

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DA AVILAMICINA NO  
CONTROLE DA ENTERITE NECRÓTICA EM PERUS DE CORTE**

**Autor: João Batista Lancini**  
**Dissertação apresentada, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Veterinárias na Área de Sanidade  
Avícola do Programa de Pós-graduação em  
Ciências Veterinárias da UFRGS**  
**Orientador: Carlos Tadeu Pippi Salle**

**Porto Alegre**  
**2011**

L249a Lancini, João Batista

Avaliação do efeito terapêutico da avilamicina no controle da enterite necrótica em perus de corte. / João Batista Lancini. - Porto Alegre: UFRGS, 2011.

69 f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2011. Carlos Tadeu Pippi Salle, Orient.

1. Sanidade Avícola 2. Enterite necrótica: Perus  
3. Desempenho zootécnico 4. *Clostridium perfringens*  
5. Avilamicina I. Salle, Carlos Tadeu Pippi, Orient.  
II. Título

CDD 619.602605

Catlogação na fonte preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Veterinária da UFRGS



**FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIENCIAS VETERINÁRIAS**

**Nome do Autor: João Batista Lancini**

**TÍTULO DO TRABALHO: AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DA  
AVILAMICINA NO CONTROLE DA ENTERITE NECRÓTICA EM PERUS DE  
CORTE**

**APROVADA EM: 03/02/2011**

**APROVADO POR:**

**Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle  
Orientador e Membro da Comissão**

**Dr. Benito Guimarães de Brito  
Membro da Banca**

**Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes  
Membro da Banca**

**Prof. Dr. Sérgio José de Oliveira  
Membro da Banca**

## **DEDICATÓRIA**

**À minha esposa Marília que é o esteio de nossa família, aos meus filhos Minéia, Emmanuel e Ana Rita, e à minha neta Lauren, que são meus estímulos para continuar na busca pelo conhecimento, livre de preconceitos e de crenças.**

*“Tudo o que permanece alheio ao homem é como se não existisse para ele, mas não por isso deixa de existir para os demais. Nada se manifesta à mente humana, se esta não começa por mostrar-se acessível ao conhecimento que generosamente se apresenta à sua investigação”*

**Da Sabedoria Logosófica**

## **AGRADECIMENTOS**

**Agradeço em primeiro lugar a Deus por conceder-me o privilégio, de realizar o maior dos experimentos, que é a vida.**

**À minha querida família, razão de minha existência e de meus esforços.**

**À minha mãe Elena Maria Pretto Lancini e a meu pai Oreste Lancini (*in memorian*), por terem me ensinado os valores éticos e morais, e por terem sido exemplo de perseverança, honestidade e de coragem.**

**Ao meu Mestre e Amigo, Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle, por haver incentivado e orientado, insistente e incansavelmente, a realização desta dissertação.**

**Ao saudoso amigo Prof. Dr. Ari Bernardes da Silva (*in memorian*) e ao Prof. Dr. Hamilton Moraes, que através de suas dedicações e entusiasmo incentivaram minha formação profissional em avicultura.**

**Aos amigos e colegas da Sadia S.A., Osório Dal Bello, Mario Sérgio Assayag, Ivomar Oldoni, Marcus F. Reginatto, Jair Alberto De Toni, Rui Peretti, Márcia Silva, Anne Lara, Elvio Cervelin, José Zucchi, e todos colegas que, de uma forma ou outra, permitiram e colaboraram para que fosse viabilizado meu experimento.**

**Aos amigos e colegas Francisco Carnino e Álvaro Medina Dubois, que colaboraram na primeira fase de meu trabalho.**

**À Elanco Saúde Animal, através do Sr. Milton M. Serapião e da Dra. Flavea Reis que aprovaram e incentivaram a realização deste experimento como parte de meu desenvolvimento profissional.**

**Ao colega Felipe Salle, pela contribuição com a formatação, diagramação e fotos da dissertação.**

**Aos colegas do CDPA da UFRGS, Lucas Brunelli Borges e à aluna Daiane Carvalho, que colaboraram intensamente com o experimento, na fase laboratorial.**

**A todos funcionários do CDPA da UFRGS e aos professores do Pós Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária, pela paciência e dedicação.**

**E também, aos que não foram citados nominalmente mas que, colaboraram em algum aspecto para a finalização de minha dissertação, gostaria de homenageá-los através de uma singela mas profunda palavra: Gratidão!**

*“Como não guardar gratidão a tudo aquilo que cooperou para tornar mais fácil e feliz o transcorrer dos dias? Deter por um instante, pois, o pensamento naqueles que nos proporcionaram um bem é render-lhes uma justa homenagem, da qual a alma jamais se arrepende, especialmente porque nesses instantes a própria vida parece adquirir outro conteúdo, e o ser, como se uma força titânica, sublime e cheia de ternura o impulsionasse, sente-se disposto a ser mais bondoso e melhor.”*

**Da Sabedoria Logosófica**

## RESUMO

A enterite necrótica causada por *Clostridium perfringens* é, comprovadamente, um grande problema para frangos de corte, seja sob a forma clínica ou subclínica, com elevados prejuízos produtivos. Em perus, não está claramente identificada a influência deste patógeno sobre os resultados produtivos, e provavelmente por razões econômicas, o volume de pesquisa nesta área é limitado. Em dois experimentos consecutivos, conduzidos em granjas experimentais diferentes, e sobre cama nova e reutilizada, perus de 14 dias, sem medicação com anticoccidianos, foram inoculados, a partir de uma amostra de campo patogênica, com uma superdosagem de aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  UFC/ml de *Clostridium perfringens*, tipo A; bactéria anaeróbica Gram positiva, que compõe a microflora intestinal dos perus. Lesões necróticas severas, com grande destruição da mucosa intestinal, foram observadas após o 4º dia de inoculação. Nos dois experimentos, a resposta dos perus à infecção foi diferente da descrita em frangos de corte. A mortalidade foi muito baixa ou nula e a recuperação das aves, independente da medicação utilizada, foi rápida com pouco ou nenhum comprometimento zootécnico. Escores das lesões histológicas foram desenvolvidos, para tentar correlacionar as lesões macroscópicas com as lesões microscópicas, mas a correlação foi baixa. Frente ao alto desafio observado, não foi possível avaliar adequadamente a ação do antimicrobiano utilizado. As respostas frente aos desafios de *Clostridium perfringens* nos perus, aparentam ser diferentes em relação às observadas em frangos de corte, sendo necessária cautela ao extrapolar padrões de uma espécie para outra. O uso de critérios subjetivos nas avaliações podem comprometer a tomada de decisão em relação aos tratamentos e as respostas esperadas.

Palavras-chave: *Clostridium perfringens*, perus, desempenho zootécnico, enterite necrótica, escores de lesões, avilamicina

## ABSTRACT

Necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens* represents a major challenge in broilers, causing clinical or sub clinical diseases, and results in important economic losses for the poultry industry. In turkeys, however, the importance of this pathogen is not clearly defined, and there are few studies assessing its effects on the performance of turkeys, most probably for economic reasons. In two consecutive trials, conducted in two experimental farms, 14 day old turkey poult were reared on new and reused wood shavings litter, without any anticoccidials in the feed, and were inoculated with an overdose of approximately  $1 \times 10^{10}$  CFU/ml of a pathogenic field sample of *Clostridium perfringens* type A. This Gram positive anaerobic bacterium is a normal inhabitant of the gut micro flora in the enteric tract of turkeys. Severe necrotic lesions, with major damage to the intestinal mucosa were observed on Day 4 after inoculation. In both trials, the response to the turkeys to the clostridial infection was clearly different from what is described in the literature for broilers. The mortality rate was very low or inexistent, and the birds in all treatments groups recovered very fast, with little or no impact on performance results. An attempt was made to establish a pattern to correlate histological lesion scores with macroscopic and microscopic lesions, but the resulting correlation was very low. Considering the high level of challenge induced in both trials, it was not possible to evaluate in activity of the antibiotic in proper terms. The response of turkeys to a high level of challenge with *Clostridium perfringens* seems to be different when compared to what is observed in broilers under similar experimental conditions, and caution should be applied when using the same diagnostic methods for different species. The use of subjective criteria to assess and describe the lesions can lead to erroneous treatments decisions and misinterpretation of the responses to treatment.

Key words: *Clostridium perfringens*, turkeys, performance results, necrotic enteritis, lesion score, avilamycin.

## Lista de ilustrações

<b>Figura 1</b> - Escore zero (0) – Intestino sem alteração macroscópica.....	34
<b>Figura 2</b> - Escore 1 – Intestino com parede fina ou friável.....	35
<b>Figura 3</b> - Escore 2 – Intestino com necrose ou ulcerações focais.....	35
<b>Figura 4</b> - Escore 3 – Intestino com lesões maiores de necrose.....	35
<b>Figura 5</b> - Escore 4 – Intestino necrose severa e extensa típica de quadros clínicos.....	35
<b>Figura 6</b> – Compartimentalização do intestino para definição de escore microscópico.....	40
<b>Figura 7</b> – Intestino com vilosidades normais (coloração HE; aumento 400 x).....	41
<b>Figura 8</b> – Intestino com vilosidades necrosadas (coloração HE; aumento 400 x).....	41
<b>Figura 9</b> - Intestino com vilosidades diminuídas pela necrose (coloração HE; aumento 400x).....	42
<b>Figura 10</b> - Desprendimento do epitélio intestinal (coloração HE; aumento 400x).....	42
<b>Figura 11</b> - Infiltração linfocitária (coloração HE; aumento 400x).....	43
<b>Figura 12</b> - Presença de muco alaranjado na mucosa intestinal no 2º dia após inoculação.....	48
<b>Figura 13</b> - Presença de bacilos Gram positivos em impressão de mucosa intestinal de peru, através de coloração Gram (aumento 1000x).....	48

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Atividades das principais toxinas do <i>Clostridium perfringens</i> .....	20
<b>Tabela 2</b> - Concentração inibitória mínima (CIM) de vários agentes sobre 22 cepas de <i>Clostridium perfringens</i> obtidas de perus criados em condições comerciais.....	28
<b>Tabela 3</b> - Delineamento experimento I – 1.800 perus machos.....	31
<b>Tabela 4</b> - Níveis nutricionais recomendados pela genética Nicholas 700.....	32
<b>Tabela 5</b> Delineamento experimento II – 2.160 perus machos.....	37
<b>Tabela 6</b> – Conversão alimentar dos 14 aos 57 dias de idade das aves.....	44
<b>Tabela 7</b> - Peso médio dos 14 aos 34 dias de idade das aves em relação ao tipo de cama.....	45
<b>Tabela 8</b> - Conversão alimentar dos 14 aos 34 dias de idade das aves em relação ao tipo de cama.....	45
<b>Tabela 9</b> - Consumo de ração dos 14 aos 34 dias de idade das aves em relação ao tipo de cama.....	46
<b>Tabela 10</b> - Ganho de peso por fase de criação das aves em relação ao tipo de cama.....	46
<b>Tabela 11</b> - Escores médios dos intestinos das aves dos experimentos I e II avaliados microscopicamente.....	47

## ABREVIATURAS E SIGLAS

CIM – Concentração inibitória mínima  
CONS – Consumo de alimento  
CONV – Conversão alimentar  
CPE – *Clostridium perfringens* enterotoxina  
CV – Coeficiente de variação  
DLM – Dose letal mínima  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
EC – European Community  
EEC – European Economic Community  
ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay  
EN – Enterite necrótica  
EPEC – Enteropathogenic *Escherichia coli*  
INM – Infectado não medicado  
NINM – Não infectado não medicado  
PCR – Polymerase Chain Reaction  
PEMS – Poults Enteritis Mortality Syndrome  
PLC - Fosfolipase C  
PM – Peso médio  
RNA – Ácido Ribonucleico  
TCV – Turkey corona vírus  
UBA – União Brasileira de Avicultura  
UFC – Unidade Formadora de Colônia  
USDA – United States Department of Agriculture  
USP – Universidade de São Paulo

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1	Enterite necrótica na avicultura .....	17
2.1.1	Etiologia e fatores de risco .....	17
2.1.2	Toxinas do <i>Clostridium perfringens</i> e os danos à mucosa intestinal .....	18
2.1.3	Características genóticas associadas à patogenicidade .....	21
2.1.4	Manifestações clínicas, patogenia e epidemiologia .....	22
2.1.5	Fatores predisponentes .....	24
2.1.6	Diagnóstico .....	25
2.1.7	Profilaxia e tratamento .....	26
2.1.7.1	Avilamicina .....	27
3.	OBJETIVOS .....	29
3.1	Objetivo geral .....	29
3.2	Objetivos específicos .....	29
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	30
4.1	Delineamento dos experimentos .....	30
4.1.1	Localização.....	30
4.1.2	Antimicrobiano e anticoccidianos.....	30
4.2	Experimento I .....	31
4.2.1	Delineamento do Experimento I.....	31
4.2.2	Dietas e arraçoamento.....	31
4.2.3	Seleção das aves e identificação.....	33
4.2.4	Instalações e manejo.....	33
4.2.5	Parâmetros avaliados.....	34
4.2.6	Inoculação e monitoria de enterite necrótica.....	34
4.2.7	Considerações sobre o bem estar dos animais.....	36
4.2.8	Análise dos dados.....	36
4.2.8.1	Processamento das informações.....	36
4.2.8.2	Análise de variância.....	36
4.3	Experimento II .....	37
4.3.1	Delineamento do experimento.....	37
4.3.2	Dietas e arraçoamento.....	37

4.3.3	Seleção das aves e identificação.....	38
4.3.4	Instalações e manejo.....	38
4.3.5	Parâmetros avaliados.....	38
4.3.6	Inoculação e monitoria de enterite necrótica.....	39
4.3.7	Análise dos dados.....	39
4.3.7.1	Processamento das informações.....	39
4.3.7.2	Análise de variância.....	39
4.4	Experimento III .....	40
4.4.1	Processamento histológico.....	40
4.4.2	Análise dos intestinos.....	40
5.	RESULTADOS .....	44
5.1	Experimento I.....	44
5.2	Experimento II.....	44
5.3	Experimento III.....	46
6.	DISCUSSÃO .....	49
7.	CONCLUSÃO .....	56
	REFERÊNCIAS .....	57
	ANEXOS .....	64

## 1. INTRODUÇÃO

Embora represente somente 2,69% do total das exportações de carnes de aves (UBA,2009), o Brasil é o terceiro maior produtor e exportador mundial de perus de corte (USDA, 2008), ainda que esteja muito longe do volume de produção dos dois principais produtores mundiais. Segundo relatórios anuais da UBA (União Brasileira de Avicultura), em 2009 foram produzidas 466.000 toneladas, sendo que 163.000 toneladas foram destinadas a exportação para diferentes e exigentes consumidores, como o mercado comum europeu e Japão. Com a melhoria da produtividade através de controles sanitários mais rígidos e efetivos e um desenvolvimento nutricional e de manejo adequados aos padrões internacionais, o Brasil tem aumentado sua importância frente aos tradicionais mercados produtores, como Estados Unidos e União Européia.

Entretanto, em função dos aumentos significativos nos custos de produção associados à retração mundial no consumo desta fonte de proteína animal, cada vez mais, os resultados de produtividade são cruciais para a manutenção da produção e sobrevivência deste segmento. Além disso, nos últimos anos, um número sucessivo de acontecimentos relacionados à segurança de alimentos, como o banimento das fontes de proteína animal nas dietas, a proibição do uso de antimicrobianos promotores de crescimento (Regulation 1831/2003/EC-União Européia), as poucas opções de agentes anticoccidianos disponíveis e a proibição de uso de aditivos para controle de histomoníase em perus, tem levado a um aumento dos problemas entéricos, comprometendo o aproveitamento do potencial genético, a saúde das aves e conseqüentemente, os resultados econômicos dos produtores (BUTAYE et al., 2003).

