

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

A INFLUÊNCIA DA DIETA EM FRANGOS DE CORTE SOBRE A  
COLONIZAÇÃO INTESTINAL POR *Clostridium perfringens* AVALIADA  
ATRAVÉS DE QUANTIFICAÇÃO POR UM MÉTODO ANALÍTICO  
ALTERNATIVO

Autor: Luciane da Silva Camargo

Dissertação apresentada como  
requisito parcial para obtenção do grau  
de mestre em Ciências Veterinárias  
na Área de Sanidade Avícola

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento

Co-orientador: Sérgio Luís Vieira

Porto Alegre

2006

VET

06260208

T

619.602605 C172i 2007

{000598612} Camargo, Luciane da Silva. A influência da dieta em frangos de corte sobre a colonização intestinal por *Clostridium perfringens* avaliada através de quantificação por um método analítico alternativo. 2007 70 f. : il.

C172i Camargo, Luciane da Silva

A influência da dieta de frangos de corte sobre a colonização intestinal por *Clostridium perfringens* avaliada através de qualificação por um método analítico alternativo / Luciane da Silva Camargo - Porto Alegre: UFRGS, 2006.

xxf.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2006. Vladimir Pinheiro do Nascimento, Orient.

1. *Clostridium perfringens* 2. Qualification diet  
3. Diets 4. Tract gastrointestinal I. Nascimento, Vladimir Pinheiro do, Orient. II. Título

CDD 619.6026 05

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



**UFRGS**

UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

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

**APROVADO POR:**

**Profa. Dra. Luciana Ruschel dos Santos,  
Membro da Banca.**

**Profa. Dra. Maristela Lovato Flores,  
Membro da Banca**

**Prof. Dr. Elci Lotar Dickel,  
Membro da Banca.**

**Ao meu co-orientador prof<sup>o</sup>Dr<sup>o</sup> Sérgio Luís Vieira e sua equipe, pela colaboração deste trabalho, e orientador prof<sup>o</sup>Dr<sup>o</sup> Vladimir Pinheiro do Nascimento, às empresas e seus colaboradores: Languiru, Avipal e Laboratório Porto Belo.**

**Ao Lanagro e seus colaboradores: Dra. Soraya Elias Marredo Constantinopolose sua equipe de meio de cultura , Dra. Dulce Maria T. Schuck, Dr<sup>o</sup>. Rogert Fulginiti Corseuil, Dr<sup>o</sup> Sérgio Salla Chagas.**

**Ao prof<sup>o</sup>Dr<sup>o</sup> Marcos Gomes, prof<sup>o</sup>Dr<sup>o</sup> Marisa Cardoso pelo auxílio estendido.**

**A todos os professores, funcionários e colegas do CDPA, em especial Ana Cristina da Rocha.**

**Ao Eduardo Viola pela sua colaboração na operacionalização do experimento.**

**A estudante de Medicina Veterinária Tatiane Parolin Mengatto.**

**E a todos que de alguma forma contribuíram pela realização deste trabalho, meu muito obrigado.**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>4</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 <i>Clostridium perfringens</i> e enterite necrótica em aves.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Toxinas.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Sinais clínicos.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4 Metodologia de isolamento microbiológico.....</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIAS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Coleta de material.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2 Metodologia de isolamento microbiológico.....</b>	<b>23</b>
<b>3.3 Método de contagem.....</b>	<b>26</b>
<b>3.4 Testes confirmatórios.....</b>	<b>26</b>
<b>4. Resultados e discussão.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Procedimentos de verificação do método.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2 Ensaio dos procedimentos.....</b>	<b>32</b>
<b>4.3 Checagem das matrizes.....</b>	<b>33</b>
<b>4.4 Fortificação das matrizes.....</b>	<b>33</b>
<b>4.5 Análise dos resultados.....</b>	<b>36</b>
<b>5. Conclusão.....</b>	<b>37</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

UFC: Unidade formadora de colônia

g: Gramas

M. A. P. A.: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

BAM: Bacteriological Analytical Manual

mL: mililitro

mm: milímetro

FDA: Food and Drug Administration

MEA: Meio experimental para anaeróbios

## LISTA DE TABELAS

- 1. Sistemática de coletas**
- 2. Resultado das quatro diluições selecionadas**
- 3. Resumo das médias encontradas nas matrizes de íleo para primeiro nível**
- 4. Resumo das médias encontradas nas matrizes de íleo para segundo nível**
- 5. Resultados obtidos da contagem das matrizes de cecos para primeiro nível**
- 6. Resultados obtidos da contagem das matrizes de cecos para segundo nível**
- 7. Resumo estatístico primeiro e segundo nível para ileos**

## RESUMO

Microrganismos do gênero *Clostridium*, particularmente *Clostridium perfringens*, permanecem como um grave problema na avicultura mundial, do ponto de vista de saúde animal, de saúde pública tanto quanto econômico. O *Clostridium perfringens* é considerado um habitante comensal do trato intestinal de frangos de corte, no entanto, quando submetidos a alterações na dieta ou mesmo então após a abolição de determinados promotores de crescimento pela Comissão das Comunidades da União Européia, o controle da população microbiana tornou-se reduzido. Uma dieta rica em grãos, trigo, cevada, e arroz aumentam a viscosidade intestinal através do aumento da produção de muco, como consequência do aumento de retenção de água no lúmen intestinal e pela ausência de enzimas capazes de agir sobre os produtos da digestão destes carboidratos. De fato, o aumento do crescimento microbiano comprometem as funções da mucosa intestinal. A partir destes fatores, o presente trabalho tem como objetivo quantificar *Clostridium perfringens* em duas diferentes dietas com e sem promotor de crescimento, utilizando um método analítico alternativo em dois segmentos do trato intestinal de frangos de corte. Para avaliar este método foi proposto a inclusão de alguns critérios de verificação do protocolo de validação para métodos microbiológicos alternativos, métodos quantitativos, referenciados na NordVal Validation (2005). Para avaliar o efeito das dietas foram analisadas 73 aves quanto a presença de *Clostridium perfringens* pelo método bacteriológico convencional segundo MAPA e BAM adaptados de acordo com a natureza da amostra no laboratório do CDPA-UFRGS pelo seguinte protocolo: 1g de inóculo de raspado de íleo e 1 g de conteúdo cecal acondicionados em 9 mL de água peptonada tamponada 0,1%, diluição 1:10, homogenizados e diluídos até a diluição  $10^{-2}$ , posteriormente mantidos em banho-maria a 80°C durante 10 minutos seguido de refrigeração em água a 20°C, alíquotas de 1 mL eram inoculadas em ágar TSC e incubados a 37° C por 24 horas. Foram analisados 4 tratamentos: T1-



dieta vegetal com promotor de crescimento, T2- dieta vegetal sem promotor de crescimento, T3- dieta vegetal milho e soja mais produtos de origem animal com promotor de crescimento e T4- dieta vegetal milho soja mais produtos de origem animal sem promotor de crescimento. A dieta do tratamento 3 obteve menor quantificação para *Clostridium perfringens* nas diferentes idades de coleta. Algumas combinações de amostras intestinais diferiram com maior destaque. As amostras 26, 28, 42 e 48 são consideradas significativas com valores menores que o nível de 10% de significância ( $<0,10$ ) – para interações triplices utiliza-se um nível de significância maior. Podemos considerar que a partir do 16º dia de idade iniciou a multiplicação de *Clostridium perfringens* no trato intestinal das aves e a partir do 25º dia de idade ocorreu uma redução mais significativa no ceco e íleo. Os ensaios para verificação do limite de detecção do método usado para íleo e ceco demonstraram um intervalo de detecção entre  $>40$  células e  $<421$  células por mL. Desta forma o método demonstrou um limite de detecção por perda de recuperação de células nas matrizes de ceco indicando que os resultados são quantitativamente maiores nas amostras. Possivelmente fatores interferentes tais como, analíticos, redução de pH, ácidos graxos de cadeia curta, exposição ao oxigênio podem ter interferido sob a recuperação das células.

## ***ABSTRACT***

Microorganism of the genus *Clostridium* particularly *Clostridium perfringens*, remain a serious problem to the world's poultry industry, in aspects not only of animal and human health but also economical. *Clostridium perfringens* considered a co mensal inhabitant of the intestinal tract of broiler chickens, however when subjected to diet alterations or even after elimination of certain growth promoters by the Commission of the European Communities, the control of the microbial population has become reduced. A diet rich in grains such as wheat, barley and rice, increase the intestinal viscosity through increasing the production of mucous as a consequence of water retention in the intestinal lumen and the absence of enzymes capable of acting upon the products of the digestion of these carbohydrates. In fact, microbial growth affects the intestinal mucous function. Based on these factors the following study has the objective to analyze the influence of two diets with or without growth promoters under the evaluation of a new method for the isolation and quantification of *Clostridium perfringens* in two segments of the gastrointestinal tract of broiler chickens. To evaluate this method there were proposed the inclusion of some verification criteria for the validation protocol in alternative microbiological methods, quantitative methods referred to in NordVal Validation (2005). To evaluate the effect of the diets, 73 birds were analyzed as to the presence of *Clostridium perfringens* using the conventional bacteriological method according to MAPA and BAM adapted to the type of sample in the CDPA/UFRGS laboratory using the following protocol: 1g of scraped inoculum of the ileum and 1 g of cecum content suspended in 9 mL of peptonated and pamptonated water at 0,1%, dilution 1:10, homogenized and diluted to  $10^{-2}$ , later maintained in a hot water bath of 80°C during 10 minutes followed by refrigeration in water at 20°C, samples of 1 mL were suspended in agar TSC and incubated at 37° C for 24 hours. Four different treatments were analyzed:

T1- vegetable diet with a growth promoter, T2- vegetable diet without a growth promoter, T3- vegetable diet of corn and soy beans with animal originated products and a growth promoter and T4- vegetable diet of corn and soy beans with animal originated products without a growth promoter. The diet of treatment 3 obtained the lowest quantification for *Clostridium perfringens* at different collection times. Some combinations of ileum samples had outstanding differences. Samples 26,28, 42 and 48 are considered significant with values lower than the 10% level of significance ( $>0,10$ )– for the triple interactions a greater level of significance is utilized. We may consider that from the 16<sup>th</sup> day of development the multiplication of *Clostridium perfringens* began, in the gastrointestinal tract of the chickens and from the 25<sup>th</sup> day of development there occurred a more significant reduction in the ileum and cecum. The practices to verify the limit of detection of the method used for the ileum and cecum demonstrated an interval of detection between  $>40$  cells and  $<421$  cells per mL. As such, the method showed a limit of detection per loss of cell recuperation in the cecum matrix indicating results that are quantitatively greater in the samples. Possibly, interfering factors such as analytical, reduction of ph, short-chain fatty acids, exposure to oxygen could have interfered with the recuperation of cells.

