes, colaborando para aumentar a relação H/L.

TABELA 7. Valores de heterófilos, linfócitos e relação H/L de frangos de 35 dias inoculados ou não com BSA, criados em dois ambientes e suplementados com diferentes níveis de vitaminas e minerais

	Heterófilos (Het/ $\mu$ L)	Linfócitos (Linf/ $\mu$ L)	Relação H/L
<b>Dieta</b>			
T1 (dieta basal)	11288	15499	0,80
T2 (basal+vit) <sup>1</sup>	12268	15583	0,84
T3 (basal+min) <sup>2</sup>	11212	16361	0,70
T4 (basal+vit+min)	10988	15651	0,73
Prob	0,79	0,89	0,47
<b>Ambiente</b>			
ATN	10602b	15969	0,69b
EPC	12275a	15578	0,84a
Prob	0,09	0,64	0,04
<b>Inoculação</b>			
Inoc	11418,81	15543,00	0,74
Não inoc	11458,91	16004,03	0,78
Prob	0,969	0,604	0,574
CV %	47,49	30,25	49,94

<sup>1</sup> 100 UI/kg vit E e 300 ppm vit C/kg de ração

<sup>2</sup> 40 ppm zinco e 0,3 ppm selenio

A suplementação com minerais e vitaminas não afetou significativamente o número de heterófilos, linfócitos e a relação H/L. Puthongsiriporn et al. (2001), ao contrário, observaram aumento no número de linfócitos com a suplementação de 65 UI vit. E/ kg da dieta, enquanto Campo & Dávila (2000) observaram que galinhas estressadas pelo calor e suplementadas com níveis de 1000 ppm de vitamina C, 250 ppm de vitamina E, 0,5% de triptofano e 250 ppm de niacina apresentaram linfopenia e conseqüente redução na relação heterófilo: linfócito (0,65 vs 0,43) em relação às aves sem suplementação.

## 2.4 CONCLUSÕES

- A suplementação de vitaminas E e C e dos minerais complexados zinco e selênio não influenciou a produção de anticorpos de frangos de corte desafiados com albumina sérica bovina;

- O estresse por calor provocou uma maior produção de anticorpos anti-albumina sérica bovina, independente da dieta utilizada;

- As aves responderam à inoculação de albumina sérica bovina com aumento na produção de anticorpos e tamanho de bursa;

- A inoculação com albumina sérica bovina não afetou o desempenho das aves, independente de ambiente e dieta utilizados.

## **CAPÍTULO 3**

### **AVALIAÇÃO DO USO DE PREBIÓTICO E PROBIÓTICO SOBRE A COLONIZAÇÃO E A RESPOSTA IMUNE DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM *Salmonella* Enteritidis**

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

Dentro das salmoneloses aviárias chamadas de paratíficas, isto é, aquelas causadas por qualquer *Salmonella* pertencente ao grupo das não específicas para nenhum hospedeiro, a *Salmonella* Enteritidis vem apresentando importância cada vez maior, pois sua ocorrência vem aumentando em diversos países nos últimos anos e, atualmente, é o sorovar mais isolado em casos de toxiinfecções alimentares em humanos (Calnek et al., 2001). No meio ambiente, as salmonelas têm facilidade de sobrevivência e multiplicação, embora sejam suscetíveis a muitos desinfetantes utilizados comercialmente e, também, ao calor. As principais formas de contaminação em aves são através do contato direto com fezes de animais contaminados, fômites e ração contaminada. Os humanos infectados e que trabalham no manejo dos animais ou em plantas de abate e processamento de produtos

avícolas, também têm grande importância, pois podem transmitir a bactéria às aves, tanto durante sua criação no aviário, quanto durante o processamento.

A preocupação sobre os efeitos dessa bactéria na perda de produtividade, antigamente o foco da atenção de pesquisadores e produtores, foi substituída por outra com grande importância em saúde pública. Atualmente, a principal importância no controle e estudo do gênero *Salmonella* está relacionado com seus efeitos sobre a saúde humana, principalmente pela geração de surtos de toxinfecções alimentares. Um surto é definido como dois ou mais casos de infecção confirmada em laboratório, em pessoas que compartilharam de uma fonte de exposição em comum (Nascimento & Santos, 2005). Foi calculada em 1,3 bilhão de casos e 3 milhões de mortes a ocorrência mundial anual de salmonelose (Thong *et. al*, 1995), o que representa um alto custo, inclusive com perdas de mercado e de produtividade.

O mercado importador de carne de frango brasileira vem aumentando suas exigências com relação à qualidade microbiológica dos produtos avícolas e, hoje, em muitos países, como os membros do NAFTA (EUA, Canadá e México) e da União Européia, a norma é a não aceitação da presença de salmonela em uma amostra de 25 g de alimento (Nascimento & Santos, 2005).

Com o objetivo de auxiliar na prevenção da contaminação de carcaças e na eliminação dos patógenos já presentes no organismo das aves, visando um incremento no desempenho e, muitas vezes, na resposta imune da ave, o uso de prebióticos e probióticos vêm sendo testado em diversos

experimentos em diferentes condições (La Ragione & Woodward, 1994; Palmu & Camelin, 1997; Spring et. al, 2000; Zulkifli et. al, 2000; Huang, et. al, 2004).

Fuller (1989) definiu o conceito de probiótico como sendo “um suplemento alimentar constituído de microrganismos vivos capazes de beneficiar o hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal” e, segundo este mesmo autor, para ser considerado um probiótico, o microorganismo deveria ser produzido em grande escala, permanecer viável e estável durante o período de estocagem, ser capaz de sobreviver no ambiente intestinal e beneficiar o organismo com a sua presença. Existem, no mercado, probióticos compostos por diferentes microrganismos e, além disso, quando um mesmo microorganismo é utilizado em diferentes produtos, ainda assim, as cepas utilizadas podem ser diferentes. Segundo Tournut (1998), a eficácia do probiótico depende estritamente da quantidade e das características das cepas do microorganismo utilizado na elaboração do produto.

O mecanismo de ação dos probióticos está relacionado com a competição por sítios de ligação ou exclusão competitiva, onde as bactérias do probiótico ocupam os sítios de ligação na mucosa intestinal e impedem a fixação das bactérias patogênicas, através de uma barreira física (Furlan, 2005). As fimbrias são estruturas fosfoglicoproteicas que possuem importância bastante conhecida para a aderência bacteriana. Elas possuem afinidade por receptores específicos que variam quanto à sua presença entre as espécies de aves e também entre as porções do trato intestinal. Segundo Dobrogosz et al. (1991) e Tornut (1998), algumas bactérias podem se aderir à superfície superior dos enterócitos, enquanto outras podem residir nas criptas onde são

produzidas as novas células epiteliais que, posteriormente, migrarão para o topo das vilosidades.

Outras funções dos probióticos são a produção de substâncias antibacterianas e enzimas, como também, estimular o sistema imune por aumentar o número e a atividade das células fagocíticas do hospedeiro. As placas de Peyer, as tonsilas cecais e a bolsa de Fabrício são locais de acúmulo de tecido linfóide no organismo das aves, os quais captam antígenos disponibilizados no trato digestório que estimulam as células B e T do sistema imune para desenvolver uma imunidade geral e inespecífica. Com o estímulo imunológico da mucosa, ocorre a produção de anticorpos do tipo IgA, os quais reduzem o número de bactérias patogênicas na luz intestinal, além de produzirem ativação de macrófagos e proliferação de células T (Silva, 2000).

Gibson & Roberfroid (1995) definiram prebióticos como “ingredientes alimentares que não são digeridos na porção proximal do trato gastrointestinal e que proporcionam efeito benéfico no hospedeiro por estimularem seletivamente o crescimento e/ou metabolismo de um grupo limitado de bactérias no cólon”. Também, segundo os mesmo autores, um prebiótico não pode ser hidrolisado ou absorvido no intestino delgado, deve ser um substrato seletivo para determinado grupo de bactérias comensais benéficas, e deve ser capaz de alterar a microbiota intestinal e induzir efeitos luminiais ou sistêmicos, benéficos ao hospedeiro.

Entre as substâncias mais estudadas como prebióticos estão os oligossacarídeos, carboidratos não digeríveis, mais especialmente os frutoligossacarídeos (FOS), os glucoligossacarídeos (GOS) e os

mananoligossacarídeos (MOS). O prebiótico pode alterar a microbiota intestinal de duas maneiras: fornecendo nutrientes para as bactérias desejáveis ou através do reconhecimento, pelas bactérias patogênicas, dos sítios de ligação nos oligossacarídeos como sendo da mucosa intestinal, reduzindo a colonização intestinal indesejável, resultando em menor incidência de infecções e melhor integridade da mucosa intestinal (Iji & Tivey, 1998). Os mananoligossacarídeos são capazes de bloquear a aderência dos patógenos e evitar a colonização, pois, na sua presença, as bactérias, através de suas fimbrias, ligam-se a eles e não à mucosa intestinal, transitando, juntamente com a digesta, sem causar problemas aos animais (Collett, 2000; Close, 2001).

Estes produtos representam uma alternativa ao uso dos aditivos tradicionais (antimicrobianos), principalmente devido a baixa eficiência destes e a proibição de uso da maioria deles em animais destinados à exportação, em função da possibilidade da indução de resistência aos patógenos de seres humanos. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do uso de um prebiótico (mananoligossacarídeo), um probiótico de exclusão competitiva (*Lactobacillus*) e de ambos em conjunto, sobre a contagem de salmonela no intestino (ceco) e no fígado, sobre a quantidade de anticorpos no soro sanguíneo, sobre as medidas das vilosidades intestinais e, também, sobre o desempenho de frangos de corte desafiados com a bactéria *Salmonella* Enteritidis.

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 Aves utilizadas e manejo experimental

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Ensino Zootécnico da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de fevereiro a março de 2005. Quatrocentos pintos machos da linhagem Ross, de um dia de idade, vacinados contra Doença de Marek, Newcastle, Bouda Aviária e Bronquite Infecciosa, foram alojados em 40 gaiolas (10 aves/gaiola) em ambiente com temperatura controlada, iluminação 24 h por dia e fornecimento de água e ração *ad libitum*, e foram desafiados contra *Salmonella* Enteritidis (SE). Semanalmente, as aves e as sobras de ração foram pesadas para calcular as variáveis de desempenho (ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar). Mortalidade e temperatura foram registradas diariamente. A mortalidade durante todo o período experimental foi calculada e a partir dela, obteve-se os valores de viabilidade (100% vivos – mortalidade), que foram utilizados para análise estatística.

### 3.2.2 Cepa utilizada e experimento piloto

Para desafiar as aves, foi utilizada uma cepa de *Salmonella* Enteritidis (SE) resistente aos antimicrobianos novobiocina e ácido nalidíxico, de forma a permitir sua posterior identificação no material coletado das aves. Antes do experimento principal, foi realizado um experimento piloto com 12 aves para determinar a dose de SE a ser utilizada, bem como a sensibilidade da cepa ao prebiótico a ser utilizado, isto é, se apresentava aglutinação *in vitro*.

Inicialmente, foram feitas diluições seriadas em solução salina a 0,85% de cloreto de sódio, de  $10^{-5}$  a  $10^{-10}$ , para observar a multiplicação da bactéria e também a concentração em que a mesma se encontrava após atingir a fase estacionária. A diluição de  $10^{-7}$  foi utilizada como referência para o número de colônias presentes/mL na amostra de bactéria a ser utilizada, em função da concentração bacteriana nela encontrada e da concentração desejada para ser inoculada nas aves.

Foram testadas as concentrações  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  UFC/mL como dose infectante para determinar qual seria a mais adequada para o experimento principal. As aves do experimento piloto foram então desafiadas com as três concentrações, aos 3 dias de idade e, sete dias após, foram abatidas e seus fígados e cecos retirados, para isolamento e contagem bacteriana da mesma forma que, posteriormente, seriam processadas no experimento. Em função dos resultados observados (placas com maior número de colônias típicas de *Salmonella* e em número ideal para contagem) foi escolhida a concentração de  $10^6$  UFC/mL para uso no experimento.

### **3.2.3 Tratamentos**

Foram testados cinco tratamentos com oito repetições cada, sendo todos originados de uma mesma dieta basal, formulada com base em Rostagno (2000), conforme o período (inicial 1-21 dias e crescimento 21-28 dias). Os níveis nutricionais das rações encontram-se na Tabela 1.

TABELA 1. Composição nutricional das rações inicial e crescimento utilizadas no experimento

DIETA	INICIAL (1-21 dias)	CRESCIMENTO (21-28 dias)
NÍVEIS NUTRICIONAIS		
EMA (kcal/kg)	3100	3000
PB (%)	21	20
Met+cis digest. (%)	0,90	0,83
Lisina (%)	1,22	1,16
Ca (%)	0,95	0,90
P disp. (%)	0,45	0,42

Os tratamentos diferiram nos aditivos utilizados: probiótico de exclusão competitiva (*Lactobacillus*), prebiótico (mananoligossacarídeo), probiótico + prebiótico, e antimicrobiano (Avilamicina) – (Tabela 2). O probiótico (T2 e T4) foi fornecido apenas uma vez durante o experimento, poucas horas após a eclosão, antes do alojamento dos pintos nas gaiolas experimentais. Foi fornecido através da aspersão de uma solução na concentração de 5 g/400 mL/2000 pintinhos diluída em água destilada. No preparo desta solução, foi utilizado corante azul (pastilhas Hi-lite, Fort Dodge<sup>®</sup>), para que os pintinhos fossem atraídos a bicar as gotículas existentes na superfície do corpo e também, desta forma, fosse possível verificar a eficiência de aplicação do produto (se 98% dos pintinhos com língua azul, produto considerado bem aplicado). O tratamento 1 foi usado como controle negativo (sem nenhum promotor de crescimento) e o tratamento 5 foi utilizado como controle positivo.

TABELA 2. Composição dos tratamentos dos grupos experimentais

Tratamento	Composição
T1	Ração basal
T2	Ração basal + adição de <b>probiótico</b> ( <i>Lactobacillus</i> <sup>1</sup> ) por aspersão
T3	Ração basal + adição de <b>prebiótico</b> (mananoligossacarídeo <sup>2</sup> – 2 kg/t até 10 dias, 1 kg/t de 10 a 21 dias e 0,5 kg/t dos 21d ao abate).
T4	Ração basal + adição de <b>probiótico</b> (idem T2) por aspersão + adição de <b>prebiótico</b> (idem T3)
T5	Ração basal + adição de Avilamicina (15 ppm)

<sup>1</sup>All-Lac XCL 5x<sup>®</sup>; <sup>2</sup>Bio-Mos<sup>®</sup>

### 3.2.4 Inoculação e coleta de amostras para contagem bacteriana

Aos 3 dias de idade, todos os pintos foram inoculados, por via oral, com uma dose de  $1 \times 10^6$  UFC/mL da amostra de *S. Enteritidis*. Aos 15 dias de idade, 80 aves escolhidas aleatoriamente foram abatidas (2/gaiola) por deslocamento cervical, sendo coletados fígado e ceco que foram armazenados em placas de Petry estéreis a 4°C até o dia seguinte. Os cecos foram coletados com conteúdo intestinal, sendo, por isso, amarrados com barbante nas extremidades para evitar a saída do conteúdo cecal. No dia seguinte, os órgãos foram flambados com álcool e foi pesado 1 g de cada amostra - os fígados foram pesados e depois flambados e os cecos foram flambados e após pesados, utilizando-se uma mistura de tecido e conteúdo. Os cecos foram flambados antes da pesagem, pois, para que esta fosse feita (1 g), era necessário romper a parede do órgão e com isto seu conteúdo seria extravasado, o que impediria a flambagem posterior. Cada amostra de 1 g foi colocada em um saco plástico contendo 9 mL de solução de tetrionato

(Merck®) e agitada por 60 segundos em um *Stomacher*. Em seguida, com os cecos, foram feitas diluições seriadas com o meio de tetracionato, a partir de cada saco ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ) e 100 µL de cada diluição foram plaqueados em ágar verde brilhante (BPLS Agar - Merck®) contendo novobiocina e ácido nalidíxico (0,1% de cada solução mãe – a 4% e 25 mg/mL, respectivamente). Todas as amostras foram feitas em duplicata e as placas foram incubadas por 24 a 72 horas a 37°C (metodologia adaptada de Seo et al., 2000). Após este período, foi feita a contagem de colônias bacterianas nas placas, sendo calculada a média das duplicatas. Logo após a contagem, 3 a 5 colônias típicas de cada placa foram escolhidas e foi feito o teste com soro poli-O (Probac®) para confirmar se as colônias eram *Salmonella*. Para os fígados, o procedimento foi igual, exceto que foi feito apenas teste qualitativo (presença/ausência da bactéria) e, para isso, apenas a diluição  $10^{-1}$  foi plaqueada. Desta forma, verificou-se a ausência ou presença de *Salmonella*, também confirmada por sorologia.

Aos 29 dias de idade das aves, todos estes procedimentos foram repetidos, com o abate de mais 80 aves.

### **3.2.5 Quantificação de anticorpos**

De duzentas aves aos 15 dias e 160 aves aos 29 dias foram coletadas amostras de sangue para obtenção de soro para análise de quantificação de anticorpos contra *Salmonella* Enteritidis. As amostras de sangue foram coletadas através de punção intracardíaca, em volumes de aproximadamente 2 mL, com seringas de 3 mL e agulhas tamanho 25 x 7 e/ou

40 x 8. Após a coleta, as amostras foram deixadas em repouso a temperatura ambiente de aproximadamente 25°C, para permitir a coagulação do sangue e a posterior separação do soro. Após um período de cerca de três horas, os soros já separados foram centrifugados a 8000 g por 7 minutos e, posteriormente, estocados a -20<sup>o</sup> C. No momento da realização das análises, os soros foram descongelados a temperatura ambiente e foram feitos *pools* de soros para cada repetição (gaiola). Cada *pool* foi formado a partir de alíquotas de 5 µL de cada soro individual das aves de uma mesma repetição. Ao todo oito pools de soros por tratamento foram analisados.

Os anticorpos contra *Salmonella* Enteritidis foram analisados através de um kit de Elisa comercial (Flockscreen<sup>®</sup>, Guildhay<sup>®</sup>,). Os testes foram realizados de acordo com as instruções do kit, com exceção da diluição dos soros que foi de 1:4 e não 1:500. Esta modificação ocorreu com o objetivo de permitir a observação das possíveis diferenças entre os soros dos tratamentos, visto que os valores de densidade ótica (DO) observados quando os testes foram realizados com soros diluídos 1:500 foram muito baixos. A leitura dos testes foi realizada com um comprimento de onda 550 nm. Os valores de DO foram utilizados como medida da quantidade de anticorpos produzidos pelas aves dos diferentes tratamentos.

### **3.2.6 Medida de vilosidades intestinais**

De todas as aves abatidas aos 15 e 29 dias (total de 160), foram coletadas amostras de intestino delgado para posterior análise de morfometria intestinal. Para a coleta, foi escolhida a porção intermediária entre o piloro e a

junção duodeno-jejuno. De cada ave, foi retirada uma amostra desta região (de aproximadamente 3 cm), a qual foi lavada externa e internamente com solução fisiológica de 0,9% cloreto de sódio para retirada do conteúdo intestinal. Cada amostra foi então colocada em potes individuais contendo solução de formalina tamponada a 10%, onde permaneceram por trinta dias para fixação das amostras. Após a fixação, as amostras foram embebidas em parafina, cortadas em lâminas de 2 a 5  $\mu\text{m}$  e coradas com hematoxilina-eosina em lâminas de vidro (Prophet et al., 1992).

Foram realizadas medidas de altura de vilosidades e profundidade de criptas intestinais, sendo a altura de vilo medida a partir de sua região basal, coincidindo com a porção superior das criptas, até o seu ápice, e as criptas medidas de sua base até a região de transição cripta:vilosidade (Pelicano et al., 2003).

As medidas foram realizadas em microscópio estereoscópico trinocular (Quimis<sup>®</sup>) apresentando aumentos de lentes totais entre 7 e 45x, sendo utilizados os aumentos de 10x e 15x. Acoplada a este microscópio, havia uma câmera ligada a um analisador de imagens (Software Leica<sup>®</sup>), que fazia a transmissão das imagens para a tela do computador. As imagens eram captadas para um programa que fazia as mensurações (Paint Brush<sup>®</sup>). Conforme o aumento de lentes utilizado, os valores observados eram multiplicados por um determinado fator de correção, constante em uma tabela de calibração. De cada ave, foram medidas entre 5 e 30 vilosidades e criptas. De todas as medidas de cada ave foi feita uma média e este valor foi utilizado como medida única por ave, para fins de análise estatística.

### 3.2.7 Análise estatística

Os dados de desempenho e de morfometria intestinal (vilosidades) foram analisados pelo GLM do programa SAS (1998). Na presença de um F significativo foram feitos contrastes (Lsmeans) para testar as diferenças entre as médias. O número de amostras foi de 8 repetições por tratamento para desempenho e 16 aves por tratamento para morfometria intestinal e contagem de *Salmonella*. Para os dados de contagem de *Salmonella*, foram criadas 5 classes, assim definidas: classe 0 – contagem “zero” de *Salmonella*; classe 1 -  $n \text{ UFC} \times 10^1$ ; classe 2 -  $n \text{ UFC} \times 10^2$ ; classe 3 –  $n \text{ UFC} \times 10^3$ ; classe 4 -  $> n \text{ UFC} \times 10^3$ ; e foi utilizado o teste de Qui-quadrado Mantel –Haenszel, com uso de contrastes entre os tratamentos.

Os dados de sorologia (densidade ótica) primeiramente foram testados para verificação de sua normalidade na distribuição. Como os mesmos não apresentaram distribuição normal, testou-se uma série de transformações, até encontrar a mais adequada para esta situação, ou seja, aquela que conseguisse transformar os dados em uma distribuição normal. A transformação utilizada para as duas variáveis (DO aos 15 dias e aos 29 dias) foi a radicial (tsqsq), a qual permitiu que fosse realizada a análise de variância pelo GLM do SAS com os dados transformados. Com o objetivo de comparar os resultados das análises realizadas, efetuou-se também outra análise estatística com o uso de um teste não paramétrico – teste de Kruskal-Wallis. Os resultados encontrados foram semelhantes àqueles obtidos com a transformação e análise de variância, o que proporcionou segurança aos resultados encontrados.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Dados de desempenho

No presente experimento, o peso médio dos pintos no primeiro dia de idade foi de 45,69 g em todos os tratamentos, variando entre 44,58 g e 46,79 g, o que não representou diferença significativa entre os pintos dos diferentes tratamentos no início do período experimental. Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos para nenhuma das variáveis de desempenho avaliadas ao longo de todo o período experimental (Tabela 3). Estes resultados concordam com Palmu & Calmelin (1997) que, testando um produto de exclusão competitiva (Broilact<sup>®</sup>) administrado aos pintos logo após a eclosão, não encontraram diferenças significativas para o desempenho dos frangos abatidos aos 58 dias.

Por outro lado, Huang et. al (2004) observaram diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) no consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar de frangos de corte que receberam diferentes probióticos de exclusão competitiva (principalmente *Lactobacillus casei* e *L. acidophilus*). Ao final do período experimental de seis semanas, nos tratamentos em que houve uso dos *Lactobacillus*, o ganho de peso foi maior e a conversão alimentar melhor do que o tratamento controle que não foi suplementado com probiótico. É importante ressaltar que estes autores encontraram resultados bastante divergentes, em função da idade das aves, dose e composição dos produtos utilizados.

Segundo Jin et. al (1997) diferenças na cepa e na forma de apresentação da bactéria utilizada no probiótico, bem como a concentração de células viáveis, podem produzir resultados discrepantes. Os mesmos autores sugerem que a suplementação com probióticos pode apresentar resultados mais satisfatórios, quando as aves são submetidas a condições de estresse, o que não foi observado no presente experimento, embora as aves tenham sofrido o estresse da inoculação com *Salmonella*.