O uso de antibióticos, durante as últimas quatro décadas, como suplemento aditivo nas dietas das aves, atuando como melhoradores de desempenho zootécnico e também, como preventivos contra a ação de microorganismos patogênicos e não patogênicos presentes no trato gastrointestinal permitiram aumento significativo no ganho de peso e melhoria da conversão alimentar, principalmente pelo controle sobre bactérias Gram + e em particular, do *Clostridium perfringens*, o agente etiológico da enterite necrótica (BUTAYE et al., 2003).

A enterite necrótica em aves foi descrita inicialmente por Parish (1961), que determinou que o agente etiológico era *Clostridium perfringens*. Este agente é normalmente encontrado no trato intestinal de aves saudáveis, entretanto, pode causar surtos da doença, especialmente em lotes de frangos de corte e perus (JOHANSSON et

al., 2004). Atualmente, o *Clostridium perfringens* do tipo A está relacionado como o principal agente etiológico da enterite necrótica; com menor frequência o tipo C pode ser isolado em alguns surtos da doença. O *Clostridium perfringens* do tipo A produz somente a toxina  $\alpha$ , enquanto o tipo C produz tanto a  $\alpha$  - toxina como a  $\beta$  – toxina (VAN IMMERSEEL et al., 2004).

A doença pode apresentar-se sob duas formas clínicas: a forma aguda e a forma subclínica. A forma aguda é caracterizada por enterite necrótica (EN) com aumento significativo de mortalidade e a forma sub-clínica com necrose focal no intestino e/ou hepatite associada ao *Clostridium perfringens* com a presença de necrose fibrinóide no fígado ou colangiohepatite, fator responsável pelo aumento nas condenações devido às lesões hepáticas (ENGSTROM et al., 2003).

Em função da pressão de várias entidades governamentais, políticas, e de consumidores, relacionando o uso dos antibióticos nas dietas dos animais com o aparecimento de resistência microbiana em humanos, foi aplicado o “princípio precaucionário” proibindo o uso não terapêutico de antibióticos na comunidade europeia a partir de janeiro de 2006. No Brasil e em praticamente todos os mercados exportadores este princípio refletiu numa redução drástica da utilização destas moléculas. Frente a essa redução no uso de antimicrobianos, ocorreu um aumento considerável nos casos de enterites nas aves, comprometendo o bem estar, a saúde e o desempenho zootécnico das mesmas. Considerando-se também o número reduzido de produtos terapêuticos introduzidos nos últimos anos, os produtores de aves são forçados a confiar em produtos antimicrobianos que tem sido usados comercialmente por mais de vinte anos (COOPER & SONGER, 2009), tornando necessárias novas estratégias de terapias e controles, para minimizar em parte, todo o prejuízo provocado para a cadeia produtiva e também para a qualidade do produto final, que por sua vez reflete na segurança dos alimentos. Atualmente, poucos produtos são permitidos para uso como terapêuticos no controle de enterites. O uso de anticoccidianos do grupo dos ionóforos, devido à sua ação sobre bactérias Gram positivas, tem sido utilizados na Europa como uma das principais ferramentas para o controle da enterite necrótica, na ausência dos promotores de crescimento (JOHANSSON et al., 2004).

Existe um grande número de aditivos e ingredientes que estão sendo utilizados para suprir a falta dos antibióticos nas dietas das aves, entre os quais, acidificantes, probióticos, óleos essenciais e extratos de plantas, enzimas e leveduras, seguindo a nova legislação europeia (diretiva 70/524/EEC, apêndice I), que descreve aditivos como

substâncias que, uma vez fornecidas aos animais, tem a capacidade de alterar suas características ou alguns indicadores de produção animal. Entretanto, ainda existem muitas dúvidas e contradições na resposta destes aditivos, quando comparados ao uso preventivo, com subdosagens dos antibióticos.

Uma das alternativas para permitir um melhor controle dos patógenos entéricos, é o uso terapêutico nas condições de maior desafio durante a fase produtiva, sob supervisão veterinária, de moléculas como a avilamicina, antibiótico oligossacarídeo do grupo das ortosomicinas, que atuam na fração 50S do RNA das bactérias, com ação específica em bactérias Gram + e não utilizados na terapêutica humana (BUTAYE et al., 2003). Esta prática tem sido utilizada em frangos de corte, matrizes de corte, entretanto, como não existe registro para utilização em perus, ainda não é possível utilizar esta importante ferramenta de controle.

Na prática de campo, apesar das opções terapêuticas disponíveis, outro aspecto importante tem levado os técnicos a enfrentarem dificuldades no controle das diferentes formas de apresentação da doença em perus. Este aspecto refere-se à dificuldade no diagnóstico, em função das escassas informações referentes às técnicas de diagnóstico e o comportamento da doença nesta espécie. Normalmente, os padrões utilizados, seguem aqueles já definidos na literatura para frangos de corte e pouco ou nada existe de específico para perus. Por exemplo, de 102 isolados de *Clostridium perfringens* obtidos de granjas na Noruega e Dinamarca, somente 4 eram de perus, demonstrando a limitada informação a respeito desta enfermidade nesta espécie (JOHANSSON et al, 2004).

As enterites em aves são responsáveis por grandes prejuízos econômicos para a indústria avícola e, com a restrição do uso de aditivos antimicrobianos sob a forma de promotores de crescimento, as alternativas para o controle destas patologias, em especial da enterite necrótica, provocada pelo *Clostridium perfringens*, são muito limitadas. Além disso, na literatura são poucos os trabalhos científicos que avaliam a ação de antimicrobianos de utilização exclusiva em medicina veterinária, quanto à sua eficácia sobre estes patógenos em perus, seja *in vitro* ou *in vivo*. As referências nesta categoria animal são baseadas em poucos estudos científicos o que gera estímulos para a busca de mais informações e em particular, sobre a resposta desta espécie frente aos altos desafios de campo, quando comparados com as experiências observadas em frangos de corte. Além do aspecto econômico, é importante salientar, que trata-se de um problema relacionado à segurança dos alimentos derivados destas fontes protéicas, já que a presença de enfermidades entéricas como a clostridiose, pode levar ao surgimento

de problemas de saúde em humanos, por estarem envolvidos na produção de enterotoxinas associadas a quadros de diarréias (*Clostridium perfringens* tipo A) e enterite necrótica em humanos (tipo C) em função do risco de contaminação de carcaças no momento do abate das aves (VAN IMMERSEEL et al., 2004).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Enterite necrótica na avicultura

#### 2.1.1 Etiologia e fatores de risco

A enterite necrótica (EN) é a forma mais severa e comum da doença causada pelo *Clostridium perfringens* tipo A ou C, bacilo anaeróbico, formador de esporos, Gram positivo, que afeta aves em todo o mundo, sendo considerada por alguns especialistas como a doença entérica mais agressiva das aves (COOPER & SONGER, 2009). As primeiras indicações de que as aves podem estar sendo acometidas por enterite necrótica são: amontoamento, penas arrepiadas, redução do ganho de peso e diarreia, seguidas de aumento de mortalidade (McDEVITT et al., 2006). Além dos surtos de enterite necrótica clínica, com os sintomas anteriormente citados, o agente pode causar doença subclínica, levando à depressão do ganho de peso e piora da conversão alimentar (LOVLAND & KALDHUSTDAL, 2001). A reprodução experimental da doença, através de diferentes vias (infusão intraduodenal de bactérias, caldo de cultura e/ou toxinas), muitas vezes, não é suficiente para que ocorram sinais clínicos da doença, como ocorre nas condições de campo, sendo que inúmeros são os fatores predisponentes envolvidos para que aconteça uma manifestação clínica (KALDHUSTDAL et al., 1999). Gazdzinski e Julian (1992), relataram um quadro de enterite necrótica em três lotes de matrizes de perus e citam que a maioria dos casos publicados sobre a doença estão relacionados à frangos de corte ou poedeiras, sendo que alguns autores não obtiveram, em condições experimentais, sucesso na reprodução experimental da enfermidade naquela espécie.

A enterite necrótica causada pelo *Clostridium perfringens* provoca uma enterotoxemia decorrente da produção das toxinas tipos A e C, causada pela grande proliferação de bactérias no trato intestinal das aves. A  $\alpha$ -toxina é, provavelmente, o principal fator associado a presença de lesões intestinais (AL SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977). Esta bactéria é um comensal no trato intestinal dos vertebrados, e portanto, facilmente isolado de ambientes contaminados por fezes (água, solo, vestimentas, botas, etc) (COOPER & SONGER, 2009). Trata-se de uma bactéria extremamente prolífica e toxigênica, e está presente todo o tempo e em todos os ambientes de produção avícola, proliferando e produzindo toxinas quando as

circunstâncias apresentam-se favoráveis (LOVLAND & KALDHUSDAL, 2001). Segundo Helmboldt & Bryant (1971) apud AL SHEIKHLY & AL SAIEG (1980); BROUSSARD et al. (1986) a coccidiose é um fator predisponente à proliferação do *Clostridium perfringens* e o desenvolvimento da enterite necrótica. Os danos provocados na mucosa pelos esporozoítos e merozoítos, associados à uma redução do pH intestinal e aumento no tempo de passagem do alimento, permite o estabelecimento e a proliferação do *Clostridium perfringens*. O número de bactérias no intestino delgado e cecos de aves com coccidiose é muitos logaritmos superior ao observado em condições normais (COOPER & SONGER, 2009).

De acordo com Meteyer et al (1992) apud DROUAL et al (1994) a enterite necrótica, provavelmente ocorra com mais frequência nos lotes comerciais de perus do que é citado pela literatura. Um considerável número de casos submetido à análise no laboratório Turlock e Fresno durante o período de 1991 a 1992 foi diagnosticado como enterite necrótica, sendo que alguns deles estavam associados a coccidiose e, a maioria, associados com inclusão intranuclear de adenovírus no baço, rim e intestinos dos perus, indicando uma infecção pelo vírus da enterite hemorrágica.

### **2.1.2 Toxinas do *Clostridium perfringens* e os danos à mucosa intestinal**

Todas as cepas desta bactéria possuem o gene da  $\alpha$ -toxina (plc) e os diferentes tipos de cepas (A-E) são caracterizados pelo perfil dos genes codificadores de outras toxinas (McDONEL & McCLANE, 1988; SONGER, 1996). O *Clostridium perfringens* produz uma série de enzimas e toxinas extracelulares, inclusive as toxinas alfa ( $\alpha$ ), teta ( $\tau$ ) e kapa ( $\kappa$ ) que são codificadas cromossomicamente pelos genes plc, pfoA e coIA, respectivamente (ROOD, 1998). Outras toxinas incluem a endotoxina epsilon ( $\epsilon$ ) associadas à enterotoxemia de outras espécies. A enterite necrótica em aves está associada às cepas A ou C de *Clostridium perfringens* produtoras de  $\alpha$  e  $\beta$ -toxinas (SONGER, 1996). (Tabela 1).

Com exceção da  $\tau$ -toxina, que atua intracelularmente, as demais toxinas produzidas pelo *Clostridium perfringens* interagem com a membrana celular. Todas as toxinas e enzimas hidrolíticas são secretadas, com exceção da enterotoxina (CPE) que é liberada após a lise celular (PETIT et al., 1999). A  $\alpha$ -toxina, principal toxina letal do *Clostridium perfringens*, é uma fosfolipase multifuncional, produzida em quantidades variadas obtidas em quase todos os isolamentos. A hidrólise da membrana fosfolipídica

de eritrócitos, plaquetas, leucócitos e células endoteliais e musculares, resulta na lise ou outras formas de citotoxicidade. É hemolítica, necrotizante e potencialmente letal. O gene *cpa* da  $\alpha$ -toxina já foi clonado e seqüenciado, e genes homólogos tem sido encontrados em outros clostrídios (SONGER, 1996). As demais toxinas  $\beta$ ,  $\epsilon$  e  $\tau$ , são responsáveis por induzir inflamação, necrose da mucosa intestinal, ativação da protease de prototoxinas, aumentar a permeabilidade intestinal, efeitos sobre o sistema nervoso central, necrose da derme, podendo também provocar mortalidade (PETIT et al., 1999). *In vivo*, os substratos celulares para a  $\alpha$ -toxina são a fosfatidilcolina e a esfingomielina, ambos componentes fosfolipídicos da membrana de células epiteliais do trato gastrintestinal. A hidrólise dos fosfolipídios produz diacilglicerol (a partir da fosfatidilcolina) e ceramida (a partir da esfingomielina) (DONELLI & FIORENTINI, 1992). O efeito da hidrólise dos fosfolipídios pode variar para diferentes tipos celulares e foi demonstrada com eritrócitos obtidos de diferentes espécies. A suscetibilidade à lise por fosfolipase C pode, em parte, refletir diferenças na composição de fosfolipídios da porção externa da célula. A hidrólise direta dos fosfolipídios da membrana parece explicar claramente os efeitos da enterite necrótica. Além disso, o diacilglicerol que resulta da hidrólise de lecitina pela  $\alpha$ -toxina, ativa a proteína C quinase, levando ao estímulo de células eucarióticas fosfolipase C e D e desencadeamento do efeito cascata do ácido araquidônico, que por sua vez induz a síntese e liberação de mediadores inflamatórios como os leucotrienos, tromboxanos, fator de agregação plaquetário e prostaciclina (TITBALL, 1993). Esta ação resulta na contração de vasos sanguíneos, aumento da permeabilidade vascular, agregação plaquetária e disfunção do miocárdio, os quais, contribuem para manifestações clínicas locais e sistêmicas caracterizadas por profundo choque e morte (PETIT et al., 1999).

Tabela 1: Atividades das principais toxinas do *Clostridium perfringens*.

Toxina	Atividade e efeitos
$\alpha$	Fosfolipase/esfingomielinase C, hemolítica, letal, necrotizante
$\beta$	Induz inflamação, necrose da mucosa intestinal, letal
$\epsilon$	Prototoxina ativada por protease, aumenta permeabilidade intestinal, tóxica para o sistema nervoso central, letal
$\iota$	Aumenta permeabilidade vascular, dermonecrótica, letal
CPE	Aumenta permeabilidade celular, inibe síntese de macromoléculas, desintregação do citoesqueleto e lise celular

Fonte: Adaptado de Songer, J. G. (1996)

Segundo Ravdin (1985 apud JUSTIN et al., 2002) tanto o  $Zn^{++}$  quanto o  $Ca^{++}$  são necessários para a atividade da fosfolipase C. O  $Zn^{++}$  é essencial para a atividade catalítica, enquanto o  $Ca^{++}$  é necessário para promover o transporte da enzima para seu substrato fosfolipídico. A enzima é geralmente caracterizada como uma metalofosfolipase C de Zn. Muitos clostrídios, assim como outras bactérias, produzem enzimas do tipo metalofosfolipase C de Zn, todas de relação estrutural muito próxima. Entretanto, a diferença mais evidente está em sua toxicidade. A  $\alpha$ -toxina do *Clostridium perfringens*, fosfolipase C, é uma toxina potente com uma dose letal mínima (DLM) de  $<0,1\mu\text{g}/\text{camundongo}$ . As toxinas do *Bacillus cereus*, da *Listeria monocytogenes* e do *Clostridium bifermentans*, por exemplo, tem DLM de  $>10\mu\text{g}/\text{camundongo}$ .

A ação da enterotoxina do *Clostridium perfringens* é a mais estudada. Ela interage com as junções protéicas das células epiteliais, levando à diarreia e paralisia causada pelo aumento na secreção de fluidos e íons no lúmen intestinal, associada a redução da absorção da glicose e uma leve descamação das células epiteliais. A ação de outras toxinas, como a  $\beta$ -1 e  $\beta$ -2 estão associadas à indução de necrose hemorrágica na mucosa intestinal, mas seu modo de ação ainda precisa ser melhor elucidado. Além disso, o *Clostridium perfringens* libera uma variedade de enzimas hidrolíticas que decompõe substratos extracelulares e outros componentes derivados da lise celular. É provável, que estas enzimas atuem de forma sinérgica com as toxinas causadoras de

danos à membrana, no momento da ruptura celular, contribuindo para a desorganização tecidual observada nas lesões gangrenosas (PETIT et al., 1999).