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente *C. perfringens* deixou de ser um microorganismo comensal do trato intestinal de aves saudáveis, para gerar danos a mucosa intestinal. Alguns elementos têm sido mencionados como fatores geradores de enterite necrótica. A manipulação da dieta pode predispor ou exacerbar o surgimento de enterites. A abolição de determinados antibióticos, promotores de crescimento, aditivo alimentar, ou ainda fatores coexistentes como coccidiose, estres e infecções imunodepressoras, ambos tem auxiliado na manifestação desta enfermidade. O uso profilático dos antibióticos têm sido banidos em muitos países em uma tentativa para limitar a disseminação da resistência zoonótica de organismos. Através da dieta, as bactérias no trato intestinal derivam na maioria de sua energia para reprodução e crescimento dos componentes da dieta, os quais são resistentes para atacar os fluidos digestivos ou absorver tão lentamente que a bactéria pode competir por eles. O *Clostridium perfringens* é capaz de gerar quebra nos indicadores de produção e elevação dos custos, relevância sob o ponto de vista de saúde pública, com a possibilidade de gerar contaminação de carcaças durante o processamento.

Deste modo com a expansão das exportações de frango de corte, o mercado brasileiro visa acompanhar diversas exigências. Com a incorporação da dieta vegetal, em adição a abolição de antimicrobianos e promotores de crescimento, através da diretiva 70/524, 97/6/EG e 2821/98 da legislação européia, a produção de frangos de corte viu-se desafiada pela enterite necrótica.

Os propósitos de ajustar uma dieta que estabilize a flora intestinal com o objetivo de eliminar ou minimizar as alterações do epitélio intestinal tem ganhado espaço dentro e fora dos programas de pesquisa.

Em virtude destes fatores, este projeto propõe-se avaliar através do isolamento e quantificação de *Clostridium sulfito redutores* e *Clostridium*

*perfringens* em dois segmentos do trato intestinal de frangos de corte em quatro diferentes tratamentos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Clostridium perfringens* e enterite necrótica em aves

Enterite necrótica é um termo que designa uma enterotoxemia aguda, não contagiosa, encontrada principalmente em animais jovens e causada pela rápida multiplicação no intestino do *Clostridium perfringens*, sendo produzida pelas toxinas liberadas pelo *Clostridium perfringens*, sendo as aves acometidas pelos tipos A e C (ITURRINO & ISHI, 2000).

Ao longo do tempo o *Clostridium perfringens* mantinha uma variedade de nomes. O *Bacillus* do reumatismo articular agudo de Achalme em 1891, bem como entre outros, *B. phlegmonis emphysematosae* de Frankel, *B. emphysematis vaginae* de Lindenthal, *B. cadaveris butyricus* de Bunday, *Granulobacillus saccharobutyricus liquefaciens immobilis* de Aschattenfroh e Grassberger, *B. enteritis sporogenes* de Klein. Seu nome foi também derivado da descrição de Veillon e Zuber em 1898, quem chamou de *Bacillus perfringens*. Quando chamado de *Clostridium welchii*, usado por alguns pesquisadores e sugerido por Migula em 1900, está denominação derivou de dois diferentes nomes, *Bacterium welchii* e *Bacterium emphysematosum*.

Seu gênero é dividido em espécies dentro de quatro grupos sobre as bases da posição dos esporos e liquefação da gelatina. Sua chave é assim caracterizada, grupo I esporos subterminal os que não hidrolizam gelatina, grupo II esporos subterminal os que hidrolizam gelatina, neste encontra-se *Clostridium perfringens*, grupo III esporos terminal os que não hidrolizam gelatina e grupo IV esporos terminal os que hidrolizam gelatina.

O gênero *Clostridium* é composto de bastonetes anaeróbicos formadores de esporos (SMITH, 1974). Apesar de algumas espécies de *Clostridium* crescerem na presença de ar, eles podem ser distinguidos de espécies de *Bacillus* pela ausência de catalase e peroxidase, os quais protegem sistemas biológicos contra os efeitos deletérios do oxigênio (SMITH, 1974). Das 93 espécies de *Clostridium* reconhecidas, somente 13 são imóveis,

em adição o *Clostridium perfringens*. Entre estas espécies imóveis, todas mas somente uma pode ser diferenciada de *C. perfringens* sobre as bases de sua incapacidade para formar colônias negras em agar SPS ou produzir nitrato de nitrito, a exceção é *Clostridium filiforme*, um organismo extremamente raro (ANGELOTTI et al 1961). Cato et al (apud HATHEWAY, 1990) sugeriu que este gênero pode algum dia ser dividido dentro de dois gêneros; um com espécies contendo 22 a 34 mol% G+C e outro contendo as espécies com mais de 40 mol%, devido a grande diversidade de genomas de 22 a 55 mol%.

Crescem vigorosamente a temperatura entre 20° e 50°C, porém um ótimo crescimento é observado 45°C pela maioria das cepas, sob ágar sangue demonstram dupla zona de hemólise, uma zona interna caracterizada por uma hemólise mais clara devido a teta toxina e outra hemólise externa devido a alfa toxina. Sobre o ágar gema de ovo as colônias são contornadas por uma zona opaca circular, reconhecida como reação da lecitinase pela toxina alfa, uma fermentação caracterizada como "tempestuosa" é observada quando inoculada em leite devido a fermentação da lactose, produção de gás, e coagulação do leite, mas sem a digestão da caseína. São facilmente recuperados de culturas mistas devido ao seu curto tempo de geração ( 8 minutos ) (SMITH, 1974). Arbuckle (1960) relatou em seu estudo de 22 cepas de *Clostridium perfringens*, a média do tempo de geração de 12 minutos com temperatura elevada aos 46°C. Caracterizam-se ainda, por outras características bioquímicas, redução de nitrato, fermentação da glicose, lactose, maltose, sacarose, salicina, rafinose, sorbitol, liquefazem a gelatina, não ocorre a produção de indol, não utilizam uréia ( HATHEWAY , 1990). Como produtos da fermentação produzem três tipos de gases, ácido acético, ácido butírico, ácido láctico (SMITH 1975).

## 2.2. Toxinas

Apenas catorze espécies de *Clostridium* são potencialmente patogênicas e suas proteínas biologicamente ativas são responsáveis pela

sua patogenicidade (HATHEWAY, 1990). Estes organismos estão listados na tabela1.

Toxina	Atividade biológica	Tipo de toxina				
		A	B	C	D	E
Toxinas maiores						
Alfa	Letal, lecitinase ( fosfolipase C )	+	+	+	+	+
Beta	Letal, necrose, sensível a tripsina	-	+	+	-	-
Epsilon	Letal, ativada pela tripsina	-	+	-	+	-
Iota	Letal, dermonecrótica, ativada pela tripsina	-	-	-	-	+
Toxinas menores						
Gama	Não definida, existência questionável	-	+	+-	-	-
			-			
Delta	Hemolisina	-	+	+	-	-
			-			
Eta	Não definida, existência questionável	+-	-	-	-	-
Teta	Hemolisina ( lábel ao O <sub>2</sub> ), citolisina	+-	+	+	+	+
Kapa	Colagenase, gelatinase	+	+	+	+	+
Lambda	Protease	-	+	-	+	+
Um	Hialuronidase	+-	+	+-	+-	+-
Nu	Dnase	+-	+	+	+-	+
Neuramidase	Ácido N-acetilneuramico glicohidrolase	+	+	+	+	+
Outras						
Enteroxina	Enterotoxica, citototxica	+	NT	+	+	NT

NT Estudos insuficientes

De acordo com a revisão realizada por Hatheway (1990) os cinco tipos de toxina de *C. perfringens* são reconhecidos através das toxinas letais ( alpha, beta, epsilon e iota). Segundo Wilsdon (apud HATHEWAY, 1990) estabeleceu quatro tipos de toxinas, A, B, C e D por uma inoculação experimental em camundongos de uma cultura filtrada, observou um



diferencial de proteção. Desta observação, relatou que o antisoro tipo A neutralizava somente cultura tipo A, tipo B neutralizava todos os tipos, tipo C neutralizava todos exceto tipo D, e tipo D neutralizou as culturas A e D. Ele reconheceu que o filtrado continha múltiplos antígenos. Estes antígenos foram mais tarde designados como alfa, presente em todos quatro tipos; beta, presente nos tipos B e C; e epsilon, presente em tipos B e D. Um quinto tipo (tipo E) foi estabelecido por Bosworth em 1943 (apud HATHEWAY, 1990) quando isolou uma cepa que produziu uma toxina letal que não poderiam ser neutralizados pelas antitoxinas tipos A, B, C ou D ou qualquer combinação destas. A antitoxina tipo E neutralizou o filtrado tóxico tipo A tão bem quanto as cepas homólogas mas não aquelas do tipo B, C, ou D, deste modo propou-se que a única toxina da cultura tipo E passou a ser designada como iota.

Para HOFSHAGEN & STENWIG (1991) a bactéria também produz um número de outros antígenos solúveis, alguns dos quais são determinados toxinas menores. Entre eles, a toxina teta, a qual é lábil ao oxigênio, toxina hemolítica; dois tipos de gelatinases, kappa e lambda da qual somente kappa é produzida pelo tipo A; um toxina a qual é hialuronidase; e nu toxina a qual é uma Dnase.

De acordo com WAGES, Dennis; Opengart, Kenneth (2003), alguns isolados de *C. perfringens* de casos de enterite necrótica não produzem frequentemente toxina in vitro para permitir tipagem. A toxina alfa produzida pelo tipo A e C e toxina beta produzida pelo tipo C são responsáveis pela necrose intestinal. Segundo Smith (1974a) todos os clostrídios patogênicos produzem toxinas. A toxina enteropatogênica de *C. perfringens* é formada intracelularmente e é liberado durante a esporulação.

Hatheway (2003) descreve a atividade hemolítica e a reação da lecitinase produzidas pela toxina alfa, podem ser usadas como um índice de crescimento bacteriano. Esta toxina é responsável pela reação da lecitinase produzida sobre o meio gema de ovo e pela zona forte de hemólise sobre ágar sangue. A fosfolipase C produzida pela toxina alfa, acredita ser o maior fator responsável pela mionecrose causada por este microorganismo. A toxina beta

produzida pelo tipo C produz lesões necróticas experimentalmente no intestino somente quando um inibidor da protease é introduzido no interior do lúmen intestinal. Aparentemente esta toxina induz a liberação de catecolaminas que são responsáveis pelo aumento da pressão sanguínea (HATHEWAY, 2003).