TABELA 3. Desempenho de frangos desafiados com *Salmonella* Enteritidis e alimentados com dietas variando em aditivos alimentares, no período de 1 a 28 dias

	PM 28d (g)	GMP 1-28 (g)	CMR 1-28 (g)	CA 1-28 (g/g)
<b>TRAT</b>				
T1 (dieta basal)	1287	1242	1803	1,45
T2 (basal+prob) <sup>1</sup>	1292	1246	1816	1,46
T3 (basal+preb) <sup>2</sup>	1286	1240	1785	1,44
T4 (basal+preb+prob)	1285	1239	1792	1,44
T5 (antimicrobiano) <sup>3</sup>	1314	1269	1839	1,45
Prob	0,83	0,83	0,81	0,84
CV %	4,45	4,60	5,32	2,15

<sup>1</sup> *Lactobacillus* - All-Lac XCL 5x<sup>®</sup>

<sup>2</sup> Mananoligossacarídeos – Bio Mos<sup>®</sup>

<sup>3</sup> Avilamicina

Loddi (2005) utilizou pintos machos Ross inoculados com *Salmonella* Enteritidis ( $1 \times 10^8$  UFC/mL, por via oral) aos 4 dias de idade e avaliou tratamentos com antimicrobiano (Flavomicina) e mananoligossacarídeos fosforilados (MOS), isoladamente e em conjunto com ácidos orgânicos. No período de 1 a 28 dias, não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos para nenhuma das variáveis de desempenho,

da mesma forma que no presente trabalho. No entanto, considerando-se o período total de 1 a 35 dias de idade, as aves que receberam antimicrobiano apresentaram maior consumo de ração ( $P < 0,05$ ) em comparação com as suplementadas com MOS fosforilado. Isto se refletiu em uma pior conversão alimentar para aquele grupo, inclusive quando comparados com o grupo controle, que foi inoculado e não recebeu nenhum aditivo suplementar.

### **3.3.2 Dados de contagem de *Salmonella***

#### **3.3.2.1 Ceco**

Para os dados de contagem das colônias de *Salmonella* no ceco, foi observada diferença significativa entre os tratamentos ( $P \leq 0,017$ ) nas amostras coletadas aos 15 dias. Pode-se observar que o tratamento com antimicrobiano (T5) obteve menor frequência observada de “zero” *Salmonella* do que todos os outros (Tabela 4). No tratamento com antimicrobiano, somente 25% das amostras apresentaram “zero” de contagem de *Salmonella*, comparado a 60% e 50% de amostras com “zero” *Salmonella* para os outros. Para as classes 3 e 4 (maior quantidade de *Salmonella* encontrada) os tratamentos com prebiótico (T3) e probiótico (T2) apresentaram o menor número de animais com presença de *Salmonella*, respectivamente.

TABELA 4. Freqüências observadas (%) da presença (contagem) de *Salmonella* no ceco distribuídas em cinco classes de acordo com o aditivo alimentar utilizado na dieta de frangos de corte

Tratamentos	Contagem de salmonela (dentro das classes*)				
	0	1	2	3	4
	%				
T1 (dieta basal)	60	6,67	6,67	20	6,67
T2 (basal+prob)	62,50	0	0	37,50	0
T3 (basal+preb)	60	0	0	13,33	26,67
T4 (basal+prob+preb)	50	0	6,25	31,25	12,50
T5 (basal+antimicrob.)	25	6,25	0	37,5	31,25

\* classe 0= não foi encontrada *Salmonella*; classe 1= *Salmonella* encontrada em diluição  $10^{-1}$  ( $n \times 10^1$ ); classe 2= *Salmonella* em diluição  $10^{-2}$  ( $n \times 10^2$ ); classe 3= *Salmonella* em diluição  $10^{-3}$  ( $n \times 10^3$ ); classe 4= *Salmonella* em quantidades incontáveis na diluição  $10^{-3}$  (ou seja,  $n > 10^3$ , pode ser  $n \times 10^4$ ,  $n \times 10^5$ ,...)

Em várias amostras, tanto aos 15 quanto aos 29 dias, não foi possível identificar a presença de *Salmonella* e encontrou-se grande número de colônias de *Escherichia coli*. Sua confirmação ocorreu através de isolamento e identificação por testes bioquímicos (uréia, ONPG, FA, OF, SIM, citrato, TSI, LIA, catalase e oxidase). A *E. coli* foi também testada *in vitro* com o prebiótico (mananoligossacarídeo) para avaliar sua possível aglutinação ao produto, o que não foi observado. Foi realizado também um antibiograma para avaliar a sensibilidade da cepa de *E. coli* isolada frente aos antimicrobianos utilizados no meio de cultura das placas (novobiocina e ácido nalidíxico) e na ração (avilamicina), no T5. A bactéria apresentou-se resistente aos três antimicrobianos testados, justificando sua presença e crescimento no ceco das aves tratadas com avilamicina. A ausência de *Salmonella* não significa, necessariamente, que o tratamento foi eficiente em eliminá-la. Com esta informação é possível apenas afirmar que não foi encontrada a bactéria, mas não que ela não estivesse presente na amostra testada. Também é importante ressaltar o fato de que o uso de antimicrobianos em baixas concentrações (15

ppm), chamados promotores de crescimento, como ocorreu neste estudo, pode ter efeitos prejudiciais na composição da microflora intestinal normal, eliminando ou reduzindo a presença de bactérias desejáveis e favorecendo o crescimento de outras, muitas delas patogênicas. Ohya & Sato (1983) relataram que o uso de doses sub-terapêuticas de antimicrobianos em frangos de corte, possivelmente, afetaria a estabilidade da microflora intestinal; este fato poderia reduzir a população de *Lactobacillus* no intestino (Engberg et al., 2000; Knarreborg et al., 2002).

Um fato importante observado no presente experimento relaciona-se à idade das aves quando do momento das contagens bacterianas. No experimento piloto as aves foram inoculadas também aos 3 dias de idade, porém as contagens foram realizadas aos 10 dias. No experimento posterior, as contagens foram feitas aos 15 e aos 29 dias, o que pode ter representado uma fonte de variação, visto que a microbiota intestinal das aves modifica-se muito em sua composição com o avançar da idade da ave, tornando-se mais complexa (Lan et al., 2005). A microbiota cecal precisa de 6 a 7 semanas para se estabelecer (Coloe et al., 1984) e uma grande quantidade de microorganismos estritamente anaeróbios ou facultativos colonizam o ceco. A partir do terceiro dia de vida, muitas espécies bacterianas estão presentes no trato gastrintestinal e muitas delas são apenas transitórias; após os 40 dias a microbiota torna-se estável e consiste predominantemente de *Streptococcus* fecais, *Escherichia coli*, *Bacteroides spp.* e *Lactobacillus spp.* ( Barnes et al., 1980; Coloe et al., 1984).

Utilizando-se técnicas moleculares de DNA ribossomal das bactérias para sua identificação, concluiu-se que a composição microbiana intestinal é um pouco diferente do que se havia descoberto através das técnicas tradicionais de cultura e isolamento. No ceco de aves adultas os grupos mais abundantes encontrados foram *Clostridium* (65%), *Fusobacterium* (14%), *Lactobacillus* (8%) e *Bacteroides* (5%). Em aves com menos de 14 dias de idade a maioria das espécies presentes no ceco e no intestino delgado era de *Lactobacilli*.

Para as contagens de *Salmonella* no ceco, comparando-se os tratamentos através de contrastes, foi possível observar algumas diferenças significativas observadas na Tabela 5.

TABELA 5. Contrastes entre os tratamentos para contagem de *Salmonella* no ceco

<b>Comparações</b>	<b>GL</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>Conclusão</b>
Geral	4	5,71*	Há diferenças entre os tratamentos
T1 x T2+3+4	1	ns	basal = pré, pró e pré+probióticos
T5 x T2+3+4	1	4,56*	antimicrob→maior n <sup>o</sup> aves c/ mais <i>Salmonella</i>
T3 x T2+4	1	ns	Prebiótico=probiótico e pré+probiótico
T2 x T3+4	1	ns	Probiótico=prebiótico e pré+probiótico
T2 x T3	1	ns	Probiótico=prebiótico
T2 x T5	1	4,88*	probiótico→maior n <sup>o</sup> aves “zero” <i>Salmonella</i> comparado com antimicrob
T3 x T5	1	ns	Prebiótico=antimicrob

T1=dieta basal

T2=dieta basal + prob (*Lactobacillus* - All-Lac XCL 5x<sup>®</sup>)

T3= dieta basal + preb (Mananoligossacarídeos – Bio Mos<sup>®</sup>)

T4=dieta basal + prob + preb

T5= dieta basal + antimicrobiano (Avilamicina)

\* P<0,05

ns= não significativo

Na Tabela 5, há indicação de que não houve diferença significativa quando se comparou o tratamento basal (T1) com aqueles suplementados com probiótico, prebiótico e pré +probiótico (T2, T3 e T4), conjuntamente. Estes dados discordam daqueles encontrados por Spring et al. (2000) que, utilizando frangos de corte desafiados com *Salmonella* Typhimurium 29E aos três dias de idade, observaram diferença significativa entre animais suplementados com mananoligossacarídeos e outros sem suplementação, na concentração de bactérias no ceco, sete dias após o desafio ( $5,40 \times 4,01 \log \text{ufc/g}$ ;  $P < 0,05$ ). O fato da contagem bacteriana neste caso ter sido feita apenas sete dias após a inoculação, pode ter contribuído para a observação dos efeitos relatados, uma vez que a possibilidade do organismo da ave eliminar o patógeno aumenta proporcionalmente ao número de dias após infecção.

Quando o tratamento com antimicrobiano (T5) foi comparado também aos suplementados com probiótico, prebiótico e combinações destes (T2, T3 e T4) encontrou-se diferença significativa no sentido de que com antimicrobiano houve maior número de aves nas classes 3 e 4 (maior número de *Salmonella*). Também, com probiótico, prebiótico e os dois combinados houve maior número de aves na classe 0 ("zero" *Salmonella*). Já com antimicrobiano houve menor número de aves na classe 0 do que nos tratamentos com suplementação. Estes resultados sugerem que o uso do antimicrobiano como promotor de crescimento pode ter desequilibrado a microflora intestinal e favorecido o crescimento da *Salmonella*, ou ainda, indicam a resistência da cepa de *Salmonella* inoculada ao antimicrobiano utilizado, o que foi confirmado através de antibiograma (dados não mostrados).

Provavelmente, os outros microorganismos presentes na microflora intestinal não eram resistentes à avilamicina, o que favoreceu o isolamento e a identificação da *Salmonella*. O único meio efetivo de combate à *Salmonella* é a manutenção de um pH ácido. Se forem eliminadas bactérias competidoras que promovem o pH ácido, como através da utilização de um antimicrobiano na dieta, por exemplo, pode-se estar favorecendo o crescimento de bactérias sensíveis ao pH ácido, como a *Salmonella*.

Antunes et al. (2003) avaliaram a incidência de *Salmonella* de diferentes sorotipos em produtos avícolas e sua suscetibilidade a vários agentes antimicrobianos. *Salmonella* Enteritidis estava entre as mais prevalentes (44% das amostras) e 75% de todas as *Salmonella* isoladas apresentaram-se resistentes a um ou mais antimicrobianos, indicando alta incidência de sorotipos resistentes.

Não houve diferença significativa entre tratamentos com prebiótico ou probiótico ou sua combinação.

Quando foram comparados apenas tratamentos com probiótico e antimicrobiano foi encontrada diferença significativa. No tratamento com probiótico a maioria das aves apresentou-se na classe 0 (62,50% x 25% para probiótico e antimicrobiano, respectivamente), enquanto que com antimicrobiano o maior número de aves foi observado nas classes 3 e 4, ou seja, com maior número de colônias de *Salmonella* (37,50% x 68,75% para probiótico e antimicrobiano, respectivamente).

A comparação entre tratamentos com prebiótico e antimicrobiano não apresentou diferença significativa.

### 3.3.2.2 Fígado

No fígado, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos quanto à ausência ou presença de *Salmonella* no órgão (P=0,50) (Tabelas 6 e 7).

As análises de contrastes entre os tratamentos, entretanto, evidenciaram diferença significativa (P≤0,03). Esta diferença produziu-se no fato de que a presença de *Salmonella* foi maior no tratamento com antimicrobiano do que naqueles com prebiótico, probiótico ou os dois combinados (Tabela 6). Em relação ao tratamento controle (T1) não houve diferença entre ele e as suplementações com prebiótico, probiótico ou ambos em conjunto. Da mesma forma, não foi encontrada diferença significativa entre o uso de probiótico ou prebiótico. Estes resultados coincidem com aqueles observados no ceco, mais uma vez indicando o efeito negativo do uso do antimicrobiano nas condições do presente experimento.

TABELA 6. Frequências observadas (%) de presença e ausência de *Salmonella* no fígado

Tratamentos	Ausência de <i>Salmonella</i> (%)	Presença de <i>Salmonella</i> (%)
T1 (dieta basal)	53,33	46,67
T2 (basal+prob) <sup>1</sup>	62,50	37,50
T3 (basal+preb) <sup>2</sup>	73,33	26,67
T4 (basal+preb+prob)	68,75	31,25
T5 (antimicrobiano) <sup>3</sup>	37,50	62,50

<sup>1</sup> *Lactobacillus* - All-Lac XCL 5x®

<sup>2</sup> Mananoligossacarídeos – Bio Mos®

<sup>3</sup> Avilamicina

TABELA 7. Contrastes entre os tratamentos (fígado)

Comparações	GL	X <sup>2</sup>	Conclusão
Geral	4	ns	Não há diferença entre tratamentos
T1 x T2+3+4	1	ns	Não há diferença entre tratamentos
T5 x T2+3+4	1	4,59*	atb→maior presença <i>Salmonella</i>
T2 x T3+4	1	ns	Não há diferença entre tratamentos
T3 x T2+4	1	ns	Não há diferença entre tratamentos
T2 x T3	1	ns	Não há diferença entre tratamentos

T1=dieta basal

T2=dieta basal + prob (*Lactobacillus* - All-Lac XCL 5x<sup>®</sup>)

T3= dieta basal + preb (Mananoligossacarídeos – Bio Mos<sup>®</sup>)

T4= dietas basal + prob + preb

T5= dieta basal + Avilamicina

\* P<0,05

ns= não significativo

### 3.3.3 Quantificação de anticorpos

Os resultados da quantificação de anticorpos através do teste Elisa, expressos em valores de densidade ótica (DO), estão apresentados na Tabela 8. Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos para os valores de densidade ótica aos 15 e aos 29 dias (Tabela 8). Observando uma probabilidade  $\leq 0,14$ , os tratamentos com uso do prebiótico (T3 e T4) apresentaram valores de DO aos 15 dias superiores aos demais indicando uma melhor resposta imune, possivelmente em consequência do estímulo causado pela presença dos mananoligossacarídeos no lúmen intestinal.

TABELA 8. Valores transformados\* de densidade ótica (DO) em soros de frangos de corte desafiados com *S. Enteritidis* recebendo diferentes aditivos alimentares

	DO aos 15 dias	DO aos 29 dias
<b>TRAT</b>		
T1 (dieta basal)	1,465	1,491
T2 (basal+prob) <sup>1</sup>	1,481	1,483
T3 (basal+preb) <sup>2</sup>	1,607	1,544
T4 (basal+preb+prob)	1,586	1,502
T5 (antimicrobiano) <sup>3</sup>	1,494	1,510
Prob	0,14	0,87
CV %	8,79	7,76

\* valores submetidos à transformação radicial (tsqsq)

<sup>1</sup> *Lactobacillus* - All-Lac XCL 5x<sup>®</sup>

<sup>2</sup> Mananoligossacarídeos – Bio Mos<sup>®</sup>

<sup>3</sup> Avilamicina

Savage et al. (1996) relataram um aumento na concentração de IgG no soro de aves suplementadas com 0,11% mananoligossacarídeos, quando comparadas com aves sem suplementação. Um aumento na produção de anticorpos em resposta ao uso de mananoligossacarídeos é esperado, em função da capacidade do sistema imune em reagir a materiais antigênicos estranhos de origem microbiana (Ferket, 2004). Porções de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* contidas em mananoligossacarídeos têm mostrado desencadear fortes propriedades antigênicas (Ballou, 1970). Os mananoligossacarídeos podem também estimular a resposta imune contra patógenos específicos impedindo sua colonização no intestino e fazendo com que sejam apresentados ao sistema imune como antígenos atenuados (Ferket, 2004).

Cotter et al. (2002) realizaram dois experimentos avaliando 4 níveis de suplementação com mananoligossacarídeos (0; 0,05; 0,1; 0,2%) sobre a produção de anticorpos contra hemácias de ovino, em frangos de corte e

poedeiras. Em poedeiras houve um aumento na produção de anticorpos com o uso de mananoligossacarídeos durante as quatro semanas pós-imunização com o antígeno, no entanto esta diferença foi significativa apenas na primeira semana ( $P < 0,01$ ). O nível inferior de suplementação (0,05%) proporcionou maiores títulos de anticorpos do que os outros dois níveis. Em frangos de corte os resultados foram bastante semelhantes, porém a diferença observada em favor do uso de mananoligossacarídeos não foi significativa e os resultados encontrados indicaram maiores títulos de anticorpos com o uso dos níveis mais altos de mananoligossacarídeos (0,1 e 0,2%). Os mecanismos responsáveis pelos efeitos dos mananoligossacarídeos sobre a imunidade ainda não estão esclarecidos. Além da capacidade de ligação com patógenos entéricos (Spring et al., 2000) e de adsorção de micotoxinas potencialmente imunossupressivas, Cotter et al. (2002) sugerem que a manose presente na superfície dos mananoligossacarídeos possa estimular a produção de uma lectina que se liga à manose e tem importante função de auxiliar a fagocitose, fundamental na resposta imune inata a microorganismos. Neste caso, a maior produção desta lectina poderia auxiliar o processamento e apresentação do antígeno às células T, etapa indispensável para o estabelecimento da imunidade adquirida.

Em um experimento utilizando duas linhagens de frangos de corte (Hubbard e Shaver), Zulkifli et al. (2000) quantificaram os títulos de anticorpos contra doença de Newcastle, em aves submetidas a três tratamentos – dieta basal sem suplementação, dieta basal + oxitetraciclina e dieta basal + cultura de *Lactobacillus*, em condições de estresse por calor dos 21 aos 42 dias. Os resultados encontrados demonstraram que não houve efeito de linhagem ou

tratamento até o início dos períodos de estresse (1 a 21 d), porém, aos 42 dias observou-se uma interação significativa entre linhagem e tratamento, com as aves Hubbard apresentando maior título de anticorpos no tratamento com *Lactobacillus*, em comparação com o grupo controle (sem suplementação). O tratamento com oxitetraciclina não foi significativamente diferente dos outros dois nesta mesma linhagem. Para as aves da linhagem Shaver, os títulos de anticorpos não foram influenciados pelos tratamentos. Este fato confirma que a resposta imune das aves a diferentes antígenos apresenta, entre outros fatores, grande variação em função da linhagem e, em estudos com linhagens comerciais diferentes, é esperado observar-se respostas bastante variáveis.

Em outro experimento, Seo et al. (2000) avaliaram a presença de anticorpos (IgG) no plasma de poedeiras inoculadas com  $1,5 \times 10^6$  UFC de *S. enteritidis* aos dois dias de idade, submetidas a tratamentos sem suplementação e suplementadas com enrofloxacina e/ou uma cultura de microflora intestinal aviária normal (NAGF). De forma geral, os autores não observaram aumento do título de IgG e também, não encontraram diferença significativa entre os tratamentos. Quatro semanas após a infecção, apenas 8% das amostras apresentaram níveis detectáveis de anticorpos anti-*S. enteritidis* e somente 10 semanas pós infecção, o número de amostras com níveis de anticorpos detectáveis atingiu seu máximo, porém nunca ultrapassando 45% das amostras.

No presente estudo, duas hipóteses podem ser levantadas: a de que as aves ao serem criadas somente até os 28 dias, não atingiram um pico máximo de expressão da produção de imunoglobulinas; ou ao contrário, que o

aumento das IgG específicas se dá mais próximo do desafio que foi aos 3 dias de idade. Também, segundo Holt et al. (1999), pintos contaminados com *Salmonella* logo após a eclosão podem permanecer infectados até a maturidade, sem o desenvolvimento de imunidade significativa contra o organismo infectante.

### **3.3.4 Medidas de vilosidades intestinais**

O objetivo foi medir 30 vilosidades por ave, no entanto, muitas lâminas apresentaram vilosidades bastante descamadas e rompidas, o que impediu a contagem no número desejado.

Para as medidas de altura de vilosidades intestinais e profundidade de criptas, aos 15 e 29 dias, não houve diferença significativa entre os tratamentos, com exceção das medidas de profundidade de cripta aos 15 dias, em que o tratamento com probiótico (T2) apresentou menor profundidade do que os tratamentos com antimicrobiano(T5) e controle negativo (T1) (Tabela 9). Estes resultados podem ser devidos ao pequeno número de amostras que puderam ser medidas, em função das descamações observadas em muitas delas, o que levou a um número diferente de medidas por tratamento. Como este tipo de variável é bastante subjetiva, por tratar-se de uma medição de porções escolhidas visualmente, não é improvável pensar-se que algum tratamento possa ter sido beneficiado, de maneira não intencional. Uma tentativa de minimizar este problema, poderia ser a coleta de amostras com as aves em jejum alimentar de algumas horas, o que possivelmente reduziria a descamação do epitélio intestinal e proporcionaria melhor qualidade das

amostras coletadas. Isto não não pôde ser feito no presente experimento, porque a ausência de conteúdo cecal poderia interferir no isolamento e quantificação da *Salmonella* presente no ceco.

TABELA 9. Medidas de altura de vilosidades (AV) e profundidade de cripta (PC) no duodeno de frangos de corte aos 15 e 29 dias, desafiados com *S. Enteritidis* recebendo diferentes aditivos alimentares

TRAT	idade das aves (dias)			
	15		29	
	AV ( $\mu\text{m}$ )	PC ( $\mu\text{m}$ )	AV ( $\mu\text{m}$ )	PC ( $\mu\text{m}$ )
T1 (dieta basal)	734,62	77,03 a	661,01	71,54
T2 (basal+prob) <sup>1</sup>	665,39	59,59 b	705,08	71,09
T3 (basal+preb) <sup>2</sup>	671,53	74,63 ab	643,91	65,26
T4 (basal+preb+prob)	827,45	61,25 ab	644,43	64,66
T5 (antimicrobiano) <sup>3</sup>	694,36	76,86 a	703,41	65,71
Prob	0,19	0,04	0,30	0,42
CV %	15,73	18,32	11,97	14,59

<sup>1</sup> *Lactobacillus* - All-Lac XCL 5x®

<sup>2</sup> Mananoligossacarídeos – Bio Mos®

<sup>3</sup> Avilamicina

A atuação dos prebióticos sobre a microbiota intestinal pode ocorrer de duas maneiras: fornecendo nutrientes às bactérias desejáveis ou através do reconhecimento, por parte das bactérias patogênicas, de sítios de ligação nos oligossacarídeos como se fossem da mucosa intestinal, o que resulta em menor colonização indesejável, menor incidência de infecções e melhor integridade intestinal (Iji & Tivey, 1998). Sua eficiência em aglutinar bactérias depende principalmente da presença de glicoproteínas (fimbrias) na estrutura bacteriana, as quais devem ligar-se ao oligossacarídeo. Quando se reduz a colonização indesejável, pode-se esperar uma melhor integridade intestinal, que pode ser representada por uma maior altura de vilos, e menor

profundidade de cripta, em razão de uma menor renovação e proliferação celular, do que quando há um processo de colonização patogênica e conseqüente descamação e renovação do epitélio intestinal.

Macari & Maiorka (2000) avaliaram o efeito da adição de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, que é constituída de mananoligossacarídeos, sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal de frangos de corte. O uso deste prebiótico na ração proporcionou aumento significativo na altura de vilo ( $P < 0,05$ ) no duodeno, jejuno e íleo, principalmente na primeira semana de vida das aves.