### 2.1.3. Características genóticas associadas à patogenicidade

Segundo Engstrom et al., (2003) a caracterização genética tem revelado que aves saudáveis podem carrear, um mínimo de dois genótipos do tipo A, como até um máximo de cinco genótipos (BARBARA et al., 2008). Por outro lado, aves com enterite necrótica ou colangiohepatite, são tipicamente colonizadas por um tipo genético simples, o qual na maioria dos casos, é diferente daqueles que colonizam aves saudáveis (ENGSTROM et al., 2003). Após uma recuperação natural ou tratamento, as aves voltam a apresentar uma colonização com múltiplos genótipos, sem a presença da cepa causadora da enterite necrótica. Esta predominância estabelecida pelas cepas associadas à enterite necrótica pode ser em decorrência da produção de bacteriocinas, já que estas inibem o crescimento das cepas não patogênicas sob condições *in vitro* (BARBARA et al., 2008). Existe um dogma estabelecido no qual, existindo condições adequadas no trato intestinal das aves, todas cepas de *Clostridium perfringens* tipo A produzem sinais e lesões de enterite necrótica. Mesmo cepas associadas à enterite necrótica não conseguiram reproduzir o quadro da doença, quando as condições intestinais não eram favoráveis. Redução da motilidade intestinal, danos à mucosa e obstrução intestinal, associadas à fatores associados à dieta, favorecem o crescimento da bactéria. A seqüência genômica e a análise de bactérias produtoras ou não de enterite necrótica devem, pelo menos em parte, estar focadas na identificação genética das cepas virulentas (COOPER & SONGER, 2009).

A maior parte dos genes associados a patogenicidade do *Clostridium perfringens* já foram caracterizados, sendo que os genes que codificam a  $\alpha$ -toxina e demais toxinas estão localizados em diferentes regiões do cromossomo próximas à fonte de replicação. O gene *cpe*, relacionado com a enterotoxemia é encontrado em regiões variadas do cromossomo em inúmeras cepas envolvidas na intoxicação alimentar em humanos e em grandes plasmídeos isolados de doenças gastrintestinais, não associadas a alimentos e em casos veterinários. Os grandes plasmídeos carreadores dos genes associados às toxinas podem ter origem em fagos de localização extracromossômica. A localização de muitos genes relacionados às toxinas em elementos extracromossômicos é

provavelmente responsável pela diversidade de cepas observadas durante as biotipagens. A perda ou aquisição de plasmídeos pode também estar associada à mudanças toxigênicas observadas em algumas cepas. A transferência genética mediada por transposons, plasmídeos conjugados e, possivelmente fagos, é possivelmente envolvida também na aquisição de fatores genéticos de virulência pelo *Clostridium perfringens* de outras bactérias, a menos obviamente, que o *Clostridium perfringens* tenha sido o reservatório original dos genes associados à toxinas para outros organismos (PETIT et al., 1999).

A genotipagem através de técnicas baseadas em DNA (PCR e hibridização) foram desenvolvidas para a tipificação do *Clostridium perfringens* e são métodos alternativos confiáveis para testes em animais de laboratório (NETHERWOOD et al., 1998). Particularmente, a investigação genética é muito útil para a detecção do gene *cpe*, o qual é raramente expressado sob condições normais de cultura bacteriana. A definição da cepa pela genotipagem é melhor indicativo do potencial de virulência do que a identificação tradicional. Entretanto, a presença de um gene, nem sempre está correlacionada com a síntese de toxinas. A genotipagem é confiável e prática, permitindo uma acuracidade mais ampla e completa na determinação de patovares do *Clostridium perfringens* do que, nas tipificações de toxinas convencionais (PETIT et al., 1999).

#### **2.1.4. Manifestações clínicas, patogenia e epidemiologia**

Embora o *Clostridium perfringens* seja um habitante natural do trato intestinal de aves saudáveis, pode provocar surtos de enterite necrótica especialmente em lotes de frangos de corte e perus. A clostridiose ocorre tanto na forma aguda, através da manifestação de enterite necrótica, normalmente em idades que variam entre duas e quatro semanas de idade das aves, causando elevada mortalidade ou, também, na forma subclínica com a presença de necrose focal no intestino, associada a colangiohepatite ou necrose fibrinóide no fígado (JOHANSSON et al., 2004). Muitos sinais, associados à forma aguda da doença, podem ser observados, entre os quais, depressão, prostração, penas arrepiadas, diarreia, sonolência, anorexia e desidratação. O desenvolvimento da doença, normalmente é agudo, provocando mortes logo após a infecção, cujos níveis podem variar de 0 a 50% (COOPER & SONGER, 2009).

As lesões macroscópicas estão, normalmente, restritas ao jejuno e íleo, mas podem ocorrer no duodeno e cecos. O intestino delgado pode apresentar-se distendido pela formação de gases e a parede apresenta-se fina e friável. A mucosa apresenta-se coberta por material pseudomembranoso fibrinoso e necrótico, de coloração amarelada ou esverdeada, que freqüentemente é descrita com aparência de “toalha turca”. Experimentalmente, lesões macroscópicas caracterizadas por mucosa engrossada e acinzentada podem ser observadas após três horas da inoculação pelo *Clostridium perfringens*. Após cinco horas, pode-se observar necrose da mucosa intestinal, que evolui com o tempo para uma enterite fibronecrótica severa, com formação de uma membrana diftérica. Fígados apresentam hepatite, caracterizada por aumento de volume e coloração bronzeada e, presença de focos necróticos além de colecistite tem sido observados tanto na forma clínica como subclínica da doença (ELEAZER & HARRELL, 1976); (SHANE et al., 1985); (LOVLAND & KALDHUSDAL, 1999). Uma forma menos severa da doença tem sido descrita e caracterizada por áreas focais de necrose na mucosa intestinal, necrose hepática e comprometimento dos resultados de produção, com ou sem sinais clínicos de infecção (KALDHUSDAL & HOFSHAGEN, 1992); (LOVLAND & KALDHUSDAL, 1999); (LOVLAND & KALDHUSDAL, 2001).

Avaliação microscópica revela necrose das vilosidades com degeneração celular que pode atingir a submucosa ou muscular da mucosa. Também é relatada necrose de coagulação dos ápices das vilosidades, com uma linha de demarcação entre o tecido necrosado e o tecido viável. Também é observado um acúmulo de células mononucleares nesta junção. Vilosidades necrosadas, células epiteliais degeneradas e células inflamatórias associadas à fibrina, compõe a membrana diftérica observada macroscopicamente. Além disso, grande quantidade de bacilos Gram positivos podem ser observados nas áreas de necrose (LONG et al., 1974); (AL SHEIKHLY & AL SAIEG, 1980); (VAN IMMERSEEL et al., 2004).

*Clostridium perfringens* invade o sistema porta e os dutos biliares, resultando em colangiohepatite, com a presença de fígado pálido e lesões necróticas focais (LOVLAND & KALDHUSDAL, (2001); (VAN IMMERSEEL et al., 2004). Microscopicamente, é observada necrose de coagulação multifocal no fígado e ductos biliares; a vesícula biliar e os dutos extra-hepáticos apresentam-se distendidos e bacilos Gram positivos são encontrados nas áreas necrosadas (KALDHUSDAL et al., 2001).

Considerando a flora intestinal normal das aves, é incomum a ausência de *Clostridium perfringens*, embora o número estimado de bactérias seja extraordinariamente variável. Intestinos de aves afetadas por enterite necrótica contém grande quantidade de *Clostridium perfringens* (p.ex.  $10^6 - 10^8$  UFC por g/mucosa), por outro lado, números elevados da bactéria no trato intestinal não são, isoladamente, suficientes para produzir o quadro clínico (COOPER & SONGER, 2009).

Surtos de enterite necrótica aparecem, comumente, entre 2 e 6 semanas de vida das aves, embora existam relatos em aves mais velhas. Este fator, pode estar associado à presença de anticorpos maternos, até aproximadamente 3 semanas de vida.

A reprodução experimental da enterite necrótica pela administração oral de estirpes de *Clostridium perfringens* tem, segundo Olkowski et al., (2006) apud GOMES, A. (2007), produzido diversos resultados e torna complexo o conhecimento da patogênese da doença. Dentre os principais problemas observados na reprodução da doença, tem-se o fato das amostras isoladas de campo produzirem lesões de enterite necrótica nos intestinos das aves, enquanto que estirpes de referência não demonstraram potencial patogênico, sugerindo que o cultivo *in vitro* resulta na perda de fatores de virulência.

#### **2.1.5. Fatores predisponentes**

A coccidiose é um dos principais fatores predisponentes para o super crescimento do *Clostridium perfringens* e o desenvolvimento da enterite necrótica (AL SHEIKHLY; AL SAIEG, 1980). Entretanto, existem relatos de surtos de enterite necrótica em perus não associados à presença de coccidiose (DROUAL et al., 1994). Pesquisas recentes suportam a hipótese de que infecções por coccídios predisõem o desenvolvimento de enterite necrótica através de uma indução local de resposta inflamatória mediada por células T, que aumentam a produção de muco intestinal. Esta condição estaria relacionada com alterações na composição da microbiota do íleo e favoreceriam o desenvolvimento de bactérias mucolíticas, como o *Clostridium perfringens*, além disso, existe uma relação da sensibilidade das células de Goblet, produtoras de muco, à injúrias inflamatórias e o impacto desta resposta na produção de muco sobre a população microbiana do intestino (COLLIER et al., 2008). Fatores de manejo que podem influenciar no desenvolvimento de enterite necrótica incluem: cama

com alto teor de fibras (TRUSCOTT & AL SHEIKHLY, 1977), densidade, alterações nos programas de arração, situações de estresse (McDEVITT et al., 2006).

Em relação às dietas, existem trabalhos mostrando a relação complexa entre a incidência de enterite necrótica e alguns tipos de ingredientes, como por exemplo, trigo, cevada, centeio, arroz, substâncias estas ricas em polissacarídeos solúveis não amilolíticos, além de dietas contendo altos níveis protéicos e a inclusão de proteínas de origem animal, como a farinha de peixe, por exemplo, podem predispor ou exacerbar a enfermidade (TRUSCOTT & AL SHEIKHLY, 1977; KALDHUSDAL & HOFSHAGEN, 1992; RIDDELL & KONG, 1992; TAKEDA et al., 1995). A natureza das dietas, talvez seja o fator mais importante não bacteriano que predispõe ao aparecimento de enterite necrótica. Rações fareladas ou mesmo peletizadas com alto índice de pequenas partículas, também estão relacionadas ao aumento da enfermidade. A incidência de enterite necrótica em aves alimentadas com dietas à base de cevada é 6 a 10 vezes maior do que aves alimentadas com dietas à base de milho, e a mortalidade é 2 a 3 vezes maior (COOPER & SONGER, 2009).

#### **2.1.6. Diagnóstico**

Inúmeros trabalhos demonstram detalhadamente os procedimentos para o diagnóstico de clostridioses, o qual pode ser efetuado com base nos sinais clínicos (depressão, diarreia e morte súbita), lesões macroscópicas constituídas de necrose aguda do intestino delgado, lesões microscópicas, isolamento do agente e detecção das toxinas de espécies patogênicas em fluidos sobrenadantes de culturas puras (SONGER, 1996). As lesões macroscópicas podem ser confundidas com infecções por *Clostridium colinum* ou coccidiose, principalmente em frangos de corte, as quais determinam lesões ulcerativas na mucosa do intestino delgado. O agente, pode ser isolado do conteúdo intestinal, raspados de mucosa ou nódulos linfóides hemorrágicos, através de incubação anaeróbica por 18 horas a 37°C em placas de agar sangue (CHALMERS et al., 2007).

Na forma clínica, formas de auxílio ao diagnóstico compreendem: epidemiologia, idade das aves, presença de fatores imunodepressores, alterações climáticas, problemas de manejo, como alta densidade, situações de estresse, outras enfermidades associadas, presença de alta mortalidade com curso rápido e alterações patológicas compatíveis com o quadro.

Entre as técnicas de diagnóstico, são descritas: inibição de atividade hemolítica de cepas de campo do tipo A e C, métodos de citotoxicidade para identificação de enterotoxinas, métodos enzimáticos como ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), aglutinação de látex, imunoeletroforese e provas genéticas ou detecção de toxinas através de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (SONGER, 1996).

### 2.1.7. Profilaxia e tratamento

Segundo Ficken & Wages, (1997) apud BRENNAN et al., (2001) a enterite necrótica causada pelo bacilo Gram positivo *Clostridium perfringens* é uma doença de grande importância em aves, causando morbidade e mortalidade significativa em todos os criatórios do mundo. O controle desta condição é dependente de inúmeros fatores, incluindo redução de fatores de risco nutricionais, infecções entéricas concomitantes, particularmente coccidiose e, o uso de aditivos com atividade contra a bactéria.

Embora diversos estudos tenham demonstrado a eficácia de certos antibióticos na prevenção da enterite necrótica, (TRUSCOTT & AL SHEIKHLY, 1977; PRESCOTT et al., 1978; WATKINS et al., 1997), poucos tem demonstrado efetividade no controle de enterite necrótica, quando utilizados através da ração (BRENNAN et al., 2001).

Normalmente, o *Clostridium perfringens* é suscetível *in vitro* a penicilina G, cefalosporinas, tetraciclina, salinomicina, monensina, bacitracina, lincomicina entre outros, e apresenta resistência a flavomicina e usualmente, a aminoglicosídeos (SONGER, 1996). Também são relatados diversos estudos, demonstrando a resistência adquirida de agentes utilizados como promotores de crescimento e profilaxia da doença, como tetraciclina, bacitracina, virginamicina, antibióticos macrolídeos lincosamídeos e outros, no controle de cepas isoladas de aves (ROOD et al., 1985; DEVRIESE et al., 1993).

Na Europa, como nos demais países, a clostridiose era comumente controlada com a utilização de antimicrobianos promotores de crescimento e anticoccidianos ionóforos, ambos com efeito antibiótico sobre bactérias Gram +, como o *Clostridium sp.* Com a proibição pelos países europeus, a partir de 1996 (Suécia) e com a última proibição em 2006 (Regulation 1831/2003/EC), do uso de antibióticos em uso contínuo como melhoradores de produção, a incidência de enterite necrótica em aves aumentou

(VAN IMMERSEEL et al., 2004), sendo que atualmente, nos países europeus a clostridiose vem sendo controlada através do uso de agentes anticoccidianos, com ação em Gram +, como narasina, boas práticas de manejo e dietas modificadas (ELWINGER et al., 1998; KALDHUSDAL et al., 2001).

A indústria avícola ainda depende dos antimicrobianos para viabilizar a produção, através do controle desta importante enfermidade, que provoca grande impacto econômico e altera as condições de bem estar animal. Estimativas da prevalência da doença variam de 1-40%, bem como o custo estimado da doença, e a forma de manifestação subclínica é muito importante, já que muitas vezes não é detectada e, conseqüentemente, não tratada (McDEVITT et al., 2006).

Com a aprovação em 2007, pelo Ministério da Agricultura do Brasil, do regulamento técnico para licenciamento de produtos antimicrobianos de uso veterinário (Diário Oficial da União, seção 1, nº22 – 31 de janeiro de 2007) foi proibido o uso de aditivos antimicrobianos usados continuamente via rações, sob a forma de promotores de crescimento, e foram estabelecidas novas regras para o uso destes medicamentos sob a forma terapêutica. Nesta nova condição, a utilização de antibióticos para o controle de enterite necrótica ficou limitada e é necessária a busca de alternativas para manter a sanidade, o bem estar das aves e os níveis de produtividade.