Os primeiros estudos desenvolvidos por Smith (1974) revelou a propriedade enzimática da toxina teta por atacar um substrato cuja integridade é essencial para estabilidade da parede de células vermelhas. Esta toxina produz uma zona clara de hemólise sob agar sangue. Segundo Smith (1974) a toxina alfa é uma fosfolipase C, responsável pela capacidade de atacar determinados lipídios na membrana. Al-Sheikhly (1977) em seu estudo com uma infusão de toxina pura tipo A, observou o efeito direto da absorção sobre os eritrócitos, justificando a ação da toxina alfa sobre a membrana citoplasmática devido a hidrólise dos fosfolipídios, a qual não causa lise em células vermelhas exceto após exposição ao choque de frio e calor.

As cepas B e D de *C. perfringens* são produtoras da toxina epsilon, produzida como uma prototoxina que é ativada por enzimas proteolíticas produzida pelo mesmo organismo, ou podendo ser ativada pela adição de tripsina a cultura. A toxina epsilon afeta primariamente o intestino pelo aumento da permeabilidade da parede intestinal, deste modo atinge a circulação agindo sistematicamente causando hiperemia de rins, edema de pulmão e excesso de fluido no pericárdio (HATHEWAY, 1990).

Produzida somente pela cepa tipo E a toxina iota relatada por Smith (1974 b) é produzida como uma prototoxina relativamente não tóxica que pode ser ativada por enzimas proteolíticas. Está produzida, é formada durante o período de crescimento ativo de organismos e é usualmente ativada por enzimas proteolíticas produzidas por eles.

Por sua vez a atividade da enterotoxina relatada por Hatheway (2003) é aumentada três pelo tratamento da tripsina. A tripsina cliva em dois sítios, cada uma envolvendo um resíduo com lisina, a toxina tripsinizada consiste 284 aminoácidos em dois curtos peptídeos de 10 e 15 aminoácidos. O mecanismo da enterotoxina parece envolver ligação direta da toxina aos

receptores sob a superfície intestinal das células epiteliais. Repentinamente mudanças ocorrem no fluxo de íons de cálcio afetando o metabolismo celular e síntese macromolecular. Os danos morfológicos resultam na alteração da permeabilidade celular. Estudos têm sido estudado quase exclusivamente em cepas tipo A, no entanto, as cepas C e D também podem produzir enterotoxina, poucas cepas dos tipos B e E tem sido testadas para produção de enterotoxina, e todas foram negativas.

Para AL-SHEIKHLY (1977) o sucesso da reprodução de enterite necrótica em aves infundidas intraduodenalmente com bactéria livre de toxinas é uma forte evidência que lesões vistas em aves afetadas são devido somente as toxinas de *Clostridium perfringens*.

### 2.3. Sinais clínicos

WAGES; Opengart (2003) incluíram em suas citações uma depressão severa, diminuição do apetite, relutância ao mover-se, diarreia e penas arrepiadas, no entanto, a doença clínica é observada por curto período de tempo. Normalmente as lesões estão localizadas no jejuno e no íleo, porém as lesões também são descritas no ceco.

Outros autores caracterizam as manifestações clínicas da EN de duas formas: a forma clássica e forma suave, entre estas ainda têm sido descritas associadas com lesões hepáticas.

Segundo Wilson et al (2005) a forma clínica de NE tipicamente ocorre como surto caracterizado por depressão, penas arrepiadas, diarreia, amontoamento, anorexia, mortalidade elevada e a duração dos sinais devem ser curtos e morte súbita ocorre comumente sem nenhum sinal premonitório.

HELMBOLDT; Bryant (1971) em seu experimento caracterizou o curso de enterite necrótica em torno de 7 dias, com mortalidade diária, raramente excedendo 1%, as aves afetadas morriam dentro de 1 ou duas horas, as aves apresentavam intestino distendido pelo gás, conteúdo líquido marrom e parede intestinal apresentando coloração marrom.

Segundo Brennan (apud WILSON et al.,2005) a forma suave é caracterizada por uma ulceração focal leve acompanhada por uma diminuição do crescimento com ou sem sinais clínicos de infecção. Geralmente estas úlceras são equivalentes as áreas de necrose da mucosa vistas na forma fulminante de EN porém são menores com uma variação de 1 a 5 mm de diâmetro (WILSON, 2005).

AL-SHEIKHLY (1977) investigando as ações indiretas de toxinas, sugerem que a morte de aves infundidas com doses letais de toxinas devem ser devido ao efeito direto da absorção de toxinas sobre os eritrócitos, provavelmente como um resultado da ação da alfa toxina sobre a membrana citoplasmática. As aves afetadas devem morrer de anóxia resultante do dano aos eritrócitos.

#### **2.4. METODOLOGIA DE ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO DE *Clostridium perfringens* (Bacteriológico convencional)**

*Clostridium perfringens* é um patógeno encontrado em animais domésticos e humanos e pode ser transmitido ao homem através do consumo de produtos de aves, por isso, este organismo é também de interesse a indústria de aves, devido ao seu envolvimento em diversas doenças de aves (Smith, 1980 apud Craven, 2001). Segundo Craven (2001) *Clostridium perfringens* é frequentemente encontrado no trato intestinal de aves saudáveis, usualmente a níveis de  $<10^4$  organismos por grama e é disseminado através da produção de aves e processamento ambiental através de fezes e ruptura intestinal de aves.

A Secretária de defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (M.A.P.A.) de nº 62 (Brasil, 2003), a qual estabelece o Método de Contagem de *Clostridium* Sulfito Redutores e de *Clostridium perfringens*, aplicada a amostras de matérias primas e alimentos. Desta forma, amostras de caráter clínico não possuem uma metodologia de acordo com a natureza da amostra.

Os meios sólidos mais comuns para enumeração presuntiva de *Clostridium perfringens* contém ferro e sulfito, o qual permite sua redução para produzir colônias negras (HAUSCHILD & HILSHEIMER, 1973). Segundo ele, os ágars extensivamente usados são SPS ( sulfite-polymyxin-sulfadiazine), SFP ( Shahidi-Fegurson perfringens), e TSC (tryptose-sulfite-cycloserine). Já que muitos outros organismos têm a habilidade para reduzir sulfito a sulfeto, uma variedade de agentes seletivos são incorporados dentro destes meios para suprimir o crescimento competitivo (ERICKSON & DEIBEL, 1978).

Angelotti et al (1961), em seus estudos preliminares sobre ágar SPS contendo várias concentrações de sulfadiazina de sódio, revelou que adição de 0,12 mg/mL era necessário para inibir membros de Enterobacteriaceae, salmonellae, proteus e pseudomonas. Para estabelecer esta concentração e não inibir o crescimento de *Clostridium perfringens* o autor comparou 20 cepas deste organismo, entre três diferentes meios: ágar BHI ( Thioglycolate brain heart infusion agar), ágar tioglicolato e RCM (reinforced clostridial médium), no qual percentual de recuperação destes cepas foi de 100%.

Uma vez estabelecida que a adição de 0,12 mg/mL de sulfadiazina, Angelotti (1961) demonstrou não afetar quantitativamente a recuperação de *Clostridium perfringens*, ao mesmo tempo que poderia inibir staphilococci, enterococci e bacillus aeróbios e ao mesmo tempo eliminar formação de outros organismos redutores de sulfito que não *C. perfringens*.

Stutz & Lawton (1984) descreveram uma nova metodologia para enumeração de *Clostridium perfringens* MPN (números mais prováveis) através do IMM (meio leite ferro modificado), no qual este método de tubos demanda menos tempo, não requer equipamento adicional para manter em condições anaeróbicas.

Abeyta et al (1985) a través da enumeração de células viáveis em alimentos comparou três meios , IMM (Iron Milk Medium), TSC (tryptose sulfite Cycloserine) e ágar SFP (Shahidi-Fegurson perfringens), mesmo considerado que sua medida estimativa estatística era baseada sobre os componentes de variância para cada meio era computado já que os resultados do IMM eram

baseados em MPN e os valores de ágars SFP e TSC eram relatados em UFC. Contudo, o mesmo autor considerou resultados superiores para IMM a 45°C teste confirmativo, altamente significativo para *C. perfringens* apresentando uma fermentação tempestuosa, definido por produção de coágulo ácido e grande produção de gás, mesmo considerando reações similares por outros organismos para uma rápida fermentação e para os ágars TSC e SFP é um resultado presuntivo pela habilidade de reduzir a sulfito e produção de lecitinase, sendo que outras espécies de *Clostridium* também podem dar a mesma resposta.

Craven (2001), pesquisando a contaminação de *Clostridium perfringens* em uma planta de processamento através da recuperação de células injuriadas pelo IMM, no trato intestinal e superfície das aves provavelmente expostas a condições de células vegetativas injuriadas (oxigênio, altas temperaturas na escalda, baixa temperatura na água do chiller e cloro) a recuperação era mais alta em IMM incubada a 37°C comparada a incubação a 46°C, sugerindo que o mecanismo de reparo ocorre a 37°C mas não a 46°C.

Os efeitos inibitórios de antibióticos usados em meios seletivos para *Clostridium perfringens* têm sido observado. Apiluktivongsa & Walker (1980) avaliou o grau de inibição de células de *Clostridium perfringens* estressadas pelo frio por agentes seletivos nos meios recuperação, metabisulfito de sódio 1mg/mL, sulfato de polimixina B 10µg/mL, sulfadiazina de sódio 12µ/mL, sulfato de neomicina 50µ/mL, d-cicloserine 400µg/mL, fosfato de oleandomicina 6µg/mL, sulfato de kanamicina 12mg/mL, entre todos os agentes o d-cicloserine mostrou a inibição mínima para recuperação de células estressadas e não estressadas, a polimixina e sulfadiazina apresentaram baixas recuperações, tornando-se mais evidentes após as células serem expostas a baixas temperaturas, a sulfadiazina maior inibição do que polimixina, leve inibição de células estressadas e não estressadas eram evidentes na presença de kanamicina; de fato as quantidades eram reduzidas pela grande maioria dos agentes exceto d-cicloserine, sendo esta diferença mais pronunciada após as células terem sido expostas a temperaturas frias.