Loddi (2003), utilizando mananoligossacarídeo (MOS) e acidificante orgânico em dietas de frangos de corte, observou aumento na altura e perímetro de vilo com a suplementação de MOS aos 21 dias de idade (1485  $\mu\text{m}$  x 960  $\mu\text{m}$ ) ( $P < 0,05$ ). Entretanto, aos 42 dias de idade não foi observado nenhum efeito significativo dos promotores utilizados sobre a morfometria intestinal, assim como ocorreu no presente experimento. A mesma autora em outro ensaio observou aumento da densidade de vilos por segmento de intestino delgado, no íleo de frangos de corte com 21 dias, tratados com um simbiótico (85% mananoligossacarídeo e 15% lactose). O uso deste produto isolado proporcionou maior densidade de vilos, ou seja, menor tamanho de vilos, do que os demais tratamentos (controle negativo; probióticos [à base de *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus reuteri* e *L. johnsonii*] e associação dos dois).

Dentre algumas funções relatadas, as bactérias probióticas auxiliam a regeneração da mucosa intestinal lesada, pois através do mecanismo de exclusão competitiva, protegem os vilos e a superfície de absorção contra as

toxinas irritantes produzidas por microrganismos patogênicos (Dobrogosz et al., 1991).

Pelicano et al. (2003), avaliando frangos de corte criados de 1 a 42 dias, suplementados com seis combinações de probióticos adicionados na ração e na água de bebida, não encontraram benefícios conclusivos na morfologia intestinal das aves com o uso de probióticos, embora tenha sido observado que a composição dos probióticos e sua forma de utilização, na água de bebida ou na ração, proporcionaram resultados diferentes. Em aves abatidas aos 42 dias, foi observado que aquelas pertencentes ao grupo controle, sem adição de probióticos, apresentaram menor altura de vilos no duodeno ( $P < 0,01$ ) em relação às aves que receberam probióticos ( $794 \mu\text{m} \times 1109 \mu\text{m}$ ). Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na profundidade de cripta entre as aves do grupo controle negativo – sem probiótico - e as que receberam probióticos. No entanto, o probiótico contendo *Saccharomyces cerevisiae* proporcionou as menores profundidades de cripta no duodeno, jejuno e íleo em relação aos probióticos contendo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* combinado com *Bacillus subtilis* ( $98 \mu\text{m} \times 165 \mu\text{m}$  e  $152 \mu\text{m}$ , respectivamente, no duodeno). Estes autores também encontraram interação significativa entre probióticos adicionados na água e na ração, sendo que a associação de *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*, ambos adicionados na ração, a culturas de *Lactobacillus reuteri* e *L. johnsonii*, utilizados na água de bebida, foi fundamental para a ocorrência de maiores profundidades de cripta. Schwarz et al. (2002) ao contrário, observaram

maiores profundidades de cripta com o uso de *Saccharomyces cerevisiae* em relação ao uso de culturas de *Bacillus subtilis*.

É importante ressaltar que os valores de altura de vilosidades e profundidade de cripta observados no presente experimento foram inferiores aos observados nos trabalhos citados, possivelmente em razão do desafio com *Salmonella* a que foram submetidas as aves, o que não ocorreu nos outros estudos, nos quais não houve nenhum desafio imposto às aves, além dos existentes em situações normais de criação. A colonização intestinal de um patógeno como a *Salmonella* provoca agressões à mucosa intestinal e conseqüente redução na altura das vilosidades. Esta por sua vez, leva a um aumento na profundidade das criptas, que é resultado de uma maior atividade proliferativa celular, que ocorre para garantir adequada taxa de renovação epitelial (Pluske et al., 1997), embora isto não tenha sido observado no presente experimento.

### **3.3.5 Viabilidade**

Não foi observada diferença significativa na viabilidade entre os tratamentos ao longo de todo o experimento (Tabela 10). A resistência à salmonelose em pintos, geralmente, aumenta proporcionalmente à idade da ave, possivelmente devido ao desenvolvimento da microbiota intestinal normal e do sistema imunológico, com a idade (Smith & Tucker, 1980; Ziprin, 1989; Corrier et al., 1991). A infecção com *Salmonella* Enteritidis raramente causa mortalidade em aves com mais de um mês de idade. Além da idade, a cepa da bactéria utilizada e seu fagótipo (PT) podem ser importantes fatores no

desenvolvimento de uma infecção por *Salmonella* Enteritidis (Suzuki, 1994) e variações na mortalidade podem ser observadas em infecções experimentais.

Enquanto Gast & Bert (1992) observaram diferenças significativas na mortalidade (14,5-89,5%) em pintos de um dia de idade inoculados por via oral com oito isolados de *Salmonella* Enteritidis, nenhum dos isolados de *S. Enteritidis* PT4 resistentes ao ácido nalidíxico foi letal para os pintos (Hinton et al., 1989), da mesma forma que ocorreu no presente experimento. Pintos de um dia de idade expostos a altas doses de salmonelas paratíficas freqüentemente apresentam mortalidade significativa nas primeiras semanas pós-infecção (Smith & Tucker, 1980). No entanto, doses inferiores geralmente resultam em menor mortalidade e mais aves são infectadas por um período mais longo (Nakamura et al, 1993; Phillips & Opitz, 1995; Gast & Holt, 1998). Como no presente experimento objetivou-se provocar uma infecção nas aves, porém, a princípio, sem causar aumentos significativos na mortalidade, a dose infectante utilizada ( $10^6$  UFC/mL) pode realmente ter sido baixa para causar alterações nas taxas de mortalidade.

TABELA 10. Viabilidade de frangos de corte desafiados com *S. Enteritidis*, durante o período experimental de 1 a 28 dias, recebendo diferentes aditivos alimentares

	<b>Viabilidade 1 a 28 dias (%)</b>
<b>TRAT</b>	
T1 (dieta basal)	93,50
T2 (basal+prob) <sup>1</sup>	93,50
T3 (basal+preb) <sup>2</sup>	98,75
T4 (basal+preb+prob)	93,50
T5 (antimicrobiano) <sup>3</sup>	91,00
Prob	0,55
CV %	9,78

<sup>1</sup> *Lactobacillus* - All-Lac XCL 5x®

<sup>2</sup> Mananoligossacarídeos – Bio Mos®

<sup>3</sup> Avilamicina

### 3.4 CONCLUSÕES

- O uso de prebiótico e probiótico não influenciou o desempenho nem a mortalidade de aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis.

- A produção de anticorpos em aves desafiadas com *Salmonella* Enteritidis foi maior nas aves que receberam prebiótico aos 15 dias de idade, porém não aos 29 dias.

- O uso de antimicrobiano proporcionou o maior número de UFCs de *Salmonella* Enteritidis nas contagens bacterianas no ceco, ao contrário do prebiótico e do probiótico, que proporcionaram as menores contagens.

- A morfometria intestinal e a mortalidade não foram influenciadas pela suplementação com prebiótico, probiótico ou antimicrobiano.

- A contaminação precoce de frangos de corte por *Salmonella* Enteritidis não causou prejuízos evidentes no desempenho, saúde intestinal e imunocompetência.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Através dos dois experimentos propostos neste trabalho foi possível concluir que a inoculação com albumina sérica bovina é uma boa ferramenta para avaliar a imunidade humoral de frangos de corte, embora exista uma grande variabilidade individual na produção de anticorpos contra este antígeno, o que dificulta a observação de diferenças nas respostas entre as aves, especialmente quando se avalia o efeito de micronutrientes na dieta, como vitaminas e minerais, sobre este parâmetro. Também é importante destacar o fato da inoculação com albumina sérica bovina não afetar o desempenho das aves, podendo desta forma ser utilizada como uma ferramenta de monitoramento do estado imunológico de um lote, sem afetar seu desempenho.

Uma questão que merece especial atenção é a grande variabilidade individual existente para a produção de anticorpos em aves de linhagens comerciais, que apresentam grande heterozigose. Este fato dificulta muito as análises dos dados e faz com que pequenas diferenças causadas por dieta e ambiente, por exemplo, possam não ser detectadas. Para uma avaliação mais completa do estado imunológico de um grupo de aves pode ser necessária a análise de outros parâmetros imunológicos relacionados com a imunidade celular e a produção de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo.

O uso de prebióticos e probióticos também deve ser estudado com bastante cautela, tendo-se em mente que a composição e a forma de aplicação destes, bem como as condições sanitárias, nutricionais e de manejo das aves, determinam sua eficiência ou não. A maioria dos trabalhos avaliando o uso de prebióticos e probióticos possuem grandes variações nestes aspectos, o que torna difícil a comparação entre os resultados por eles apresentados, visto que as fontes de variação para as respostas podem ser bem mais numerosas do que o esperado. Para avaliações mais seguras e conclusivas do uso dos prebióticos e dos probióticos, uma opção seria a repetição dos experimentos nas condições em que forem realizados, porém, apenas modificando um dos possíveis fatores de variação de resposta, como por exemplo, as condições nutricionais ou o manejo empregado.

É de fundamental importância, também, que se disponha de mais informações sobre a composição exata dos prebióticos e probióticos utilizados nos experimentos e, especialmente no caso destes últimos, da concentração dos microorganismos presentes nos produtos analisados, para permitir a comparação das respostas observadas, sem que a composição dos produtos possa representar mais uma fonte de variação nos resultados. Até o momento, os estudos realizados indicam que os resultados obtidos com o uso de prebióticos e de probióticos são bastante específicos para as condições individuais de cada experimento e torna-se difícil prever as respostas encontradas, quando qualquer uma das condições experimentais for diferente da inicialmente analisada.

A *Salmonella* Enteritidis é uma bactéria caracterizada como má competidora e, conseqüentemente, sua identificação e contagem podem sofrer influência da composição da microbiota intestinal da ave. Também, é importante destacar que a infecção precoce por esta bactéria pode não ser prejudicial para o desempenho e a imunocompetência das aves, embora isto varie, especialmente, em função das cepas da bactéria utilizada e da dose infectante.

Os dois experimentos propostos neste trabalho estão dentro de metodologias que ainda estão em desenvolvimento, como a determinação da melhor forma de avaliação da imunocompetência em aves e a avaliação dos mecanismos de ação e das respostas obtidas com o uso de diferentes aditivos alimentares, como os probióticos e os prebióticos. Certamente muito conhecimento surgirá nestas áreas nos próximos anos e poderá complementar ou mesmo discordar do que foi proposto nos experimentos deste trabalho.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**. 4<sup>th</sup> ed, Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. 553p.

AL- MURRANI, W. K.; KASSAB, A.; AL-SAM, H. Z.; AL- ATHARI, A. M. Heterophil/ lymphocyte ratio as a selection criterion for heat resistance in domestic fowls. **British Poultry Science**, Oxfordshire, v. 38, p. 159-163, 1997.

ALTAN, O.; ALTAN, A.; ÇABUC, M.; BAYRAKTAR, H. Effects of heat stress on some blood parameters in broilers. **Turk Journal of Animal Science**, Tubitak, v. 24, n. 2, p. 145-148, 2000.

ANTUNES, P.; RÉU, C.; SOUZA, J. C.; PEIXE, L.; PESTANA, N. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v. 82, p. 97-103, 2003.

AUSTIC, R. E. Feeding poultry in hot and cold climates. In: **STRESS Physiology in Livestock**. Boca Raton, FL: CRC, 1985. p. 123-136.

BAILEY, J.S. Control of *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry production: a summary of work at Russell Research Center [Athens, Georgia 30613, USA]. **Poultry Science**, Champaign, v.72, n.6, p.1169-1173, 1993.

BALLOU, C. E. A study of the immunochemistry of three yeast mannans. **Journal of Biological Chemistry**, Washington, v. 245, p. 1197-1203, 1970.

BALNAVE, D. Challenges of accurately defining the nutrient requirements of heat-stressed poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, n. 1, p. 5-14, 2004.

BARNES, E. M.; IMPEY, C. S.; COOPER, D. M. Manipulation of the crop and intestinal flora of the newly hatched chick. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 33, supl. 11, p. 2426-2433, 1980.

BAR-SHIRA, E.; SKLAN, D.; FRIEDMAN, A. Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period. **Development & Comparative Immunology, Charleston**, v. 27, p. 147-157, 2003.

BARTA, O.; BARTA, V.; PIERSON, F. W. Optimum conditions for the chicken lymphocyte transformation test. **Avian Disease**, Athens, v. 36, p. 945-955, 1992.

BARTLETT, J. R.; SMITH, M. O. Effects of different levels of zinc on the performance and immunocompetence of broilers under heat stress. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, n. 10, p. 1580-1588, 2003.

BENSON, B. N.; CALVERT, C. C.; ROURA, E.; KLASING, K. C. Dietary energy source and density modulate the expression of immunologic stress in chicks. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 123, p. 1714-1723, 1993.

BLAHA, Th. The state of the art of *salmonella*. SWINE CONFERENCE, 24., Minneapolis, MN, 1997. **Proceedings...** Minneapolis, 1997. p. 79-81.

BLALOCK, J. L.; THAXTON, J. P.; GARLICH, J. D. Humoral immunity in chicks experiencing marginal vitamin B-6 deficiency. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 114, p. 312-322, 1984.

BONNET, S.; GERAERT, P. A.; LESSIRE, M.; CARRE, B.; GUILLAUMIN, S. Effect of high ambient temperature on feed digestibility in broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, n. 6, p. 857-863, 1997.

BRAKE, J. T. Role of ascorbic acid in poultry production: ascorbic acid, stress and immunity. **Zootechnic International**, [s.l.], January, p. 37-40, 1989.

CALNEK, B.W.; SCHAT, K.A. Proliferation of chicken lymphoblastoid cells after in vitro infectio with Mareks's disease virus. **Avian Diseases**, Athens, v.35, n.4, p.728-737, 1991.

CALNEK, B. K.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; REID, W. M.; YODER, Jr. H. W. **Diseases of Poultry**. 9<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State University Press, 1991. 929p.

CAMPBELL, T. H. Hematology. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian Medicine**: principles and application. Forth Worth-FL: Wingers Publishing, 1994. p. 177-198.

CAMPO, J. L.; DÁVILA, S. G. Changes in heterophils to lymphocyte ratios of heat-stressed chickens in response to dietary supplementation of several related stress agents. **European Poultry Science**, Stuttgart, v. 66, n. 80-84, 2002.

CATTELAN Jr., E. V. **Efeito da restrição alimentar no desempenho e na qualidade de carcaça em frangos de corte.** 1995. 228f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

COGAL, R. M. J.; AHMED, S. A.; LARSEN, C. T. Analysis of avian lymphocyte proliferation by a new ,simple, nonradioactive assay (Lympho-Pro). **Avian Disease**, Athens, v. 41, p. 714-725, 1997.

COLDITZ, I. G. Effects of the immune system on metabolism: implications for production and disease resistance in livestock. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 75, p. 257-268, 2002.

COLLETT, S. Nutrição, imunidade e produtividade. In: RONDA LATINOAMERICANA, O FUTURO DA ALIMENTAÇÃO, 10., 2000, Brasil. **Palestras...** Brasil, 2000. p.20-30.

COLNAGO, G. L.; JENSEN, L. S.; LONG, P. L. Effect of selenium and vitamin E on the development on immunity to coccidiosis in chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 63, p. 1136-1143, 1984.

COLES, E. H. **Veterinary Clinical Pathology.** 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. 486p.

COLOE, P. J.; BAGUST, T. J.; IRELAND, L. Development of the normal gastrointestinal microflora of specific pathogen-free chickens. **The Journal of Hygiene**, London, v. 92, p. 79-87, 1984.

COOPER, M.A.; WASHBURN, K.W. The relationships of body temperature to weight gain, feed consumption, and feed utilization in broiles under heat stress. **Poultry Science**, Champaign, v.77, n.2, p.237-242, 1998.

CORRIER, D. E.; HARGIS, B.; HINTON, A. Jr.; LINDSEY, D.; CALDWELL, D.; MANNING, J.; DELOACH, J. Effect of anaerobic cecal microflora and dietary lactose on colonization resistance of layer chicks to invasive *Salmonella enteritidis*. **Avian Disease**, Athens, v. 35, p. 337-343, 1991.

COTTER, P. F.; SEFTON, A. E.; LILBURNS, M. S. Manipulating the immune system of layers and breeders: novel applications of mannan oligosaccharides. In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM, 18., 2002, Nottingham. **Proceedings: Nutritional biotechnology in the feed and food industries.** Nottingham: Nottingham University Press, 2002. p. 21-27.

CRAVENER, T. L.; ROUSH, W. B.; MASHALY, M. M. Broiler production under varying populations densities. **Poultry Science**, Champaign, v. 71, p. 427-433, 1992.

CUNNICK, J. E.; KOJIC, L. D.; HUGHES, R. A. Stress-induced changes in immune function are associated with increased production of an interleukin-1-like factor in young domestic fowl. **Brain, Behavior Immunology**, San Diego, v. 8, p. 123-136, 1994.

CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1999. 454p.

CZARICK, M.; TISON, B. L. Reflective roof coatings on commercial laying houses. **Transactions of the ASAE**, St. Joseph, v. 90, p. 4512, 1990.

DAVIS, G. S.; ANDERSON, K. E.; CARROLL, A. S. The effects of long-term caging and molt single comb white leghorn hens on heterophil to lymphocyte ratios, corticosterone and thyroid hormones. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, n. 4, p. 514-518, 2000.

DAVISON, T. F.; MISSON, B. H.; WILLIAMSON, R. A.; REA, J. Effect of increased circulating corticosterone in the immature fowl on the blastogenic responses of peripheral blood lymphocytes. **Development & Comparative Immunology**, Charleston, v. 12, p. 131-144, 1988.

DESOUZART, O. Os dez mais na carne de frango. **Ave World**, Paulínia, n. 15, p. 20-26, 2005.

DIBNER, J. J., KITCHELL, M. L., ATWELL, C. A. A. The effect of dietary ingredients and age on the microscopic structure of the gastrointestinal tract in poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 5, n. 3, p. 70-77, 1996.

DOBROGOSZ, W. J.; BLACK, B. L.; CASAS, I. A. Delivery of viable *Lactobacillus reuteri* to the gastrointestinal tract of poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 70, p. 158, 1991.

DONKER, R. A.; BEUVING, G. Effect of corticosterone infusion on plasma corticosterone concentration, antibody production, circulating leukocytes and growth in chicken lines selected for humoral immune responsiveness. **British Poultry Science**, Oxfordshire, v. 30, n. 3, p. 361-369, 1989.

DONKER, R. A.; NIEUWLAND, M. G. B.; VAN DER ZIJPP, A. J. Heat-stress influences on antibody production in chicken selected for high and low immune responsiveness. **Poultry Science**, Champaign, v. 69, p. 599-607, 1990.

EDENS, F. Practical applications for selenomethionine: broiler breeder reproduction. In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM, 18., 2002, Nottingham: Nutritional biotechnology in the feed and food industries. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University Press, 2002. p. 29-42.

EL-BOUSHY, A. R. Vitamin E affects viability, immune response of poultry. **Feedstuffs**, Minneapolis, v. 60, n. 4, p. 20-26, 1988.

ELSASSER, T. H.; KLASING, K. C.; FILIPOV, N.; THOMPSON, F. The metabolic consequences of stress: targets for stress and priorities for nutrient use. In: MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. **The Biology of Animal Stress**. New York : CAB International Press, 2000. p. 77-110.

ENGBERG, R. M.; HEDEMANN, M. S.; LESER, T. D.; JENSEN, B. B. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, p. 1311-1319, 2000.

ERF, G. F.; BOTTJE, W. G.; BERSI, T. K.; HEADRICK, M. D.; FRITS, C. A. Effects of dietary vitamin E on the immune system in broilers: altered proportions of CD4 T cells in the thymus and spleen. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, p. 529-537, 1998.

FERKET, P. R.; QURESHI, M. A. Performance and immunity of heat-stressed broilers fed vitamin and electrolyte supplemented drinking water. **Poultry Science**, Champaign, v. 71, p. 88-97, 1992.

FERKET, P. R.; QURESHI, M. A.; GARLICH, J. D.; RIVERS, D. V.; KIDD, M. T. Vitamin E and performance immunity and meat quality of turkeys. In: CAROLINA NUTRITION CONFERENCE, 1993, Charlotte. **Proceedings...** Charlotte, 1993. p. 1-6.

FRIEDMAN, A.; SKLAN, D. Effects of retinoids on immune responses in birds. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 53, p. 185-195, 1997.

FULLER, R. Probiotics in man and animals: a review. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.66, n.5, p. 365-378, 1989.

FURLAN, R. L. Avaliação e uso de pré e probióticos. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 6., 2005, Chapecó. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005. p. 58-76.

FURLAN, R. L.; MACARI, M. Termorregulação. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2.ed. Jaboticabal: Funesp, 2002. p. 209-230.

GAST, R. K.; BEARD, C. W. Evaluation of ac chick mortality model for predicting the consequences of Salmonella enteritidis infections in laying hens. **Poultry Science**, Champaign, v. 71, p. 281-287, 1992.

GAST, R. K.; HOLT, P. S. Persistence of Salmonella enteritidis from one day of age until maturity in experimentally infected layers chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, p. 1759-1762, 1998.

GEBERT, A. The role of M cells in the protection of mucosal membranes. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 108, p. 455-470, 1997.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.125, n.6, p.1401-1412, 1995.

GLICK, B. The immune system of poultry: Poultry production. **World's Poultry Science Journal**, New York, v. 32, n. 3, p. 483-524, 1995.

GOGAL, R. M. J.; AHMED, S. A.; LARSEN, C. T. .Analysis of avian lymphocyte proliferation by a new, simple, nonradioactive assay (Lympho-Pro). **Avian Disease**, Athens, v. 41, p. 714-721, 1997.

GONZALES, E.; JUNQUEIRA, O. M.; MACARI, M.; ROSA, G. J. M.; MENDES, A. A. Restrição alimentar em frangos de corte machos. 2 ganho de peso compensatório. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 31., 1994, Maringá. **Anais...** Maringá, 1994. p.50.

GONZALEZ-VEGA-AGUIRRE, D.; CONTRERAS, B. P. A.; KLEIN, R.; BOEHMWALD, H. Effect of vitamin C and E supplementation in the diet of broilers chicks on performance and immune response. **Revista de Veterinaria da Argentina**, Corrientes, v. 26, n. 2, p. 333-340, 1995.

GORE, A. B.; QURESHI, M. A. Enhancement of humoral and cellular immunity by vitamin E after embryonic exposure. **Poultry Science**, Champaign v. 76, p. 984-991, 1997.

GROSS, W. B.; SIEGEL, H. S. Evaluation of the heterophil/ lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. **Avian Disease**, Athens, v. 27, p. 972-979, 1983.

GROSS, W. B.; SIEGEL, P. B. Effects of early environmental stresses on chicken body weight, antibody response to RBC antigens, feed efficiency, and response to fasting. **Avian Disease**, Athens, v. 24, p. 569-579, 1980.

GROSS, W. B.; SIEGEL, P. B. Genetic-environmental interactions and antibody response in chickens to two antigens. **Avian Disease**, Athens, v. 34, p. 843-847, 1990.

GUO, Y. M.; LIU, C. N.; ZHOU, Y. P. Impact of heat stress on broiler and effects of supplemental yeast chromium. **Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica**, [Beijing], v. 29, p. 339-344, 1998.

GUTIERRO, I.; HERNANDEZ, R. M.; IGARTUA, M.; GASCÓN, A. R.; PEDRAZ, J. L. Size dependent immune response after subcutaneous, oral, and intranasal administration of BSA loaded nanospheres. **Vaccine**, Surrey, UK, v. 21, p. 67-77, 2002.

HARMON, B. G. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, p. 972-977, 1998.

HECKERT, R. A.; ESTEVEZ, I.; RUSSEK-COHEN, E.; PETTIT-RILEY, R. Effects of density and perch availability on the immune status of broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 81, p. 451-457, 2002.