#### **2.1.7.1. Avilamicina**

A avilamicina é um dos antibióticos mundialmente utilizado para a prevenção e controle da enterite necrótica em frangos de corte. Pertence ao grupo dos antibióticos oligossacarídios do grupo da orthosomicina, sendo produzido a partir da fermentação do *Streptomyces viridochromogenes*. A indicação de uso, como produto terapêutico veterinário, é referente ao controle de infecções entéricas, provocadas por bactérias Gram +, em galinhas, perus e demais espécies produtivas, sendo recomendada uma dose oral de 10 mg/kg de alimento (EMEA, 2007).

Apesar de existirem inúmeras moléculas com atividade sobre bactérias Gram +, diversos trabalhos demonstram a eficácia da avilamicina na prevenção e controle da enterite necrótica. Watkins et al., (1997), demonstraram baixos valores do CIM (concentração inibitória mínima) na avaliação *in vitro* do antibiótico frente ao *Clostridium perfringens* (Tabela 2). Outros trabalhos confirmam a ação da avilamicina sobre a redução na contagem bacteriana do *Clostridium perfringens* associada à

mortalidade, enquanto assegurou a manutenção dos índices zootécnicos e benefícios em relação à qualidade de carcaça (ELWINGER et al., 1998; JOHANSSON et al., 2004).

Tabela 2: Concentração inibitória mínima (CIM) de vários agentes sobre 22 cepas de *Clostridium perfringens* obtidas de perus criados em condições comerciais

Composto	Número de cepas com CIM (mg/L)													
	≤0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
Avilamicina	1	7	12	2										
Avoparcina	-	11	9	2										
Bacitracina	-	-	-	-	-	-	3	10	7	-	1	-	1	-
Lincomicina	-	-	-	-	3	-	1	5	2	-	1	1	-	9
Monensina	-	-	-	5	15	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Narasina	-	4	17	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicilina	17	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tilmicosina	-	-	-	-	-	13	5	-	-	-	-	-	4	-
Tilosina	-	-	-	-	-	14	4	-	-	-	-	-	4	-
Virginiamicina	-	-	-	-	-	12	-	3	6	1	-	-	-	-

Fonte: Watkins et al (1997).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral a avaliação da ação de uma substância antimicrobiana no controle de enfermidades entéricas em perus de corte, sob condições de desafio, provocadas por *Clostridium perfringens* isolados de campo.

#### 3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Avaliar a eficácia da avilamicina frente ao desafio de *Clostridium perfringens* artificialmente inoculado em perus de corte.
- 3.2.2 Avaliar a presença da doença e suas conseqüências em grupos infectados e medicados em comparação com grupos infectados e não medicados.
- 3.2.3 Avaliar a resposta do uso da avilamicina nos resultados de produção de grupos infectados e medicados em comparação com aves infectadas e não medicadas.
- 3.2.4 Avaliar a correlação entre o grau de lesões macroscópicas observadas à necropsia, com o grau de lesões dos mesmos intestinos observados em avaliação histopatológica.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Delineamento dos experimentos**

Três avaliações experimentais foram conduzidas. Duas avaliações buscando identificar o impacto do desafio por *Clostridium perfringens* sobre o desempenho de perus recebendo alimentação medicada desde o primeiro dia de desafio (15 dias de idade), até o final da avaliação (57 dias no experimento I e 34 dias no experimento II) seguidas de uma terceira avaliação que buscou correlacionar o grau de lesões macroscópicas com o nível de alteração microscópica dos intestinos.

#### **4.1.1 Localização**

Os dois experimentos em boxes foram conduzidos nas instalações de pesquisa de uma integradora de perus, localizada em Chapecó, Santa Catarina, e a avaliação histológica dos tecidos foi realizada nas instalações do CDPA (Centro de Diagnóstico em Patologia Aviária) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em Porto Alegre, RS.

#### **4.1.2 Antimicrobiano e anticoccidianos**

Foi utilizado o antimicrobiano avilamicina na concentração de 10% e nas dosagens de 10, 20 e 30 mg/kg de peso vivo, a partir dos 15 dias de idade das aves até os 57 dias, no final do experimento I e nas dosagens de 30 e 100 mg/kg de peso vivo até os 34 dias, no final do experimento II.. Não foram utilizados anticoccidianos buscando um maior desafio entérico nas condições experimentais.

## 4.2 EXPERIMENTO I

### 4.2.1 Delineamento do Experimento I

O delineamento do experimento I foi desenvolvido para avaliar dosagens crescentes do antibiótico e sua resposta frente ao desafio pelo *Clostridium perfringens* com uma dosagem aproximada de  $1 \times 10^{10}$  cfu/ave, frente aos grupos controles, conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3 - Delineamento experimento I – 1.800 perus machos

Tratamentos (via ração)	Desafio por <i>Clostridium perfringens</i> (via água)
1 Avilamicina 10 ppm – 15 – 57 dias	Sim
2 Avilamicina 20 ppm – 15 – 57 dias	Sim
3 Avilamicina 30 ppm – 15 – 57 dias	Sim
4 Controle infectado – Não medicado	Sim
5 Controle não infectado – Não medicado	Não

Para evitar o risco de contaminação cruzada entre os tratamentos, foram utilizadas regras específicas referentes ao manejo dos boxes, equipamentos e fômites (troca de calçados, uniformes, etc).

Antes do início do experimento, todo pessoal envolvido no manejo das aves, recebeu instruções sobre os cuidados para evitar contaminação cruzada entre tratamentos.

As aves foram vacinadas no incubatório contra Bouda Aviária e Pneumovirose.

Nenhum anticoccidiano foi incluído nas rações para oportunizar uma maior desafio por coccídias e facilitar o desenvolvimento do quadro entérico desejado.

Amostras das rações foram enviadas para análise, para confirmar a ausência de anticoccidiano. (Anexo 2)

### 4.2.2 Dietas e arraçoamento

O programa de arraçoamento foi dividido em 2 fases, sendo ração inicial (sem medicação) do 1° ao 14° dia, ração de crescimento do 15° dia ao 57° dia, medicada com

antibiótico nos tratamentos 1, 2 e 3. Para os tratamentos 4 e 5 (Controle Infectado-Não Medicado e Controle Não Infectado-Não Medicado), a ração não recebeu nenhum aditivo.

Dietas com elevados níveis proteicos foram formuladas e produzidas em uma fábrica de rações comerciais. Todos nutrientes foram similares às dietas comerciais (Tabela 4).

Tabela 4: Níveis nutricionais recomendados pela genética (Nicholas 700)

Nutrientes	Inicial P00	Crescimento P01
Energia metabolizável aparente (kcal/Kg)	2910	3040
Proteína bruta (%)	28	26
Lisina digestível (%)	1,69	1,55
Met+Cis digestível (%)	1,01	0,93
Treonina digestível (%)	1,03	0,95
Cálcio (%)	1,48	1,40
Fósforo disponível (%)	0,76	0,70
Sódio (%)	0,17	0,17
Colina (ppm)	2000	1900

Fonte: Aviagen Turkeys Inc. – Nicholas 85x700

O antibiótico (avilamicina 10%) foi adicionado separadamente, sendo que no experimento I, foram utilizadas três dosagens, 10 ppm (tratamento 1), 20 ppm (tratamento 2) e 30 ppm (tratamento 3). O produto foi adicionado à uma ração basal única, previamente preparada, assegurando os mesmos níveis nutricionais para todos tratamentos. Em função da impossibilidade de envio das amostras de rações para análise no exterior, foram consideradas as respectivas dosagens, obedecendo-se os níveis de inclusão do premix em cada batida de ração.

As aves foram alimentadas à vontade, exceto nos dias em que foram feitas as inoculações com *Clostridium perfringens*, ocasião em que o alimento foi retirado na noite anterior à inoculação. O fornecimento de água seguiu o mesmo critério descrito anteriormente.

Todos dados foram registrados individualmente, por box e por tratamento, aos 14, 21, 28, 35, 42 e 57 dias de idade, para avaliação do ganho de peso e consumo

alimentar. A quantidade total de ração fornecida para cada box foi pesada nas respectivas datas e os valores registrados.

Todas as aves mortas foram pesadas, individualmente, para que o peso fosse incluído no cálculo da conversão alimentar, no final de cada fase.

#### **4.2.3 Seleção das aves e identificação**

Foram utilizados 1800 perus neste experimento. Todos sexados, machos de 1 dia de idade, provenientes do incubatório da Sadia S.A, em Chapecó, SC, da linhagem Nicholas 700, saudáveis e com pesos homogêneos. As aves foram pesadas e distribuídas aleatoriamente nos diferentes boxes, sendo identificados por tratamento e por repetição.

#### **4.2.4 Instalações e manejo**

As aves foram alojadas em um galpão experimental adaptado para a produção de perus, com 12 x 104 metros, equipado com cortinas, ventiladores, aspersores uniformemente distribuídos no ambiente para o manejo de ventilação e temperatura. O galpão apresentava 90 boxes com 8 metros quadrados, dos quais 60 boxes foram utilizados no experimento, contendo 30 aves por box (3,75 aves por metro quadrado).

O experimento foi composto por 5 tratamentos, distribuídos aleatoriamente, em um sistema inteiramente casualizado, com 12 repetições por tratamento.

Cada box estava equipado com um comedouro e um bebedouro pendular. Seguindo os procedimentos normais de manejo, a iluminação foi de 23 horas no primeiro dia de alojamento, seguida de 1 hora de redução nos 5 dias subsequentes, até atingir um período de 18 horas de luz diária, até o final do experimento. A temperatura foi mantida em 36°C no primeiro dia, seguindo os padrões da linhagem nos dias seguintes do experimento. As aves foram criadas sobre cama que já havia sido utilizada, com aproximadamente 10 cm de profundidade, provenientes de dois experimentos anteriores no mesmo galpão, nos quais não foram relatadas enfermidades, buscando-se com isso, um maior desafio entérico.

#### 4.2.5 Parâmetros avaliados

No primeiro dia de alojamento, foi calculado o peso médio das aves, por box. Seguindo o protocolo estabelecido, foram avaliados posteriormente, o peso médio, consumo alimentar e conversão alimentar, respectivamente aos 14, 21, 28, 35, 42 e 57 dias de idade. As aves mortas foram pesadas individualmente, para correção da conversão alimentar. As aves enfermas, sem acesso ao alimento e à água, foram eliminadas de forma humanitária, seguindo os princípios de bem estar dos animais.

#### 4.2.6 Inoculação e monitoria de enterite necrótica

O desafio foi efetuado através de inoculos, obtidos a partir de um caldo de cultura, com aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  cfu/ml de *Clostridium perfringens* obtido da mesma espécie, e relacionado a um caso clínico de campo. Foi administrado através dos bebedouros, uma vez ao dia para todos tratamentos com desafio ( T1 a T4 ). A inoculação foi realizada após um período prévio de jejum hídrico de aproximadamente 4 horas, e durante 3 dias consecutivos, a partir do 14° dia de vida das aves até o 16° dia, seguindo um método adaptado de Collier et al, (2008) . Água limpa sem inóculo e no mesmo volume, foi utilizada para tratar os grupos controles não medicados (T5). As aves consumiram toda a água fornecida, com e sem inoculos, em aproximadamente 30 minutos. No 18° dia, ou seja, 2 dias após a última inoculação, 1 ave por box, foi escolhida aleatoriamente, sacrificada de forma humanitária, e submetida a avaliação do escore de lesões intestinais, seguindo um modelo modificado aos padrões descritos por Prescott, J.F. (1979), conforme exemplificado nas figuras de 1 a 5.



Figura 1 - Escore Zero (0) – Intestino sem alteração macroscópica

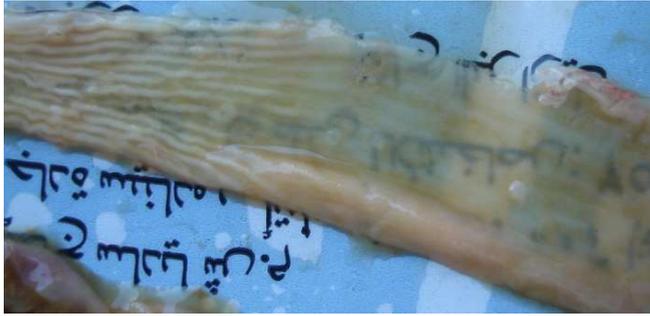


Figura 2 - Escore 1- Intestino com parede fina ou friável



Figura 3 - Escore 2 – Intestino com necrose ou ulcerações focais



Figura 4 - Escore 3 – Intestino com lesões maiores de necrose



Figura 5 - Escore 4 – Intestino com necrose severa e extensa típica de quadros clínicos

Amostras de intestinos foram enviadas ao laboratório para avaliação dos raspados de mucosa, a fim de identificar a possível presença de oocistos de *Eimeria sp.*, mas os resultados foram negativos (Anexo 4)

#### **4.2.7 Considerações sobre o bem estar dos animais**

Preocupações relativas ao bem estar ou qualquer condição específica de algum animal no grupo experimental, foram levadas imediatamente ao conhecimento dos coordenadores do experimento para avaliação das alternativas de tratamentos e direcionamento de ações.

#### **4.2.8 Análise dos dados**

##### **4.2.8.1 Processamento das informações**

Os ganhos médios de peso (g/ave) aos 14, 21, 28, 35, 42 e 57 dias obtidos de cada box, foram calculados a partir do peso vivo total e o número de aves vivas pesadas em cada período.

O consumo de ração total (em kg) e peso total das aves (em kg), de cada box avaliado, foram utilizados no cálculo da conversão alimentar (kg ração/kg de ganho de peso). Consumo médio de ração (g/ave) de cada box, foi calculado a partir do consumo total de ração em cada box, e o número de aves vivas em cada período avaliado, respectivamente.

##### **4.2.8.2 Análise de variância**

Foram analisados: consumo de alimento, ganho de peso, conversão alimentar e mortalidade nos períodos de 1-14, 15-21, 22-28, 29-35, 36-42, 43-57 e, no período total de 1-57 dias de idade.

O software SAS® (SAS Institute, 1988) foi utilizado para analisar os dados do experimento.

As diferenças entre as médias foram analisadas através do teste de Tukey ( $P < 0.05$ ).

## 4.3 EXPERIMENTO II

### 4.3.1 Delineamento do experimento

O experimento II foi conduzido nas mesmas bases de delineamento do experimento I, com as seguintes modificações (Tabela 5).

Tabela 5 - Delineamento experimento II – 2.160 perus machos

Tratamentos (via ração)	Desafio por <i>Clostridium perfringens</i> (via água)
1 Avilamicina 30 ppm – 15 – 34 dias	Sim
2 Avilamicina 100 ppm – 15 – 34 dias	Sim
3 Controle infectado – Não medicado	Sim
4 Controle não infectado – Não medicado	Não

### 4.3.2 Dietas e arraçoamento

O programa de arraçoamento foi dividido em 2 fases, sendo ração inicial (sem medicação) do 1º ao 14º dia e, ração crescimento do 15º dia ao 34º dia (medicada com antibiótico nos tratamentos 1 e 2). Os níveis nutricionais foram os mesmos utilizados no experimento I.

O antibiótico (avilamicina 10%) foi adicionado separadamente. No experimento II, o produto foi utilizado nas dosagens de 30 ppm (tratamento 1) e 100 ppm (tratamento 2), respectivamente, sobre uma ração basal única, previamente preparada, assegurando os mesmos níveis nutricionais para todos tratamentos. Em função da impossibilidade de envio das amostras de rações para análise no exterior, foram consideradas as respectivas dosagens, obedecendo-se os níveis de inclusão do premix em cada batida de ração.

Todos dados foram registrados individualmente, por box e por tratamento, aos 14, 21, 28 e 34 dias de idade, para avaliação do ganho de peso e consumo alimentar. A quantidade total de ração fornecida para cada box foi pesada nas respectivas datas e os valores registrados.

### **4.3.3 Seleção das aves e identificação**

Foram utilizados 2160 perus no experimento II. Todos sexados, machos de 1 dia de idade, provenientes do incubatório da Sadia S.A, em Chapecó, SC, da linhagem Nicholas 700, saudáveis e com pesos homogêneos. As aves foram pesadas e distribuídas aleatoriamente nos diferentes boxes, sendo identificados por tratamento e por repetição.