De acordo com Labbe & Harmon (1992) a preparação de alimentos e homogenizados fecais devem ser misturados com água peptonada 0,1% para obter diluição 1:10. Para amostras fecais, homogenizar 1 g ou 1 mL em 9 mL de água peptonada 0,1%, homogeneizar em vortex, para formar esporos aquecer o homogenizado em banho-maria a 75°C por 20 minutos.

De com o exposto a literatura disponibiliza diversos métodos para quantificação de *Clostridium perfringens* em matéria-prima de alimentos. Porém não existe um método específico destinado a amostras clínicas com o objetivo de testar o limite de detecção e a sensibilidade do mesmo com base em alguns critérios de validação para métodos quantitativos descritos no Nordval (2005).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta de material

Foram alojadas 840 aves na Estação Experimental da UFRGS em EI Dourado do Sul, dispostos em 4 tratamentos com 6 replicatas cada, em boxes de 2,5m<sup>2</sup>. Destas aves, 73 amostras foram analisadas quanto a presença de *Clostridium perfringens* pelo método bacteriológico convencional com base na metodologia descrita pela Secretária de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (M.A.P.A.) de nº 62 e pelo manual de bacteriologia analítica (FDA/CFSAN 2001).

As aves foram vacinadas com vacina viva anticoccidiana atenuada. Os tratamentos foram distribuídos em T1 - dieta milho soja com promotor de crescimento, T2 - dieta milho soja sem promotor de crescimento, T3 - dieta milho soja, farinha de ossos e farinha de carne com promotor de crescimento (avilamicina) e T4 - dieta milho-soja, farinha de ossos e farinha de carne sem promotor de crescimento (avilamicina).

Das 73 amostras distribuídas em quatro tratamentos com seis replicatas cada, as idades foram coletadas em nove níveis, conforme a capacidade de demanda do laboratório. Na primeira fase de coleta as replicatas R1 e R2 de todos os tratamentos foram coletados ao 14º dia de idade, replicatas R3 e R4 ao 15º dia de idade e R5 e R6 ao 16º dia de idade. A segunda fase de coleta iniciou ao 20º dia de idade com R1 e R2, 21º dia de idade R3 e R4 e 25º dia de idade R5 e R6, a terceira fase de coleta procedeu mesmo esquema. Em virtude das temperaturas elevadas no mês de janeiro, o box onde alojava a replicata 3 do tratamento 1 foi eliminado para evitar erros estatísticos, sendo assim o mesmo procedeu para os demais tratamentos de mesma replicata.



Para a realização da análise foi utilizado o software estatístico SAS. Aplicando uma análise fatorial com 3 fatores, sendo eles: idade, tratamento e segmentos intestinais.

O modelo proposto para análise foi significativo ao nível de 5% de significância. Como foi significativa a maior interação ( $p < 0,0001$ ), que é a interação tríplice (entre os fatores) entre idades, tratamentos e segmentos intestinais.

Tabela 1 - Sistemática de coletas

Dias de coleta	T1	T2	T3	T4
14°	R1	R1	R1	R1
20°				
34°	R2	R2	R2	R2
15°	R3	R3	R3	R3
21°				
35°	R4	R4	R4	R4
16°	R5	R5	R5	R5
25°				
36°	R6	R6	R6	R6

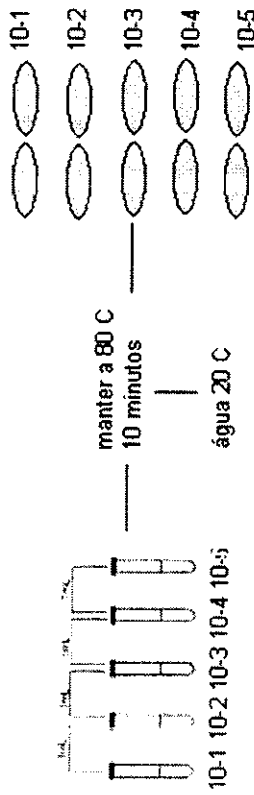
### 3.2 Metodologia de isolamento microbiológico

Para melhor isolamento e posterior contagem, as aves foram abatidas no laboratório do CDPA-UFRGS com o objetivo de eliminar o tempo decorrido entre coleta e a execução das análises. Imediatamente antes da coleta, os tubos contendo água peptonada tamponada 0,1% foram mantidos em banho-maria a 60° C, com o objetivo de reduzir a tensão superficial de oxigênio. Foram pesados 1g de raspado de íleos e cecos acondicionados em tubos contendo 9mL de água peptonada 0,1%, seguida de homogeneização em vortex, após foram realizadas as diluições seriadas. Os tubos foram

conduzidos ao banho-maria 80°C durante 10 minutos, com o objetivo de eliminar as formas vegetativas, estimular a esporulação e a flora interferente, após, transferidos ao banho-maria a 20°C. Para cada diluição foi semeada alíquotas de 1 mL em duplicatas e nomeadas de acordo com diluição "A" e diluição "B" em ágar TSC (semeadura em profundidade) suplementado com D-cicloserine 0.5% a uma de temperatura de 46° a 48°C. Após solidificação do meio, as placas foram acondicionadas em jarras de anaerobiose contendo gerador de anaerobiose - Anaerobac (Probac ®), as quais foram incubados à 37°C por 24 horas. Após a incubação a leitura foi realizada pelo método de contagem direta em placa para obter resultado em UFC(unidade formadora de colônia) de cada diluição.

Foram selecionadas as diluições que continham a concentração entre 20-200 UFC, sendo a contagem nomeada *Clostridium sulfito redutores*.

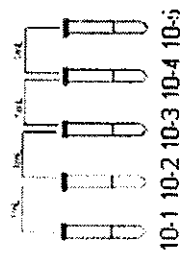
1 g raspado jejuno



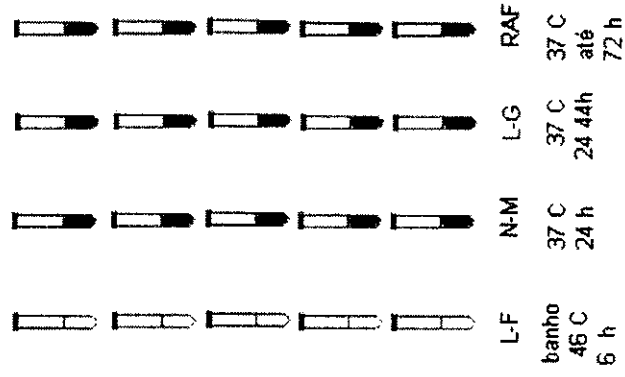
Incubar 24 horas  
36 C em  
anaerobiose

Repicar 5  
colônias  
para  
tioglicolato

1 g raspado ceco



CONFIRMAÇÃO



### 3.3 Método de contagem de *Clostridium perfringens*

A aplicação dos procedimentos para contagem de colônias seguem as regras específicas do Manual de Microbiologia (M.A.P.A.) anexo IV. Uma vez eleita a diluição, fez-se a contagem e a média das diluições homólogas. As colônias típicas de *Clostrídios* sulfito redutores são negras e de tamanho variável de 1 a 3 mm em agar TSC. Posteriormente, foram testadas para confirmação 5 colônias, repicando-as para meio MEA (meio experimental para anaeróbios), fórmula (anexo 1). Após inoculadas eram incubadas à 37°C durante 24 horas.

#### 1. Figura- Meio experimental para anaeróbios.



### 3.4 Testes confirmativos para *Clostridium perfringens*

As confirmações foram realizadas sob uma série de testes bioquímicos. Transferidos 1 mL de cultura em MEA para o meio leite-ferro modificado (anexo 2), mantidos os tubos em banho-maria a 46° C por até 6 horas. O *clostridium perfringens* é um grande produtor de gás com formação

de coágulo, conforme o BAM (2001) este teste é considerado presuntivo pela FDA/CFSAN.

Prova da motilidade, inoculado com agulha em ágar nitrato-motilidade tamponado (anexos) é imóvel com crescimento apenas ao longo da linha de inoculação. Prova da redução do nitrato: após a leitura da motilidade, foi acrescentado ao ágar 0,5 a 1 mL de solução de ácido sulfanílico ( reagente A) e de alfa-naftiletilenodiamina (reagente B). O aparecimento de uma coloração vermelha indicava a redução de nitrato a nitrito. Para confirmação de resultado negativo, acrescentou-se algumas miligramas de óxido de zinco (pó de zinco). O aparecimento de uma cor rosa era indicativo da não redução do nitrato, enquanto que a não alteração de cor era indicativo de redução do nitrato.

Fermentação da lactose e liquefação da gelatina. Transferido inóculo da cultura com agulha, se o meio era utilizado 8 ou mais horas após sua preparação, regenerava-se por aquecimento a 50°C por duas horas em banho-maria, antes da inoculação. Incubar a 37°C por 44 horas, após a incubação, os tubos eram mantidos em geladeira por 1 hora. Observa-se a fermentação da lactose pela produção de bolhas de gás e pela mudança de cor do meio vermelho para amarelo e também pela liquefação da gelatina por meio da permanência do estado líquido.

Fermentação da rafinose. Verificação através da fermentação da rafinose pela viragem da cor do indicador vermelho de fenol para amarelo. A fermentação ocorria em 72 horas.

#### 4. Resultados e discussão

No decorrer do experimento as aves alojadas não demonstraram sinais clínicos de enterite necrótica.

O BAM possui algumas diferenças em sua metodologia em relação ao MAPA. No BAM o leite ferro modificado é considerado um teste presuntivo, sendo realizado antes da série bioquímica. No MAPA o teste leite ferro modificado é realizado junto a série bioquímica. Neste trabalho, algumas diferenças foram estabelecidas na metodologia em função da natureza da amostra. Para o BAM e MAPA a sobre camada de ágar TSC com acréscimo de gema de gema são preponderantes para intensificar a anaerobiose e a reação da lecitinase. No entanto, com amostras clínicas a flora acompanhante limita pela formação de um tapete de bactérias na camada superior, impedindo o repique de colônias isoladas de *Clostridium perfringens* e a formação de colônias falso positivas para lecitinase, devido a confluência de colônias de *Clostridium perfringens*. O MEA substitui o meio fluido tioglicolato.

Algumas combinações de amostras intestinais diferiram com maior destaque. As amostras 26, 28, 42 e 48 são consideradas significativas com valores menores que o nível de 10% de significância ( $<0,10$ ) – para interações triplices utiliza-se um nível de significância maior. Podemos considerar que a partir do 16º dia de idade iniciou a multiplicação de *Clostridium perfringens* no trato intestinal das aves e a partir do 25º dia de idade ocorreu uma redução mais significativa no ceco e íleo.