HEGAZY, S. M.; ADACHI, Y. Comparison on the effects of dietary selenium, zinc, and selenium and zinc supplementation on growth and immune response between chick groups that were inoculated with *Salmonella* and aflatoxin or *Salmonella*. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, p. 331-335, 2000.

HERSHBERG, R. M. The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking V. Polarized compartmentalization of antigen processing and Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells. **American Journal of Physiology**, Gastrointestinal and Liver Physiology, Bethesda, p. G833-G839, 2002.

HESTER, P. Y.; MUIR, W. M.; CRAIG, J. V. Group selection for adaptation to multiple-hen cages: humoral immune response. **Poultry Science**, Champaign, v. 75, p. 1315-1320, 1996.

HINTON, M.; PEARSON, G. R.; THRELFALL, E. J.; ROWE, B.; WOODWARD, M.; WRAY, C. Experimental *Salmonella* enteritidis infection in chicks. **Veterinary Record**, London, v. 124, p. 223, 1989.

HOLT, P. S.; GAST, R. K.; PORTER Jr., R. E.; STONE, H. D. Hyporesponsiveness of the systemic and mucosal humoral immune systems in chickens infected with *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* at one day of age. **Poultry Science**, Champaign, v. 78, p. 1510-1517, 1999.

HOWLIDER, M. A. R.; ROSE, S. P. Temperature and the growth of broilers. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 43, n. 2, p. 228-237, 1987.

HUANG, M. K.; CHOI, Y. J.; HOUDE, R.; LEE, J. W.; LEE, B.; ZHAO, X. Effects of *Lactobacilli* and an acidophilic fungus on the production performance and immune responses in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, p. 788-795, 2004.

HUMPHREY, T. J. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella enteritidis*: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, n. 21, p. 31-40, 1994.

HUMPHREY, B. D.; KLASING, K. C. Modulation of nutrient metabolism and homeostasis by the immune system. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 60, p. 90-100, 2004.

IJI, P.A.; TIVEY, D.R. Natural and synthetic oligosaccharides in broiler chicken diets. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v.54, n.2, p.129-143, 1998.

JACOB, R. A. The integrated antioxidant system. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 15, n. 4, p. 755-766, 1995.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 417p.

JIN, L. Z.; HO, Y. W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Probiotics in poultry: modes of action. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 53, p. 351-368, 1997.

KAGNOFF, M. F.; ECKMANN, L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 100, p. 6-10, 1997.

KNARREBORG, A.; SIMON, M.A.; ENGBERG, R. M.; JENSEN, B. B.; TANNOCK, G. W. 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**, Washington, v. 68, p. 5918-5924, 2002.

KIDD, M. T.; QURESHI, M. A.; FERKET, P.R.; THOMAS, L. N. Dietary zinc-methionine enhances mononuclear-phagocytic function in young turkeys. **Biological Trace Element Research**, New Jersey, v.42, p.217-229, 1994.

KIDD, M. T.; FERKET, P. R.; QURESHI, M. A. Zinc metabolism with special reference to its role in immunity. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 52, p. 309-324, 1996.

KLASING, K. C. Effects of inflammatory agents and interleukin-1 on iron and zinc metabolism. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 247, n. 5, p. 901-904, 1984.

KLASING, K. C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, p. 1119-1125, 1998.

KLASING, K. C.; LAURIN, D. E.; PENG, R. K.; FRY, M. Immunologically mediated growth depression in chicks: influence of feed intake. Corticosterone and interleukin-1. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 117, p. 1629-1637, 1987.

KRIEF, A.; LETESSON, J. J.; BILLEN, D. Comparison between "IgY technology" from chickens and a "IgG technology" from mice for production of tailor-made antibodies. **Tetrahedron Letters**, Zurich, v. 43, p. 1843-1846, 2002.

KUTLU, H. R.; FORBES, J. M. Self-reaction of ascorbic acid in coloured foods by heat stressed broiler chicks. **Physiology & Behavior**, The Netherlands, v. 53, p. 103-110, 1993.

LAN, Y.; VERSTEGEN, M. W. A.; TAMMINGA, S.; WILLIAMS, B. A. The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 61, p., 2005.

LA RAGIONE, R. M.; WOODWARD, M. J. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of salmonella enterica serotype enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. **Veterinary Microbiology**, The Netherlands, v. 94, p. 245-256, 2003.

LATIMER, K. S.; BIENZLE, D. The avian leukogram: determination and interpretation. In: LATIMER, K. S.; BIENZLE, D. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5<sup>th</sup> ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.417-432.

LEESON, S.; SUMMERS, J. D. **Nutrition of the Chicken**. 4<sup>th</sup>ed. Guelph: University Books, 2001. 591p.

LESHCHINSKY, T. V.; KLASING, K. C. Effect of vitamin E on the immunity of chicken. In: FASEB MEETING, [San Francisco, 1998]. S.I., [1998?].

LODDI, M. M. **Probióticos, prebióticos e acidificantes orgânicos em dietas para frangos de corte**. Jaboticabal : UNESP.FCAV, 2003. Tese (Doutorado em Zootecnia) - FCAV, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

LODDI, M. M. **Mananoligossacarídeo fosforilado e flavomicina: respostas em frangos de corte desafiados com salmonella**. Paulínia : Aveworld, 2005. p.7. Especial Ave World. Promotores Naturais de Crescimento.

MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Fisiologia Cardiovascular. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2ed. Jaboticabal: Funep/Unesp, 2002. p. 17-36.

MACARI, M.; MAIORKA, A. Função gastrointestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: Facta, 2000. p. 161-174.

MAIORKA, A. Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. In: SIMPÓSIO DE AVES E SUÍNOS, Porto Alegre, 2005. **Apresentação oral**. Porto Alegre, 2005.

MAIORKA, A.; MACARI, M. Absorção de minerais. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2ed. Jaboticabal: Funep/Unesp, 2002. p. 167-174.

MARSH, J. A.; COMBS, Jr. G. F.; WHITACRE, M. E.; DIETERT, R. R. Effect of selenium and vitamin E dietary deficiencies on chick lymphoid organ development. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 182, p. 425-436, 1986.

Mc FARLANE, J. M.; CURTIS, S. E. Multiple concurrent stressors in chicks. 3. Effects on plasma corticosterone and the heterophil:lymphocyte ratio. **Poultry Science**, Champaign, v. 68, p. 522-527, 1989.

MCKEE, J. S.; HARRISON, P. C. Effects of supplemental ascorbic acid on the performance of broiler chickens exposed to multiple concurrent stressors. **Poultry Science**, Champaign, v. 74, p. 1772-1785, 1995.

MCKEE, J. S.; HARRISON, P. C.; RISKOWSKI, G. L. Effects of supplemental ascorbic acid on the energy conversion of broiler chicks during heat stress and feed withdrawal. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, p. 1278-1286, 1997.

MILLER, L.; QURESHI, M. A. Induction of heat shock proteins and phagocytic function of chicken macrophage following *in vitro* heat exposure. **Veterinarian Immunology and Immunopathology**, Nouzilly, v. 37, n. 1, p. 34-42, 1991.

MITCHELL, M. A.; KETTLEWELL, P. J.; MAXWELL, M. H. Indicators of physiological stress in broiler chickens during road transportation. **Animal Welfare**, Hertfordshire, v. 2, n. 1, p. 91-103, 1992.

MONTGOMERY, R. D.; BOYLE, C. R.; MASLIN, W. R. Influence of antigen concentration, inoculation interval, number of exposures, type of housing, and placement concentration on the tear antibody response to *Brucella abortus* in chickens. **Avian Disease**, Athens, v. 35, p. 606-614, 1991.

MORGAN, W. E. Heat reflective roof coatings. **Transaction of the ASAE**, St. Joseph, v. 90, p. 4513, 1990.

MORGULIS, M. S. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: Funep/Unesp, 2002. p. 231-243.

MULLAN, B. P.; WILSON, R. H.; HARRIS, D.; ALLEN, J. G.; NAYLOR, A. Supplementation of weaner pig diets with zinc oxide or Bioplex™ zinc. In: ALLTECH'S ANNUAL SYMPOSIUM, 18., 2002, Nottingham: Nutritional biotechnology in the feed and food industries. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University Press, 2002. p. 81-97.

NAGANO, Y.; LEE, T. Different types of virus inhibitory factors in interferon produced by different organs. **Société de Biologie et des ses Filiales**, Paris, v. 172, p. 805-808, 1978.

NAKAMURA, M.; NAGAMINE, N.; SUZUKI, S.; NORIMATSU, M.; OISHI, K.; KIJIMA, M.; TAMURA, Y.; SATO, S. Long-term shedding of Salmonella enteritidis in chickens which received a contact exposure within 24 hrs of hatching. **Journal of Veterinary Medical Science(JSVS)**, Tokyo, v. 55, p. 649-653, 1993.

NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R. Salmonella enteritidis: controle, implicações em saúde pública e na qualidade dos produtos de origem avícola. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 6., 2005, Chapecó. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005. p. 46-57.

NEUTRA, M. R.; MANTIS, N. J.; KRAEBENBUHL, J. P. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. **Nature Immunology**, New York, v. 2, p. 1004-1009, 2001.

NEUTRA, M. R.; PRINGAULT, E.; KRAEBENBUHL, J. P. Antigen samples across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, CA, v. 14, p. 275-300, 1996.

NOCKELS, C. F. Increased vitamin needs during stress and disease. In: GEORGIA NUTRITION CONFERENCE, 1988, Atlanta. **Proceedings...** Atlanta, 1988, p.9.

NORIEGA, M. L. V. C. **Apuntes de hematologia aviar**. México: Universidad Nacional Autónoma, 2000. 70p. (Apostila)

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Poultry**. 9<sup>th</sup> ed. Washington: National Academy of Sciences, 1994. 155p.

OHYA, T.; SATO, S. Effects of dietary antibiotics on intestinal microflora in broiler chickens. **National Institute of Animal Health quarterly**, Tokyo, v. 23, p. 49-60, 1983.

PALMU, L.; CAMELIN, I. The use of competitive exclusion in broilers to reduce the level of salmonella contamination on the farm and at the processing plant. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, p. 1501-1505, 1997.

PANDA, A. K.; REDDY, M. R.; RAMARAO, S. V.; PRAHARAJ, N. K. Effect of dietary supplementation of probiotic on performance and immune response of layers in decline phase of production. **Indian Journal Poultry Science**, v. 35, p. 102-104, 2000a.

PANDA, A. K.; REDDY, M. R.; RAMARAO, S. V.; RAJU, M. V. L. N.; PRAHARAJ, N. K. Growth, carcass characteristics, immunocompetence and response to *Escherichia coli* of broilers fed diets with various levels of probiotic. **Archives Geflugelkd**, [S.l.], v. 64, p. 152-156, 2000b.

PARDUE, S. L.; THAXTON, J. P. Evidence for amelioration of steroid-mediated immunosuppression by ascorbic acid. **Poultry Science**, Champaign, v. 63, p. 1262-1268, 1984.

PARDUE, S. L.; THAXTON, J. P.; BRAKE, J. Role of ascorbic acid in chicks exposed to high environmental temperature. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 58, p. 1511-1516, 1985.

PARMENTIER, H. K.; SIEMONSMA, R.; NIEUWLAND, M. G. B. Immune responses to bovine serum albumin in chicken lines divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. **Poultry Science**, Champaign, v. 73, p. 825-835, 1994.

PATTERSON, J. A.; BURKHOLDER, K. M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, p. 627-631, 2003.

PATTERSON, P. H.; SIEGEL, H. S. Impact of cage density on pullet performance and blood parameters of stress. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, p. 32-40, 1998.

PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A.; OBA, A.; NORKUS, E. A.; KODAWARA, L. M.; LIMA, T. M. A. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 98, n. 547, p. 125-134, 2003.

PEREA, A. T.; ISAÍAS, G. I.; MALDONADO, F. G. Técnicas de medición de estrés em aves. **Veterinaria Mexicana**, México, v. 28, n. 4, p. 345-351, 1997.

PHILLIPS, R. A.; OPITZ, H. M. Pathogenicity and persistence of *Salmonella enteritidis* and egg contamination in normal and infectious bursal disease virus-infected leghorn chicks. **Avian Disease**, Athens, v. 39, p. 778-787, 1995.

PLAVNIK, I.; HURWITZ, S. The performance of broiler chicks during and following a severe feed restriction at an early age. **Poultry Science**, Champaign, v. 64, n. 2, p. 348-355, 1995.

PLAVNIK, I.; YAHAV, S. Effect of environmental temperature on broiler chickens subjected to growth restriction at an early age. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, n. 6, p. 870-872, 1998.

PLUSKE, J.R.; HAMPSON, D.J.; WILLIAMS, I.H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v.51, p.215-236, 1997.

POPE, C. R. Pathology of lymphoid organs with emphasis on immunosuppression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Nouzilly, v. 30, p. 31-44, 1991.

POPPE, C. Salmonella infections in domestic fowl. In: WRAY, C. ; WRAY, A. (ed.). **Salmonella in Domestic Animals**. Wallingford: CABI Publishing, 2000.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington : Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology, 1992. 279p.

PUVADOLPIROV, S.; THAXTON, J. P. Model of physiological stress in chickens 1. Response parameters. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, n. 4, p. 363-369, 2000.

PUTHPONGSIRIPORN, U.; SCHEIDELER, S. E.; SELL, J. L.; BECK, M. M. Effects of vitamin E and C supplementation on performance, in vitro lymphocyte proliferation, and antioxidant status of laying hens during heat stress. **Poultry Science**, Champaign, v. 80, p. 1190-1200, 2001.

QURESHI, M. A.; HAVENSTEIN, G. B. A comparison of the immune performance of a 1991 commercial broiler with a 1957 random bred strain when fed "typical" 1957 and 1991 broiler diets. **Poultry Science**, Champaign, v. 73, p. 1805-1812, 1994.

REALI, E. H. Inteligência artificial na criação de frangos de corte. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 6., 2005, Chapecó. **Anais...** Chapecó, 2005. p. 37-38.

REGNIER, J. A.; KELLEY, K. W; GASKINS, C. T. Acute thermal stressors and synthesis of antibodies in chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 59, p. 985-990, 1980.

RETSKY, K. L.; FREI, B. Vitamin C prevents metal ion-dependent initiation and propagation of lipid peroxidation in human low-density lipoprotein. **Biochemistry and Biophysic Acta**, Amsterdam, v. 3, n. 1257, p. 279-287, 1995.

REVIDATI, F. A.; FERNANDEZ, R. J.; TERRAES, J. C.; SANDOVAL, G. L.; LUCHI, P. E. Modificaciones del peso corporal y indicadores de estrés em pollos parrilleros sometidos a inmovilización y volteo. **Revista Veterinaria da Argentina**, Corrientes, v. 12, n. 1, 2002.

RIBEIRO, A. M. L.; MAGRO, N.; PENZ, Jr. A. M. Granulometria do milho em rações de crescimento de frangos de corte e seu efeito no desempenho e metabolismo. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 1, n. 1, 2002.

RIBEIRO, A. M. L.; RUDNIK, L. Modulação nutricional e resposta imunológica. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, 2003, Cascavel, PR. [Anais...]. [Cascavel : CBNA, 2003].

ROSALES, A. G.; VILLEGAS, P.; LUKERT, P. D.; MOHAMED, A. M.; BROWN, J. Isolation, identification and pathogenicity of two strains of infectious bursal virus. **Avian Disease**, Athens, v. 33, n. 1, p. 35-41, 1989.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; FERREIRA, A. S.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C. **Tabelas Brasileiras para aves e suínos**: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: UFV, 2000. p. 141.

RUCKEBUSH, L. P.; PHANEUP, L. P.; DUNLOP, R. F. **Fisiologia de pequenas y grandes especies**. México: Manual Moderno, 1994. 862p.

RUTZ, F. Aspectos fisiológicos que regulam o conforto térmico das aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1994, Santos. **Anais...** Campinas: FACTA, 1994. p. 99-110.

RUTZ, F. Impacto da nutrição vitamínica sobre a resposta imunológica das aves. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 3., 2002, Chapecó. **Resumos...** Chapecó, 2002. p. 1-15.

RUTZ, F. **Comunicação pessoal**. Porto Alegre, outubro de 2001.

SAS. **SAS (2001) User's Guide (8.2)**. Cary : Statistical Analysis System Institute, 2001.

SAVAGE, T. F.; COTTER, P. F.; ZAKRZEWSKA, E. I. The effect of feeding a mannan oligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgG and bile IgA of Wrolstad MW male turkeys. **Poultry Science**, Champaign, v. 75, supl. 1, abstr. S129., 1996.

SCHWARZ, K.K.; FRANCO, S.G.; FEDALTO, L.M.; BORGES, S.A.; SILVA, A.V. da S.; PEDROSO, A.C. Efeitos de antimicrobianos, probióticos, prebióticos e simbióticos sobre o desempenho e morfometria do jejuno de frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v.4, supl.75, 2002.

SCOTT, T. R.; DUNNINGTON, E. A.; SIEGEL, P. B. *Brucella abortus* antibody response of White leghorn chickens selected for high and low antibody responsiveness to sheep erythrocytes. **Poultry Science**, Champaign, v. 73, p. 346-349, 1994.

SELL, J. L. Physiological limitations and potential for improvement in gastrointestinal tract function of poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 5, p. 96-101, 1996.

SEO, K. H.; HOLT, P. S.; GAST, R. K.; HOFACRET, C. L. Elimination of early *Salmonella enteritidis* infection after treatment with competitive-exclusion culture and enrofloxacin in experimentally infected chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, p. 1408-1413, 2000.

SIEGEL, P. B. Stress and immunity. In: NATIONAL MEETING ON POULTRY HEALTH AND CONDEMNATIONS, 14., 1989, College Park. **Proceedings...** College Park, 1989. p. 157-160.

SILVA, J.R.L. e. Sistema imunitário das mucosas: introdução ao tema. In: ELIA, C.C.S.; SOUZA, H.S.P. **Imunologia da mucosa intestinal: da bancada ao leito**. Rio de Janeiro : Atheneu, 2001.

SILVA, E.N. da. Probióticos e prebióticos na alimentação de aves. In: CONFERENCIA APINCO 2000 DE CIENCIA E TECNOLOGIA AVICOLAS, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2000. v.2, p.241-251.

SMITH, M. O. Parts yield of broilers reared under cycling high temperatures. **Poultry Science**, Champaign, v. 72, n. 10, p. 1146-1150, 1993.

SMITH, H. W.; TUCKER, J. F. The virulence of *Salmonella* strains for chickens: their excretion by infected chickens. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v. 84, p.479-488, 1980.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K. A.; NEWMAN, K. E. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, p. 205-211, 2000.

SUBBA RAO, D. S. V.; GLICK, B. Effects of cold exposure on the immune response of chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 56, p. 992-996, 1977.

SUZUKI, S. Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* in poultry in poltry. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v. 21, p. 89-105, 1994.

TALEBI, A.; TORGERSON, P. R.; MULCAHY, G. Optimal conditions for measurement of blastogenic responses of chickens to concanavalin a in whole blood assays. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Nouzilly, v. 46, p. 293-301, 1995.

TEETER, R. G.; SMITH, M. O.; MURRAY, E. Force feeding methodology and equipment for poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 63, n. 4, p. 573-575, 1984.

TEMIM, S.; CHAGNEAU, A. M.; GUILLAUMIN, S; MICHAEL, J.; PERESSON, R.; TESSERAUD, S. Does excess dietary protein improve growth performance and carcass characteristics in heat-exposed chickens? **Poultry Science**, Champaign, v. 79, n. 2, p. 312-317, 2000.

TENGERDY, R.P. Vitamin E, immune response and disease resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.570, n.1, p. 335-344, 1989.

THAXTON, P.; SIEGEL, H. S. Immunodepression in young chickens by high environmental temperature. **Poultry Science**, Champaign, v. 49, p. 202-205, 1970.

THAXTON, P.; SIEGEL, H. S. Depression of secondary immunity by high environmental temperature. **Poultry Science**, Champaign, v. 51, p. 1519-1526, 1972.

THAXTON, P.; SIEGEL, H. S. Modification of high temperature and ACTH-induced immunodepression by metyrapone. **Poultry Science**, Champaign, v. 52, p. 618-624, 1973.

THONG, K.; NGEOW, Y.; ALTWEGG, M.; NAVARATNAM, P.; PANG, T. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, n.5, p.1070-1074, 1995.

THORNTON, P. A. Increased environmental temperature influences on ascorbic acid activity in the domestic fowl. **Federation Proceedings**, [S.I.], v.20, p.210, Abstract, 1961.

TOURNUT, J. R. Probiotics. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. p.179-199.

VAN ASTEN, A. J. A. M.; VAN DIJK, J. E. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, The Netherlands, v. 44, p. 251-259, 2005.

VAN ASTEN, A. J. A. M.; KONINKX, J. F. J. G.; VAN DIJK, J. E. *Salmonella* entry: M cells versus absorptive enterocytes. Letter to the editor. **Veterinary Microbiology**, The Netherlands, v. 108, p. 149-152, 2005.

WEINSTOCK, D.; SCHAT, K. A.; CALNEK, B. W. Cytotoxic T lymphocytes in reticuloendotheliosis virus infected chickens. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 19, n. 2, p. 267-272, 1989.

WELLINGHAUSEN, N.; KIRCHNER, H; RINK, L. The immunobiology of zinc. **Immunology Today**, London, v. 18, n. 11, p. 519-521, 1997.

YAMAUCHI, K. E.; ISSHIKI, Y. Scanning electron microscopic observations on the intestinal villi in growing white leghorn and broiler chickens from 1 to 30 days of age. **British Poultry Science**, Oxfordshire, v. 32, p. 67-78, 1991.

ZIPRIN, R. L.; CORRIER, D. E.; ELISSALDE, M. H. Maturation of resistance to salmonellosis in newly hatched chicks: inhibition by cyclosporine. **Poultry Science**, Champaign , v. 68, p. 1637-1642, 1989.

ZULKIFLI, I.; DUNNINGTON, E. A.; GROSS, W. B.; SIEGEL, P. B. Inhibition of adrenal steroidogenesis, food restriction and acclimation of high ambient temperatures in chickens. **British Poultry Science**, Oxfordshire, v. 35, p. 417-426, 1994.

ZULKIFLI, I.; ABDULLAH, N.; MOHD AZRIN, N.; HO, Y. W. Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing lactobacillus cultures and oxytetracycline under heat stress conditions. **British Poultry Science**, Oxfordshire, v. 40, p. 593-597, 2000.