### **4.3.4 Instalações e manejo**

As instalações apresentavam 94 boxes, cada um medindo 8 metros quadrados e contendo 45 aves por box (5,62 aves por metro quadrado). O experimento foi composto de 4 tratamentos, distribuídos aleatoriamente, em um sistema inteiramente casualizado, com 12 repetições por tratamento, num total de 48 boxes, ou seja, metade do galpão (4 tratamentos x 6 repetições) foi devidamente limpo, desinfetado e isolado com duplas cortinas, para evitar a passagem de pessoas e equipamentos, o qual recebeu cama nova com aproximadamente 10 cm de espessura em cada box. A outra metade do galpão (4 tratamentos x 6 repetições), foi devidamente preparada porém, foi mantida com a cama reutilizada de 2 lotes, para repetir as condições de ambiente do experimento I. A instalação estava equipada com cortinas, ventiladores e aspersores, uniformemente distribuídos no ambiente para manejo de temperatura e ventilação. Cada box continha um comedouro e um bebedouro pendular. As aves receberam 23 horas de luz no primeiro dia, seguidas de 1 hora de redução nos 5 dias subseqüentes, até atingir um período de 18 horas de luz, cujo tempo foi mantido até o final do experimento. Quanto às pesagens, foram realizadas com 14, 21, 28 e 35 dias. No primeiro dia, foi calculado o peso médio por box. No primeiro dia de alojamento, a temperatura foi mantida em 36°C e, seguindo os procedimentos padrões da granja experimental, registros de temperatura máxima e mínima, foram efetuados diariamente.

### **4.3.5 Parâmetros avaliados**

No primeiro dia de alojamento, foi calculado o peso médio das aves, por box. Seguindo o protocolo estabelecido, foram avaliados posteriormente, o peso médio, consumo alimentar e conversão alimentar, aos 14, 21, 28 e 34 dias de idade. As aves mortas foram pesadas individualmente, para correção da conversão alimentar. As aves

enfermas, sem acesso ao alimento e à água, foram eliminadas de forma humanitária, seguindo os princípios de bem estar dos animais.

#### **4.3.6 Inoculação e monitoria de enterite necrótica**

Seguiu os mesmos padrões utilizados no experimento I (descrito anteriormente).

O inóculo foi administrado através dos bebedouros, uma vez ao dia para todos tratamentos com desafio (T1 a T3). Água limpa sem inóculo e no mesmo volume, foi utilizada para tratar os grupos controles não medicados ( T4).

#### **4.3.7 Análise dos dados**

##### **4.3.7.1 Processamento das informações**

Os ganhos médios de peso (g/ave) aos 14, 21, 28 e 34 dias obtidos de cada box, foram calculados a partir do peso vivo total e o número de aves vivas pesadas em cada período.

O consumo de ração total (em kg) e peso total das aves (em kg), de cada box avaliado, foram utilizados no cálculo da conversão alimentar (kg ração/kg de ganho de peso). Consumo médio de ração (g/ave) de cada box, foi calculado a partir do consumo total de ração em cada box, e o número de aves vivas em cada período avaliado, respectivamente.

##### **4.3.7.2 Análise de variância**

Foram analisados: consumo de alimento, ganho de peso, conversão alimentar e mortalidade nos períodos de 1-14, 15-21, 22-28 e 29-34 e, no período total de 1-34 dias de idade.

O software SAS® (SAS Institute, 1988) foi utilizado para analisar os dados do experimento. As diferenças entre as médias foram analisadas através do teste de Tukey ( $P < 0.05$ ).

## 4.4 EXPERIMENTO III

### 4.4.1 Processamento Histológico

As amostras de intestino foram seccionadas transversalmente, desidratadas em série de álcool em concentração crescente, incluídas em blocos de parafina e coradas com hematoxilina e eosina conforme Luna (1968).

### 4.4.2 Análise dos intestinos

Os intestinos foram divididos em quadrantes e numerados em sentido horário conforme demonstrado na Figura 6. Em cada quadrante foram avaliados seis ítems: (1) presença de necrose, (2) hemorragia, (3) desprendimento do epitélio, (4) oocistos de eimeria, (5) bastonetes e (6) células inflamatórias, conforme exemplificado nas figuras 7 a 11.

Neste experimento, com a finalidade de tornar a análise o menos subjetiva possível, foi determinada uma avaliação de forma binária, recebendo escore zero (ausência) ou um (presença), assim para cada quadrante poderia obter-se um escore máximo de seis. (Anexo 6).

O escore final do órgão foi dado através da média da soma dos escores dos quatro quadrantes, sendo assim, o maior escore que uma amostra poderia receber seria seis.

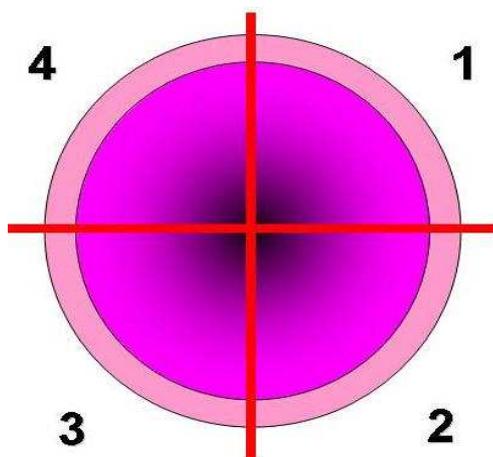


Figura 6 - Compartimentalização do intestino para definição de escore microscópico

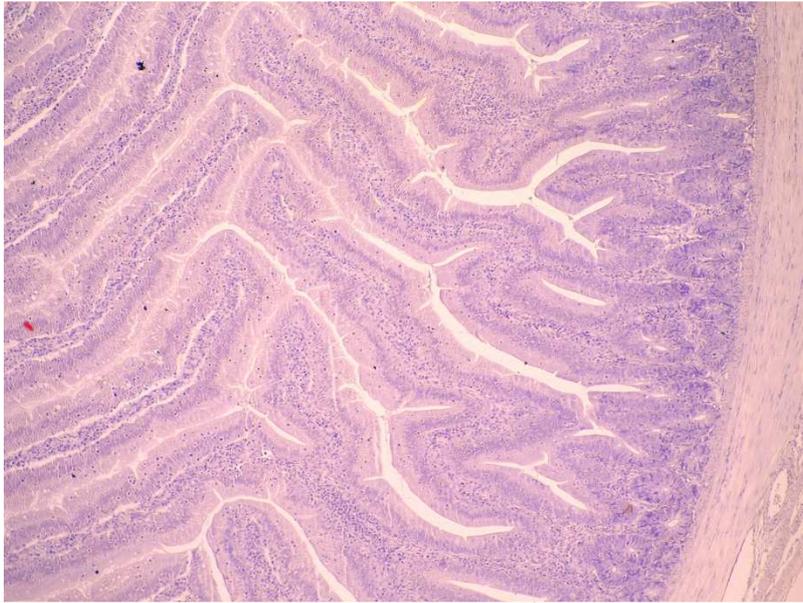


Figura 7: Intestino com vilosidades normais (coloração HE; aumento 400x)

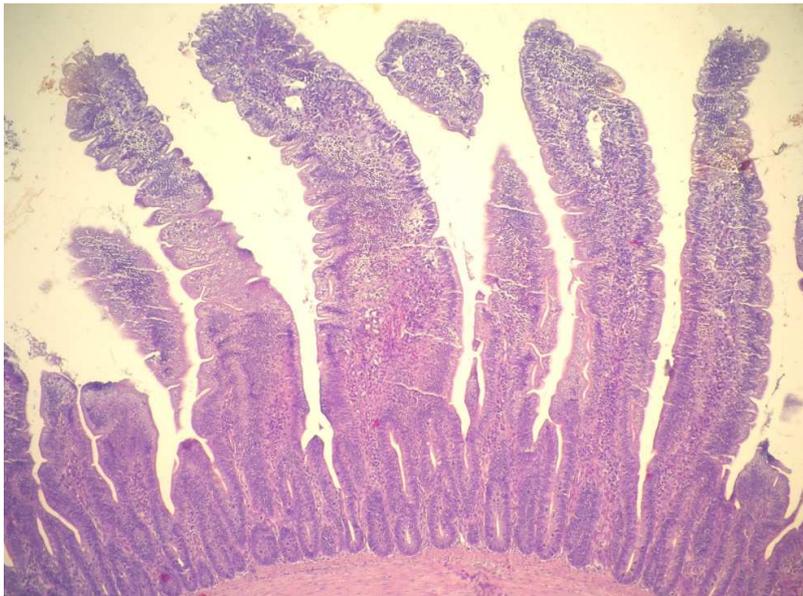


Figura 8: Intestino com vilosidades necrosadas (coloração HE; aumento 400 x)

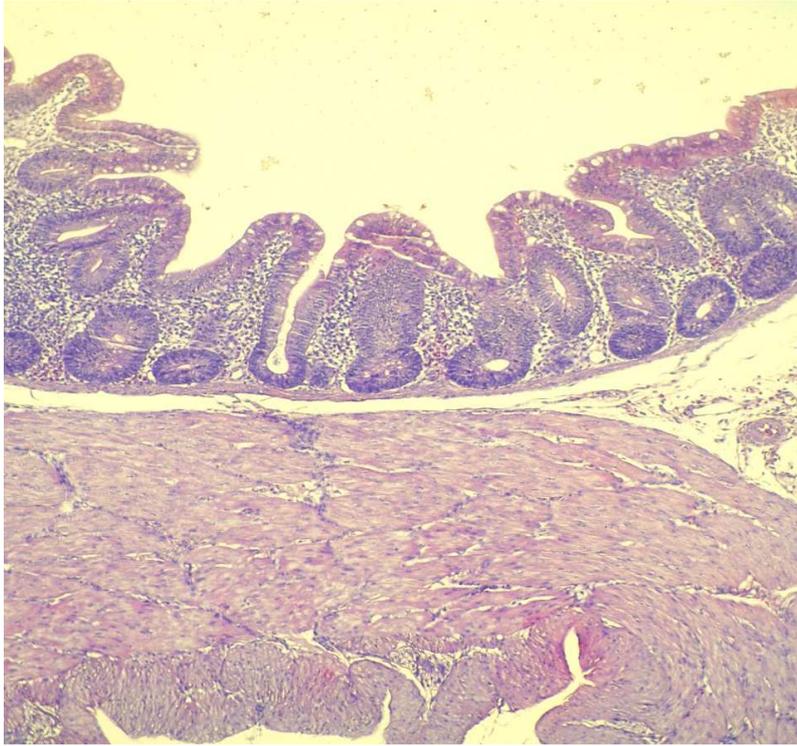


Figura 9: Intestino com vilosidades diminuídas pela necrose (coloração HE; aumento 400x)

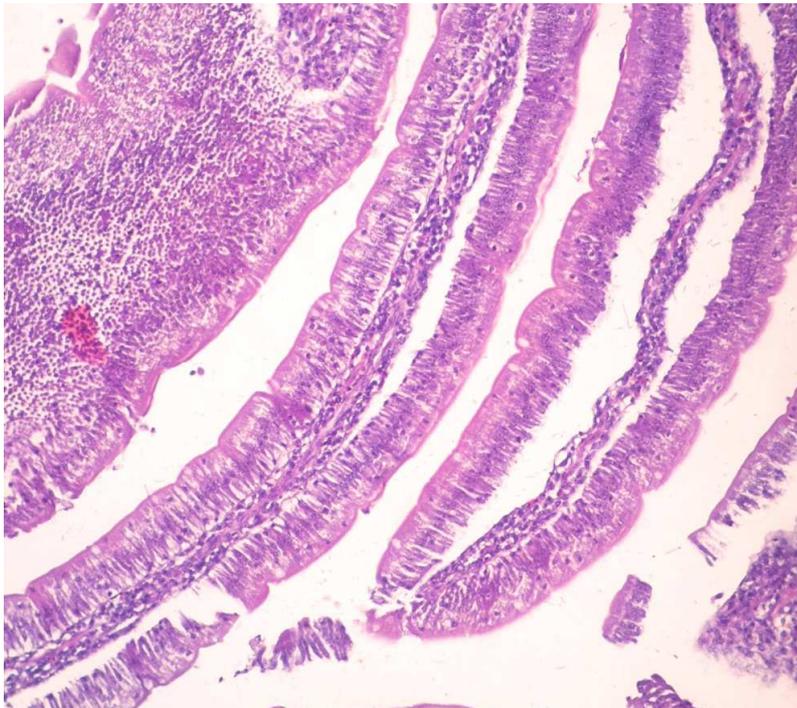


Figura 10: Desprendimento do epitélio intestinal (coloração HE; aumento 400x)

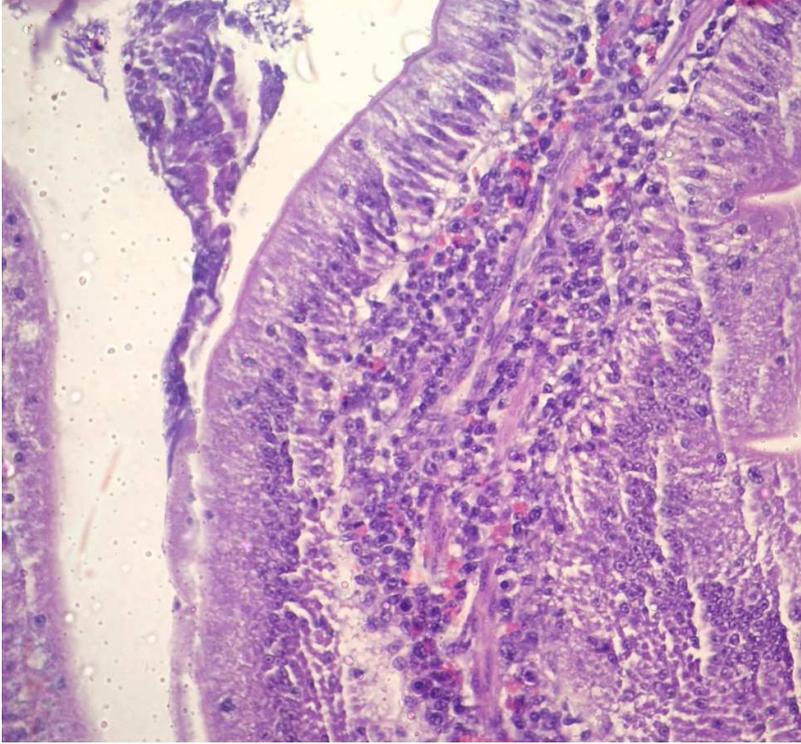


Figura 11: Infiltração linfocitária (coloração HE; aumento 400x)

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Experimento I

Na tabela 6, observa-se que a conversão alimentar, aos 42 dias, das aves medicadas com o tratamento 3 (avilamicina 30 ppm) foi estatisticamente melhor que o grupo controle não infectado, não medicado, enquanto que não diferiu dos demais tratamentos, inclusive em relação ao controle infectado e não medicado. Aos 57 dias de vida, a conversão das aves medicadas com o tratamento 3 (avilamicina 30 ppm) foi significativamente melhor que o tratamento infectado não medicado, mas não diferiu das aves dos demais tratamentos (10 e 20 ppm ou controle não infectado, não medicado). Em relação aos demais parâmetros avaliados (peso médio, ganho de peso diário, conversão alimentar e mortalidade), não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos. É importante observar o baixo coeficiente de variação (CV) em relação aos parâmetros avaliados.

Tabela 6: Conversão alimentar dos 14 aos 57 dias de idade das aves em relação ao tipo de cama.