As combinações que concernem o tratamento 3 foram as que demonstraram menor multiplicação do agente da enterite necrótica. Desta forma a dieta de milho-soja mais produtos de origem animal com promotor de crescimento avilamicina produziu um efeito redutor sobre o agente.

Algumas cepas de *Clostridium perfringens* podem apresentar características bioquímicas atípicas, teste da redução do nitrato a nitrito. De

acordo com o prof<sup>o</sup>Dr<sup>o</sup> Francisco Faria Lobato (comunicação pessoal) 10% das cepas podem não reduzir nitrato a nitrito. Com base nesta afirmação algumas confirmações poderiam ter sido deixadas de ser caracterizadas como *Clostridium perfringens*. Em adição, relatos em literatura confirmam (Hall 1969, apud Shahidi & Ferguson, 1970) a dificuldade para demonstrar a redução do nitrato.

#### Avaliação 1° nível de coleta segmento íleo

Idade	Tratamento	Resultado	Identificação
14	T1	<1,0 X 10	1
14	T2	<1,0 X 10	3
14	T3	<1,0 X 10	5
14	T4	<1,0 X 10	7
15	T1	<1,0 X 10	9
15	T2	<1,0 X 10	11
15	T3	<1,0 X 10	13
15	T4	<1,0 X 10	15
16	T1	<1,0 X 10	17
16	T2	<1,0 X 10	19
16	T3	<1,0 X 10	21
16	T4	3,2 <sup>2</sup> X 10	23

#### Avaliação 1° nível de coleta segmento ceco

Idade	Tratamento	Resultado	Identificação
14	T1	<1,0 X 10	2
14	T2	<1,0 X 10	4
14	T3	<1,0 X 10	6
14	T4	<1,0 X 10	8
15	T1	<1,0 X 10	10
15	T2	<1,0 X 10	12
15	T3	<1,0 X 10	14
15	T4	<1,0 X 10	16
16	T1	7,5 X 10	18
16	T2	2,2 X 10 <sup>2</sup>	20
16	T3	1,3 X 10 <sup>2</sup>	22
16	T4	1,5 X 10 <sup>2</sup>	24

## Avaliação 2° nível de coleta segmento íleo

Idade	Tratamento	Resultado	Identificação
20	T1	$1,5 \times 10^2$	25
20	T2	$<1,0 \times 10$	27
20	T3	$1,9 \times 10^2$	29
20	T4	$<1,0 \times 10$	31
21	T1	$<1,0 \times 10$	33
21	T2	$<1,0 \times 10$	35
21	T3	$1,5 \times 10$	37
21	T4	$5,5 \times 10$	39
25	T1	$4,1 \times 10$	41
25	T2	$<1,0 \times 10$	43
25	T3	$2,0 \times 10$	45
25	T4	$<10 \times 10$	47

## Avaliação 2° nível de coleta segmento ceco

Idade	Tratamento	Resultado	Identificação
20	T1	$6,1 \times 10^3$	26
20	T2	$1,0 \times 10^4$	28
20	T3	$4,5 \times 10$	30
20	T4	$2,9 \times 10^2$	32
21	T1	$<1,0 \times 10$	34
21	T2	$<1,0 \times 10$	36
21	T3	$7,2 \times 10^2$	38
21	T4	$1,4 \times 10^3$	40
25	T1	$1,6 \times 10^3$	42
25	T2	$<1,0 \times 10$	44
25	T3	$<1,0 \times 10$	46
25	T4	$3,0 \times 10^3$	48

## Avaliação 3° nível de coleta segmento íleo

Idade	Tratamento	Resultado	Identificação
34	T1	$<1,0 \times 10$	49
34	T2	$<1,0 \times 10$	51
34	T3	$<1,0 \times 10$	53
34	T4	$<1,0 \times 10$	55
35	T1	$<1,0 \times 10$	57
35	T2	$<1,0 \times 10$	59
35	T3	$<1,0 \times 10$	61
35	T4	$<1,0 \times 10$	63
36	T1	$<1,0 \times 10$	65
36	T2	$<1,0 \times 10$	67
36	T3	$<1,0 \times 10$	69
36	T4	$<1,0 \times 10$	71



## Avaliação 3° nível de coleta segmento ceco

Idade	Tratamento	Resposta	Identificação
34	T1	<1,0 X 10	50
34	T2	<1,0 X 10	52
34	T3	<1,0 X 10	54
34	T4	<1,0 X 10	56
35	T1	<1,0 X 10	58
35	T2	<1,0 X 10	60
35	T3	<1,0 X 10	62
35	T4	<1,0 X 10	64
36	T1	<1,0 X 10	66
36	T2	<1,0 X 10	68
36	T3	<1,0 X 10	70
36	T4	<1,0 X 10	72

A dieta empregada nestes tratamentos são caracterizadas a base de milho e soja com e sem proteína de origem animal. Além destes grãos de cereais, outros ainda podem constituir a dieta de aves, caracterizada como fonte de carboidratos, como por exemplo sorgo, trigo e cevada.

De acordo com Vieira 2002, as rações práticas no hemisfério ocidental tem o milho como sua principal fonte de carboidratos, um ingrediente de alta digestibilidade para aves, desde que mantenha qualidade mínima com relação a densidade e presença de toxinas fúngicas. O mesmo relata que a maior preocupação com relação a grão de cereais nas dietas de aves se dá com relação aos ingredientes alternativos, aqueles que não o milho, a exemplo de sorgo, trigo, tritcale, centeio, cevada e os farelos de trigo, arroz, etc.

Para Józeafiak et al (2004) os principais problemas associados com polissacarídeos não amido para as aves são a viscosidade e a capacidade de retenção de água. Annison and Choct (apud Józeafiak et al, 2004) afirma que pesquisas têm demonstrado justificativa para a viscosidade intestinal como sendo a causa, pectinas solúveis ou  $\beta$ -glucanos, mesmo em pequenas quantidades, aumenta marcadamente a viscosidade intestinal.

Em virtude dos efeitos da dieta sobre a flora intestinal é corrente o uso de promotores de crescimento com o objetivo de minimizar a proliferação de

microorganismos. Butaye et al (2003) relata que poucos autores têm investigado a influência da avilamicina sobre a flora intestinal, o de organismos *C.perfringens* nos intestinos das aves era reduzido adicionando 10 ppm de avilamicina na ração. De fato, avaliação estatística demonstra uma redução significativa na quantificação do tratamento 3 com promotor de crescimento avilamicina.

#### 4.1 Procedimentos de verificação do método

Com o objetivo de testar o limite de detecção e sensibilidade deste método alguns procedimentos de verificação do protocolo de validação de métodos microbiológicos alternativos para métodos quantitativos referenciados na NordVal validation (2005) foram desenvolvidos.

#### 4.2 Ensaio dos Procedimentos

Uma cepa de *Clostridium perfringens* gentilmente cedida pelo Lanagro/Porto Alegre foi inoculada em MEA e incubada por 24 horas a 37°C. Foram desenvolvidas 12 repetições (ANEXO 3) em dias alternados, das quais 4 foram selecionadas para realizar a média do inóculo. Cada cultura em fase estacionária foi diluída até a diluição  $10^{-8}$ . Aliquotas de 1 mL foram semeadas em duplicata em ágar TSC suplementado com d-cicloserine, após solidificação foi incubado em anaerobiose por 24 horas a 37°C. A contagem foi realizada em todas as diluições com suas respectivas médias. A média final das 4 diluições selecionadas  $2,8 \times 10^7$  UFC/ mL em fase estacionária.

**Tabela 2- Resultado das 4 diluições selecionadas.**

Repetições	1			2		
	A	B	MÉDIA	A	B	MÉDIA
-1	Inc	inc	inc	inc	Inc	inc
-2	Inc	inc	inc	inc	Inc	inc
-3	Inc	inc	inc	inc	Inc	inc
-4	Inc	inc	inc	inc	Inc	inc

-5	260	316	288	138	176	157
-6	26	23	24,5	14	17	15,5
-7	3	5	4	1	1	1
-8	Aus	aus	aus	aus	Aus	aus
	2,7X10 <sup>7</sup>			1,3X10 <sup>7</sup>		
Repetições	3			4		
Diluições	A	B	MÉDIA	A	B	MÉDIA
-1	Inc	inc	inc	inc	Inc	Inc
-2	Inc	inc	inc	inc	Inc	Inc
-3	Inc	inc	inc	inc	Inc	Inc
-4	Inc	inc	inc	inc	Inc	Inc
-5	Inc	inc	inc	inc	Inc	Inc
-6	129	156	141	356	345	350,5
-7	35	36	35,5	61	53	57
-8	1	4	2,5	3	4	3,5
	3,7X10 <sup>7</sup>			3,5X10 <sup>7</sup>		

### 4.3 Checagem das matrizes

Para proceder com a fortificação das matrizes foi necessário checar as matrizes quanto a presença de *Clostridium perfringens*. Pesadas 3 gramas de ileo e 3 gramas de ceco, destes, 1 g de cada foi acrescida de 4 mL de água peptonada tamponada 0,1%, diluição 1:5, a homogenização foi realizada em vortex por 2 minutos. As demais gramas de matrizes foram reservadas e mantidas sob refrigeração a 4°C. Semeados em ágar TSC suplementado com d-cicloserine, após solidificados foram incubados em anaerobiose por 24 horas a 37°C. Matrizes que demonstraram formação de UFC para *Clostridium perfringens* foram descartadas das etapas posteriores do ensaio.

### 4.4 Fortificação das matrizes

Para realizar o limite de quantificação foram necessárias 6 repetições para cada matriz nos diferentes níveis. No primeiro nível, 1 mL da diluição 10<sup>-6</sup>

foi utilizada para fortificar cada matriz de ceco e ileo, em segundo nível, 0,4 mL da diluição  $10^{-5}$  foram utilizadas para fortificação.

De acordo com as médias estabelecidas nas diluições em fase estacionária, o número esperado de UFC no primeiro nível, diluição  $10^{-6}$ , são 28 UFC e para o segundo nível, diluição  $10^{-5}$ , são 112 UFC.

Como forma de controle do primeiro e segundo nível foi inoculado em duplicata alíquotas de 1mL em ágar TSC suplementado com d-cicloserine, média do primeiro nível 438 UFC e para o segundo nível, o crescimento caracterizado como incontáveis (aproximadamente 4380 UFC).