## **6. APÊNDICES**

APÊNDICE 1. Análise de variância do efeito de dieta (suplementação vitamínica e mineral), ambiente (EPC e ATN) e inoculação com BSA no ganho médio de peso (GMP) de frangos de corte no período de 1 a 35 dias

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	3	0,0106	0,0035	0,52	0,67
Amb	1	0,2667	0,2667	39,43	<0,0001
Inoc	1	0,0031	0,0031	0,46	0,50
Erro	50	0,3382	0,0068		
total	55	0,6231			

APÊNDICE 2. Análise de variância do efeito de dieta (suplementação vitamínica e mineral), ambiente (EPC e ATN) e inoculação com BSA no consumo médio de ração (CMR) de frangos de corte no período de 1 a 35 dias

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	3	0,1398	0,0466	5,20	0,003
Amb	1	0,4866	0,4866	54,28	<0,0001
Inoc	1	0,0195	0,0195	2,18	0,15
Erro	50	0,4482	0,0090		
total	55	1,0939			

APÊNDICE 3. Análise de variância do efeito de dieta (suplementação vitamínica e mineral), ambiente (EPC e ATN) e inoculação com BSA na conversão alimentar (CA) de frangos de corte no período de 1 a 35 dias

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	3	0,0406	0,0135	8,76	<0,0001
Amb	1	0,0034	0,0034	2,23	0,14
Inoc	1	0,0004	0,0004	0,27	0,60
Erro	50	0,0772	0,0015		
total	55	0,1222			

APÊNDICE 4. Análise de variância do efeito de dieta (suplementação vitamínica e mineral), ambiente (EPC e ATN) e inoculação com BSA na viabilidade de frangos de corte no período de 1 a 35 dias

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	3	77,10	25,70	0,38	0,76
Amb	1	61,25	61,25	0,91	0,34
Inoc	1	24,64	24,64	0,37	0,55
Erro	62	4150,87	66,95		
total	67	4310,63			

APÊNDICE 5. Análise de variância do efeito de dieta (suplementação vitamínica e mineral), ambiente (EPC e ATN) e inoculação com BSA nos valores de densidade ótica no soro de frangos de corte aos 35 dias

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	3	1,3769	0,4590	1,66	0,18
Amb	1	1,1619	1,1619	4,21	0,04
Inoc	1	10,2323	10,2323	37,06	<0,0001
Ero	62	17,1168	0,2761		
total	67	30,21			

APÊNDICE 6. Análise de variância do efeito de dieta (suplementação vitamínica e mineral), ambiente (EPC e ATN) e inoculação com BSA no peso de bursa de frangos de corte aos 35 dias

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	3	7,98	2,66	1,89	0,13
Amb	1	63,64	63,34	45,10	<0,0001
Inoc	1	13,01	13,01	9,26	0,003

Erro	130	182,58	1,40
total	135	257,49	

APÊNDICE 7. Análise de variância do efeito de dieta (suplementação vitamínica e mineral), ambiente (EPC e ATN) e inoculação com BSA no rendimento de bursa de frangos de corte aos 35 dias

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	3	0,019	0,0064	2,24	0,09
Amb	1	0,082	0,0821	28,48	<0,0001
Inoc	1	0,027	0,0267	9,28	0,003
Erro	130	0,375	0,022		
total	135	0,487			

APÊNDICE 8. Análise de variância do efeito de dieta (suplementação vitamínica e mineral), ambiente (EPC e ATN) e inoculação com BSA no peso de baço de frangos de corte aos 35 dias

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	3	0,29	0,10	0,24	0,87
Amb	1	13,90	13,90	34,52	<0,0001
Inoc	1	0,07	0,07	0,17	0,68
Erro	130	52,35	0,40		
total	135	67,59			

APÊNDICE 9. Análise de variância do efeito de dieta (suplementação vitamínica e mineral), ambiente (EPC e ATN) e inoculação com BSA no rendimento de baço de frangos de corte aos 35 dias

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	3	0,00008	0,0003	0,33	0,80
Amb	1	0,0178	0,0178	21,58	<0,0001
Inoc	1	0,00009	0,00009	0,12	0,73
Erro	130	0,1071	0,0008		
total	135	0,1272			

APÊNDICE 10. Análise de variância do efeito de dieta (suplementação vitamínica e mineral), ambiente (EPC e ATN) e inoculação com BSA no número de heterófilos de frangos de corte aos 35 dias

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	3	31600248	10533416	0,35	0,79
Amb	1	88101791	88101791	2,95	0,09
Inoc	1	45896	45896	0,00	0,97
Erro	121	3609638655	29831724		
total	126	3731355953			

APÊNDICE 11. Análise de variância do efeito de dieta (suplementação vitamínica e mineral), ambiente (EPC e ATN) e inoculação com BSA no número de linfócitos de frangos de corte aos 35 dias

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	3	14348283	4782761	0,21	0,89
Amb	1	4819737	4819737	0,21	0,64
Inoc	1	6066969	6066969	0,21	0,60
Erro	121	2722446394	22499557		
total	126	2747333670			

APÊNDICE 12. Análise de variância do efeito de dieta (suplementação vitamínica e mineral), ambiente (EPC e ATN) e inoculação com BSA na relação H/L de frangos de corte aos 35 dias

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	3	0,3875	0,1291	0,86	0,46

Amb	1	0,6546	0,6546	4,34	0,04
Inoc	1	0,0479	0,0479	0,32	0,57
Erro	121	18,2436	0,1508		
total	126	19,3597			

APÊNDICE 13. Análise de variância do efeito da dieta (variando em aditivos alimentares) sobre o peso médio aos 28 dias (PM28) de frangos de corte desafiados com salmonella

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	4	4790,7	1197,2	0,36	0,83
Erro	35	115722,5	3306,3		
total	39	120513,2			

APÊNDICE 14. Análise de variância do efeito da dieta (variando em aditivos alimentares) sobre o ganho médio de peso de 1 a 28 dias (GMP1-28) de frangos de corte desafiados com salmonella

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	4	4887,6	1221,9	0,37	0,83
Erro	35	115401,0	3297,2		
total	39	120288,7			

APÊNDICE 15. Análise de variância do efeito da dieta (variando em aditivos alimentares) sobre o consumo médio de ração de 1 a 28 dias (CMR1-28) de frangos de corte desafiados com salmonella

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	4	14639,1	3659,8	0,40	0,81
Erro	35	323273,1	9236,4		
total	39	337912,3			

APÊNDICE 16. Análise de variância do efeito da dieta (variando em aditivos alimentares) sobre a conversão alimentar de 1 a 28 dias (CA1-28) de frangos de corte desafiados com salmonella

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	4	0,0014	0,0003	0,36	0,83
Erro	35	0,0338	0,0010		
total	39	0,0352			

APÊNDICE 17. Análise de variância do efeito da dieta (variando em aditivos alimentares) sobre valores de densidade ótica aos 15 dias (DO15) de frangos de corte desafiados com salmonella

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	4	0,1345	0,3336	1,87	0,14
Erro	35	0,6309	0,0180		
total	39	0,7655			

APÊNDICE 18. Análise de variância do efeito da dieta (variando em aditivos alimentares) sobre valores de densidade ótica aos 29 dias (DO29) de frangos de corte desafiados com salmonella

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	4	0,0164	0,0041	0,30	0,87
Erro	34	0,4643	0,0136		
total	38	0,4807			

APÊNDICE 19. Análise de variância do efeito da dieta (variando em aditivos alimentares) sobre o comprimento de vilosidades (CV) aos 15 dias de frangos de corte desafiados com salmonella

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	4	87447,7	20611,9	1,67	0,19
Erro	22	270814	12309,7		
total	26				

APÊNDICE 20. Análise de variância do efeito da dieta (variando em aditivos alimentares) sobre a profundidade de cripta (PC) aos 15 dias de frangos de corte desafiados com salmonella

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	4	1815,3	153,8	2,93	0,04
Erro	22	3408,06	154,9		
total	26				

APÊNDICE 21. Análise de variância do efeito da dieta (variando em aditivos alimentares) sobre o comprimento de vilosidades (CV) aos 29 dias de frangos de corte desafiados com salmonella

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	4	32563,9	8140,9	1,26	0,30
Erro	37	238908,8	6456,9		
total	41				

APÊNDICE 22. Análise de variância do efeito da dieta (variando em aditivos alimentares) sobre a profundidade de cripta (PC) aos 29 dias de frangos de corte desafiados com salmonella

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	4	388,77	97,19	1,00	0,42
Erro	37	3602,62	97,37		
total	41				

APÊNDICE 23. Análise de variância do efeito da dieta (variando em aditivos alimentares) sobre a viabilidade de 1 a 28 dias de frangos de corte desafiados com salmonella

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Prob>F
Dieta	4	258,40	64,60	0,76	0,56
Erro	35	2961,5	84,61		
total	39				

## **7. VITA**

Lilian Kratz Vogt, filha de Hugo Luiz Kratz e Maria Teresa Ribeiro Kratz, nasceu em 21 de junho de 1975, na cidade de Pelotas, RS.

Estudou no Instituto de Educação Assis Brasil, onde cursou o primeiro grau e, no Colégio Gonzaga, cursando o segundo grau.

Em 1993 ingressou na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, formando-se em 1998.

No ano de 1999 ingressou no curso de Mestrado em Zootenia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, com conclusão em 2001, quando ingressou na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, nível doutorado.

Atualmente é professora da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

## DADOS DE DESEMPENHO (CAPÍTULO 2)

TRAT	REPET	AMB	INOC	PMI	PM07	GMP07	CMR07	CA07	PM14	PM14C	GMP14	GMP114	CMR14	CA14	PM21	GMP21	CMR21	CA21
1	1	2	1	0,045	0,124	0,079	0,100	1,26	0,373	0,365	0,249	0,328	0,335	1,34	0,824	0,459	0,611	1,33
1	2	2	1	0,046	0,144	0,098	0,118	1,21	0,400	0,405	0,257	0,355	0,353	1,38	0,865	0,460	0,622	1,35
1	3	2	1	0,043	0,152	0,109	0,124	1,14	0,367	0,405	0,215	0,324	0,333	1,55	0,841	0,436	0,587	1,35
1	4	2	1	0,044	0,141	0,097	0,117	1,21	0,410	0,435	0,269	0,366	0,365	1,36	0,861	0,426	0,628	1,48
1	5	2	1	0,044	0,147	0,103	0,127	1,23	0,423	0,430	0,277	0,380	0,364	1,32	0,888	0,458	0,634	1,38
1	6	2	1	0,044	0,159	0,116	0,128	1,11	0,383	0,385	0,224	0,340	0,328	1,46	0,880	0,495	0,650	1,31
1	7	2	0	0,042	0,153	0,110	0,123	1,11	0,433	0,445	0,281	0,391	0,415	1,48	0,865	0,420	0,614	1,46
1	8	2	0	0,043	0,167	0,124	0,135	1,08	0,452	0,455	0,285	0,409	0,376	1,55	0,913	0,458	0,650	1,42
1	9	2	0	0,042	0,145	0,103	0,126	1,22	0,380	0,375	0,235	0,338	0,355	1,51	0,811	0,436	0,575	1,32
1	10	1	1	0,042	0,127	0,085	0,101	1,19	0,310	0,315	0,183	0,268	0,268	1,46	0,765	0,450	0,600	1,33
1	11	1	1	0,045	0,157	0,112	0,128	1,14	0,412	0,440	0,255	0,367	0,298	1,30	0,886	0,446	0,640	1,44
1	12	1	1	0,043	0,126	0,084	0,101	1,21	0,373	0,380	0,247	0,331	0,321	1,30	0,816	0,436	0,608	1,39
1	13	1	1	0,045	0,165	0,120	0,137	1,14	0,447	0,455	0,282	0,402	0,371	1,32	0,953	0,498	0,697	1,40
1	14	1	1	0,043	0,172	0,129	0,145	1,12	0,443	0,445	0,272	0,401	0,384	1,41	0,940	0,495	0,674	1,36
1	15	1	0	0,045	0,169	0,125	0,137	1,10	0,443	0,460	0,274	0,399	0,369	1,35	0,969	0,509	0,705	1,39
1	16	1	0	0,045	0,157	0,112	0,133	1,19	0,430	0,440	0,274	0,386	0,366	1,34	0,866	0,426	0,657	1,54
1	17	1	0	0,043	0,144	0,101	0,115	1,14	0,417	0,435	0,273	0,374	0,358	1,31	0,904	0,469	0,676	1,44
2	1	2	1	0,045	0,139	0,095	0,116	1,22	0,413	0,425	0,274	0,369	0,350	1,28	0,915	0,490	0,653	1,33
2	2	2	1	0,043	0,157	0,114	0,137	1,21	0,420	0,415	0,264	0,378	0,376	1,43	0,909	0,494	0,666	1,35
2	3	2	1	0,043	0,143	0,101	0,121	1,20	0,393	0,410	0,250	0,351	0,351	1,40	0,847	0,437	0,602	1,38
2	4	2	1	0,045	0,163	0,118	0,134	1,14	0,443	0,440	0,281	0,399	0,363	1,29	0,892	0,452	0,638	1,41
2	5	2	1	0,044	0,157	0,113	0,132	1,17	0,373	0,385	0,216	0,329	0,351	1,62	0,880	0,495	0,650	1,31
2	6	2	1	0,043	0,166	0,123	0,142	1,15	0,460	0,475	0,294	0,417	0,383	1,30	0,948	0,473	0,669	1,42
2	7	2	0	0,043	0,148	0,105	0,126	1,20	0,417	0,425	0,268	0,373	0,351	1,31	0,822	0,397	0,566	1,42
2	8	2	0	0,044	0,139	0,095	0,115	1,22	0,407	0,430	0,268	0,363	0,369	1,38	0,896	0,466	0,630	1,35
2	9	2	0	0,045	0,138	0,092	0,112	1,21	0,400	0,415	0,263	0,355	0,380	1,45	0,855	0,440	0,597	1,36
2	10	1	1	0,046	0,158	0,112	0,130	1,16	0,427	0,425	0,269	0,381	0,368	1,37	0,879	0,454	0,659	1,45
2	11	1	1	0,046	0,151	0,105	0,124	1,17	0,413	0,425	0,263	0,368	0,346	1,32	0,880	0,455	0,652	1,44
2	12	1	1	0,044	0,157	0,113	0,139	1,23	0,407	0,435	0,250	0,363	0,346	1,39	0,917	0,482	0,658	1,36
2	13	1	1	0,044	0,162	0,118	0,129	1,09	0,360	0,360	0,198	0,316	0,306	1,54	0,876	0,516	0,661	1,28
2	14	1	1	0,046	0,127	0,081	0,106	1,30	0,376	0,395	0,249	0,330	0,320	1,43	0,836	0,441	0,584	1,33
2	15	1	0	0,045	0,145	0,100	0,114	1,14	0,403	0,445	0,258	0,358	0,343	1,33	0,840	0,395	0,677	1,71
2	16	1	0	0,044	0,132	0,088	0,105	1,19	0,373	0,400	0,242	0,330	0,335	1,39	0,855	0,455	0,643	1,41

2	17	1	0	0,044	0,150	0,106	0,120	1,14	0,437	0,455	0,287	0,393	0,359	1,25	0,910	0,455	0,665	1,46
3	1	2	1	0,043	0,131	0,089	0,109	1,23	0,363	0,355	0,232	0,321	0,317	1,36	0,775	0,420	0,551	1,31
3	2	2	1	0,043	0,136	0,093	0,115	1,23	0,393	0,425	0,258	0,351	0,341	1,32	0,879	0,454	0,632	1,39
3	3	2	1	0,042	0,150	0,108	0,127	1,18	0,403	0,410	0,254	0,362	0,339	1,34	0,880	0,470	0,610	1,30
3	4	2	1	0,046	0,131	0,085	0,105	1,23	0,373	0,380	0,242	0,327	0,347	1,43	0,799	0,419	0,624	1,49
3	5	2	1	0,043	0,161	0,118	0,138	1,16	0,448	0,460	0,287	0,405	0,374	1,47	0,859	0,399	0,579	1,45
3	6	2	1	0,042	0,174	0,132	0,150	1,14	0,450	0,460	0,277	0,409	0,352	1,27	0,918	0,458	0,635	1,39
3	7	2	0	0,043	0,137	0,094	0,109	1,15	0,410	0,410	0,273	0,367	0,345	1,26	0,814	0,404	0,570	1,41
3	8	2	0	0,046	0,151	0,105	0,127	1,21	0,343	0,350	0,193	0,298	0,330	1,71	0,814	0,464	0,569	1,23
3	9	2	0	0,042	0,151	0,109	0,130	1,19	0,420	0,445	0,269	0,378	0,350	1,30	0,786	0,341	0,615	1,80
3	10	1	1	0,045	0,175	0,130	0,144	1,11	0,453	0,465	0,279	0,409	0,374	1,34	0,905	0,440	0,690	1,57
3	11	1	1	0,044	0,130	0,086	0,105	1,22	0,377	0,385	0,247	0,333	0,314	1,27	0,829	0,444	0,637	1,43
3	12	1	1	0,045	0,140	0,095	0,119	1,26	0,393	0,425	0,254	0,349	0,344	1,36	0,925	0,500	0,689	1,38
3	13	1	1	0,044	0,163	0,119	0,132	1,11	0,430	0,430	0,267	0,386	0,351	1,32	0,904	0,474	0,646	1,36
3	14	1	1	0,042	0,145	0,103	0,120	1,16	0,407	0,420	0,262	0,365	0,333	1,27	0,894	0,474	0,646	1,36
3	15	1	0	0,045	0,142	0,097	0,118	1,22	0,413	0,440	0,272	0,369	0,341	1,26	0,896	0,456	0,653	1,43
3	16	1	0	0,044	0,168	0,125	0,138	1,11	0,460	0,470	0,292	0,417	0,372	1,27	0,938	0,468	0,681	1,45
3	17	1	0	0,045	0,149	0,104	0,115	1,10	0,427	0,430	0,278	0,382	0,359	1,29	0,880	0,450	0,633	1,41
4	1	2	1	0,045	0,144	0,099	0,115	1,17	0,427	0,450	0,283	0,382	0,347	1,23	0,893	0,443	0,618	1,40
4	2	2	1	0,043	0,145	0,102	0,115	1,14	0,417	0,425	0,272	0,374	0,351	1,29	0,910	0,485	0,617	1,27
4	3	2	1	0,045	0,151	0,106	0,119	1,13	0,420	0,420	0,269	0,375	0,351	1,30	0,885	0,465	0,616	1,33
4	4	2	1	0,042	0,158	0,116	0,128	1,10	0,430	0,450	0,272	0,388	0,345	1,27	0,879	0,429	0,587	1,37
4	5	2	1	0,046	0,181	0,135	0,141	1,04	0,473	0,480	0,292	0,427	0,367	1,25	0,962	0,482	0,660	1,37
4	6	2	1	0,044	0,172	0,129	0,145	1,13	0,467	0,490	0,294	0,423	0,362	1,23	0,968	0,478	0,668	1,40
4	7	2	0	0,044	0,169	0,125	0,142	1,13	0,460	0,475	0,291	0,416	0,372	1,28	0,943	0,468	0,636	1,36
4	8	2	0	0,044	0,151	0,108	0,135	1,25	0,417	0,435	0,266	0,374	0,384	1,45	0,963	0,528	0,702	1,33
4	9	2	0	0,045	0,152	0,107	0,125	1,18	0,413	0,445	0,262	0,369	0,353	1,35	0,936	0,491	0,666	1,36
4	10	1	1	0,046	0,155	0,109	0,131	1,20	0,417	0,435	0,262	0,371	0,378	1,44	0,930	0,495	0,667	1,35
4	11	1	1	0,045	0,165	0,121	0,125	1,04	0,460	0,475	0,295	0,416	0,376	1,28	0,972	0,497	0,686	1,38
4	12	1	1	0,044	0,145	0,100	0,115	1,15	0,417	0,440	0,272	0,372	0,344	1,26	0,922	0,482	0,666	1,38
4	13	1	1	0,042	0,135	0,093	0,104	1,12	0,387	0,390	0,252	0,345	0,314	1,25	0,840	0,450	0,614	1,37
4	14	1	1	0,044	0,152	0,108	0,122	1,13	0,423	0,425	0,271	0,379	0,353	1,30	0,849	0,424	0,609	1,44
4	15	1	0	0,044	0,137	0,093	0,116	1,24	0,400	0,430	0,263	0,356	0,343	1,30	0,878	0,448	0,655	1,46
4	16	1	0	0,046	0,140	0,094	0,111	1,18	0,410	0,425	0,270	0,364	0,339	1,26	0,872	0,447	0,628	1,40
4	17	1	0	0,045	0,157	0,112	0,141	1,26	0,423	0,435	0,266	0,378	0,359	1,35	0,929	0,494	0,670	1,36

TRAT      REPET      AMB      INOC      PM28      GMP28      CMR28      CA28      PM35      GMP35      GMP1435      CMR35      CA35

1	1	2	1	1,385	0,562	1,111	1,98	1,980	0,595	1,616	1,053	1,77
1	2	2	1	1,430	0,565	1,097	1,94	1,985	0,555	1,580	0,994	1,79
1	3	2	1	1,430	0,589	1,169	1,98	2,100	0,670	1,695	1,092	1,63
1	4	2	1	1,410	0,549	1,111	2,02	1,945	0,535	1,510	1,048	1,96
1	5	2	1	1,430	0,542	1,122	2,07	2,015	0,585	1,585	1,167	2,00
1	6	2	1	1,520	0,641	1,181	1,84	2,165	0,645	1,781	1,009	1,56
1	7	2	0	1,455	0,590	1,157	1,96	1,915	0,460	1,470	1,045	2,27
1	8	2	0	1,555	0,643	1,166	1,81	2,170	0,615	1,716	1,007	1,64
1	9	2	0	1,410	0,599	1,165	1,94	2,010	0,600	1,635	1,039	1,73
1	10	1	1	1,350	0,585	1,144	1,96	2,025	0,675	1,710	1,131	1,68
1	11	1	1	1,510	0,625	1,183	1,89	2,235	0,725	1,796	1,186	1,64
1	12	1	1	1,450	0,634	1,224	1,93	2,135	0,685	1,755	1,179	1,72
1	13	1	1	1,545	0,592	1,169	1,97	2,315	0,770	1,860	1,291	1,68
1	14	1	1	1,545	0,605	1,180	1,95	2,293	0,748	1,848	1,218	1,63
1	15	1	0	1,545	0,576	1,163	2,02	2,315	0,770	1,855	1,290	1,68
1	16	1	0	1,495	0,629	1,120	1,78	2,227	0,732	1,787	1,207	1,65
1	17	1	0	1,495	0,591	1,181	2,00	2,180	0,685	1,745	1,234	1,80
2	1	2	1	1,550	0,635	1,025	1,61	2,200	0,650	1,775	1,137	1,75
2	2	2	1	1,525	0,616	1,034	1,68	2,110	0,585	1,695	1,108	1,89
2	3	2	1	1,350	0,503	0,973	1,93	1,895	0,545	1,485	0,982	1,80
2	4	2	1	1,475	0,584	0,993	1,70	1,985	0,510	1,546	0,997	1,95
2	5	2	1	1,490	0,610	1,056	1,73	2,150	0,660	1,765	1,111	1,68
2	6	2	1	1,545	0,597	1,015	1,70	2,170	0,625	1,695	1,094	1,75
2	7	2	0	1,507	0,684	1,183	1,73	2,113	0,607	1,688	1,090	1,80
2	8	2	0	1,535	0,639	1,051	1,64	2,155	0,620	1,725	1,094	1,76
2	9	2	0	1,435	0,580	1,021	1,76	1,995	0,560	1,580	1,012	1,81
2	10	1	1	1,485	0,606	1,022	1,69	2,090	0,605	1,665	1,125	1,86
2	11	1	1	1,505	0,626	1,057	1,69	2,180	0,675	1,756	1,168	1,73
2	12	1	1	1,525	0,608	1,075	1,77	2,260	0,735	1,825	1,219	1,66
2	13	1	1	1,520	0,644	1,076	1,67	2,250	0,730	1,890	1,223	1,68
2	14	1	1	1,475	0,639	1,114	1,74	2,190	0,715	1,795	1,173	1,64
2	15	1	0	1,555	0,715	1,062	1,49	2,290	0,735	1,845	1,225	1,67
2	16	1	0	1,460	0,605	1,060	1,75	2,095	0,635	1,695	1,149	1,81
2	17	1	0	1,510	0,600	1,078	1,80	2,280	0,770	1,825	1,272	1,65
3	1	2	1	1,475	0,700	1,073	1,53	2,000	0,525	1,645	1,087	2,07
3	2	2	1	1,475	0,596	1,011	1,70	1,995	0,520	1,570	1,054	2,03
3	3	2	1	1,435	0,556	1,029	1,85	2,050	0,615	1,641	1,056	1,72
3	4	2	1	1,405	0,607	1,066	1,76	2,030	0,625	1,651	1,090	1,74