Tratamentos	CONV14	CONV21	CONV28	CONV35	CONV 42	CONV57
Avilamicina 10 ppm	1,135	1,294	1,356	1,447	1,587ab	1,673ab
Avilamicina 20 ppm	1,142	1,288	1,348	1,449	1,601 ab	1,674 ab
Avilamicina 30 ppm	1,132	1,278	1,345	1,440	1,579 b	1,663 b
Infectado Não Medic.	1,147	1,292	1,348	1,453	1,602 ab	1,684 a
Não infectados Não Medic	1,159	1,304	1,364	1,460	1,609 a	1,681 ab
MÉDIA	1,143	1,291	1,352	1,450	1,596	1,676
CV	2,93	1,95	1,54	1,39	1,45	1,00

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ )

### 5.2 Experimento II

Na tabela 7, referente ao experimento II, observa-se a influencia do tipo de cama sobre o peso médio das aves. Houve diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre as médias de peso com relação a variável analisada “ tipo de cama”, onde pode-se constatar peso médio superior aos 14 dias e aos 34 dias de idade, naquelas aves criadas sobre cama nova. Também para esta variável, é importante observar o baixo coeficiente de variação (CV) em relação aos parâmetros avaliados.

Tabela 7: Peso médio dos 14 aos 34 dias de vida das aves em relação ao tipo de cama.

	PM14	PM21	PM28	PM34
Tratamentos	Nova/Velha/Média			
Avilamicina 30 ppm	342/324/333	643/640/642	1137/1120/1128	1691/1609/1650
Avilamicina 100 ppm	357/326/341	672/648/660	1178/1126/1152	1744/1604/1674
Infectado Não Medic.	344/319/332	640/634/637	1130/1091/1110	1677/1594/1636
Não infectados Não Medic	340/330/335	633/646/640	1117/1119/1118	1664/1603/1633
MÉDIA	346 a/324 b/335	647/642/645	1141/1114/1127	1694 a/1603 b/1648
CV	4,38	3,96	4,15	3,93

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (P<0,001)

Na tabela 8, com relação a variável “conversão alimentar”, observou-se melhor resultado aos 14 dias nas aves criadas sobre cama nova. Entretanto, aos 21 dias de idade, ou seja, após o período de desafio por clostrídios, uma melhor conversão alimentar, foi observada nas aves criadas sobre cama velha. Observou-se diferença estatística entre os tratamentos, nas avaliações da conversão alimentar dos 28 e 34 dias de idade. Aos 28 dias, as aves que receberam ração medicada com avilamicina na dosagem de 100 ppm (tratamento 2), apresentaram conversão alimentar significativamente melhor, comparada com os tratamentos 3 (controle infectado e não medicado) e 4 (controle não infectado, não medicado), embora não tenha diferido estatisticamente do tratamento 1 (avilamicina 30 ppm). Com relação à conversão alimentar aos 34 dias de idade, a melhor resposta foi observada com o tratamento 2 (avilamicina 100 ppm) frente ao controle não infectado, não medicado, embora não tenha diferido em relação aos demais tratamentos (T1-avilamicina 30 ppm, T3- controle infectado, não medicado). É importante observar o baixo coeficiente de variação (CV) em relação aos parâmetros avaliados.

Tabela 8: Conversão alimentar dos 14 aos 34 de vida das aves em relação ao tipo de cama.

	CONV14	CONV21	CONV28	CONV34
Tratamentos	Nova/Velha/Média			
Avilamicina 30 ppm	1,132/1,164/1,148	1,263/1,252/1,257	1,312/1,290/1,301 ab	1,376/1,371/1,373 ab
Avilamicina 100 ppm	1,133/1,155/1,144	1,257/1,230/1,244	1,310/1,263/1,286 b	1,378/1,357/1,368 b
Infectado Não Medic.	1,123/1,199/1,161	1,263/1,259/1,261	1,313/1,328/1,321 a	1,383/1,399/1,391 ab
Não infectados Não Medic	1,118/1,158/1,138	1,267/1,247/1,257	1,318/1,322/1,320 a	1,382/1,410/1,396 a
MÉDIA	1,127 b/1,169 a/1,148	1,262 a/1,247 b/1,255	1,313/1,301/1,307	1,379/1,384/1,382
CV	3,39	2,08	2,08	1,80

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (P<0,05)

Na tabela 9, é possível observar a influência da cama sobre o consumo de alimento. Em todas as fases de arraçãoamento, as aves criadas sobre cama nova,

apresentaram consumo significativamente superior àquelas criadas sobre cama reutilizada ( $P < 0,05$ ). É importante observar o baixo coeficiente de variação (CV) em relação aos parâmetros avaliados.

Tabela 9: Consumo de ração dos 14 aos 34 dias de vida das aves em relação ao tipo de cama.

	CONS14	CONS21	CONS28	CONS34
Tratamentos	Nova/Velha/Média			
Avilamicina 30 ppm	387/377/382	812/801/807	1492/1447/1469	2326/2207/2267
Avilamicina 100 ppm	404/376/390	844/797/821	1543/1420/1481	2402/2175/2289
Infectado Não Medic.	386/382/384	809/796/803	1484/1447/1466	2319/2230/2274
Não infectados Não Medic	380/382/381	802/805/804	1472/1480/1476	2299/2260/2279
MÉDIA	390 a/379 b/384	817 a/800 b/808	1498 a/1448 b/1473	2336 a/2218 b/2277
CV	4,70	3,16	4,09	4,05

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ )

Na tabela 10, demonstra que nos períodos entre 21-28 dias e 28-34 dias, ocorreu um ganho de peso maior nas aves criadas sobre cama nova, fenômeno similar ao observado no consumo de alimento. Em relação as demais variáveis, não observou-se diferenças significativas, entre os tratamentos avaliados. É importante observar o baixo coeficiente de variação (CV) em relação aos parâmetros avaliados.

Tabela 10: Ganho de peso por fase de criação das aves em relação ao tipo de cama.

	GANHOPESO14-21	GANHOPESO21-28	GANHOPESO28-34
Tratamentos	Nova/Velha/Média		
Avilamicina 30 ppm	301/316/309	494/479/487	554/489/522
Avilamicina 100 ppm	315/322/319	506/478/492	565/478/522
Infectado Não Medic.	296/314/305	490/457/474	547/503/525
Não infectados Não Medic	293/315/304	484/474/479	547/484/515
MÉDIA	301 b/317 a/309	493 a/472 b/483	553 a/489 b/521
CV	4,42	5,38	5,60

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ )

### 5.3 Experimento III

A tabela 11 apresenta os escores médios obtidos dos intestinos das aves dos experimentos I e II avaliados macro e microscópicamente. Foram utilizadas as 39 amostras que puderam ser aproveitadas na avaliação histopatológica (as demais foram prejudicadas por problemas de acondicionamento, transporte ou conservação) e comparadas com os escores macroscópicos obtidos dos respectivos intestinos. Observa-se que há uma baixa correlação entre os distintos métodos de avaliação ( $r=0,14$ ).

Também é possível observar que o coeficiente de variação da avaliação macroscópica foi de 91% , enquanto na avaliação microscópica o coeficiente de variação ficou menor do que a metade da observação anterior, ou seja, 38%. (Anexo 6).

Tabela 11: Escores médios dos intestinos das aves dos experimentos I e II avaliados microscopicamente.

Escore das lesões	Média dos escores(+SD)	N	CV	R
Microscópicos	2,79 ± 1,06	39	38%	0,14
Macroscópicos	1,05 ± 0,96	39	91%	0,14

Nos experimentos I e II, embora amostras do conteúdo intestinal, tenham sido coletadas imediatamente após a necropsia dos animais, para possível isolamento e contagem de *Clostridium perfringens*, os cultivos realizados não conseguiram isolar o agente. Possivelmente, em função da metodologia utilizada nas coletas e o tempo entre as coletas e a semeadura em laboratório, os resultados foram inconclusivos.

Nas necropsias realizadas aos 18 dias (4º dia após o início das inoculações) foram observadas lesões necróticas severas, com grande destruição da mucosa intestinal, entretanto, não foi observada mortalidade em nenhum tratamento na fase de desafio.

No segundo experimento, mesmo na área que recebeu cama nova, com galpão completamente limpo, desinfetado e com vazio sanitário de 30 dias, não foram observadas diferenças no quadro entérico, quando comparado com as aves criadas na metade do galpão na qual foi mantida a cama reutilizada (2 lotes), sendo que o tipo e grau de lesões foram similares em relação às observações do primeiro experimento. As lesões macroscópicas foram indicativas de clostridiose nas duas etapas avaliadas e com as mesmas características, porém mais intensas do que aquelas observadas na avaliação do inóculo em nível laboratorial. Nos dois experimentos, o quadro entérico manifestou-se após o 2º dia de inoculação, com a presença de fezes contendo muco alaranjado, e leve desprendimento de mucosa (figura 12). Em alguns boxes, observou-se uma leve redução no consumo de alimento, embora nenhum sinal associado à clostridiose clínica

tenha sido relatado. À necropsia, aos 18 dias, observou-se escores severos, com grande destruição da mucosa intestinal, dilatação dos cecos com grande acúmulo de gás, com escores de até 4 na escala modificada de Prescott, J.F.



Figura 12: Presença de muco alaranjado na mucosa intestinal no 2º dia após inoculação.

Foi realizada a impressão da mucosa intestinal do jejuno de algumas aves necropsiadas, onde verificou-se a presença de bacilos Gram positivos compatíveis com *Clostridium perfringens* (figura 13).

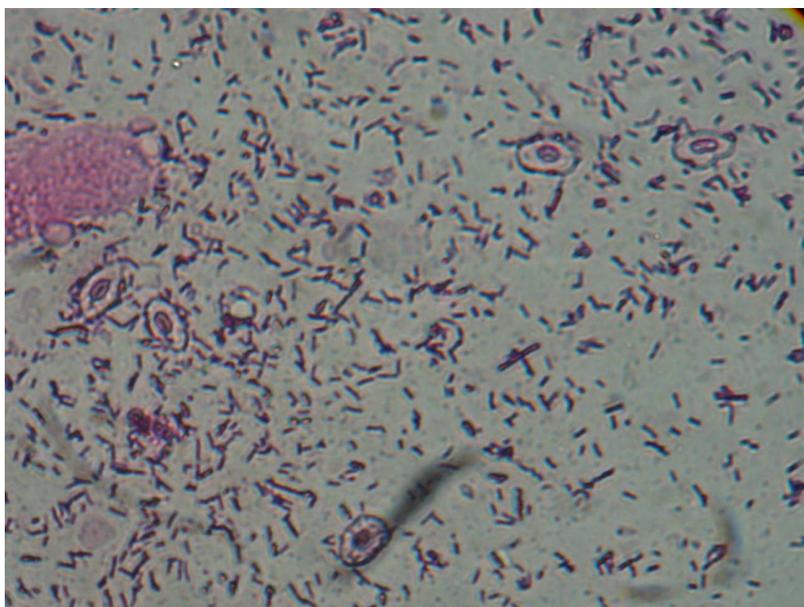


Figura 13: Presença de bacilos Gram positivos em impressão de mucosa intestinal de peru (*Clostridium perfringens*), através de coloração de Gram. (aumento 1000x).

Posteriormente, amostra do material utilizado no inóculo foi enviada ao laboratório de bacteriologia da Universidade de São Paulo - USP, onde através da técnica de PCR foi tipificada a bactéria como *Clostridium perfringens* do tipo A. (Anexo 1)

## 6 DISCUSSÃO

O modelo de avaliação proposto nestes experimentos, para verificar a ação de um patógeno amplamente estudado como é o caso do *Clostridium perfringens* demonstra que ainda existem muitos aspectos não esclarecidos, principalmente, quando relaciona-se com sua ação em perus. Embora todos cuidados tenham sido tomados, para evitar a contaminação cruzada entre os grupos infectados e os não infectados, os grupos controles não inoculados e não medicados apresentaram lesões similares aos demais tratamentos. Em função disso, surgiram dúvidas com relação à possibilidade de infecção cruzada por outro patógeno que pudesse estar presente na granja experimental, já que no primeiro experimento trabalhou-se com cama aviária reutilizada. Como nenhuma patologia foi relatada nos experimentos conduzidos anteriormente, é possível que tenha ocorrido a passagem do agente durante o manejo entre boxes. Outra hipótese levantada, estaria associada à uma possível contaminação do inóculo, por algum agente viral que pudesse manifestar ou exacerbar as lesões entéricas observadas, como é o caso das infecções enteropatogênicas em perus associadas à coronavírus (TCV) ou astrovírus (PEMS). A literatura relaciona em perus jovens co-infecções causadas pela presença de *E.coli* enteropatogênica (EPEC) com o coronavírus causador da TCV (Turkey Corona Virus), podendo levar a quadros de refugagem severa e alta mortalidade, segundo Guy et al., (2000) apud BARNES et al, (2008). Além disso, as lesões macroscópicas causadas pela infecção viral (TCV) são semelhantes às aquelas observadas nas necropsias das aves avaliadas aos 18 dias, com alguns intestinos pálidos e flácidos e a presença de cecos distendidos com gás e conteúdo aquoso. Em nossos experimentos, entretanto, não foram observados sinais clínicos característicos desta patologia, como por exemplo, depressão, anorexia, desidratação, hipotermia ou perda de peso (SAIF, Y.M, 2008). A mortalidade manteve-se normal em ambos experimentos. Além disso, os técnicos envolvidos com a produção diária desta espécie relataram que os quadros associados de TCV não apresentaram recuperação rápida como a observada (Comunicação pessoal, Dr. Jair De Toni). A literatura associa estas infecções virais a altas taxas de mortalidade segundo Guy et al., (2000) apud BARNES et al, (2008). Esta possibilidade, embora não descartada completamente, pela dificuldade de isolar e associar a presença dos vírus à manifestação clínica das enteropatias observadas, não foi observada nos lotes criados anteriormente na granja experimental e tampouco, nos isoladores do laboratório onde as aves utilizadas para a preparação dos inóculos foram criadas.

Para esclarecer ainda mais esta dúvida, decidiu-se pela repetição do teste do inóculo em isoladores, para fazer a comparação do quadro entérico com aves infectadas e não infectadas, no mesmo período, e para verificar qual a possibilidade de as aves já chegarem ao laboratório infectadas com algum tipo de patógeno viral ou bacteriano, que poderia confundir o quadro entérico, com lesões semelhantes e na mesma faixa etária – 18 dias - , quando foram realizadas as necropsias. O quadro de lesões observado na avaliação das aves criadas nos isoladores, repetiu o observado em granja experimental, embora com sinais mais leves.

Paradoxalmente, ao contrário do que era esperado por técnicos com mais de trinta anos de experiência em produção de perus, frente ao grau de lesões observados nas necropsias nos dois experimentos, não foi constatada mortalidade em nenhum tratamento e, dois a três dias após a necropsia, nenhum sinal clínico que pudesse estar associado à enteropatia foi observado. Também não se verificou nenhum sinal que pudesse caracterizar desconforto ou sofrimento das aves, como diarreia, por exemplo. Observação semelhante é feita por Gholamiandehkordi et al., (2007), em cujo experimento as lesões em frangos de corte foram observadas na metade das aves inoculadas, 4 dias após a exposição ao *Clostridium perfringens* e, não foram mais observadas nas aves após 2 dias do aparecimento das lesões. O autor não faz referências quanto à mortalidade. Também não verificou diferenças significativas no grau de lesões por clostridiose entre os diferentes tratamentos avaliados.

Outra hipótese levantada é se outra bactéria pudesse estar contaminando o inóculo, além do *Clostridium perfringens*. Esta hipótese, porém, foi descartada considerando-se a condição de anaerobiose e a seletividade do meio de cultura utilizado.

Diversos modelos experimentais baseiam-se na associação de distintos fatores estressores, sejam eles nutricionais, com dietas à base de farinha de peixe ou amidos de baixa digestibilidade, de manejo e presença de outros patógenos como vacinas de coccidiose e outros fatores imunodepressores, para que aumente a probabilidade de aparecimento de lesões causadas por *Clostridium sp.*, seja em sua forma clínica ou sub-clínica. (KALDHUSDAL & HOFESHAGEN,1992); (COLLIER et al, 2003); (WILLIAMS et al, 2003); (GHOLAMIANDEHKORDI et al,2007).

Em nossos experimentos, embora o inóculo não tenha sido administrado individualmente e, portanto, não tivéssemos garantia de que todas as aves receberam a mesma dosagem, a concentração elevada que foi utilizada de  $1 \times 10^{10}$  UFC por ave, demonstrou que foi suficiente para desenvolver o quadro entérico, independente de

outras variáveis associadas. Nos raspados de mucosa realizados em amostras de intestinos das aves necropsiadas, não foi identificada presença de oocistos, mesmo sem adicionarmos anticoccidianos à dieta (Anexo 4). Isto nos leva a questionar se frente a diferentes condições, a resposta dos perus de corte ao desafio por *Clostridium perfringens*, pode ser comparada de forma simples e direta, com as alterações observadas em frangos de corte. Entendemos, que estudos comparativos necessitam ser feitos para avaliar a suscetibilidade das diferentes espécies.

Em alguns aspectos avaliados, o desempenho geral das aves foi melhor naquelas aves criadas em cama nova, onde é provável que o grau de desafio por outros agentes, tenha sido menor, justificando esta diferença em ganho de peso (média) e conversão alimentar.

Na média geral dos pesos aos 57 dias para o experimento I, verificou-se leve redução (1,9%) comparado com a tabela padrão para a linhagem (PM 4,511 Kg x 4,60 Kg tabela) e aos 34 dias para o experimento II, verificou-se (PM 1,648 kg x 1,860 kg tabela), com uma redução frente à tabela padrão da linhagem de 12,8%, demonstrando que à medida que avança a idade diminuíram as diferenças de peso, em relação aos valores esperados (Anexo 5).

Os escores de lesões intestinais não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos. As aves não receberam anticoccidianos em nenhuma das fases da criação, entretanto, não foram observadas lesões por coccidiose e tampouco oocistos nos raspados de mucosa (Anexo 4). Nesta condição, é importante salientarmos a ação fundamental dos agentes ionóforos como antimicrobianos Gram positivos.

Aos 21 dias de idade, ou seja, logo após o período de desafio por clostrídios, observou-se uma melhor conversão alimentar naquelas aves criadas sobre cama reutilizada, levando-nos a questionar se estariam mais protegidas imunologicamente e com melhores condições de resistência especificamente nesta fase mais crítica já que, nas subseqüentes, as melhores respostas zootécnicas voltaram a ser observadas nas aves criadas sobre cama nova, onde o desafio por outros agentes poderia ser mais baixo. Foi observada diferença estatística, nas avaliações da conversão alimentar dos 28 e 34 dias de idade. Aos 28 dias, observou-se uma melhor conversão nas aves que receberam ração medicada com avilamicina 100 ppm (tratamento 2), com diferença significativa frente aos tratamentos 3 (controle infectado e não medicado) e 4 (controle não infectado, não medicado), embora não tenha diferido estatisticamente do tratamento 1 (avilamicina 30 ppm). Este aspecto é importante, e nos leva a duas considerações: 1) triplicando a

dosagem do antibiótico (30 ppm) observa-se um efeito positivo sobre alguns parâmetros e 2) o medicamento foi desenvolvido com dosagens apropriadas para controlar desafios normais de campo considerando-se, como referência, uma população de *Clostridium perfringens* em frangos de corte de 100 UFC/g de íleo ( $1 \times 10^2$ ) ou 10 mil UFC/g de cecos ( $1 \times 10^4$ ) (WISE, M.; SIRAGUSA, G. R., 2005). Entretanto, em nossos experimentos as mesmas dosagens de avilamicina foram usadas para um desafio de 10 bilhões de UFC ( $1 \times 10^{10}$ ) por ave. Se, por um lado, o alto desafio foi capaz de reproduzir o quadro entérico com clareza, por outro, pode ter sobrepujado em muito a capacidade de dose x resposta do terapêutico.

Em relação ao ganho de peso, observou-se uma melhora, nos períodos entre 21 e 28 dias e dos 28 aos 34 dias, nas aves criadas sobre cama nova, o que pode indicar uma capacidade de recuperação mais rápida em condições nas quais supõe-se existirem um número menor de variáveis atuando simultaneamente ao desafio por clostrídios.

A literatura consultada é restrita quanto à ação do *Clostridium perfringens* na mucosa intestinal de perus. Os inúmeros trabalhos publicados em frangos de corte parecem não refletir o quadro observado em perus. Após a inoculação da bactéria houve uma rápida recuperação das aves, sem comprometer de forma relevante os parâmetros produtivos, contrastando com o que a literatura relata em frangos de corte, onde os prejuízos são consideráveis. Vários autores relatam os danos da clostridiose sobre a performance e mortalidade em frangos de corte (AL SHEIKHLY et al, 1977); (AL SHEIKHLY et al, 1980); (ELWINGER, K et al, 1992); (CRAVEN, S.E. et al, 2001); (LOVLAND, A. et al, 2001); (LOVLAND, A. et al, 2003); (OPENGART, K. 2008). Ao contrário, poucos trabalhos relatam a presença de enterite necrótica em perus. (ELEAZER, T.H. et al, 1976); (GAZDZINSKI et al, 1992); (NORTON, R.A. et al, 1992); (DROUAL, R. et al, 1994).

Pela elevada dosagem de inoculação utilizada e pelo grau de lesões observadas na necrópsia, foi consenso dos técnicos (comunicação pessoal – Dr. Jair De Toni e equipe) que trabalham com perus em nível de produção, que em condições de campo, o nível de lesões observado teria sido suficiente para causar prejuízos severos, como mortalidade elevada e perda de produtividade, caso o mesmo grau de lesões ocorresse em frangos de corte. Entretanto, nos dois experimentos conduzidos, a mortalidade foi baixa e as aves não demonstraram sinais clínicos de infecção severa, tais como depressão, inapetência, diarreia, etc. Ou seja, a reação dos perus, foi atípica se observarmos os sinais clínicos descritos na literatura para frangos de corte.

No que refere-se a clostridiose, entendemos que é necessária muita precaução ao extrapolarmos dados de pesquisas em frangos de corte para a produção de perus.

Em relação à comparação das lesões macroscópicas frente às lesões observadas na avaliação histopatológica, observou-se que os escores de lesões intestinais identificados macroscopicamente por técnicos com mais de 30 anos de experiência em produção e diagnóstico de campo, e correlacionados com os escores citados na literatura científica para frangos de corte (PRESCOTT et al., 1979) não demonstraram correlação quando avaliados microscopicamente, ou seja, embora as técnicas de avaliações sejam diferentes, para um maior escore macroscópico, não houve a esperada correspondência no escore da lesão através de histopatologia. Frente a esta observação, é importante considerar se a subjetividade nas análises macroscópicas não seria um fator que pudesse levar a conclusões equivocadas nesta correlação, já que não existe até o momento, uma forma mais apropriada de mensurar os graus macroscópicos de lesões entéricas, em função da diversidade de formas com a qual se apresentam. Como foi feito na avaliação microscópica, talvez fosse interessante buscar uma nova alternativa de classificação, para tornar o diagnóstico menos subjetivo possível. Outro aspecto a considerar, é o relato de veterinários responsáveis pela produção, que na prática, observam uma maior resistência dos perus, quando expostos a níveis semelhantes de infecção por clostrídios, no que refere-se a agressão intestinal e quando comparados com a suscetibilidade observada em frangos de corte. Embora, no único trabalho recente publicado por pesquisadores brasileiros sobre a relação de lesões provocadas por coccidiose em frangos de corte (ASSIS et al, 2010) demonstraram uma correlação direta e positiva ( $r=0,55$  a  $0,64$ ) entre os achados macro e microscópicos de lesões, em nosso experimento, as avaliações apresentaram uma correlação baixa ( $r=0,14$ ). A dúvida é, se esta correlação é baixa de fato, ou o sistema de avaliação de lesões macroscópicas é, também, extremamente subjetivo. Neste caso, seria interessante buscarmos desenvolver padrões de avaliação mais criteriosos para as lesões macroscópicas. Além disso, embora os escores de lesões tenham sido avaliados por um profissional experiente, o coeficiente de variação observado na avaliação macroscópica foi extremamente elevado (91%), o que reforça nosso questionamento quanto à influência destes aspectos nas avaliações. Pela experiência que obtivemos, durante quase trinta anos, executando necropsias e treinando técnicos de campo para o controle de enfermidades entéricas, pudemos entender que todas aquelas hipóteses e considerações, levam a questionar algumas práticas usuais quanto aos critérios, também subjetivos, da utilização de medicamentos

na prevenção e controle de enfermidades entéricas em perus, já que todos os padrões baseiam-se em experiências científicas desenvolvidas em frangos de corte, e em nossa opinião, não deveriam ser simplesmente transferidas para outras espécies, considerando cada particularidade.

Outro aspecto que necessita ser levado em consideração é se o tempo, de aproximadamente 10 a 15 minutos, entre o sacrifício das aves e a avaliação do escore intestinal possa ter oportunizado uma maior ação enzimática (fosfolipases) que comprometesse uma análise mais criteriosa das lesões. Neste caso, a habilidade e a rapidez do técnico de campo/laboratório, poderia influenciar a resposta, considerando-se a grande subjetividade nos diagnósticos e a interferência de inúmeros fatores, como idade da ave, patogenicidade da cepa, estado imunológico, entre outros fatores. Uma dúvida levantada é se a metodologia de coleta dos intestinos não possa ter influenciado os resultados obtidos na correlação de lesões macroscópicas e microscópicas. Para responder a este tipo de questionamentos, o Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária – CDPA está desenvolvendo uma metodologia comparando a influência dos diferentes tempos entre coletas de material à necropsia e sua conservação sobre a qualidade e o grau de lesões observados microscopicamente.

Em nosso experimento, em função do número limitado de publicações correlacionando a influência de patógenos intestinais sobre o grau de destruição entérica e o impacto sobre os resultados de produção, esperávamos poder relacionar as antigos métodos de avaliação (escores de lesões macroscópicas x lesões microscópicas) utilizadas em frangos para diagnóstico de coccidiose e clostridiose (JOHNSON & REID, 1970; PRESCOTT, 1979) para interpretar a influência destes patógenos em perus; entretanto, ao buscarmos uma base de correlação para suportar nossas observações barramos na falta de dados científicos sobre este assunto. Inúmeros trabalhos correlacionam o escore de lesões por coccidiose e enterite necrótica em frangos de corte ao desempenho zootécnico das aves. (AL-SHEIKHLY & AL-SAYEG, 1980); (BABA et al., 1997); (WILLIAMS, 2005); (PERSIA et al, 2006). Entretanto, não localizamos na literatura nenhum trabalho associando lesões entéricas causadas por clostridiose ao desempenho dos perus.

Isto demonstra, em nossa opinião, a necessidade de mais estudos para buscarmos identificar a possível influência de métodos de controle da clostridiose sobre a morfologia intestinal de perus infectados e examinar a correlação entre as lesões macroscópicas e os danos microscópicos causados por *Clostridium sp*, já que sem estas

informações podemos, equivocadamente, extrapolar métodos de avaliação de uma espécie para outra, sem nenhuma base científica apropriada.

## 7 CONCLUSÃO

Frente ao objetivo inicial do experimento, que era o de avaliar a ação da avilamicina como terapêutico no controle de enterite necrótica em perus, não conseguimos demonstrar todos os benefícios do produto, considerando as condições de extremo desafio entérico verificadas, as quais levaram a outras observações interessantes, não associadas ao medicamento. A enterite severa não determinou alterações significativas nos resultados zootécnicos dos perus, principalmente, no que refere-se à mortalidade. Verificou-se que alguns parâmetros avaliados daquelas aves criadas em cama nova, apresentaram melhorias significativas frente às aves criadas em cama reutilizada. No experimento II, logo após o período crítico de desafio, ou seja, aos 28 dias de idade, as aves medicadas apresentaram melhora significativa na conversão alimentar quando comparadas com as aves dos controles infectados, não medicados e, não infectados, não medicados. As aves criadas em cama nova, apresentaram um consumo de alimento significativamente superior àquelas criadas em cama reutilizada.

Na relação de avaliações macro e microscópicas das lesões entéricas, ficou evidenciada a falta de correlação nos métodos de diagnóstico. Em relação aos itens de avaliação eleitos para medir as lesões microscópicas, foi possível observar um coeficiente de variação (CV) de 38% , menos da metade do obtido nas avaliações macroscópicas cujo CV foi de 91%, reforçando nossas considerações quanto a subjetividade dos métodos diagnósticos utilizados atualmente. O desempenho geral das aves foi melhor naquelas aves criadas em cama nova. Nas condições deste experimento, a avilamicina não pode demonstrar sua eficácia, frente a um desafio de  $10^{10}$  UFC/ave (10 bilhões de bactérias/ave) mas, ainda assim, observou-se melhora significativa frente a alguns parâmetros avaliados.

Podemos observar, através destes experimentos, que muitas dúvidas permanecem e muita pesquisa será necessária para identificar os efeitos das agressões intestinais em perus, com relação ao desempenho de produção, ficando evidenciado o cuidado que devemos ter ao extrapolar padrões de diagnóstico utilizados em frangos de corte para outras espécies.

## REFERÊNCIAS

- Al Sheikhly, F.; Al Saieg, A. Role of Coccidia in the occurrence of necrotic enteritis of chickens. **Avian Diseases**. v.24, n.2, p.324-333, 1980
- Al Sheikhly, F.; Truscott, R. B. The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of crude toxins of *Clostridium perfringens* into the duodenum. **Avian Diseases**. v.21, n.2, p.241-255, 1977
- Assis, R.C.L., Luns F.D., Beletti, M.E., Assis, R.L., Nasser, N.M., Faria, E.S.M., Cury, M.C. Histomorphometry and macroscopic intestinal lesions in broilers infected with *Eimeria acervulina*. **Veterinary Parasitology**. v.168, p.185-189, 2010.
- Aviagen Turkeys Inc. Capturado no site: <http://www.aviagen.com> – Nicholas 700 Commercial Performance Goals (85 ML) no dia 10 de janeiro de 2010.
- Baba, E. et al. Clostridial population and the intestinal lesions in chickens infected with *Clostridium perfringens* and *Eimeria necatrix*. **Veterinary Microbiology**. v.54, p.301-308, 1997.
- Barbara, A. J.; Trinh, H. T.; Glock, R. D.; Glenn, Songer J. Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. **Veterinary Microbiology**, v.126, n.4, p.377-382, 2008
- Barnes, J.H., Nolan, L.K., Vaillancourt, J.P. Colibacillosis in: **Diseases of Poultry**, cap. 18, p.691-732, 12<sup>a</sup> ed., 2008
- Brennan, J.; Moore, G.; Poe, S. E.; Zimmermann, A.; Vessie, G.; Barnum, D. A.; Wilson, J. Efficacy of in-feed tylosin phosphate for the treatment of necrotic enteritis in broiler chickens. **Poultry Science**, v.80, n.10, p.1451-1454, 2001
- Broussard, C. T.; Hofacre, C. L.; Page, R. K.; Fletcher, O. J. Necrotic enteritis in cage-reared commercial layer pullets. **Avian Diseases**, v.30, n.3, p.617-619, 1986
- Butaye, P.; Devriese, L. A.; Haesebrouck, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.2, p.175-188, 2003

Chalmers, G.; Bruce, H. L.; Toole, D. L.; Barnum, D. A.; Boerlin, P. Necrotic enteritis potential in a model system using *Clostridium perfringens* isolated from field outbreaks. **Avian Diseases**, v.51, n.4, p.834-839, 2007

Collier, C. T.; Hofacre, C. L.; Payne, A. M.; Anderson, D. B.; Kaiser, P.; Mackie, R. I.; Gaskins, H. R. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.122, n.1-2, p.104-115, 2008

Cooper, K. K.; Songer, J. G. Necrotic enteritis in chickens: a paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. **Anaerobe**. v.15, n.1-2, p.55-60, 2009

Devriese, L. A.; Daube, G.; Hommez, J.; Haesebrouck, F. In vitro susceptibility of *Clostridium perfringens* isolated from farm animals to growth-enhancing antibiotics. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, n.1, p.55-57, 1993

**Diário Oficial da União**, seção 1, nº 22, 31 de janeiro de 2007.

Directive 70/524/EEC. Capturado no site:

[http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/list\\_additives.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/list_additives.pdf)

Donelli, G.; Fiorentini, C. Cell injury and death caused by bacterial protein toxins. **Toxicology Letters**, v.64-65 Spec No, p.695-699, 1992

Droual, R.; Shivaprasad, H. L.; Chin, R. P. Coccidiosis and necrotic enteritis in turkeys. **Avian Diseases**, v.38, n.1, p.177-183, 1994

Eleazer, T. H.; Harrell, J. S. *Clostridium perfringens* infection in turkey poults. **Avian Diseases**, v.20, n.4, p.774-776, 1976

Elwinger, K.; Berndtson, E.; Engstrom, B.; Fossum, O.; Waldenstedt, L. Effect of antibiotic growth promoters and anticoccidials on growth of *Clostridium perfringens* in the caeca and on performance of broiler chickens. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.39, n.4, p.433-441, 1998

EMEA/CVMP, 2007. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/Avilamycin1.pdf>

Engstrom, B. E.; Fermer, C.; Lindberg, A.; Saarinen, E.; Baverud, V.; Gunnarsson, A. Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. **Veterinary Microbiology**, v.94, n.3, p.225-235, 2003

Gazdzinski, P.; Julian, R. J. Necrotic enteritis in turkeys. **Avian Diseases**, v.36, n.3, p.792-798, 1992

Gholamiandehkordi, A.R., Timbermont, L. Lanckriet, A., Broeck W.V.D., Pedersen, K., Dewulf, J., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immerseel, F. **Avian Pathology**, v.36, n. 5, p. 375-382, 2007.

Gomes, A.M. Isolamento e tipificação genotípica de *Clostridium perfringens* em frangos de corte. Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal de Minas Gerais**, 2007.

Guy, J.S., Smith, L.G., Breslin, J.J., Vaillancourt, J.P., Barnes, H.J., High mortality and growth depression experimentally produced in young turkeys by dual infection with enteropathogenic *Escherichia coli* and turkey coronavirus. **Avian Diseases**, v.44 p.105-113 apud Barnes et al in: **Diseases of Poultry**, cap. 18<sup>th</sup>, 12<sup>a</sup> ed, 2008.

Helmboldt, C. F.; Bryant, E. S. The pathology of necrotic enteritis in domestic fowl. **Avian Diseases**, v.15, n.4, p.775-780, 1971

Johnson, J., Reid, W.M., Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. **Experimental Parasitology**, v.28, p.30-36, 1970.

Johansson, A.; Greko, C.; Engstrom, B. E.; Karlsson, M. Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. **Veterinary Microbiology**, v.99, n.3-4, p.251-257, 2004

Justin, N.; Walker, N.; Bullifent, H. L.; Songer, G.; Bueschel, D. M.; Jost, H.; Naylor, C.; Miller, J.; Moss, D. S.; Titball, R. W.; Basak, A. K. The first strain of *Clostridium perfringens* isolated from an avian source has an alpha-toxin with divergent structural and kinetic properties. **Biochemistry**, v.41, n.20, p.6253-6262, 2002

Kaldhusdal, M.; Hofshagen, M. Barley inclusion and avoparcin supplementation in broiler diets. 2. Clinical, pathological, and bacteriological findings in a mild form of necrotic enteritis. **Poultry Science**, v.71, n.7, p.1145-1153, 1992

Kaldhusdal, M.; Hofshagen, M.; Lovland, A.; Langstrand, H.; Redhead, K. Necrotic enteritis challenge models with broiler chickens raised on litter: evaluation of preconditions, *Clostridium perfringens* strains and outcome variables. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.24, n.3, p.337-343, 1999

Kaldhusdal, M.; Schneitz, C.; Hofshagen, M.; Skjerve, E. Reduced incidence of *Clostridium perfringens*-associated lesions and improved performance in broiler chickens treated with normal intestinal bacteria from adult fowl. **Avian Diseases**, v.45, n.1, p.149-156, 2001

Long, J. R.; Pettit, J. R.; Barnum, D. A. Necrotic enteritis in broiler chickens. II. Pathology and proposed pathogenesis. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.38, n.4, p.467-474, 1974

Lovland, A.; Kaldhusdal, M. Liver lesions seen at slaughter as an indicator of necrotic enteritis in broiler flocks. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.24, n.3, p.345-351, 1999

Lovland, A.; Kaldhusdal, M. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens*-associated hepatitis. **Avian Pathology**, v.30, n.1, p.73-81, 2001

Luna, L.G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**, 13<sup>rd</sup> ed, 258 p., McGraw-Hill, New York, 1968.

McDevitt, R. M.; Brooker, J. D.; Acamovic, T.; Sparks, N. H. C. Necrotic enteritis; a continuing challenge for the poultry industry. **Worlds Poultry Science Journal**. v.62, n.2, p.221-247, 2006

McDonel, J. L.; McClane, B. A. Production, purification, and assay of *Clostridium perfringens* enterotoxin. **Methods in Enzymology**, v.165, p.94-103, 1988

Netherwood, T.; Wood, J. L.; Mumford, J. A.; Chanter, N. Molecular analysis of the virulence determinants of *Clostridium perfringens* associated with foal diarrhoea. **Veterinary Journal**, v.155, n.3, p.289-294, 1998

Norton, R.A. , Hopkins B.A., Skeeles, J.K., Beasley, J.N., Kreeger, J.M. High mortality of domestic turkeys associated with *Ascaridia dissimilis*. **Avian Diseases**, v. 36, n.2, p.469-473, 1992.

Opengart, N. Necrotic enteritis in: **Diseases of Poultry**, cap. 22<sup>nd</sup>, p. 872-879, 12<sup>th</sup> ed., 2008.

Parish, W. E. Necrotic enteritis in the fowl (*Gallus gallus domesticus*). I. Histopathology of the disease and isolation of a strain of *Clostridium welchii*. **Journal Compendium Pathology**, v.71, p.377-393, 1961

Persia, M.E.; Young, E.L.; Utterback, P.L.; Parsons, C.M. Effects of dietary ingredients and *Eimeria acervulina* infection on chick performance, apparent metabolizable energy and amino acid digestibility. **Poultry Science**, v. 85, p.48-55, 2006.

Petit, L.; Gibert, M.; Popoff, M. R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. **Trends in Microbiology**, v.7, n.3, p.104-110, 1999

Prescott, J. F.; Sivendra, R.; Barnum, D. A. The use of bacitracin in the prevention and treatment of experimentally-induced necrotic enteritis in the chicken. **Canadian Veterinary Journal**, v.19, n.7, p.181-183, 1978

Regulation 1831/2003/EC on additives for use in animal nutrition, replacing Directive 70/524/EEC on additives in feeding-stuffs. Capturado no site:  
[http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/legisl\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/legisl_en.htm)

Ravdin, J. I.; Murphy, C. F.; Guerrant, R. L.; Long-Krug, S. A. Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. **Journal of Infectious Diseases**, v.152, n.3, p.542-549, 1985

Riddell, C.; Kong, X. M. The influence of diet on necrotic enteritis in broiler chickens. **Avian Diseases**, v.36, n.3, p.499-503, 1992

Rood, J. I. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. **Annual Review of Microbiology**, v.52, p.333-360, 1998

Rood, J. I.; Buddle, J. R.; Wales, A. J.; Sidhu, R. The occurrence of antibiotic resistance in *Clostridium perfringens* from pigs. **Australian Veterinary Journal**, v.62, n.8, p.276-279, 1985

SAS – SAS Institute, 1988

Sayf, Y.M. Viral Enteric Infections in: **Diseases of Poultry**, cap. 12, p.329-338, 12<sup>a</sup> ed., 2008

Shane, S. M.; Gyimah, J. E.; Harrington, K. S.; Snider, T. G., III. Etiology and pathogenesis of necrotic enteritis. **Veterinary Research Community**, v.9, n.4, p.269-287, 1985

Songer, J. G. Clostridial enteric diseases of domestic animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, n.2, p.216-234, 1996

Takeda, T.; Fukata, T.; Miyamoto, T.; Sasai, K.; Baba, E.; Arakawa, A. The effects of dietary lactose and rye on cecal colonization of *Clostridium perfringens* in chicks. **Avian Diseases**, v.39, n.2, p.375-381, 1995

Titball, R. W. Bacterial phospholipases C. **Microbiology Review**, v.57, n.2, p.347-366, 1993

Truscott, R. B.; Al Sheikhly, F. Reproduction and treatment of necrotic enteritis in broilers. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, n.6, p.857-861, 1977

UBA (União Brasileira de Avicultura). **Relatório Anual 2005/2006**. Capturado em 25 de maio de 2008. Online Disponível na internet:  
[http://www.uba.org.br/ubanews\\_files/rel\\_uba\\_2005\\_06.pdf](http://www.uba.org.br/ubanews_files/rel_uba_2005_06.pdf).

UBA - União Brasileira de Avicultura - **Relatório Anual 2009** capturado no site:  
<http://www.uba.org.br/site3/>

USDA 2008 - capturado no site: <http://www.usdabrazil.org.br>

Van Immerseel, F.; De Buck, J.; Pasmans, F.; Huyghebaert, G.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian Pathology**, v.33, n.6, p.537-549, 2004

Watkins, K. L.; Shryock, T. R.; Dearth, R. N.; Saif, Y. M. In-vitro antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. **Veterinary Microbiology**, v.54, n.2, p.195-200, 1997

Wise, M.G.; Siragusa, G.R. Quantitative detection of *Clostridium perfringens* in the broiler fowl gastrointestinal tract by Real -Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.7, p.3911-3916, 2005.

Willians, R.B. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. **Avian Pathology**, v.34, n.3, p.159-180, 2005.

## ANEXO 1: Laudo ref. Identificação e Classificação do Patógeno



**USP** UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal  
Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87  
Cidade Universitária, São Paulo-SP CEP 05308-270

LABORATÓRIO DE SANIDADE SUÍNA  
Tel: 11 3091-1377  
Tel: 11 3091-7926  
FAX: 11 3091-7928

Responsável: Anne Caroline de Lara

RG: 45

Data de chegada no laboratório: 31.03.2010

Página 1 de 1

Empresa: Sadia

Proprietário: -

Cidade/UF: Concórdia / SC

Material enviado: 1 estoque de *Clostridium perfringens*.

Exames solicitados: Reação em cadeia pela polimerase (PCR).

- **Resultado:** *Clostridium perfringens* tipo A.

São Paulo, 04 de maio de 2010.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Micke Moreno





ANEXO 4 – Laudo laboratorial – raspado de mucosa intestinal para identificação da presença de oocistos de *Eimeria* sp.

**Sadia**  
Serviço de Diagnóstico  
Laboratório de Parasitologia

**Relatório de Exames Parasitológico**

<b>DATA</b>	<b>EXAME</b>	<b>LABORATÓRIO</b>	<b>LOTE</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>REMESSA</b>	<b>RESPONSÁVEL</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>TIPO DE TUBO</b>	<b>IDADE</b>
14/05/2019	RASPADO DE MUCOSA INTESTINAL	BRANCA EXPERIMENTAL	1703313	NEGATIVO	NENHUM	JAIR DE TOBI	INTESTINO	PERU	18 DIAS

**OBSERVAÇÃO:**  
Raspado negativo para oocistos de protozoários nas impressões da mucosa intestinal.

*Carla Oliveira*  
Supervisora

ANEXO 5 – Desempenho de peso da linhagem Nicholas 700 x 85 Machos



Nicholas 85 x 700  
Commercial Performance Objectives - Males

Male - lbs						Male - kgs					
Age (weeks)	Male Weight	Gain/Day (lbs)	Feed Weekly	Consumption Cumulative	Feed Conversion	Age (weeks)	Male Weight (grams)	Gain/Day (grams)	Feed Weekly	Consumption Cumulative	Feed Conversion
1	0.32	0.045	0.33	0.33	1.05	1	0.14	20	0.15	0.15	1.05
2	0.66	0.061	0.67	0.95	1.11	2	0.39	28	0.28	0.43	1.11
3	1.70	0.081	1.07	2.02	1.19	3	0.77	37	0.49	0.92	1.19
4	2.78	0.099	1.48	3.51	1.26	4	1.26	45	0.67	1.59	1.26
5	4.08	0.117	1.93	5.44	1.33	5	1.88	53	0.68	2.47	1.33
6	5.83	0.139	2.72	8.16	1.40	6	2.64	63	1.23	3.70	1.40
7	7.65	0.160	3.47	11.63	1.45	7	3.56	73	1.57	5.27	1.46
8	10.14	0.181	3.99	15.62	1.54	8	4.80	82	1.81	7.08	1.54
9	12.68	0.201	4.79	20.41	1.61	9	5.75	91	2.17	9.26	1.61
10	15.62	0.223	5.84	26.25	1.68	10	7.09	101	2.65	11.91	1.68
11	18.47	0.240	6.07	32.32	1.75	11	8.38	109	2.75	14.66	1.75
12	21.25	0.253	6.57	38.89	1.83	12	9.64	115	2.98	17.64	1.83
13	24.11	0.265	7.16	46.04	1.91	13	10.93	120	3.25	20.88	1.91
14	27.02	0.276	7.72	53.76	1.99	14	12.26	125	3.50	24.39	1.99
15	29.94	0.285	8.21	61.97	2.07	15	13.58	129	3.72	28.11	2.07
16	32.63	0.289	8.96	70.91	2.16	16	14.89	133	4.05	32.16	2.16
17	35.70	0.300	9.41	80.31	2.25	17	18.9	136	4.27	36.43	2.25
18	38.48	0.305	10.11	90.42	2.35	18	17.45	139	4.58	41.01	2.35
19	41.17	0.310	10.45	100.88	2.45	19	18.68	140	4.74	45.76	2.45
20	43.74	0.312	10.23	111.10	2.54	20	19.84	142	4.84	50.40	2.54
21	46.16	0.314	10.75	121.86	2.64	21	20.94	142	4.86	55.26	2.64
22	48.40	0.314	11.23	133.09	2.75	22	21.95	143	5.09	60.37	2.75

Performance objectives should be viewed as goals that can be achieved with good management and environmental control. Feed results vary for many reasons (e.g. feed consumption can be affected by feed texture, energy level and water availability).

Aviagen Turkeys, Inc. • 31100 Highland Trail, East • Lewisburg, WV 24901 • U.S.A. • Tel: 904 730 2600 • Fax: 301 793 2834  
Aviagen Turkeys Ltd • Chownley Oak Business Park • Tattenhall, Cheshire PR5 9DA • UK • Tel: +44 (0) 1820 772020 • www.aviagen.com

## ANEXO 6 – Exemplo da Tabela de Avaliação de Lesões Microscópicas

T1 - 1° COLETA	QUA						QUA						QUA						SOMATÓRIO (escore mícro)						
	D	1					D	2					D	3						D	4				
	NECROSE	CÉLULAS INFLAMATÓRIAS	DESPRENDIMENTO EPITELIAL	HEMORRAGIA	COCCÍDIOS	BASTONETES	NECROSE	CÉLULAS INFLAMATÓRIAS	DESPRENDIMENTO EPITELIAL	HEMORRAGIA	COCCÍDIOS	BASTONETES	NECROSE	CÉLULAS INFLAMATÓRIAS	DESPRENDIMENTO EPITELIAL	HEMORRAGIA	COCCÍDIOS	BASTONETES	NECROSE	CÉLULAS INFLAMATÓRIAS	DESPRENDIMENTO EPITELIAL	HEMORRAGIA	COCCÍDIOS	BASTONETES	
2	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	3,25
11	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	3,75
13	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	3
21	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	2,75
29	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	2,75
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
80	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	2,75
87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
91	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	3,75