**Tabela 3- Resumo das médias encontradas nas matrizes de ileo para primeiro nível.**

Primeiro nível	Esperado UFC	Média UFC	Percentual
1	28	15	37,50
4	28	17,5	43,75
5	28	3	7,50
6	28	79,5	198,75
7	28	4,5	11,25
9	28	4,5	11,25
10	28	111,5	278,75
11	28	5	12,50

**Tabela 4- Resumo das médias encontradas nas matrizes de ileo para segundo nível.**

Segundo nível	Esperado UFC	Média UFC	Percentual
1	112	27	6,41
2	112	98	23,28
4	112	17,5	4,16
5	112	3	0,71
6	112	290,5	69,00
7	112	359	85,27
9	112	367	87,17
10	112	269	63,90
11	112	368	87,41
12	112	94,5	22,45

Nas diversas tentativas em que as matrizes de ceco foram testadas quanto a presença de *Clostridium perfringens*, muitas foram eliminadas. Não obstante, os resultados da fortificação demonstraram-se insatisfatórios para tecer um paralelo em relação da matriz íleo para recuperação de células. Em virtude deste fator os dados obtidos a partir da leitura em placas estão expostos em tabela abaixo apenas com o objetivo de explanar as dificuldades impostas pela natureza da matriz.

**Tabela 5- Resultados obtidos da contagem das matrizes de cecos para primeiro nível.**

Primeiro nível ceco	UFC
3A	aus
3B	aus
10A	91
10B	aus
11A	Inc
11B	aus

**Tabela 6 - Resultados obtidos da contagem das matrizes de cecos para segundo nível.**

Segundo nível ceco	UFC
3A	inc
3B	aus
10A	39
10B	inc
11A	aus
11B	inc

#### 4.5 Análise dos resultados

Os ensaios para verificação do limite de detecção do método usado para íleo e ceco demonstraram um intervalo de detecção entre >40 células e <421 células por mL.

Em função dos ensaios de limite de detecção a perda de recuperação de células nas matrizes de ceco indicam que os resultados são quantitativamente maiores nas amostras. Possivelmente fatores interferentes tais como, analíticos, redução de pH, ácidos graxos de cadeia curta, exposição ao oxigênio podem ter interferido sob a recuperação das células.

Nos ensaios realizados nas matrizes de íleos, os índices de recuperação obtiveram resultados satisfatórios como demonstrados na tabela abaixo.

**Tabela 7 - Resumo estatístico primeiro e segundo nível para íleo**

	1° nível	2° nível
Média UFC	30,06	189,35
Desvio padrão	41,62	155
Média percentual	75,16%	45%
Mediana	10	183,5
Fator de recuperação	10%	0,54%

## 5. CONCLUSÕES

1 Conforme apresentado nas diversas idades a dieta milho-soja mais ingredientes de origem animal com promotor de crescimento, tratamento 3 demonstrou menor multiplicação do agente da enterite necrótica.

2 Os resultados expressos nos tratamentos com a aplicação da fórmula para obter as confirmações de *Clostridium perfringens* a partir de *Clostridium* sulfito redutores podem ter gerado resultados inferiores ao esperado nos diferentes tratamentos. Uma vez que a contagem dos *Clostridium* sulfito redutores não refletem as características do agente da enterite necrótica, necessitando confirmação bioquímica através da escolha aleatória de colônias suspeitas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYTA J.C.; WEKELL M.M.; PEELER J. T. Comparison of media for enumeration of *Clostridium perfringens* in foods. **Journal of food science**. Vol. 50, p. 1732-1735, 1985.

APILUKTIVONGSA P.; WALKER H. W.. Influence of selective agents on recovery of cold-stressed cells of *Clostridium perfringens*. **Journal of food science**. vol 45, p. 574-574,1980.

AL-SHEIKHLY, F., TRUSCOTT, R. B. The pathology of necrotic of chickens following infusion of crude toxins of *Clostridium perfringens* into the duodenum. **Avian Diseases**. vol.21 n° 2. p 241-255. 1976.

ANGELOTTI, R.; HALL, H. E.; FOTER, M. J.; LEWIS, K. H.. Quantitation of *Clostridium perfringens* in foods. **Applied Microbiology**. Vol.10. p 193-198. 1962.

USFDA-CFSAN . **Bacteriological Analytical Manual online**. Jan. 2001. cap. 16, pg 1-8.

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L. A.; HAESEBROUCK. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**. Vol 16. n° 2 . p 175-188. 2003.

BRASIL. Portaria n° 62, de de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Capítulo IV e anexo IV.



CRAVEN, S. E. Ocorrence of *Clostridium perfringens* in the broiler chicken processing plant as determined by recovery in iron milk medium. **Journal of Food Protection**. Vol 64, n° 12, p 1956-1960, 2001.

CRAVEN, S. E.; STERN, N. J.; COX, N. A.; BAYLEY, J. S.; BERRANG, M. Cecal carriage of *Clostridium perfringens* in broiler chickens given mucosal starter cilture. **Avian Diseases**. Vol 43. p.484-490. 1999.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMNITIES. Ameding Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feefingstuffs as regards withdrawal of the authorisation of certain additives. Bruxelles, 25/07/2001.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMNITIES. Concerning the authorisation of an additive in feedingstuffs. Bruxelles, 29/01/2003.

ERICKSON J. E.; DEIBEL R. H.. New medium for rapid screening and enumeration of *Clostriidium perfringens* in foods. **Applied and environmental microbiology**. vol. 36, n° 4, p.567-571, Out.1978.

HATHEWAY C. L. . Toxigenic Clostridia. **Clinical microbiology reviews**. Vol. 3 n° 1, p.66-98. Jan.1990.

HATHEWAY, C. L.. Toxigenic Clostridia. **Clinical Microbiology Reviews**. Vol 3. n° 1. p 66-98.

HAUSCHIELD A. H. W.; HILSHEIMER R. Evaluation and modifications of media for enumeration of *Clostridium perfringens*. **Applied Microbiology**. vol. 27 n° 1 p. 78-82, Jan. 1974.

HEMBOLDT, C. F.; BRYANT, E. S.. The pathology of necrotic enteritis in domestic fowl. **Avian Diseases**. n° 15, p 775-780. 1971.

HOFSHAGEN M.; STENWIG H. Toxin production by *Clostridium perfringens* isolated from broiler chickens and capercaillies (tetrao urogallus) with and without necrotizing enteritis. **Avian Diseases**. Vol. 36, p. 837-843. 1992.

ITURRINO R. B. S.; ISHI MARK. **Doença das aves**. 2000. p. 242-246. cap. 4.6.

JOZEFIAK D.; RUTKOWSKI A.; MARTIN S. A. Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. **Animal feed science and technology**. Vol. 113, p. 1-15, 2004.

LABBE G. R.; HARMON S. M.. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. p 623-634. cap. 37. 1992.

MARSHALL S. R. ; STEENBERGEN J. F.; McCLUNG L. S.. Rapid technique for enumeration of *Clostridium perfringens*. **Applied microbiology**. vol. 13, n° 4, p. 559-563, Jul. 1965.

NORDVAL, Department of Microbial Food Safety. Protocol for the validation of alternative microbiological methods. **Danish Institute for Food and Veterinary Research**. NV-DOC.D-2005-01-01.

SHAHIDI S. A. & FERGUNSON A. R. New quantitative, qualitative, and confirmatory media for rapid analysis of food for *Clostridium perfringens*. **Applied Microbiology**. Vol. 21, n° 3, março, p 500-506.

SMITH, L. D. S.. The Clostridia. **HANDBOOK OF MICROBIOLOGY**. Vol.1. p.90-96. 1974.

SMITH L.DS. **The pathogenic anaerobic bacteria**. 2° ed. cap. 7 1974.

SMITH L. DS.; HOBBS G.. Bergey's manual determinative bacteriology. 8ed. 1974.

STUTZ, M. W.; LAWTON, G. C.. Effects of diet and antimicrobials on growth, feed efficiency, intestinal *Clostridium perfringens*, and ileal weight of broiler chicks. **Poultry Science**. n° 63. p 2036-2042. 1984.

STUTZ, M. W.; LAWTON, G. C.. The iron milk most probable number method for enumeration of *Clostridium perfringens* in the diet and intestine of the chick. **Poultry Science**. n° 63. p 2241-2246. 1984.

VIEIRA S. L.. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Cap. 9, p. 125-133, 2000.

WAGES, P. . D.; OPENGART, K.. Necrotic enteritis . **Diseases of Poultry**. 11° Ed. 2003.

WILSON J.; TICE G.; BRASH M. L. e HILARE S. ST.. **Wolrd's Poultry Science Journal**. Vol. 61, p.435-449. Set 2005.

## ANEXO 1

### Meio experimental para anaeróbios

peptona	10 gramas	20 gramas
Extrato de levedura	2,50 gramas	5,00 gramas
glicose	6,25 gramas	12,50 gramas
Cloreto de sódio	2,50 gramas	5,00 gramas
L-cisteína	0,25 gramas	0,50 gramas
Caldo de fígado	250 mL	500 mL
Caldo de carne	250 mL	500mL

Ajustar pH 7,6

Esterilizar por autoclavação 121°C durante 30 minutos

Preparo caldo de carne

Composição:

Carne bovina moída 500 gramas

Água destilada 1000 mL

Modo de preparar:

Acrescentar água e colocar em refrigeração da noite para o dia, ferver durante 30 minutos, filtrar em gaze e clarificar em papel fitro.

Enfrascar e congelar.

Caldo de fígado

Procedimento idêntico ao caldo de carne.

## ANEXO 2

### Meio Nitrato motilidade

Reagentes para detecção da redução de nitrato a nitrito

Reagente A Ácido sulfanílico:

Ácido sulfanílico 1g

Ácido acético 5N 125 mL

Reagente B N - ( 1 - naftil ) etilenodiamina

N - ( 1 - naftil ) etilenodiamina dihidroclorado 0.25 g

Ácido acético 5 N 200 mL

Reagente C alfa-naftol:

Alfa-naftol 1g

Ácido acético 5N 200 mL

Para preparar ácido acético 5 N, adicionar 28,75 mL de ácido acético glacial para 71,25 mL de água destilada.

Estocar os reagentes em frasco de vidro escuro.