3	5	2	1	1,405	0,546	1,037	1,90	1,960	0,555	1,500	1,053	1,90
3	6	2	1	1,480	0,563	1,012	1,80	2,133	0,653	1,674	0,991	1,85
3	7	2	0	1,380	0,566	1,057	1,87	2,045	0,665	1,635	1,116	1,68
3	8	2	0	1,400	0,586	1,072	1,83	1,975	0,575	1,625	1,039	1,81
3	9	2	0	1,490	0,704	1,035	1,47	2,075	0,585	1,630	1,030	1,76
3	10	1	1	1,555	0,650	1,037	1,60	2,287	0,732	1,822	1,249	1,71
3	11	1	1	1,450	0,621	1,071	1,72	2,120	0,670	1,735	1,210	1,81
3	12	1	1	1,510	0,585	1,049	1,79	2,255	0,745	1,830	1,280	1,72
3	13	1	1	1,510	0,607	1,067	1,76	2,120	0,610	1,691	1,093	1,79
3	14	1	1	1,530	0,636	1,063	1,67	2,180	0,650	1,760	1,127	1,73
3	15	1	0	1,505	0,610	1,083	1,78	2,175	0,670	1,736	1,227	1,83
3	16	1	0	1,570	0,632	1,049	1,66	2,275	0,705	1,805	1,276	1,81
3	17	1	0	1,490	0,610	1,104	1,81	2,180	0,690	1,750	1,217	1,76
4	1	2	1	1,493	0,601	1,082	1,80	1,960	0,467	1,511	1,319	2,83
4	2	2	1	1,500	0,590	1,007	1,71	2,060	0,560	1,635	1,038	1,85
4	3	2	1	1,460	0,576	1,028	1,78	2,025	0,565	1,606	1,029	1,82
4	4	2	1	1,420	0,541	0,987	1,82	1,855	0,435	1,405	0,903	2,07
4	5	2	1	1,540	0,578	1,003	1,74	2,073	0,533	1,593	0,984	1,94
4	6	2	1	1,565	0,598	1,024	1,71	2,190	0,625	1,701	1,115	1,78
4	7	2	0	1,535	0,592	1,026	1,73	2,093	0,558	1,618	0,964	2,05
4	8	2	0	1,560	0,598	1,034	1,73	2,110	0,550	1,676	1,120	2,04
4	9	2	0	1,570	0,634	1,046	1,65	2,190	0,620	1,745	1,138	1,84
4	10	1	1	1,550	0,620	1,060	1,71	2,315	0,765	1,880	1,241	1,62
4	11	1	1	1,580	0,608	1,050	1,73	2,360	0,780	1,885	1,281	1,64
4	12	1	1	1,525	0,603	1,045	1,73	2,180	0,655	1,740	1,113	1,70
4	13	1	1	1,440	0,600	1,056	1,76	2,120	0,680	1,730	1,171	1,72
4	14	1	1	1,470	0,621	1,083	1,74	2,105	0,635	1,680	1,154	1,82
4	15	1	0	1,520	0,642	1,082	1,69	2,285	0,765	1,855	1,280	1,67
4	16	1	0	1,470	0,598	1,042	1,74	2,045	0,575	1,620	1,080	1,88
4	17	1	0	1,545	0,617	1,066	1,73	2,285	0,740	1,851	1,237	1,67

### DADOS DE MORTALIDADE (CAPÍTULO 2)

TRAT	REPET	AMB	INOC	MORT07	mortal07	MORT14	mortal14	MORT114	mortal114	MORT21	mortal21
1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0

1	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	6	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	8	2	0	0	0	1	16,67	1	16,67	0	0
1	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	11	1	1	0	0	1	16,67	1	16,67	0	0
1	12	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	13	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	14	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	6	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	7	2	0	0	0	0	0	0	0	1	25
2	8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	11	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	12	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	13	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	14	1	1	1	16,67	0	0	1	0	0	0
2	15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	5	2	1	1	16,67	0	0	1	0	0	0

3	6	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	11	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	12	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	13	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	14	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	16	1	0	0	0	1	16,67	1	0	0	0	0
3	17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	25
4	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	6	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	11	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	12	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	13	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	14	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TRAT	REPET	AMB	INOC	MORT28	mortal28	MORT35	mortal35	MORT1435	mortal1435	MORT135	mortal135
1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0

1	6	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16,67
1	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	11	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	16,67
1	12	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	13	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	14	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	16	1	0	1	25	0	0	1	25	1	1	25
1	17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	6	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	7	2	0	0	0	0	0	1	25	1	1	25
2	8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	11	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	12	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	13	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	14	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2	15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
3	6	2	1	0	0	1	25	1	25	1	1	25
3	7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	10	1	1	1	25	0	0	1	25	1	25	1	25			
3	11	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
3	12	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
3	13	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
3	14	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
3	15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
3	16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0			
3	17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	1	2	1	0	0	0	0	1	25	1	25	1	25			
4	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	5	2	1	0	0	1	25	1	25	1	25	1	25			
4	6	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	7	2	0	0	0	1	25	1	25	1	25	1	25			
4	8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	10	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	11	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	12	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	13	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	14	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

### DADOS DE VIABILIDADE (CAPÍTULO 2)

TRAT	REPET	AMB	MORT07	mortal07	viab07	MORT14	mortal14	viab14	MORT114	mortal114	viab114	MORT21	mortal21	viab21	MORT28	mortal28	viab28
1	1	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	2	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	3	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	4	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	5	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	6	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100

1	7	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	8	2	0	0	100	1	16,67	83,33	1	16,67	83,33	0	0	100	0	0	100
1	9	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	10	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	11	1	0	0	100	1	16,67	83,33	1	16,67	83,33	0	0	100	0	0	100
1	12	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	13	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	14	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	15	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	16	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	1	25	75
1	17	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	1	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	2	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	3	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	4	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	5	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	6	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	7	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	1	25	75	0	0	100
2	8	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	9	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	10	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	11	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	12	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	13	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	14	1	1	16,67	83,33	0	0	100	1	0	100	0	0	100	0	0	100
2	15	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	16	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	17	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	1	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	2	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	3	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	4	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	5	2	1	16,67	83,33	0	0	100	1	0	100	0	0	100	0	0	100
3	6	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	7	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	8	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	9	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100

3	10	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	1	25	75
3	11	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	12	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	13	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	14	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	15	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	16	1	0	0	100	1	16,67	83,33	1	0	100	0	0	100	0	0	100
3	17	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	1	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	1	25	75	0	0	100
4	2	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	3	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	4	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	5	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	6	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	7	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	8	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	9	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	10	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	11	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	12	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	13	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	14	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	15	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	16	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	17	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100

TRAT	REPET	AMB	MORT35	mortal35	viab35	MORT1435	mortal1435	viab1435	MORT135	mortal135	viab135
1	1	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	2	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	3	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	4	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	5	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	6	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	7	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	8	2	0	0	100	0	0	100	1	16,67	83,33
1	9	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100

1	10	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	11	1	0	0	100	0	0	100	1	16,67	83,33
1	12	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	13	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	14	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	15	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
1	16	1	0	0	100	1	25	75	1	25	75
1	17	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	1	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	2	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	3	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	4	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	5	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	6	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	7	2	0	0	100	1	25	75	1	25	75
2	8	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	9	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	10	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	11	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	12	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	13	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	14	1	0	0	100	0	0	100	1	0	100
2	15	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	16	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
2	17	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	1	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	2	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	3	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	4	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	5	2	0	0	100	0	0	100	1	0	100
3	6	2	1	25	75	1	25	75	1	25	75
3	7	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	8	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	9	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	10	1	0	0	100	1	25	75	1	25	75
3	11	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	12	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100

3	13	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	14	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	15	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	16	1	0	0	100	0	0	100	1	0	100
3	17	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	1	2	0	0	100	1	25	75	1	25	75
4	2	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	3	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	4	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	5	2	1	25	75	1	25	75	1	25	75
4	6	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	7	2	1	25	75	1	25	75	1	25	75
4	8	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	9	2	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	10	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	11	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	12	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	13	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	14	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	15	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	16	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	17	1	0	0	100	0	0	100	0	0	100

### DADOS DE DENSIDADE ÓTICA DE Ac anti BSA (CAPÍTULO 2)

gaiola	trat	repet	amb	inoc	titulo
T1R1	1	1	1	1	0.4905
T1R1	1	1	1	1	0.624
T1R1	1	1	1	1	0.087
T1R1	1	1	1	1	0.1369
T1R2	1	2	1	1	0.1141
T1R2	1	2	1	1	0.5755
T1R2	1	2	1	1	0.133
T1R2	1	2	1	1	<b>0.0682</b>
T1R3	1	3	1	1	0.1045
T1R3	1	3	1	1	0.1262

T1R3	1	3	1	1	0.1059
T1R3	1	3	1	1	0.2199
T1R4	1	4	1	1	0.57
T1R4	1	4	1	1	0.1033
T1R4	1	4	1	1	0.218
T1R5	1	5	1	1	0.1482
T1R5	1	5	1	1	0.1793
T1R5	1	5	1	1	0.1416
T1R6	1	6	1	1	0.1326
T1R6	1	6	1	1	0.1131
T1R6	1	6	1	1	0.1444
T1R6	1	6	1	1	0.1174
T1R7	1	7	1	2	0.0663
T1R7	1	7	1	2	0.0838
T1R8	1	8	1	2	0.1144
T1R8	1	8	1	2	0.0997
T1R9	1	9	1	2	0.0709
T1R9	1	9	1	2	0.0948
T1R10	1	10	2	1	0.1405
T1R10	1	10	2	1	0.093
T1R10	1	10	2	1	0.6106
T1R10	1	10	2	1	0.0677
T1R11	1	11	2	1	0.3102
T1R11	1	11	2	1	0.0805
T1R11	1	11	2	1	0.338
T1R11	1	11	2	1	0.1603
T1R12	1	12	2	1	0.1103
T1R12	1	12	2	1	0.1217
T1R12	1	12	2	1	0.2375
T1R12	1	12	2	1	0.2994
T1R13	1	13	2	1	1.540
T1R13	1	13	2	1	0.7064
T1R13	1	13	2	1	0.1634
T1R13	1	13	2	1	0.0916
T1R14	1	14	2	1	0.2873
T1R14	1	14	2	1	0.3293
T1R14	1	14	2	1	0.0869

T1R14	1	14	2	1	2.752
T1R15	1	15	2	2	0.0697
T1R15	1	15	2	2	0.0804
T1R15	1	15	2	2	0.344
T1R16	1	16	2	2	0.0723
T1R16	1	16	2	2	0.073
T1R17	1	17	2	2	0.0765
T1R17	1	17	2	2	0.0867
T2R1	2	1	1	1	0.3308
T2R1	2	1	1	1	0.3643
T2R1	2	1	1	1	0.3498
T2R1	2	1	1	1	0.7066
T2R2	2	2	1	1	0.1343
T2R2	2	2	1	1	3.686
T2R2	2	2	1	1	0.0867
T2R2	2	2	1	1	0.9158
T2R3	2	3	1	1	0.268
T2R3	2	3	1	1	0.4521
T2R3	2	3	1	1	0.1333
T2R3	2	3	1	1	0.1565
T2R4	2	4	1	1	0.0958
T2R4	2	4	1	1	0.1652
T2R4	2	4	1	1	0.4202
T2R4	2	4	1	1	0.0728
T2R5	2	5	1	1	0.1025
T2R5	2	5	1	1	0.0859
T2R5	2	5	1	1	0.1692
T2R5	2	5	1	1	0.5054
T2R6	2	6	1	1	0.1016
T2R6	2	6	1	1	0.0866
T2R6	2	6	1	1	1.86
T2R6	2	6	1	1	<b>1.276</b>
T2R7	2	7	1	2	0.0704
T2R7	2	7	1	2	0.0913
T2R8	2	8	1	2	0.0842
T2R8	2	8	1	2	0.1186
T2R9	2	9	1	2	0.0797

T2R9	2	9	1	2	0.0913
T2R10	2	10	2	1	0.1294
T2R10	2	10	2	1	0.1489
T2R10	2	10	2	1	1.529
T2R10	2	10	2	1	0.6661
T2R11	2	11	2	1	0.2203
T2R11	2	11	2	1	0.1022
T2R11	2	11	2	1	2.073
T2R11	2	11	2	1	0.2639
T2R12	2	12	2	1	3.434
T2R12	2	12	2	1	0.081
T2R12	2	12	2	1	0.1111
T2R12	2	12	2	1	0.0661
T2R13	2	13	2	1	0.1704
T2R13	2	13	2	1	0.1502
T2R13	2	13	2	1	0.2514
T2R13	2	13	2	1	0.0965
T2R14	2	14	2	1	0.1418
T2R14	2	14	2	1	0.0947
T2R14	2	14	2	1	0.0744
T2R14	2	14	2	1	0.0763
T2R15	2	15	2	2	0.0701
T2R16	2	16	2	2	0.0659
T2R16	2	16	2	2	0.0789
T2R17	2	17	2	2	0.0785
T2R17	2	17	2	2	0.0736
T3R1	3	1	1	1	0.1158
T3R1	3	1	1	1	0.0899
T3R1	3	1	1	1	0.1256
T3R1	3	1	1	1	0.0965
T3R2	3	2	1	1	0.092
T3R2	3	2	1	1	2.202
T3R2	3	2	1	1	0.8929
T3R2	3	2	1	1	0.5219
T3R3	3	3	1	1	0.0908
T3R3	3	3	1	1	0.1094
T3R3	3	3	1	1	0.119

T3R4	3	4	1	1	0.1829
T3R4	3	4	1	1	0.0977
T3R4	3	4	1	1	0.1697
T3R4	3	4	1	1	0.1104
T3R5	3	5	1	1	0.12
T3R5	3	5	1	1	0.1037
T3R5	3	5	1	1	0.0997
T3R5	3	5	1	1	1.496
T3R6	3	6	1	1	0.1313
T3R6	3	6	1	1	2.531
T3R6	3	6	1	1	0.3163
T3R7	3	7	1	2	0.0994
T3R7	3	7	1	2	0.0793
T3R8	3	8	1	2	0.091
T3R8	3	8	1	2	0.0881
T3R9	3	9	1	2	0.0986
T3R9	3	9	1	2	0.5746
T3R10	3	10	2	1	0.0857
T3R10	3	10	2	1	0.0668
T3R10	3	10	2	1	0.0848
T3R11	3	11	2	1	0.0725
T3R11	3	11	2	1	0.0763
T3R11	3	11	2	1	0.163
T3R11	3	11	2	1	4
T3R12	3	12	2	1	0.2399
T3R12	3	12	2	1	0.082
T3R12	3	12	2	1	0.5187
T3R12	3	12	2	1	0.124
T3R13	3	13	2	1	0.126
T3R13	3	13	2	1	0.1006
T3R13	3	13	2	1	0.1518
T3R13	3	13	2	1	0.1906
T3R14	3	14	2	1	1.407
T3R14	3	14	2	1	0.1093
T3R14	3	14	2	1	0.2436
T3R14	3	14	2	1	0.1549
T3R15	3	15	2	2	0.0667

T3R16	3	16	2	2	0.0668
T3R16	3	16	2	2	0.0643
T3R17	3	17	2	2	0.0703
T3R17	3	17	2	2	0.0731
T4R1	4	1	1	1	0.1766
T4R1	4	1	1	1	0.3312
T4R1	4	1	1	1	0.4893
T4R2	4	2	1	1	0.4853
T4R2	4	2	1	1	0.0862
T4R2	4	2	1	1	0.0782
T4R2	4	2	1	1	0.183
T4R3	4	3	1	1	0.083
T4R3	4	3	1	1	0.1167
T4R3	4	3	1	1	0.0937
T4R4	4	4	1	1	0.0865
T4R4	4	4	1	1	0.0976
T4R4	4	4	1	1	0.1149
T4R4	4	4	1	1	0.0797
T4R5	4	5	1	1	0.1043
T4R5	4	5	1	1	1.081
T4R5	4	5	1	1	0.2587
T4R6	4	6	1	1	0.1119
T4R6	4	6	1	1	0.2672
T4R6	4	6	1	1	0.0846
T4R6	4	6	1	1	0.4439
T4R7	4	7	1	2	0.073
T4R7	4	7	1	2	0.0666
T4R8	4	8	1	2	0.0875
T4R8	4	8	1	2	0.0819
T4R9	4	9	1	2	0.0842
T4R9	4	9	1	2	0.0665
T4R10	4	10	2	1	0.0707
T4R10	4	10	2	1	0.1382
T4R10	4	10	2	1	0.0872
T4R10	4	10	2	1	0.095
T4R11	4	11	2	1	0.1819
T4R11	4	11	2	1	0.0995

T4R11	4	11	2	1	0.092
T4R12	4	12	2	1	0.0715
T4R12	4	12	2	1	0.0916
T4R12	4	12	2	1	0.0635
T4R12	4	12	2	1	0.3638
T4R13	4	13	2	1	0.1243
T4R13	4	13	2	1	0.0695
T4R13	4	13	2	1	1.501
T4R13	4	13	2	1	0.1555
T4R14	4	14	2	1	0.1446
T4R14	4	14	2	1	0.3814
T4R14	4	14	2	1	0.0753
T4R14	4	14	2	1	2.69
T4R14	4	14	2	1	<b>0.0652</b>
T4R15	4	15	2	2	0.0724
T4R15	4	15	2	2	0.0688
T4R16	4	16	2	2	0.0628
T4R16	4	16	2	2	0.0628
T4R17	4	17	2	2	0.0645
T4R17	4	17	2	2	0.0829

### DADOS DE PESO E RENDIMENTO DE ÓRGÃOS (CAPÍTULO 2)

TRAT	REPET	AMB	INOC	PESOV	BURSA	BACO	RBO	RBA
1	1	2	1	1950	3,34	1,29	0,1713	0,0662
1	1	2	1	2069	2,82	2,10	0,1363	0,1015
1	2	2	1	1978	4,46	1,55	0,2255	0,0784
1	2	2	1	2014	4,14	1,49	0,2056	0,0740
1	3	2	1	2103	3,74	1,79	0,1778	0,0851
1	3	2	1	2109	4,42	2,03	0,2096	0,0963
1	4	2	1	1990	3,03	1,27	0,1523	0,0638
1	4	2	1	2130	2,30	1,19	0,1080	0,0559
1	5	2	1	2142	3,19	2,45	0,1489	0,1144
1	5	2	1	2344	4,60	1,56	0,1962	0,0666
1	6	2	1	2197	5,92	1,90	0,2695	0,0865

1	6	2	1	2281	3,69	1,94	0,1618	0,0851
1	7	2	0	2074	1,38	1,27	0,0665	0,0612
1	7	2	0	1970	4,48	1,43	0,2274	0,0726
1	8	2	0	2151	3,69	1,67	0,1715	0,0776
1	8	2	0	2165	3,81	1,96	0,1760	0,0905
1	9	2	0	2105	1,30	2,27	0,0618	0,1078
1	9	2	0	2004	3,74	1,45	0,1866	0,0724
1	10	1	1	2268	6,26	3,18	0,2760	0,1402
1	10	1	1	1927	4,83	1,45	0,2506	0,0752
1	11	1	1	2343	9,29	2,70	0,3965	0,1152
1	11	1	1	2231	4,29	3,48	0,1923	0,1560
1	12	1	1	2002	4,54	2,44	0,2268	0,1219
1	12	1	1	2278	4,40	2,05	0,1932	0,0900
1	13	1	1	2465	4,99	1,81	0,2024	0,0734
1	13	1	1	2503	7,70	2,76	0,3076	0,1103
1	14	1	1	2325	6,25	2,32	0,2688	0,0998
1	14	1	1	2376	5,87	2,31	0,2471	0,0972
1	15	1	0	2303	3,12	1,85	0,1355	0,0803
1	15	1	0	2250	4,45	2,29	0,1978	0,1018
1	16	1	0	2228	3,18	2,13	0,1427	0,0956
1	16	1	0	2208	5,29	2,29	0,2396	0,1037
1	17	1	0	2211	5,33	2,72	0,2411	0,1230
1	17	1	0	2341	2,51	2,52	0,1072	0,1076
2	1	2	1	2374	5,14	2,04	0,2165	0,0859
2	1	2	1	2157	1,99	1,34	0,0923	0,0621
2	2	2	1	2150	4,08	0,88	0,1898	0,0409
2	2	2	1	2055	1,50	0,95	0,0730	0,0462
2	3	2	1	1905	2,99	1,06	0,1570	0,0556
2	3	2	1	1859	2,97	1,07	0,1598	0,0576
2	4	2	1	2144	4,11	2,64	0,1917	0,1231
2	4	2	1	1955	4,68	2,06	0,2394	0,1054
2	5	2	1	2296	3,95	2,09	0,1720	0,0910
2	5	2	1	2045	3,26	1,47	0,1594	0,0719
2	6	2	1	2210	3,63	1,66	0,1643	0,0751

2	6	2	1	2128	3,51	1,97	0,1649	0,0926
2	7	2	0	2154	4,43	2,30	0,2057	0,1068
2	7	2	0	2263	3,06	2,09	0,1352	0,0924
2	8	2	0	2299	3,54	2,15	0,1540	0,0935
2	8	2	0	2114	2,73	1,55	0,1291	0,0733
2	9	2	0	2135	5,32	1,82	0,2492	0,0852
2	9	2	0	2070	1,96	1,19	0,0947	0,0575
2	10	1	1	2262	4,29	1,96	0,1897	0,0866
2	10	1	1	2250	6,44	2,27	0,2862	0,1009
2	11	1	1	2339	3,88	2,01	0,1659	0,0859
2	11	1	1	2283	5,25	1,80	0,2300	0,0788
2	12	1	1	2335	5,60	2,33	0,2398	0,0998
2	12	1	1	2200	6,47	1,96	0,2941	0,0891
2	13	1	1	2195	4,71	3,33	0,2146	0,1517
2	13	1	1	2292	4,27	2,05	0,1863	0,0894
2	14	1	1	2422	4,11	2,99	0,1697	0,1235
2	14	1	1	2086	4,68	1,40	0,2244	0,0671
2	15	1	0	2229	4,42	2,13	0,1983	0,0956
2	15	1	0	2438	4,84	3,56	0,1985	0,1460
2	16	1	0	2133	4,21	1,63	0,1974	0,0764
2	16	1	0	2095	2,59	2,19	0,1236	0,1045
2	17	1	0	2236	4,94	3,03	0,2209	0,1355
2	17	1	0	2240	7,11	2,23	0,3174	0,0996
3	1	2	1	2081	3,49	1,64	0,1677	0,0788
3	1	2	1	1831	3,75	2,02	0,2048	0,1103
3	2	2	1	2073	5,38	1,64	0,2595	0,0791
3	2	2	1	2078	4,13	2,24	0,1987	0,1078
3	3	2	1	2171	3,36	1,27	0,1548	0,0585
3	3	2	1	2194	3,64	2,45	0,1659	0,1117
3	4	2	1	2200	5,93	1,30	0,2695	0,0591
3	4	2	1	1866	3,91	1,62	0,2095	0,0868
3	5	2	1	1968	2,64	1,34	0,1341	0,0681
3	5	2	1	1908	4,06	1,97	0,2128	0,1032
3	6	2	1	2094	2,42	1,73	0,1156	0,0826

3	6	2	1	2125	3,13	1,49	0,1473	0,0701
3	7	2	0	1903	3,88	1,14	0,2039	0,0599
3	7	2	0	2240	3,66	1,75	0,1634	0,0781
3	8	2	0	2080	3,95	1,77	0,1899	0,0851
3	8	2	0	1753	3,43	1,23	0,1957	0,0702
3	9	2	0	2007	2,11	2,34	0,1051	0,1166
3	9	2	0	2204	3,80	1,32	0,1724	0,0599
3	10	1	1	2346	4,31	2,84	0,1837	0,1211
3	10	1	1	2285	4,53	2,56	0,1982	0,1120
3	11	1	1	1992	4,79	2,15	0,2405	0,1079
3	11	1	1	2205	5,29	2,43	0,2399	0,1102
3	12	1	1	2141	3,71	2,41	0,1733	0,1126
3	12	1	1	2397	5,05	2,58	0,2107	0,1076
3	13	1	1	2171	5,34	3,23	0,2460	0,1488
3	13	1	1	2143	7,46	1,53	0,3481	0,0714
3	14	1	1	2243	6,85	1,36	0,3054	0,0606
3	14	1	1	2110	7,67	2,59	0,3635	0,1227
3	15	1	0	2269	4,94	3,03	0,2177	0,1335
3	15	1	0	2180	7,21	2,00	0,3307	0,0917
3	16	1	0	2371	3,82	2,73	0,1611	0,1151
3	16	1	0	2279	2,65	1,50	0,1163	0,0658
3	17	1	0	2444	4,41	1,40	0,1804	0,0573
3	17	1	0	2100	6,69	2,65	0,3186	0,1262
4	1	2	1	2259	4,13	1,48	0,1828	0,0655
4	1	2	1	2009	4,68	1,09	0,2330	0,0543
4	2	2	1	2083	3,92	2,10	0,1882	0,1008
4	2	2	1	2140	3,50	2,52	0,1636	0,1178
4	3	2	1	2147	4,80	1,92	0,2236	0,0894
4	3	2	1	2112	5,74	2,77	0,2718	0,1312
4	4	2	1	1786	2,14	1,24	0,1198	0,0694
4	4	2	1	2023	3,92	1,47	0,1938	0,0727
4	5	2	1	1888	2,14	1,97	0,1133	0,1043
4	5	2	1	2286	2,21	1,60	0,0967	0,0700
4	6	2	1	2165	3,12	1,89	0,1441	0,0873

4	6	2	1	1897	3,40	2,20	0,1792	0,1160
4	7	2	0	1935	2,43	0,84	0,1256	0,0434
4	7	2	0	2324	3,94	1,71	0,1695	0,0736
4	8	1	0	2350	3,22	3,38	0,1370	0,1438
4	8	1	0	1980	3,09	1,01	0,1561	0,0510
4	9	1	0	2210	6,03	0,97	0,2729	0,0439
4	9	1	0	2155	4,85	1,44	0,2251	0,0668
4	10	1	1	2165	3,67	2,14	0,1695	0,0988
4	10	1	1	2478	5,61	2,70	0,2264	0,1090
4	11	1	1	2214	6,70	2,67	0,3026	0,1206
4	11	1	1	2439	4,53	2,33	0,1857	0,0955
4	12	1	1	2226	5,42	2,37	0,2435	0,1065
4	12	1	1	2260	3,98	2,09	0,1761	0,0925
4	13	1	1	2074	3,69	2,29	0,1779	0,1104
4	13	1	1	2263	4,08	2,58	0,1803	0,1140
4	14	1	1	2172	3,45	1,47	0,1588	0,0677
4	14	1	1	2165	4,30	1,49	0,1986	0,0688
4	15	1	0	2529	4,90	2,91	0,1938	0,1151
4	15	1	0	2161	5,12	2,73	0,2369	0,1263
4	16	1	0	2159	3,08	6,00	0,1427	0,2779
4	16	1	0	2176	2,98	2,92	0,1369	0,1342
4	17	1	0	2167	3,02	3,82	0,1394	0,1763
4	17	1	0	2417	2,90	1,53	0,1200	0,0633

### DADOS DE CONTAGEM DE LEUCÓCITOS (CAPÍTULO 2)

AVE	TRAT	REPET	AMB	INOC	Hb	Ht	LT	het	eos	basof	mono	linf	HL
1	1	1	2	1	7,00	32,00	24252,63	8973,47	242,53	970,11	485,05	13581,47	0,66
2	1	1	2	1	6,70	33,00	15284,21	6113,68	1222,74	764,21	764,21	6419,37	0,95
3	1	2	2	1	7,10	35,00	26526,32	13263,16	1856,84	1326,32	530,53	9549,47	1,39
4	1	3	2	1	6,30	35,00	37333,33	12320,00	3360,00	1866,67	373,33	19413,33	0,63
5	1	3	2	1	6,40	31,00	28498,25	10544,35	854,95	569,96	284,98	16244,00	0,65
6	1	4	2	1	6,20	36,00	27789,47	7781,05	1111,58	1945,26	1111,58	15840,00	0,49

7	1	4	2	1	6,60	32,00	25600,00	7680,00	2560,00	256,00	1024,00	14080,00	0,55
8	1	5	2	1	5,60	32,00	28294,74	7356,63	1414,74	2263,58	282,95	16976,84	0,43
9	1	5	2	1	5,90	31,00	39592,98	24547,65	1187,79	2375,58	1583,72	9898,25	2,48
10	1	6	2	1	6,80	32,00	33459,65	11376,28	2342,18	1672,98	334,60	17733,61	0,64
11	1	6	2	1	5,90	32,00	26049,12	10419,65	781,47	3646,88	520,98	10680,14	0,98
12	1	7	2	0	5,20	32,00	44912,28	24701,75	898,25	2694,74	898,25	15719,30	1,57
13	1	7	2	0	5,30	30,00	24842,11	7204,21	993,68	993,68	248,42	15402,11	0,47
14	1	8	2	0	6,30	32,00	34582,46	15907,93	0,00	2074,95	1383,30	15216,28	1,05
15	1	8	2	0	5,40	30,00	28210,53	15233,68	282,11	2256,84	1692,63	8745,26	1,74
16	1	9	2	0	6,50	32,00	23803,51	6188,91	1190,18	952,14	1190,18	14282,11	0,43
17	1	9	2	0	5,80	30,00	34105,26	13642,11	1023,16	3410,53	341,05	15688,42	0,87
18	1	10	1	1	7,30	39,00	29557,89	9162,95	295,58	1773,47	1773,47	16552,42	0,55
19	1	10	1	1	6,30	31,00	25670,18	10011,37	513,40	1283,51	770,11	13091,79	0,76
20	1	11	1	1		32,00	26049,12	10159,16	1562,95	520,98	260,49	13545,54	0,75
21	1	11	1	1	6,60	31,00	45249,12	11764,77	2262,46	3619,93	3619,93	23982,04	0,49
22	1	12	1	1	7,10	31,00	25670,18	7444,35	513,40	2053,61	513,40	15145,40	0,49
23	1	13	1	1	6,90	33,00	37978,95	11013,89	759,58	1139,37	759,58	24306,53	0,45
24	1	13	1	1		33,00	38442,11	6535,16	768,84	768,84	1922,11	28447,16	0,23
25	1	14	1	1	6,70	35,00	37087,72	16318,60	741,75	1483,51	1112,63	17431,23	0,94
26	1	15	1	0	7,00	35,00	19157,89	4981,05	1149,47	2107,37	1532,63	9387,37	0,53
27	1	15	1	0	7,20	32,00	28743,86	5748,77	862,32	1724,63	287,44	20120,70	0,29
28	1	16	1	0	6,50	32,00	22456,14	6961,40	1571,93	2021,05	1122,81	10778,95	0,65
29	1	16	1	0	7,10	35,00	33649,12	10431,23	1009,47	3028,42	336,49	18843,51	0,55
30	1	17	1	0	7,00	32,00	27845,61	12530,53	278,46	1670,74	835,37	12530,53	1,00
31	1	17	1	0	7,10	36,00	49010,53	25975,58	980,21	1470,32	1960,42	18624,00	1,39
32	2	1	2	1	5,50	27,00	27094,74	7315,58	1896,63	1354,74	541,89	15985,89	0,46
33	2	1	2	1	6,30	32,00	49178,95	24589,47	491,79	491,79	983,58	22622,32	1,09
34	2	2	2	1	7,00	37,00	35312,28	10240,56	2471,86	353,12	1765,61	20481,12	0,50
35	2	2	2	1	5,50	33,00	32421,05	14589,47	324,21	2269,47	2593,68	12644,21	1,15
36	2	3	2	1	6,30	33,00	33115,79	13908,63	331,16	993,47	2318,11	15564,42	0,89
37	2	3	2	1	7,30	36,00	28547,37	16842,95	570,95	1141,89	570,95	9420,63	1,79
38	2	4	2	1	5,20	32,00	29192,98	7882,11	0,00	583,86	1459,65	19267,37	0,41
39	2	4	2	1	5,80	32,00	40421,05	14955,79	2021,05	3233,68	1212,63	18997,89	0,79
40	2	5	2	1	4,40	31,00	30238,60	11490,67	1814,32	2419,09	907,16	13607,37	0,84

41	2	5	2	1	6,50	31,00	26540,35	10881,54	530,81	1857,82	796,21	12473,96	0,87
42	2	6	2	1	5,90	31,00	43508,77	26975,44	435,09	870,18	3045,61	12182,46	2,21
43	2	6	2	1	6,70	31,00	13770,53	5370,51	0,00	413,12	688,53	7298,38	0,74
44	2	7	2	0	7,00	36,00	35621,05	12467,37	0,00	2493,47	356,21	20304,00	0,61
45	2	7	2	0	6,90	34,00	34119,30	13988,91	1705,96	3753,12	682,39	13988,91	1,00
46	2	8	2	0	6,80	34,00	33880,70	15246,32	1016,42	3049,26	677,61	13891,09	1,10
47	2	8	2	0	6,90	33,00	35894,74	16870,53	1076,84	1794,74	1076,84	15075,79	1,12
48	2	9	2	0	5,00	32,00	30989,47	12085,89	1859,37	1549,47	619,79	14874,95	0,81
49	2	9	2	0	5,40	28,00	28098,25	10958,32	842,95	1123,93	280,98	14892,07	0,74
50	2	10	1	1	7,20	33,00	17600,00	5808,00	528,00	2112,00	1936,00	7216,00	0,80
51	2	10	1	1	7,40	33,00	49557,89	20318,74	991,16	4460,21	991,16	22796,63	0,89
52	2	11	1	1		36,00	30315,79	13642,11	1515,79	3334,74	1515,79	10307,37	1,32
53	2	11	1	1	7,80	35,00	35368,42	16623,16	353,68	2475,79	4244,21	11671,58	1,42
54	2	12	1	1	6,80	34,00	29585,96	14201,26	887,58	295,86	887,58	13313,68	1,07
55	2	13	1	1	7,90	39,00	41052,63	15600,00	2873,68	2873,68	410,53	19294,74	0,81
56	2	13	1	1	6,70	33,00	24084,21	6021,05	722,53	1204,21	240,84	15895,58	0,38
57	2	14	1	1	6,80	32,00	28743,86	10060,35	862,32	1149,75	2012,07	14659,37	0,69
58	2	14	1	1	6,10	29,00	24828,07	9434,67	1241,40	1986,25	993,12	11172,63	0,84
59	2	15	1	0		32,00	27396,49	8218,95	1095,86	1095,86	547,93	16437,89	0,50
60	2	15	1	0		29,00	30119,30	9638,18	301,19	1505,96	1204,77	17469,19	0,55
61	2	16	1	0	6,70	33,00	28021,05	7005,26	1961,47	1681,26	280,21	17092,84	0,41
62	2	16	1	0	7,20	30,00	40631,58	8126,32	1218,95	2437,89	406,32	28442,11	0,29
63	2	17	1	0		28,00	25543,86	6896,84	1021,75	1021,75	766,32	15837,19	0,44
64	2	17	1	0	6,90	32,00	28743,86	8910,60	862,32	1724,63	862,32	16384,00	0,54
65	3	1	2	1	6,20	32,00	27845,61	9189,05	3063,02	556,91	1113,82	13922,81	0,66
66	3	2	2	1	6,10	32,00	34133,33	10581,33	2389,33	1024,00	682,67	19456,00	0,54
67	3	2	2	1	6,40	33,00	23157,89	6715,79	463,16	694,74	694,74	14589,47	0,46
68	3	3	2	1	7,10	34,00	62273,68	25532,21	3113,68	1245,47	1245,47	31136,84	0,82
69	3	3	2	1	6,20	31,00	25235,09	6056,42	1009,40	252,35	252,35	17664,56	0,34
70	3	4	2	1	5,10	28,00	22007,02	6822,18	0,00	440,14	440,14	14304,56	0,48
71	3	4	2	1	6,70	29,00	22385,96	7835,09	223,86	223,86	1567,02	12536,14	0,63
72	3	5	2	1	6,00	31,00	29803,51	11921,40	596,07	894,11	2682,32	13709,61	0,87
73	3	5	2	1	4,60	32,00	28968,42	8400,84	869,05	1158,74	289,68	18250,11	0,46
74	3	6	2	1	6,10	32,00	34133,33	5461,33	341,33	1024,00	1706,67	25600,00	0,21

75	3	6	2	1	5,50	30,00	20210,53	5254,74	1414,74	606,32	606,32	12328,42	0,43
76	3	7	2	0	5,80	34,00	33403,51	11691,23	1002,11	1336,14	334,04	19040,00	0,61
77	3	7	2	0	5,90	30,00	29052,63	10749,47	290,53	2905,26	1162,11	13945,26	0,77
78	3	8	2	0	6,60	33,00	44926,32	25608,00	0,00	2246,32	898,53	16173,47	1,58
79	3	9	2	0	6,50	33,00	24547,37	9818,95	245,47	1472,84	736,42	12273,68	0,80
80	3	9	2	0	6,00	33,00	36357,89	13088,84	2181,47	2908,63	363,58	17815,37	0,73
81	3	10	1	1	6,80	32,00	27396,49	10684,63	547,93	3013,61	1095,86	12054,46	0,89
82	3	10	1	1	7,00	30,00	32421,05	10698,95	648,42	2269,47	1945,26	16858,95	0,63
83	3	11	1	1	7,70	32,00	23803,51	5236,77	476,07	714,11	952,14	16424,42	0,32
84	3	11	1	1		31,00	29585,96	11538,53	1479,30	1183,44	887,58	14497,12	0,80
85	3	12	1	1		35,00	26526,32	10610,53	795,79	1856,84	1856,84	11406,32	0,93
86	3	12	1	1		32,00	27845,61	8632,14	835,37	835,37	2506,11	15036,63	0,57
87	3	13	1	1	6,30	31,00	67873,68	40724,21	0,00	4072,42	6108,63	16968,42	2,40
88	3	13	1	1		36,00	32842,11	9524,21	328,42	1970,53	1313,68	19705,26	0,48
89	3	14	1	1	6,20	31,00	23059,65	9454,46	922,39	691,79	2767,16	9223,86	1,03
90	3	14	1	1	5,90	30,00	25684,21	9503,16	513,68	1027,37	770,53	13869,47	0,69
91	3	15	1	0	6,00	31,00	19143,86	5168,84	957,19	765,75	1148,63	11103,44	0,47
92	3	16	1	0	7,30	34,00	44856,14	9868,35	2691,37	4934,18	1345,68	26016,56	0,38
93	3	16	1	0		34,00	35312,28	12712,42	353,12	706,25	1765,61	19774,88	0,64
94	3	17	1	0		39,00	23536,84	8708,63	470,74	941,47	1412,21	12003,79	0,73
95	4	1	2	1	5,70	33,00	30568,42	10393,26	1222,74	2445,47	611,37	15895,58	0,65
96	4	1	2	1	6,10	33,00	23852,63	8109,89	1431,16	954,11	238,53	13118,95	0,62
97	4	2	2	1	6,10	30,00	22105,26	8842,11	663,16	1105,26	663,16	10831,58	0,82
98	4	2	2	1	6,30	31,00	36982,46	13683,51	1849,12	1109,47	1849,12	18491,23	0,74
99	4	3	2	1	6,10	29,00	22182,46	10203,93	443,65	1330,95	443,65	9760,28	1,05
100	4	3	2	1	7,20	35,00	23578,95	10610,53	707,37	707,37	1178,95	10374,74	1,02
101	4	4	2	1	5,90	31,00	29150,88	14283,93	874,53	291,51	2623,58	11077,33	1,29
102	4	4	2	1	6,20	32,00	42666,67	14933,33	853,33	2986,67	426,67	23466,67	0,64
103	4	5	2	1	6,20	33,00	43305,26	15589,89	2598,32	1732,21	1732,21	21652,63	0,72
104	4	5	2	1	6,20	30,00	20210,53	9498,95	404,21	404,21	404,21	9498,95	1,00
105	4	6	2	1	7,30	35,00	41508,77	15773,33	415,09	2490,53	1245,26	21584,56	0,73
106	4	6	2	1	6,10	31,00	44596,49	17392,63	445,96	1783,86	3121,75	21852,28	0,80
107	4	7	2	0	6,30	30,00	21473,68	9877,89	858,95	644,21	429,47	9663,16	1,02
108	4	8	2	0	6,70	32,00	30091,23	9328,28	601,82	2407,30	902,74	16851,09	0,55

109	4	8	2	0	6,20	30,00	24421,05	10989,47	0,00	2197,89	488,42	10745,26	1,02
110	4	9	2	0	6,40	33,00	48863,16	16613,47	977,26	2443,16	488,63	28340,63	0,59
111	4	9	2	0	6,90	34,00	34596,49	14530,53	345,96	1037,89	691,93	17990,18	0,81
112	4	10	1	1	5,50	30,00	21052,63	7157,89	210,53	631,58	631,58	12421,05	0,58
113	4	10	1	1	6,70	33,00	26863,16	8864,84	805,89	2149,05	805,89	14237,47	0,62
114	4	11	1	1	5,90	31,00	33066,67	7936,00	1653,33	992,00	2314,67	20170,67	0,39
115	4	11	1	1	6,70	32,00	26049,12	8075,23	520,98	0,00	1562,95	15889,96	0,51
116	4	12	1	1	5,90	30,00	29894,74	8370,53	2989,47	1494,74	2092,63	14947,37	0,56
117	4	12	1	1	7,20	31,00	29585,96	8579,93	887,58	887,58	1479,30	17751,58	0,48
118	4	13	1	1	7,80	36,00	46484,21	19988,21	1394,53	2789,05	1394,53	20917,89	0,96
119	4	13	1	1	6,10	32,00	23354,39	8174,04	700,63	934,18	934,18	12611,37	0,65
120	4	14	1	1	7,70	34,00	20042,11	9820,63	400,84	1402,95	200,42	8217,26	1,20
121	4	14	1	1	6,10	33,00	27094,74	8941,26	541,89	2709,47	270,95	14631,16	0,61
122	4	15	1	0	7,50	36,00	34610,53	14536,42	1038,32	1038,32	1730,53	16266,95	0,89
123	4	15	1	0	6,40	31,00	32849,12	11168,70	985,47	1970,95	1313,96	17410,04	0,64
124	4	16	1	0	6,20	28,00	18863,16	5847,58	0,00	565,89	188,63	12261,05	0,48
125	4	16	1	0	7,30	33,00	35431,58	12401,05	2480,21	2480,21	354,32	17715,79	0,70
126	4	17	1	0	6,40	28,00	17487,72	5246,32	0,00	699,51	349,75	11192,14	0,47
127	4	17	1	0	6,10	30,00	25684,21	7448,42	770,53	770,53	770,53	15924,21	0,47

### DADOS DE DESEMPENHO (CAPÍTULO 3)

OBS	TRAT	REPET	PI	NAVES	PMI	PM7	PM14	PM21	PM28	GMP1a7	GMP7a14	GMP14a21	GMP1a21	GMP21a28	GMP1a28
1	1	1	462,00	10,00	46,20	141,50	381,80	750,50	1200,00	95,30	240,30	368,70	704,30	449,50	1153,80
2	1	2	459,00	10,00	45,90	157,40	424,40	820,50	1325,00	111,50	267,00	396,10	774,60	504,50	1279,10
3	1	3	455,00	10,00	45,50	146,70	402,50	770,00	1358,00	101,20	255,80	367,50	724,50	588,00	1312,50
4	1	4	449,00	10,00	44,90	138,67	371,00	756,14	1234,29	93,77	232,33	385,14	711,24	478,14	1189,39
5	1	5	463,00	10,00	46,30	131,70	345,50	690,63	1223,75	85,40	213,80	345,13	644,33	533,13	1177,45
6	1	6	446,00	10,00	44,60	132,20	365,00	788,25	1317,50	87,60	232,80	423,25	743,65	529,25	1272,90
7	1	7	457,00	10,00	45,70	135,50	388,30	754,38	1303,75	89,80	252,80	366,08	708,68	549,38	1258,05
8	1	8	451,00	10,00	45,10	161,30	420,56	755,57	1335,71	116,20	259,26	335,02	710,47	580,14	1290,61
9	2	1	463,00	10,00	46,30	155,90	399,10	815,00	1331,25	109,60	243,20	415,90	768,70	516,25	1284,95
10	2	2	459,00	10,00	45,90	143,40	379,00	727,50	1240,00	97,50	235,60	348,50	681,60	512,50	1194,10
11	2	3	461,00	10,00	46,10	136,10	400,40	776,13	1312,50	90,00	264,30	375,73	730,03	536,38	1266,40

12	2	4	453,00	10,00	45,30	137,70	374,50	770,63	1252,50	92,40	236,80	396,13	725,33	481,88	1207,20
13	2	5	451,00	10,00	45,10	140,00	374,10	722,00	1200,00	94,90	234,10	347,90	676,90	478,00	1154,90
14	2	6	464,00	10,00	46,40	146,10	398,50	787,75	1328,75	99,70	252,40	389,25	741,35	541,00	1282,35
15	2	7	451,00	10,00	45,10	144,20	386,75	796,83	1361,67	99,10	242,55	410,08	751,73	564,83	1316,57
16	2	8	460,00	10,00	46,00	149,44	403,33	779,00	1311,43	103,44	253,89	375,67	733,00	532,43	1265,43
17	3	1	450,00	10,00	45,00	136,60	361,60	741,13	1296,25	91,60	225,00	379,53	696,13	555,13	1251,25
18	3	2	451,00	10,00	45,10	137,10	354,90	722,57	1182,86	92,00	217,80	367,67	677,47	460,29	1137,76
19	3	3	448,00	10,00	44,80	152,00	387,30	809,25	1341,25	107,20	235,30	421,95	764,45	532,00	1296,45
20	3	4	463,00	10,00	46,30	142,30	375,90	746,00	1290,00	96,00	233,60	370,10	699,70	544,00	1243,70
21	3	5	464,00	10,00	46,40	167,60	394,80	812,88	1342,50	121,20	227,20	418,08	766,48	529,63	1296,10
22	3	6	452,00	10,00	45,20	155,60	388,20	758,00	1288,75	110,40	232,60	369,80	712,80	530,75	1243,55
23	3	7	449,00	10,00	44,90	140,40	343,50	670,88	1238,75	95,50	203,10	327,38	625,98	567,88	1193,85
24	3	8	459,00	10,00	45,90	147,20	380,60	752,88	1306,25	101,30	233,40	372,28	706,98	553,38	1260,35
25	4	1	457,00	10,00	45,70	149,90	370,60	781,43	1358,57	104,20	220,70	410,83	735,73	577,14	1312,87
26	4	2	462,00	10,00	46,20	139,30	367,70	751,00	1290,00	93,10	228,40	383,30	704,80	539,00	1243,80
27	4	3	463,00	10,00	46,30	138,00	364,40	729,50	1217,50	91,70	226,40	365,10	683,20	488,00	1171,20
28	4	4	465,00	10,00	46,50	142,40	362,00	695,00	1283,33	95,90	219,60	333,00	648,50	588,33	1236,83
29	4	5	465,00	10,00	46,50	161,67	415,78	825,71	1415,71	115,17	254,11	409,94	779,21	590,00	1369,21
30	4	6	457,00	10,00	45,70	146,80	359,10	747,25	1286,25	101,10	212,30	388,15	701,55	539,00	1240,55
31	4	7	463,00	10,00	46,30	140,00	347,40	700,00	1231,25	93,70	207,40	352,60	653,70	531,25	1184,95
32	4	8	459,00	10,00	45,90	124,10	321,00	705,29	1195,71	78,20	196,90	384,29	659,39	490,43	1149,81
33	5	1	453,00	10,00	45,30	150,50	408,13	791,20	1360,00	105,20	257,63	383,08	745,90	568,80	1314,70
34	5	2	463,00	10,00	46,30	162,60	434,70	837,50	1358,75	116,30	272,10	402,80	791,20	521,25	1312,45
35	5	3	450,00	10,00	45,00	146,67	381,67	772,33	1340,00	101,67	235,00	390,67	727,33	567,67	1295,00
36	5	4	449,00	10,00	44,90	138,30	377,00	723,00	1250,00	93,40	238,70	346,00	678,10	527,00	1205,10
37	5	5	459,00	10,00	45,90	145,40	378,10	776,63	1302,50	99,50	232,70	398,53	730,73	525,88	1256,60
38	5	6	456,00	10,00	45,60	148,30	396,30	769,13	1281,25	102,70	248,00	372,83	723,53	512,13	1235,65
39	5	7	460,00	10,00	46,00	150,10	388,40	771,50	1344,29	104,10	238,30	383,10	725,50	572,79	1298,29
40	5	8	447,00	10,00	44,70	147,20	387,10	747,38	1276,25	102,50	239,90	360,28	702,68	528,88	1231,55

OBS	TRAT	REPET	CMR1a7	CMR7a14	CMR14a21	CMR1a21	CMR21a28	CMR1a28	CA1a7	CA7a14	CA14a21	CA1a21	CA21a28	CA1a28
1	1	1	127,80	333,60	520,60	982,00	714,75	1696,75	1,34	1,39	1,41	1,39	1,59	1,47
2	1	2	141,10	351,40	570,46	1062,96	798,00	1860,96	1,27	1,32	1,44	1,37	1,58	1,45
3	1	3	135,80	342,30	557,83	1035,93	901,38	1937,31	1,34	1,34	1,52	1,43	1,53	1,48
4	1	4	133,76	305,89	558,44	998,09	737,00	1735,09	1,43	1,32	1,45	1,40	1,54	1,46
5	1	5	120,40	282,90	500,60	903,90	803,50	1707,40	1,41	1,32	1,45	1,40	1,51	1,45

6	1	6	116,40	301,80	588,02	1006,22	819,75	1825,97	1,33	1,30	1,39	1,35	1,55	1,43
7	1	7	111,40	315,30	541,28	967,98	823,75	1791,73	1,24	1,25	1,48	1,37	1,50	1,42
8	1	8	145,20	341,46	572,15	1058,81	809,00	1867,81	1,25	1,32	1,71	1,49	1,39	1,45
9	2	1	138,30	306,30	557,60	1002,20	832,00	1834,20	1,26	1,26	1,34	1,30	1,61	1,43
10	2	2	127,00	300,40	515,51	942,91	791,75	1734,66	1,30	1,28	1,48	1,38	1,54	1,45
11	2	3	150,00	347,90	534,43	1032,33	837,63	1869,95	1,67	1,32	1,42	1,41	1,56	1,48
12	2	4	120,60	292,00	538,04	950,64	793,63	1744,27	1,31	1,23	1,36	1,31	1,65	1,44
13	2	5	105,60	284,30	490,83	880,73	790,41	1671,14	1,11	1,21	1,41	1,30	1,65	1,45
14	2	6	129,40	315,10	541,43	985,93	827,88	1813,81	1,30	1,25	1,39	1,33	1,53	1,41
15	2	7	133,30	369,69	652,49	1155,48	858,33	2013,82	1,35	1,52	1,59	1,54	1,52	1,53
16	2	8	138,59	336,33	567,51	1042,43	802,00	1844,43	1,34	1,32	1,51	1,42	1,51	1,46
17	3	1	124,70	311,20	525,16	961,06	823,25	1784,31	1,36	1,38	1,38	1,38	1,48	1,43
18	3	2	119,70	283,00	517,84	920,54	718,71	1639,26	1,30	1,30	1,41	1,36	1,56	1,44
19	3	3	141,60	327,50	569,81	1038,91	827,75	1866,66	1,32	1,39	1,35	1,36	1,56	1,44
20	3	4	128,20	298,10	523,93	950,23	817,50	1767,73	1,34	1,28	1,42	1,36	1,50	1,42
21	3	5	148,30	340,70	569,02	1058,02	835,88	1893,89	1,22	1,50	1,36	1,38	1,58	1,46
22	3	6	133,50	310,80	533,30	977,60	824,63	1802,22	1,21	1,34	1,44	1,37	1,55	1,45
23	3	7	130,10	306,40	462,87	899,37	809,88	1709,25	1,36	1,51	1,41	1,44	1,43	1,43
24	3	8	131,50	321,00	536,65	989,15	825,38	1814,52	1,30	1,38	1,44	1,40	1,49	1,44
25	4	1	135,10	296,80	601,67	1033,57	872,86	1906,43	1,30	1,34	1,46	1,40	1,51	1,45
26	4	2	109,70	281,60	527,82	919,12	799,75	1718,87	1,18	1,23	1,38	1,30	1,48	1,38
27	4	3	128,50	303,70	505,75	937,95	765,75	1703,70	1,40	1,34	1,39	1,37	1,57	1,45
28	4	4	126,20	298,14	546,84	971,18	872,25	1843,43	1,32	1,36	1,64	1,50	1,48	1,49
29	4	5	145,27	340,11	588,34	1073,72	911,00	1984,72	1,26	1,34	1,44	1,38	1,54	1,45
30	4	6	130,70	289,90	529,30	949,90	826,38	1776,27	1,29	1,37	1,36	1,35	1,53	1,43
31	4	7	136,40	304,20	519,32	959,92	794,50	1754,42	1,46	1,47	1,47	1,47	1,50	1,48
32	4	8	105,50	264,90	544,28	914,68	731,43	1646,11	1,35	1,35	1,42	1,39	1,49	1,43
33	5	1	107,40	370,41	644,63	1122,44	877,60	2000,04	1,02	1,44	1,68	1,50	1,54	1,52
34	5	2	142,20	349,60	577,91	1069,71	835,75	1905,46	1,22	1,28	1,43	1,35	1,60	1,45
35	5	3	127,60	298,56	577,91	1004,06	832,83	1836,90	1,26	1,27	1,48	1,38	1,47	1,42
36	5	4	132,20	321,18	532,76	986,14	797,86	1784,00	1,42	1,35	1,54	1,45	1,51	1,48
37	5	5	135,80	330,10	586,45	1052,35	811,75	1864,10	1,36	1,42	1,47	1,44	1,54	1,48
38	5	6	130,60	263,00	541,68	935,28	787,00	1722,28	1,27	1,06	1,45	1,29	1,54	1,39
39	5	7	132,40	314,50	555,43	1002,33	864,07	1866,40	1,27	1,32	1,45	1,38	1,51	1,44
40	5	8	125,40	301,20	509,74	936,34	794,38	1730,72	1,22	1,26	1,41	1,33	1,50	1,41

### DADOS DE CONTAGEM DE *SALMONELLA* (CAPÍTULO 3)

GAIOLA	TRAT	REPET	AVE	Contagem duplic.	diluição/OBS	classe
48B	4	8	B		amarelas	0
12A	1	2	A		amarelas	0
51B	5	1	B		amarelas	0
34B	3	4	B		amarelas	0
58B	5	8	B		amarelas	0
54B	5	4	B		amarelas	0
51A	5	1	B		amarelas	0
36A	3	6	A		amarelas	0
34A	3	4	A		amarelas	0
53B	5	3	B		amarelas	0
52A	5	2	A		amarelas	0
43B	4	3	B		amarelas	0
13B	1	3	B		amarelas	0
13A	1	3	A		amarelas	0
11A	1	1	A		amarelas	0
15A	1	5	A		amarelas	0
11B	1	1	B		amarelas	0
26A	2	6	A		amarelas	0
41B	4	1	B		amarelas	0
23B	2	3	B		amarelas	0
25A	2	5	A		amarelas	0
21A	2	1	A		amarelas	0
22B	2	2	B		amarelas	0
25B	2	5	B		amarelas	0
23A	2	3	A		amarelas	0
33A	3	3	A		amarelas	0
43A	4	3	A		amarelas	0
45A	4	5	A		amarelas	0
47B	4	7	B		amarelas	0
48A	4	8	A		amarelas	0
33B	3	3	B		amarelas	0
41A	4	1	A		amarelas	0
17B	1	7	B		amarelas	0
22A	2	2	A	positivo	-3	3

18B	1	8	B	positivo	-3	3
14B	1	4	B		amarelas	0
56B	5	6	B		amarelas	0
18A	1	8	A	positivo	-1	1
21B	2	1	B	positivo	-2	2
37B	3	7	B		amarelas	0
21B	2	1	B	positivo	-3	3
54A	5	4	A		amarelas	0
28A	2	8	A	positivo	-2	2
58A	5	8	A		amarelas	0
38B	3	8	B	positivo	-4	4
28B	2	8	B		amarelas	0
14A	1	4	A		amarelas	0
31B	3	1	B		amarelas	0
44A	4	4	A		amarelas	0
37A	3	7	A		amarelas	0
15B	1	5	B		amarelas	0
57B	5	7	B		amarelas	0
35B	3	5	B		amarelas	0
24A	2	4	A		amarelas	0
24B	2	4	B		amarelas	0
36B	3	6	B		amarelas	0
16B	1	6	B		amarelas	0
55A	5	5	A		amarelas	0
53B	5	3	B		amarelas	0
16A	1	6	A		amarelas	0
32B	3	2	B		amarelas	0
35A	3	5	A		amarelas	0
27A	2	7	A		amarelas	0
44B	4	4	B		amarelas	0
46B	4	6	B		amarelas	0
57A	5	7	A		amarelas	0
45B	4	5	B		amarelas	0
26B	2	6	B		amarelas	0
27B	2	7	B		amarelas	0
31A	3	1	A		amarelas	0
46A	4	6	A		amarelas	0

56A	5	6	A	amarelas	0
55B	5	5	B	amarelas	0
32A	3	2	A	amarelas	0
42A	4	2	A	amarelas	0
12B	1	2	B	amarelas	0
47A	4	7	A	amarelas	0
38A	3	8	A	amarelas	0
52B	5	2	B	amarelas	0

### DADOS DE CONTAGEM DE SALMONELLA NO FÍGADO (CAPÍTULO 3)

GAIOLA	TRAT	REPET	AVE	Contagem duplic.	diluição/OBS	Fígado(Sim/Nao)	OBS
11A	1	1	A		amarelas	N	
11B	1	1	B		amarelas	S	
12A	1	2	A		amarelas	N	
12B	1	2	B		amarelas	N	
13A	1	3	A		amarelas	N	
13B	1	3	B		amarelas	N	
14A	1	4	A		amarelas	N	
14B	1	4	B		amarelas	N	
15A	1	5	A		amarelas	S	
15B	1	5	B		amarelas	N	
16A	1	6	A		amarelas	N	
16B	1	6	B		amarelas	N	
17A	1	7	A			N	
17B	1	7	B		amarelas	N	
18A	1	8	A	positivo	-1	N	
18B	1	8	B	positivo	-3	S	
21A	2	1	A		amarelas	N	
21B	2	1	B	positivo	-3	N	
22A	2	2	A	positivo	-3	N	
22B	2	2	B		amarelas		
23A	2	3	A		amarelas	N	
23B	2	3	B		amarelas	N	
24A	2	4	A		amarelas	N	

24B	2	4	B		amarelas	N	
25A	2	5	A		amarelas	N	
25B	2	5	B		amarelas	N	
26A	2	6	A		amarelas	N	
26B	2	6	B		amarelas	N	
27A	2	7	A		amarelas	N*	* isolam.de Bacillus
27B	2	7	B		amarelas	S	
28A	2	8	A	positivo	-2	N	
28B	2	8	B		amarelas	N	
31A	3	1	A		amarelas	N	
31B	3	1	B		amarelas	N	
32A	3	2	A		amarelas	N	
32B	3	2	B		amarelas	N	
33A	3	3	A		amarelas	N	
33B	3	3	B		amarelas	N	
34A	3	4	A		amarelas	N*	* isolam.de Bacillus
34B	3	4	B		amarelas	N	
35A	3	5	A		amarelas	N	
35B	3	5	B		amarelas	N	
36A	3	6	A		amarelas	N	
36B	3	6	B		amarelas	N	
37A	3	7	A		amarelas	N	
37B	3	7	B		amarelas	S	
38A	3	8	A		amarelas	N	
38B	3	8	B	positivo	-4	N	
41A	4	1	A		amarelas	N	
41B	4	1	B		amarelas	N	
42A	4	2	A		amarelas	N	
42B	4	2	B			N	
43A	4	3	A		amarelas	N	
43B	4	3	B		amarelas	N	
44A	4	4	A		amarelas	N	
44B	4	4	B		amarelas	N	
45A	4	5	A		amarelas	N*	* isolam.de Bacillus
45B	4	5	B		amarelas	N*	* isolam.de Bacillus
46A	4	6	A		amarelas	N	
46B	4	6	B		amarelas	N	

47A	4	7	A	amarelas	N
47B	4	7	B	amarelas	N
48A	4	8	A	amarelas	N
48B	4	8	B	amarelas	N
51A	5	1	A	amarelas	N
51B	5	1	B	amarelas	N
52A	5	2	A	amarelas	S
52B	5	2	B	amarelas	N
53A	5	3	A		N
53B	5	3	B	amarelas	N
54A	5	4	A	amarelas	S
54B	5	4	B	amarelas	N
55A	5	5	A	amarelas	N
55B	5	5	B	amarelas	N
56A	5	6	A	amarelas	N
56B	5	6	B	amarelas	N
57A	5	7	A	amarelas	S
57B	5	7	B	amarelas	S
58A	5	8	A	amarelas	N
58B	5	8	B	amarelas	N

**DADOS DE CONTAGEM DE SALMONELLA EM FÍGADO E CECO (CAPÍTULO 3)**

TRAT	REPET	AVE	Fígado	class
1	1	A	0	0
1	1	B	0	0
1	2	A	0	0
1	2	B	1	0
1	3	A	1	0
1	4	A	0	1
1	4	B	0	0
1	5	A	1	4
1	5	B	1	0
1	6	A	0	3
1	6	B	1	3



4	2	A	0	0
4	2	B	1	0
4	3	A	0	2
4	3	B	0	0
4	4	A	0	4
4	4	B	1	0
4	5	A	0	3
4	5	B	0	0
4	6	A	0	3
4	6	B	0	0
4	7	A	0	3
4	7	B	1	3
4	8	A	1	0
4	8	B	1	3
5	1	A	1	4
5	1	B	1	1
5	2	A	1	3
5	2	B	1	4
5	3	A	0	0
5	3	B	1	0
5	4	A	0	3
5	4	B	0	0
5	5	A	1	4
5	5	B	1	3
5	6	A	1	3
5	6	B	0	3
5	7	A	0	4
5	7	B	1	3
5	8	A	1	4
5	8	B	0	0

**DADOS DE DENSIDADE ÓTICA DE *Ac anti-Salmonella* (CAPÍTULO 3)**

AVE	TRAT	REPET	DO15	DO29
1	1	1	0,0985	0,2841

2	1	2	0,1539	0,2307
3	1	3	0,1274	0,1400
4	1	4	0,1759	0,1116
5	1	5	0,1886	0,1633
6	1	6	0,2514	0,1441
7	1	7	0,1339	0,1244
8	1	8	0,1163	0,1729
9	2	1	0,1252	0,1860
10	2	2	0,2849	0,1377
11	2	3	0,1743	0,1183
12	2	4	0,1276	0,1105
13	2	5	0,1386	0,1624
14	2	6	0,1678	0,1941
15	2	7	0,1363	0,2511
16	2	8	0,1649	0,1663
17	3	1	0,5881	0,1103
18	3	2	0,1956	
19	3	3	0,4047	0,1557
20	3	4	0,1115	0,1119
21	3	5	0,1425	0,2234
22	3	6	0,2229	0,3065
23	3	7	0,2766	0,3196
24	3	8	0,1202	0,2222
25	4	1	0,1203	0,1317
26	4	2	0,2030	0,1328
27	4	3	0,1872	0,1452
28	4	4	0,3097	0,1317
29	4	5	0,2569	0,2220
30	4	6	0,3253	0,3115
31	4	7	0,1958	0,1356
32	4	8	0,2541	0,2147
33	5	1	0,1065	0,1380
34	5	2	0,2531	0,1256
35	5	3	0,3386	0,1472
36	5	4	0,1395	0,1274
37	5	5	0,1897	0,2431
38	5	6	0,1437	0,1112

39  
40

5  
5

7  
8

0,1043  
0,1292

0,1694  
0,4447

### DADOS DE MORFOMETRIA INTESTINAL (CAPÍTULO 3)

ave	trat	repet	vilo15	cripta15	vilo29	cripta29
1	1	1A	645,45	75,40	690,30	77,80
2	1	1B	1074,90	71,10	730,80	76,10
3	1	2A			745,10	82,20
4	1	2B			748,30	69,30
5	1	3A			514,70	79,00
6	1	3B	788,90	78,50	596,80	71,60
7	1	4A				
8	1	4B			631,60	71,10
9	1	5A	769,50	77,20	522,90	60,60
10	1	5B			621,40	88,70
11	1	6A	865,40	66,60	669,90	57,60
12	1	6B			692,40	72,30
13	1	7A			594,70	69,20
14	1	7B			675,40	56,10
15	1	8A			557,10	65,90
16	1	8B				
17	2	1A	690,20	54,30	756,30	92,80
18	2	1B	318,10	31,50	576,40	79,00
19	2	2A	683,20	49,20	819,40	85,30
20	2	2B			660,80	66,70
21	2	3A	706,30	55,90	596,50	81,00
22	2	3B			794,40	75,60
23	2	4A	776,20	100,60	703,10	65,70
24	2	4B			791,80	67,90
25	2	5A	485,90	53,70	575,00	64,60
26	2	5B				
27	2	6A	678,30	66,10		
28	2	6B	652,00	68,00		
29	2	7A	808,00	59,00	711,90	59,60
30	2	7B	771,40	58,80	661,70	53,70
31	2	8A	817,50	60,50	658,10	69,00

32	2	8B	762,60	64,90	815,10	48,20
33	3	1A	666,80	86,80	595,30	62,60
34	3	1B				
35	3	2A			661,30	73,40
36	3	2B	640,20	58,40	620,50	54,30
37	3	3A			726,40	79,50
38	3	3B			567,70	82,80
39	3	4A				
40	3	4B			627,20	64,40
41	3	5A				
42	3	5B	507,90	83,70	792,80	62,60
43	3	6A			642,60	56,70
44	3	6B	657,30	75,50		
45	3	7A	690,50	61,60		
46	3	7B				
47	3	8A	823,50	48,30		
48	3	8B			571,20	70,50
49	4	1A			682,80	53,80
50	4	1B	989,10	69,20		
51	4	2A			755,10	82,70
52	4	2B			658,10	64,10
53	4	3A	967,00	54,50	686,80	65,30
54	4	3B	796,90	54,50	618,00	60,50
55	4	4A	727,40	58,60	718,40	58,80
56	4	4B			520,50	55,70
57	4	5A			764,40	55,90
58	4	5B			523,30	57,90
59	4	6A			578,10	54,30
60	4	6B	757,00	68,30	548,10	78,40
61	4	7A			740,50	71,40
62	4	7B			526,00	53,00
63	4	8A	876,10	63,70	566,90	64,70
64	4	8B	709,70	58,50	675,50	80,20
65	5	1A	571,50	71,00	821,80	60,60
66	5	1B	756,80	83,70	679,40	63,60
67	5	2A	634,50	74,70	685,70	73,30
68	5	2B	683,80	83,80	751,00	62,10
69	5	3A				

70	5	3B				
71	5	4A	708,70	68,90	770,20	63,00
72	5	4B				
73	5	5A	705,70	72,20		
74	5	5B	670,60	73,10	622,20	67,40
75	5	6A				
76	5	6B				
77	5	7A			618,10	78,20
78	5	7B	972,80	60,50	626,30	61,10
79	5	8A	700,40	81,60	593,60	70,00
80	5	8B				

### DADOS DE VIABILIDADE (CAPÍTULO 3)

TRAT	REPET	MORT07	mortal07	viab07	MORT14	mortal14	viab14	MORT21	mortal21	viab21	MORT121	mortal121	viab121
1	1		0	100		0	100		0	100	0	0	100
1	2		0	100		0	100		0	100	0	0	100
1	3		0	100		0	100	2	25	75	2	20	80
1	4	1	10	90		0	100		0	100	1	10	90
1	5		0	100		0	100		0	100	0	0	100
1	6		0	100		0	100		0	100	0	0	100
1	7		0	100		0	100		0	100	0	0	100
1	8		0	100	1	10	90		0	100	1	10	90
2	1		0	100		0	100		0	100	0	0	100
2	2		0	100		0	100		0	100	0	0	100
2	3		0	100		0	100		0	100	0	0	100
2	4		0	100		0	100		0	100	0	0	100
2	5		0	100		0	100	1	12,5	87,5	1	10	90
2	6		0	100		0	100		0	100	0	0	100
2	7		0	100	2	20	80		0	100	2	20	80
2	8	1	10	90		0	100		0	100	1	10	90
3	1		0	100		0	100		0	100	0	0	100
3	2		0	100		0	100	1	12,5	87,5	1	10	90
3	3		0	100		0	100		0	100	0	0	100
3	4		0	100		0	100		0	100	0	0	100
3	5		0	100		0	100		0	100	0	0	100

3	6	0	100	0	100	0	100	0	100	0	0	100
3	7	0	100	0	100	0	100	0	100	0	0	100
3	8	0	100	0	100	0	100	0	100	0	0	100
4	1	0	100	0	100	1	12,5	87,5	1	10	90	90
4	2	0	100	0	100	0	100	0	100	0	0	100
4	3	0	100	0	100	0	100	0	100	0	0	100
4	4	0	100	1	10	90	0	100	1	10	90	90
4	5	1	10	90	0	100	0	100	1	10	90	90
4	6	0	100	0	100	0	100	0	100	0	0	100
4	7	0	100	0	100	0	100	0	100	0	0	100
4	8	0	100	0	100	1	12,5	87,5	1	10	90	90
5	1	0	100	2	20	80	1	12,5	87,5	3	30	70
5	2	0	100	0	100	0	100	0	100	0	0	100
5	3	1	10	90	0	100	1	12,5	87,5	2	20	80
5	4	0	100	1	10	90	0	100	1	10	90	90
5	5	0	100	0	100	0	100	0	100	0	0	100
5	6	0	100	0	100	0	100	0	100	0	0	100
5	7	0	100	0	100	0	100	0	100	0	0	100
5	8	0	100	0	100	0	100	0	100	0	0	100

TRAT	REPET	MORT28	mortal28	viab28	MORT128	mortal128	viab128
1	1		0	100	0	0	100
1	2		0	100	0	0	100
1	3	1	12,5	87,5	3	32,5	67,5
1	4		0	100	1	10	90
1	5		0	100	0	0	100
1	6		0	100	0	0	100
1	7		0	100	0	0	100
1	8		0	100	1	10	90
2	1		0	100	0	0	100
2	2		0	100	0	0	100
2	3		0	100	0	0	100
2	4		0	100	0	0	100
2	5	1	12,5	87,5	2	22,5	77,5
2	6		0	100	0	0	100
2	7		0	100	2	20	80

2	8		0	100	1	10	90
3	1		0	100	0	0	100
3	2		0	100	1	10	90
3	3		0	100	0	0	100
3	4		0	100	0	0	100
3	5		0	100	0	0	100
3	6		0	100	0	0	100
3	7		0	100	0	0	100
3	8		0	100	0	0	100
4	1		0	100	1	10	90
4	2		0	100	0	0	100
4	3		0	100	0	0	100
4	4	1	12,5	87,5	2	22,5	77,5
4	5		0	100	1	10	90
4	6		0	100	0	0	100
4	7		0	100	0	0	100
4	8		0	100	1	10	90
5	1		0	100	3	30	70
5	2		0	100	0	0	100
5	3		0	100	2	20	80
5	4		0	100	1	10	90
5	5		0	100	0	0	100
5	6		0	100	0	0	100
5	7	1	12,5	87,5	1	12,5	87,5
5	8		0	100	0	0	100