### ANEXO 3

#### Meio Lactose-Gelatina

Triptose 15 gramas

Extrato de de soja 10 gramas ( extrato de levedo)

Lactose 10 gramas

Vermelho de fenol ( como solução ) 0.05 gramas

Gelatina 120 gramas

Água destilada 1000 mL

Em 400 mL de água destilada dissolver triptose, extrato de soja e lactose sob aquecimento.

Suspender a gelatina em 600 mL de água destilada e aquecer a 50° a 60°C com agitação para dissolver

Misturar as duas soluções

Ajustar pH para 7,5 +ou- 0,2

Adicionar vermelho de fenol e misturar

Dispensar em tubos 10 mL altos tampa rosca

Autoclavar 10 min a 121°C

Caso não seja utilizado dentro de oito, regenera-lo por aquecimento a 50-70°C por 2-3 horas antes do uso para eliminar o oxigênio.

**ANEXO 4****Meio leite ferro modificado**

900 mL de leite integral

100 mL de água destilada

1 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Dissolver 1 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  em água destilada, acrescentar ao leite aos poucos.

## ANEXO 5

Idade	Tratamento	Replicata	Intest	Resp
14	T1	R1	1	10
14	T1	R1	2	10
14	T1	R2	1	10
14	T1	R2	2	10
14	T2	R1	1	10
14	T2	R1	2	10
14	T2	R2	1	10
14	T2	R2	2	10
14	T5	R1	1	10
14	T5	R1	2	10
14	T5	R2	1	10
14	T5	R2	2	10
14	T6	R1	1	10
14	T6	R1	2	10
14	T6	R2	1	10
14	T6	R2	2	10
15	T1	R4	1	10
15	T1	R4	2	10
15	T2	R3	1	10
15	T2	R3	2	10
15	T2	R4	1	10
15	T2	R4	2	10
15	T5	R3	1	10
15	T5	R3	2	10
15	T5	R4	1	10
15	T5	R4	2	10
15	T6	R3	1	10
15	T6	R3	2	10
15	T6	R4	1	10
15	T6	R4	2	10
16	T1	R5	1	10
16	T1	R5	2	10
16	T1	R6	1	10
16	T1	R6	2	140
16	T2	R5	1	10
16	T2	R5	2	440
16	T2	R6	1	10
16	T2	R6	2	10
16	T5	R5	1	10
16	T5	R5	2	10
16	T5	R6	1	10
16	T5	R6	2	250



16	T6	R5	1	620
16	T6	R5	2	10
16	T6	R6	1	12
16	T6	R6	2	300
20	T1	R1	1	10
20	T1	R1	2	9800
20	T1	R2	1	21
20	T1	R2	2	2400
20	T2	R1	1	10
20	T2	R1	2	9600
20	T2	R2	1	10
20	T2	R2	2	11000
20	T5	R1	1	380
20	T5	R1	2	80
20	T5	R2	1	10
20	T5	R2	2	10
20	T6	R1	1	10
20	T6	R1	2	360
20	T6	R2	1	10
20	T6	R2	2	230
21	T1	R4	1	10
21	T1	R4	2	10
21	T2	R3	1	10
21	T2	R3	2	10
21	T2	R4	1	10
21	T2	R4	2	10
21	T5	R3	1	10
21	T5	R3	2	1200
21	T5	R4	1	20
21	T5	R4	2	250
21	T6	R3	1	100
21	T6	R3	2	1400
21	T6	R4	1	10
21	T6	R4	2	1400
25	T1	R5	1	72
25	T1	R5	2	1900
25	T1	R6	1	10
25	T1	R6	2	1300
25	T2	R5	1	10
25	T2	R5	2	10
25	T2	R6	1	10
25	T2	R6	2	10
25	T5	R5	1	30
25	T5	R5	2	10
25	T5	R6	1	10
25	T5	R6	2	10

25	T6	R5	1	10
25	T6	R5	2	6000
25	T6	R6	1	10
25	T6	R6	2	10
34	T1	R1	1	10
34	T1	R1	2	10
34	T1	R2	1	10
34	T1	R2	2	10
34	T2	R1	1	10
34	T2	R1	2	10
34	T2	R2	1	10
34	T2	R2	2	10
34	T5	R1	1	10
34	T5	R1	2	10
34	T5	R2	1	10
34	T5	R2	2	10
34	T6	R1	1	10
34	T6	R1	2	10
34	T6	R2	1	10
34	T6	R2	2	10
35	T1	R4	1	10
35	T1	R4	2	10
35	T2	R3	1	10
35	T2	R3	2	10
35	T2	R4	1	10
35	T2	R4	2	10
35	T5	R3	1	10
35	T5	R3	2	10
35	T5	R4	1	10
35	T5	R4	2	10
35	T6	R3	1	10
35	T6	R3	2	10
35	T6	R4	1	10
35	T6	R4	2	10
36	T1	R5	1	10
36	T1	R5	2	10
36	T1	R6	1	10
36	T1	R6	2	10
36	T2	R5	1	10
36	T2	R5	2	10
36	T2	R6	1	10
36	T2	R6	2	10
36	T5	R5	1	10
36	T5	R5	2	10
36	T5	R6	1	10
36	T5	R6	2	10

36	T6	R5	1	10
36	T6	R5	2	10
36	T6	R6	1	10
36	T6	R6	2	10

## ANEXO 6

Repetições Diluições	1			2		
	A	B	MÉDIA	A	B	MÉDIA
-1	inc	inc	inc	inc	inc	Inc
-2	inc	inc	inc	inc	inc	Inc
-3	inc	inc	inc	inc	inc	Inc
-4	inc	inc	inc	inc	inc	Inc
-5	260	316	288	138	176	157
-6	26	23	24,5	14	17	15,5
-7	3	5	4	1	1	1
-8	aus	aus	aus	aus	aus	

Repetições Diluições	3			4		
	A	B	MÉDIA	A	B	MÉDIA
-1	inc	inc	inc	inc	inc	Inc
-2	inc	inc	inc	inc	inc	Inc
-3	inc	inc	inc	inc	inc	Inc
-4	inc	inc	inc	inc	inc	Inc
-5	inc	inc	inc	inc	inc	Inc
-6	129	156	141	356	345	350,5
-7	35	36	35,5	61	53	57
-8	1	4	2,5	3	4	3,5

Repetições Diluições	5			6		
	A	B	MÉDIA	A	B	MÉDIA
-1	inc	inc	inc	inc	inc	Inc
-2	inc	inc	inc	inc	inc	Inc
-3	inc	inc	inc	inc	inc	inc
-4	inc	inc	inc	inc	inc	inc
-5	inc	inc	inc	inc	inc	inc
-6	344	247	295,5	302	375	338,5
-7	18	14	16	28	26	27
-8	5	5	5	4	4	4

Repetições Diluições	7			8		
	A	B	MÉDIA	A	B	MÉDIA
-1	inc	inc	inc	inc	inc	inc
-2	inc	inc	inc	inc	inc	inc
-3	inc	inc	inc	inc	inc	inc
-4	inc	inc	inc	inc	inc	inc
-5	390	450	420	154	185	169,5
-6	7	10	8,5	56	53	54,5

-7	4	7	5,5	4	1	2,5
-8						

Repetições Diluições	9			10		
	A	B	MÉDIA	A	B	MÉDIA
-1	inc	inc	inc	inc	inc	inc
-2	inc	inc	inc	inc	inc	inc
-3	inc	inc	inc	inc	inc	inc
-4	inc	inc	inc	inc	inc	inc
-5	429	415	422	302	358	330
-6	58	25	41,5	42	57	49,5
-7	17	9	13	5	10	7,5
-8						

Repetições Diluições	11			12		
	A	B	MÉDIA	A	B	MÉDIA
-1	inc	inc	inc	inc	inc	inc
-2	inc	inc	inc	inc	inc	inc
-3	inc	inc	inc	inc	inc	inc
-4	inc	inc	inc	inc	inc	inc
-5	inc	inc	inc	inc	inc	inc
-6	181	154	167,5	121	148	134,5
-7	10	90	50	30	aus	15
-8						

## ANEXO 7

CONTAGEM Clostrídio sp e confirmação bioquímica  
14 DIAS

	ÍLEO		CECO	
T1R1	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	aus	aus
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T1R2	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	aus	aus
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T2R1	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	aus	aus
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T2R2	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	aus	aus
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T5R1	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	aus	aus
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T5R2	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	aus	aus
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T6R1	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	aus	aus
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T6R2	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	aus	aus
diluição 2	aus	aus	aus	aus

15 dias

	ÍLEO		CECO			
T1R3	A	B	A	B		
diluição 1	aus	aus	aus	aus		
diluição 2	aus	aus	aus	aus		
T1R4	ÍLEO		CECO			
	A	B	A	B		
diluição 1	aus	aus	aus	aus		
diluição 2	aus	aus	aus	aus		
T2R3	ÍLEO		CECO			
	A	B	A	B		
diluição 1	aus	aus	aus	aus		
diluição 2	aus	aus	aus	aus		
T2R4	ÍLEO		CECO			
	A	B	A	B		
diluição 1	aus	aus	aus	aus		
diluição 2	aus	aus	aus	aus		
T5R3	ÍLEO		CECO			
	A	B	A	B		
diluição 1	aus	aus	aus	aus		
diluição 2	aus	aus	aus	aus		
T5R4	ÍLEO		CECO			
	A	B	A	B		
diluição 1	aus	aus	aus	aus		
diluição 2	aus	aus	aus	aus		
T6R3	ÍLEO		CECO			
	A	B	A	B		
diluição 1	aus	aus	aus	aus		
diluição 2	aus	aus	aus	aus		
T6R4	ÍLEO		CECO			
	A	B	A	B		
diluição 1	aus	aus	aus	aus		
diluição 2	aus	aus	aus	aus		
Bioquímico	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilid
T6R3 ceco dil 1	neg	pos	pos	neg	pos	neg
T5R3 ceco dil 1	pos	neg	pos	neg	neg	neg

T5R4 ceco dil 1	pos	neg	pos	pos	neg	neg
-----------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

16 dias

	ÍLEO		CECO	
T1R5	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	72	64
diluição 2	2	2	aus	aus
T1R6	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	4	5	21	1
diluição 2	aus	aus	1	aus
T2R5	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	1	4	2
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T2R6	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	aus	aus
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T5R5	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	4	3
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T5R6	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	4	17	33
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T6R5	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	288	aus	9	18
diluição 2	333	aus	aus	aus
T6R6	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	3	3	11	287
diluição 2	2	1	aus	aus

T1R5 ileo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
	1 pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens



2	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg
3	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg
4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

T1R5 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg
2	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg
3	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg
4	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg
5	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg

T1R6 íleo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg
2	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg
3	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg
4	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg
5	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg

T6R5 íleo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos
2	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg
3	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg
4	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg
5	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg

T5R5 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos
2	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg
3	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg
4	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg
5	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg

T5R6 íleo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	neg	pos	neg	pos	neg	C. perfringens
2	neg	pos	pos	neg	pos	neg	neg
3	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg
4	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg
5	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg

T2R5 íleo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	neg	neg	C.perfringens
2	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg
3	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg
4	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg
5	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg

T1R6 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
2	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg
3	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg
4	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg
5	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg

T6R6 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
2	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg
3	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg
4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

T6R6 ileo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
2	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
3	pos	neg	neg	neg	pos	neg	C. perfringens
4	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

T5R6 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
2	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
3	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
4	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
5	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens

T1R5 ileo dil 2	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
2	pos	neg	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
3	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg

## 20 DIAS

	ÍLEO		CECO	
T1R1	A	B	A	B
diluição 1	2	2	inc	inc
diluição 2	1	aus	261	224
T1R2	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B

diluição 1	11	19	inc	inc
diluição 2	aus	aus	16	7
T2R1	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	inc	inc
diluição 2	aus	aus	inc	241
T2R2	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	178	189	inc	inc
diluição 2	aus	aus	262	297
T5R1	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	17	20	inc	inc
diluição 2	aus	aus	4	4
T5R2	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	1	aus	inc	inc
diluição 2	aus	aus	aus	2
T6R1	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	2	aus	97	82
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T6R2	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	inc	aus	89	144
diluição 2	aus	aus	1	2

T2R2 íleo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
4	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
5	neg	pos	pos	neg	pos	neg	neg

T2R1 ceco dil 2	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg
2	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg
3	pos	neg	pos	neg	pos	neg	neg
4	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
5	pos	neg	pos	neg	pos	neg	neg

T2R2 ceco dil 2	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	neg	pos	neg	pos	neg	neg
2	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg
3	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
4	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
5	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg

T5R1 ileo dil 2	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	neg	pos	neg	pos	neg	neg
2	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
3	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg
4	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg

T5R2 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
	pos	pos	neg	neg	pos	neg	neg

T5R2 ileo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg

T6R1 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
2	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg
3	pos	neg	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
4	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
5	pos	pos	neg	neg	pos	neg	neg

T1R1 ceco dil 2	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
2	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg
3	pos	neg	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
4	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg
5	neg	neg	pos	pos	pos	neg	neg

T1R1 ileo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg
2	pos	neg	pos	neg	pos	neg	neg

T1R2 ceco dil 2	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg
2	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg
3	pos	pos	pos	neg	pos	neg	C. perfringens
4	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg
5	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg

T1R2 ileo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg
2	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
3	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg
4	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg
5	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg

T6R2 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg
2	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg
3	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
4	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg
5	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg

T5R1ceco dil 2	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
2	pos	pos	pos	neg	pos	neg	neg
3	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
4	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg

21 dias

	ÍLEO		CECO	
T1R3	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	238	236
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T1R4	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	1	2	aus	aus
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T2R3	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	9	aus	57	aus
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T2R4	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	46	aus	148
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T5R3	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	116	aus

diluição 2	aus	aus	aus	aus
T5R4	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	1	8	163	82
diluição 2	1	aus	1	aus
T6R3	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	231	247	aus	18
	9	aus	aus	16
T6R4	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	46	213	268
diluição 2	aus	27	aus	13

T1R4 ileo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg

T2R3 ceco dil 2	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg
2	quebrou	quebrou	quebrou	quebrou	quebrou	sem result.	neg
3	pos	neg	pos	neg	pos	neg	neg
4	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg
5	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg

T2R3 ileo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	neg	neg	pos	neg	neg
2	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg
3	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
4	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg
5	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg

T6R4 ileo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg
2	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg
3	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg
4	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg
5	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg

T5R4 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
2	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg
3	pos	neg	pos	neg	pos	neg	neg

4	neg	pos	pos	neg	pos	neg	neg
5	neg	pos	pos	neg	pos	neg	neg

T6R3 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
2	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg
3	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg
4	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
5	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens

T6R3 ileo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
2	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg
3	pos	neg	pos	neg	pos	neg	C. perfringens
4	pos	neg	pos	neg	pos	neg	C. perfringens
5	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg

T6R4 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	neg	neg	C. perfringens
2	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg
3	pos	pos	pos	pos	neg	pos	C. perfringens
4	pos	pos	neg	pos	pos	neg	C. perfringens
5	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg

T2R4 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	neg	pos	neg	pos	neg	neg
2	pos	neg	pos	neg	pos	neg	neg
3	pos	neg	pos	neg	pos	neg	neg
4	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg
5	pos	neg	pos	neg	pos	neg	neg

T2R4 ileo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg
2	pos	neg	pos	neg	pos	neg	neg
2	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg
3	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg
4	pos	neg	pos	neg	pos	neg	neg

T5R3 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
2	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
3	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
4	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
5	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens

T5R4 ileo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
-----------------	-------------	----------	---------	----------	---------	------------	-----------

1	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg
2	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg
3	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg
4	pos	pos	pos	pos	neg	neg	C. perfringens
5	pos	pos	pos	pos	neg	neg	C. perfringens

T1R3 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
2	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
3	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg
4	pos	pos	pos	neg	pos	neg	C. perfringens
5	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg

25 dias

T1R5	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	11	7	229	32
diluição 2	AUS	AUS	239	18
T1R6	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	177	156
diluição 2	aus	aus	AUS	aus
T2R5	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	1	aus	inc	inc
diluição 2	aus	aus	22	128
T2R6	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	1	aus	inc	inc
diluição 2	aus	aus	93	70
T5R5	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	6	3	inc	inc
diluição 2	aus	aus	160	136
T5R6	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	3	2	inc	284
diluição 2	1	1	4	4
T6R5	ÍLEO		CECO	



	A	B	A	B
diluição 1	aus	1	94	103
diluição 2	aus	aus	2	aus
T6R6	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	2	aus	104	inc
diluição 2	aus	aus	aus	aus

T5R5 íleo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
2	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg
3	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
4	pos	pos	pos	pos	neg	neg	C. perfringens
5	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg

T6R6 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg
2	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg
3	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg
4	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg
5	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg

T6R5 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
3	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
4	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
5	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg

T6R5 íleo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg

T6R6 íleo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	neg	neg	neg	neg	neg	C. perfringens
2	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg

T2R6 ceco dil 2	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg
3	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg
4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg

T2R6 íleo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg

2	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg
3	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg
4	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg
5	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg

T2R5 ceco dil 2	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg
2	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg
3	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg
4	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg
5	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg

T1R6 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
2	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
3	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
4	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens

T1R5 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
2	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
3	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
4	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C. perfringens
5	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg

T1R5 ileo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg
2	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg
3	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg
4	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg

T5R6 ileo dil 2	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	neg	pos	neg	pos	neg	neg
2	pos	neg	pos	neg	pos	neg	neg
3	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg

T5R6 ceco dil 2	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg
3	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg
4	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg



3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

T2R2 ceco dil	1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg
2	neg	pos	pos	pos	neg	pos	neg	neg
3	neg	pos	pos	pos	neg	pos	neg	neg
4	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg
5	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg

T6R1 ceco dil	1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
2	pos	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
3	pos	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg
4	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
5	pos	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg

T1R1 ceco dil	1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg

T1R2 ceco dil	1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg

T6R2 ceco dil	1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	pos	pos	pos	neg	pos	neg	neg

T5R2 íleo dil	1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	pos	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg

T5R2 ceco dil	1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg

35 dias

	ÍLEO		CECO	
T1R3	A	B	A	B
diluição 1				
diluição 2				
T1R4	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	9	14
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T2R3	ÍLEO		CECO	

aos 35 dias não foi coletado,  
alta mortalidade

	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	1	aus
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T2R4	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	17	21
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T5R3	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	1	aus
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T5R4	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	6	7
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T6R3	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	13	19
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T6R4	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	aus	2
diluição 2	aus	aus	aus	aus

T1R4 ceco dil	1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
	1	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg
	2	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
	3	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg
	4	neg	neg			neg	neg	neg
	5	neg	pos			neg	neg	neg

T5R4 ceco dil	1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
	1	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg
	2	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
	3	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg
	4	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
	5	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg

T6R4 ceco dil	1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
	1	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg

T2R3 ceco dil	1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
	1	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg

T6R3 ceco dil	1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
	1	neg	neg	pos	neg	pos	pos	neg
	2	neg	quebrou	quebrou	quebrou	neg	neg	sem result.
	3	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg
	4	neg	pos	pos	neg	pos	pos	neg
	5	neg	pos	pos	pos	pos	pos	neg

T2R4 ceco dil	1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
	1	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
	2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
	3	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
	4	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
	5	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg

T1R4 ceco dil	1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
	1	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
	2	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg
	3	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
	4	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg
	5	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg

T5R3 ceco dil	1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
	1	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg
	2	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg
	3	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg
	4	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg
	5	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg

36 dias

	ÍLEO		CECO	
T1R5	A	B	A	B
diluição 1	1	aus	3	1
diluição 2	aus	1	1	aus
T1R6	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	15	19	2	2
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T2R5	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	3	7

diluição 2	aus	aus	aus	aus
T2R6	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	1	1	12	14
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T5R5	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	aus	aus
diluição 2	1	aus	aus	aus
T5R6	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	1	2	3	1
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T6R5	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	4	15
diluição 2	aus	aus	aus	aus
T6R6	ÍLEO		CECO	
	A	B	A	B
diluição 1	aus	aus	271	276
diluição 2	aus	aus	3	aus

T1R5 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg

T2R6 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg
2	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg
3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
4	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg
5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

T2R5 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
3	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg
4	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg
5	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg

T2R6 íleo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg

2	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg
---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

T5R6 ileo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

T5R6 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg
2	neg	neg	pos	pos	pos	neg	neg
3	neg	pos	neg	pos	neg	neg	neg

T1R5 ileo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
3	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
4	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg

T1R6 ileo dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
3	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
4	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg

T1R6 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg
2	neg	neg	pos	pos	pos	neg	neg
3	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg
4	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg
5	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg

T6R6 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg
2	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg
3	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg
4	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg
5	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg

T6R5 ceco dil 1	Leite-ferro	Rafinose	Lactose	Gelatina	Nitrato	Motilidade	Resultado
1	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
3	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg
4	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg
5	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg