

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Avaliação de alterações intestinais macroscópicas
e correlação com aspetos microbiológicos em
Perdiz-vermelha (*Alectoris rufa*)**

-Versão Final-

Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária
António Miguel Bernardo Bragança Ferreira

Orientadora: Professora Doutora Patrícia Alexandra Curado Quintas Dinis
Poeta

Coorientador: Doutor Hervé Henri Cornil Ameloot



Vila Real, Maio de 2018

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Avaliação de alterações intestinais e correlação
com aspetos microscópicos**

Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária
António Miguel Bernardo Bragança Ferreira

Orientadora: Professora Doutora Alexandra Curado Quintas Poeta
Coorientador: Doutor Hervé Ameloot

Composição do Júri:

Vila Real, Maio de 2018

O conteúdo deste trabalho é da
inteira responsabilidade do autor.

“Se não houver pessoas suficientes a duvidar de si, é porque não está a fazer a diferença”

Seth Godin, *The Icarus Deception – How high will you fly?*

AGRADECIMENTOS

À minha família, os proporcionadores de toda esta caminhada.

Obrigado Mãe, Pai e João, realmente esta vitória também é Vossa!

Ao Hervé Ameloot, como co-orientador e amigo, pela incessável ajuda e apoio ao longo do meu estágio e deste projeto. Com toda a sua agenda preenchida, de tudo fez para estar presente e contribuir para o sucesso deste trabalho. Obrigado!

Ao Arnaud Bezille e Emmanuel Prampart, pela ajuda incansável neste projeto, pela paciência que tiveram ao longo do meu estágio e acima de tudo pelo conhecimento que me transmitiram todos os dias.

À Claudine Chardin, pela ajuda, amizade, humor e confraternidade com que lidou comigo em todas as jornadas preenchidas.

À Cassandre, à Nathalie e à Françoise um grande abraço com saudade e muito obrigado pela ajuda na língua Francesa.

À família Séguin, por confiarem em mim e fazerem de mim parte da família. Obrigado Dominique, Marie Agnès e Etienne!

Aos gestores cinegéticos que me deram a oportunidade de concretizar este trabalho, abrindo as portas da sua exploração. Obrigado M. Stéphane Puisset, M. Frédéric Charles e M. Didier Charles.

À Professora Patrícia Poeta, orientadora deste trabalho à qual agradeço todo o apoio, ajuda e disponibilidade.

À Professora Madalena Vieira-Pinto por toda a amabilidade e ajuda.

Ao Dr. Miguel Fontes, sempre disponível a uma volta pelas Perdizes transmitindo todo o seu conhecimento, pela sua preocupação e amizade. Sem ele este projeto não era possível.

Ao Dr. Xavier Chatenet, uma vez que ocasionou a minha ida para França.

Ao Professor Manuel Rui Alves, definitivamente um pilar da minha tese, possibilitando uma interessante análise estatística.

A todos os meus amigos de Tomar, muito obrigado!

À família que me apadrinou em Vila Real, obrigado por toda a confraternidade, apoio e paciência. Não teria sido a mesma coisa se não vos tivesse conhecido.

À Teresa, por ser a melhor namorada do Mundo, pela mais valia na correção da minha tese e essencialmente por estar presente em todos os bons e maus momentos.

RESUMO

Atualmente, mais de 30 milhões de perdzizes-vermelhas são produzidas na Europa e, só nos EUA, este tipo de avicultura representa um impacto de 5.000 milhões de dólares. A produção destas aves é feita sobre um sistema semi-intensivo e o principal desafio são os problemas intestinais, que representam cerca de 84% das prescrições de antibióticos. As doenças intestinais principais são provocadas por coccídeas e protozoários flagelados.

Embora haja um vasto conhecimento destes parasitas, permanecem por descobrir muitos aspetos relativos à epidemiologia e controlo. Assim, a melhor compreensão dos fenómenos que interligam a microbiologia, parasitologia, patofisiologia e zootecnia é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de promoção da saúde intestinal.

Neste estudo, executou-se um protocolo que integrou as 4 temáticas anteriormente descritas através do acompanhamento de 2 explorações de 2080 e 4400 perdzizes, no centro de França. Semanalmente procedeu-se à medição da temperatura e pH da água de bebida, levantamento da informação relativa ao comportamento das aves, alterações de manejo, tratamentos e escolha aleatória de 5 animais para análises laboratoriais. A nível laboratorial, em cada um dos 3 segmentos intestinais (duodeno, jejuno/íleo e ceco), determinou-se a carga parasitária, procedeu-se à monitorização das populações bacterianas de *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Campylobacter* spp. e fungos tendo-se fotografado para posterior análise e avaliação de lesões e alterações intestinais. Ainda se executaram esfregaços e colorações do trato digestivo com o objetivo de compreender e avaliar a sua utilização em ambiente prático.

Os resultados deste estudo revelaram que a monitorização da temperatura e pH da água é importante, sendo que temperaturas mais frescas (iguais ou inferiores a 24 °C) e valores de pH ácidos (entre 3 e 4) pareceram preferíveis. Alguns parâmetros de manejo como a idade de saída para o parque de voo, condição corporal e utilização de tratamentos parecem ser bons indicadores de qualidade de bandos. No que concerne às parasitoses, confirmou-se que a epidemiologia e controlo das mesmas permanecem mal compreendidos, uma vez que tanto os tratamentos como os quadros clínicos não corroboraram com o descrito. Observaram-se tratamentos sem eficácia e, ao mesmo tempo, animais com sinais intestinais evidentes de coccidiose sem se refletir no comportamento, condição corporal e mortalidade. Os tratamentos antibióticos parecem influenciar positivamente a existência de fungos em todos os segmentos intestinais e o

acesso ao exterior parece determinar a presença e carga de *Campylobacter* spp. em todo o intestino.

A monitorização de populações Gram-negativas e Gram-positivas através da coloração de esfregaços de conteúdo intestinal revelou-se ineficaz, verificando-se heterogeneidade e dificuldade na observação das lâminas. Apesar disso, esta coloração verificou-se útil na identificação de bactérias com morfologias atípicas, como do género *Sarcina* e espirais/encurvadas, que parecem desenvolver-se aquando de alterações gastrointestinais agressivas. O uso da coloração *May-Grunwald-Giemsa* e *Hemacolor*[®] demonstrou-se eficaz na coloração de formas parasitárias de *Eimeria* spp, sendo que *Hemacolor*[®] prevaleceu pela rapidez (3 min.) sem deterioração da qualidade. Este meio de diagnóstico poderá ser considerado como ferramenta prática em espécies cinegéticas, carecendo de mais experiências e ensaios. Estas colorações poderão não ser úteis na identificação de protozoários flagelados, ainda que permitam a observação de parasitas sem necessária identificação da motilidade.

Ainda se pôde concluir que a avaliação geral da saúde intestinal, de um ponto de vista holístico, se revela importante e crucial uma vez que a enterite bacteriana é frequentemente observada em aves cinegéticas, todavia deverá ser aprofundada a sua utilização em situação prática e laboratorial, de modo a aproximar todos os intervenientes do setor para um problema comum.

ABSTRACT

Nowadays, more than 30 million red-legged partridges are produced in Europe and in the USA. The upland game bird industry has an impact of \$5.000 million and is a growing business. The production of these birds is made in semi-intensive systems and the main challenge are intestinal disorders, which represent about 84% of antibiotic prescriptions. The major intestinal diseases are caused by parasites, such as coccidia and protozoan flagellates.

Although there is an extensive knowledge of these parasites, many aspects of the epidemiology and control remain unclear. Thus, a better understanding of the phenomena that interfere with microbiology, parasitology, pathophysiology and zootechnics is fundamental for the development of intestinal health promotion strategies.

In this study, a protocol was implemented that integrated the four thematic previously described by following 2 batches of 2080 and 4400 partridges in the central region of France. The weekly assessment has included: measure of temperature and pH of the drinking water, bird behavior information, management changes, treatments and collection of 5 animals for laboratory analysis. In the laboratory, in each of the 3 main intestinal segments (duodenum, jejunum/ileum and cecum) was determined the parasite charge, the bacterial populations of *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Campylobacter* spp. and fungi were monitorized and photographs were taken for later analysis and evaluation of gut alterations and lesions. Colorations of the gut mucosa/content smears were also performed in order to understand and evaluate their use in a practical environment.

The results of this study revealed that the monitoring of water temperature and pH is important, with cooler temperatures (equal to or less than 24 ° C) and acidic pH values (between 3 and 4) appearing to contribute for bird quality. Some management parameters such as the age of release for the flight pen, body condition and use of treatments seem to be good indicators of flock quality. Regarding to parasite infections, it was confirmed that the epidemiology and control of these parasites remain poorly understood, since the treatments and the clinical features did not corroborate with what's described. Ineffective treatments and at the same time animals with obvious intestinal signs of coccidiosis were observed in birds without behavior alterations with good body condition and no mortality. Antibiotic treatments appeared to positively influence the existence of fungi in all

intestinal segments and the access to the flight pen appeared to determine the presence and charge of *Campylobacter* spp. in all gut.

Monitoring of Gram-negative and Gram-positive populations by staining intestinal contents was not possible, because of the heterogeneity and difficulty in the microscopical observation. In spite of this, this staining was useful in the identification of bacteria with atypical morphologies, such as the genus *Sarcina* and spiral/curved bacteria, which appear to develop during aggressive gastrointestinal alterations. The use of *May-Grunwald-Giemsa* and *Hemacolor*[®] staining was very successful in the staining of parasitic forms of *Eimeria* spp. *Hemacolor*[®] had a better performance since it is very quick (3 min.) with good quality. This type of diagnosis can be considered as a practical tool in game bird production, lacking more experiments and trials. These stains may not be useful in the identification of flagellated protozoa, although they allow the observation of parasites without necessary identification of the motility.

It was possible to conclude that the intestinal health evaluation, from a holistic point of view is important and crucial since bacterial enteritis is frequently observed in game birds but its use should be further investigated in practical and laboratory situation, in order to approach all participants in the industry to a common problem.

De: no-replay@abstracts.eventyco.com 
Assunto: [EPC2018 Abstracts] "Presence of Campylobacter spp. in farm-reared Red-legged Partridge (Alectoris rufa)" Final decision
Data: 18 de maio de 2018, 11:06
Para: antonio-miguel-ferreira@hotmail.com

N

Abstract ID : 646

Dear António Miguel Ferreira

The Scientific Committee of the 15th European Poultry Conference (Dubrovnik 2018) is pleased to inform you that the abstract ID [646](#) entitled: [Presence of Campylobacter spp. in farm-reared Red-legged Partridge \(Alectoris rufa\)](#) has been accepted for EPC 2018 conference.

Updated information on the scientific program will be posted on the conference homepage as it becomes available. Please check the www.epc2018.com regularly for more specific information. There you will find more details regarding the exact date and time of your presentation and it will be clearly identified in the program.

I look forward to welcoming you to spectacular surroundings in the cosy city of Dubrovnik in September!

Yours sincerely,

For the Scientific Committee,

Prof. Helga Medic

Presence of *Campylobacter spp.* in farm-reared Red-legged Partridge (*Alectoris rufa*)

A. Ferreira,¹ A. Bezille,² H. Ameloot,² C. Chardin,² M. Rui Alves³ E. Prampart² & P. Poeta¹

1 - Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

2 - MCVET Conseil, Quiers-sur-Bezonde, France

3 - Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Portugal

Nowadays, more than 70 million game birds are produced in Europe just among red-legged partridges and pheasants for hunting purposes (Shchricke, 1991; Vallance, 2006; Silva, 2004; Gortázar et al. 2000; Garrido 2002; Millán et al. 2003; MAPA, 1993; Millán, 2001; Hylands & Helsheikha, 2014). In the USA the upland game bird industry represents a \$5.000 million impact and growing business (McFarlane, 2014). This production is usually made in semi-intensive systems, where the birds can contact with the external environment through the flight pen. In these species, 84% of the antibiotics prescriptions are related to intestinal disorders (Ameloot, 2018). Little is known about the role of *Campylobacter spp.* in these birds, but some reports show that farm-reared and restocked partridges can act as carriers of enteropathogens increasing the risk of transmission to natural populations throughout the releases (Díaz-Sánchez, 2012).

During the summer of 2017, two batches of 2080 and 4400 partridges were followed in France, to identify the presence of *Campylobacter spp.* in each intestinal segment. Five animals per batch were weekly collected to evaluate gut lesions and alterations, and then performing a pool of intestinal content. The intestinal content of each segment was collected with a sterile inoculation loop and diluted in saline peptone, homogenized and then seeded in a specific culture media for *Campylobacter spp.* (CASA[®]) within 30 minutes of collection. The study lasted for 10 weeks and revealed that the access to the flight pen determines the presence and charge of *Campylobacter spp.* with high significative correlations in the duodenum ($\rho = 0,95$), jejunum/ileum ($\rho = 0,85$) and caecum ($\rho = 0,81$). These results show that the flight pen can represent a risk of contamination, but it remains unclear if it represents a potential risk for other species, or for partridges themselves like a trigger-point for some enteritis.

Since the production of free-range poultry is similar to that of game birds because they have continuous daytime access to open-air runs (Miao et al., 2005), one can speculate that the same problem may exist in Poultry, with a high risk of food contamination by *Campylobacter spp.*

Índice

1. INTRODUÇÃO.....	- 1 -
1.1. OBJETIVOS DO TRABALHO.....	- 3 -
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	- 4 -
2.1 A PERDIZ VERMELHA NA NATUREZA.....	- 4 -
2.1.1. Taxonomia e distribuição.....	- 4 -
2.1.2. Habitat e alimentação.....	- 5 -
2.1.3. Comportamento.....	- 5 -
2.1.4. Situação atual.....	- 6 -
2.2 CRIAÇÃO DA PERDIZ VERMELHA EM CATIVEIRO.....	- 7 -
2.2.1 Reprodução.....	- 8 -
2.2.1.1 Instalações para reprodutoras.....	- 8 -
2.2.1.2 Maneio reprodutivo e postura.....	- 9 -
2.2.1.3 Maneio do ovo.....	- 10 -
2.2.1.3.1 Recolha e seleção.....	- 10 -
2.2.1.3.2 Fumigação.....	- 11 -
2.2.1.3.3 Conservação.....	- 11 -
2.2.1.4 Incubação.....	- 12 -
2.2.2 Criação e Venda.....	- 13 -
2.2.2.1 Salas aquecidas.....	- 14 -
2.2.2.2 Pré-Parques.....	- 15 -
2.2.2.3 Parques de voo.....	- 15 -
2.3 DOENÇAS INTESTINAIS DA PERDIZ-VERMELHA.....	- 16 -
2.3.1 Coccidiose.....	- 16 -
2.3.1.1 Etiologia.....	- 16 -
2.3.1.2 Ciclo de vida.....	- 17 -
2.3.1.3 Sinais clínicos.....	- 18 -

2.3.1.4 Patologia.....	- 18 -
2.3.1.5 Diagnóstico	- 19 -
2.3.1.6 Tratamento e controlo.....	- 20 -
2.3.1.7 Relação entre a microbiota intestinal e a coccidiose	- 22 -
2.3.2 Enterites provocadas por protozoários da família Trichomonadidae.....	- 23 -
2.3.2.1 Etiologia e ciclo de vida.....	- 23 -
2.3.2.2 Sinais clínicos e patogenia	- 24 -
2.3.2.3 Diagnóstico	- 25 -
2.3.3 Enterites provocadas por <i>Spironucleous meleagridis</i>	- 26 -
2.3.3.1 Etiologia e ciclo de vida.....	- 26 -
2.3.3.2 Sinais clínicos e patogenia	- 27 -
2.3.3.3 Diagnóstico	- 28 -
2.3.4 Controlo de enterites provocadas por protozoários flagelados	- 29 -
2.3.5 Interação entre a microbiota intestinal e protozoários flagelados.....	- 30 -
2.4 QUALIDADE DA ÁGUA EM AVICULTURA.....	- 31 -
2.4.1 Temperatura e pH.....	- 32 -
3. MATERIAL E METODOS.....	- 34 -
3.1 ÁREA DE ESTUDO E RECOLHA DE DAdos.....	- 34 -
3.1.1 Exploração A.....	- 34 -
3.1.2 Exploração B.....	- 34 -
3.1.3 Laboratório de análises	- 35 -
3.2 Metodologia.....	- 36 -
3.3 Análise do desempenho zootécnico	- 37 -
3.4 Análise macroscópica do intestino.....	- 38 -
3.5 Análise parasitológica	- 39 -
3.6 Análise microbiológica.....	- 40 -
3.7 Teste rápido Coronavirus	- 42 -

3.8	Colorações	- 43 -
3.9	Análise estatística.....	- 44 -
3.9.1	Análise de correspondências.....	- 44 -
3.9.2	Análise de correlações	- 45 -
3.9.3	Software.....	- 45 -
4.	Resultados	- 46 -
4.1.	Desempenho Zootécnico	- 46 -
4.1.1	Exploração A.....	- 46 -
4.1.2	Exploração B.....	- 47 -
4.2	Temperatura e pH da água.....	- 48 -
4.2.1	Exploração A.....	- 48 -
4.2.2	Exploração B.....	- 49 -
4.3	Parasitoses e lesões	- 49 -
4.3.1	Scoring microscópico: Exploração A.....	- 49 -
4.3.2	Lesões e alterações intestinais: Exploração A	- 51 -
4.3.3	Scoring microscópico: Exploração B	- 54 -
4.3.2	Lesões e alterações intestinais: Exploração B.....	- 56 -
4.4	Análise de correspondência	- 59 -
4.4.1	Duodeno.....	- 60 -
4.4.2	Jejuno e Íleo	- 64 -
4.4.3	Ceco	- 67 -
4.7	Coloração GRAM	- 70 -
4.8	May Grunwald Giemsa e Hemacolor®	- 77 -
5.	Discussão dos resultados.....	- 82 -
5.1.	Desempenho zootécnico e manejo	- 82 -
5.2.	Parasitoses	- 85 -
5.2.1	Exploração A.....	- 86 -

5.2.1 Exploração B.....	- 88 -
5.3. Populações bacterianas.....	- 92 -
5.3.1 Relação entre o parque de voo e microorganismos.....	- 92 -
5.3.3 Echerichia coli, Enterococcus spp. e fungos.....	- 95 -
5.4. CORONAVIRUS.....	- 96 -
5.5. Parametros macroscópicos e a sua interpretação.....	- 98 -
5.6. Colorações.....	- 100 -
5.5.1 Gram.....	- 100 -
5.5.2 May Grunwald Giemsa e Hemacolor®.....	- 104 -
6. Conclusão.....	- 105 -
7. Bibliografia.....	- 111 -
8. Anexos.....	- 124 -

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Exploração A, pavilhão de avicultura convencional (fotografia do autor). - 34 -
- Figura 2. Exploração B. Pavilhão de avicultura tipo “túnel” (fotografias do autor). - 35 -
- Figura 3. Laboratório onde decorreu o presente trabalho. 1 - Local se faz a oicisão das aves, onde se pode encontrar o equipamento utilizado para eletronarcese (1a) e a zona de sangramento (1b); 2 - Mesa de necrópsias e local de armazenamento de material; 3 – Caixa de transporte (3a) e instrumento de medição da temperatura e pH da água (fotografias do autor). - 36 -
- Figura 4. Classificação de condição corporal. 3 – Bom; 2 – Magro; 1- Caquético (fotografias do autor). - 38 -
- Figura 5. Oocistos de *Eimeria* spp. - 40 -
- Figura 6. Técnica de recolha de conteúdo intestinal. 1 – recolha; 2/3 – diluição em peptona salina; 4 – homogeneização com a ajuda do vortex (fotografias do autor)..... - 41 -
- Figura 7. Protocolo de recolha e diluição utilizado. Setas azuis – recolha de 10 µl de fezes com a ajuda de uma ansa e diluir em 9 ml de peptona salina; Setas pretas – Semear 10 µl da amostra diluída nos meios de cultura indicados; Seta vermelha – Diluição da amostra cecal 10x (1 ml da amostra em 9ml de peptona salina); Seta verde – Diluição da amostra cecal 100x (100 µl da amostra em 9 ml de peptona salina). - 41 -
- Figura 8. Duodeno com conteúdo mucoide e líquido (fotografia do autor)..... - 51 -
- Figura 9. Duodeno com alterações focos necróticos típicos de *Eimeria kofoidi* (fotografia do autor). - 51 -
- Figura 10. Jejuno com alterações ao nível da espessura da parede intestinal. Parede fina podendo observar-se através dela (fotografia do autor)..... - 52 -
- Figura 11. Na imagem superior pode-se observar um segmento jejunal com conteúdo líquido e gás (seta preta). Na imagem inferior: jejuno inflamado (cor avermelhada) apresentando sangue digerido (seta verde) (fotografias do autor)..... - 52 -
- Figura 12. Diferentes alterações: diminuição da dilatação (imagem da esquerda); conteúdo cecal líquido e de cor bege (imagem do centro); conteúdo cecal líquido (imagem da direita); (fotografias do autor)..... - 53 -
- Figura 13. Diferentes alterações: gás (setas pretas); diminuição do conteúdo cecal e por consequência perda de dilatação; conteúdo líquido (seta verde); (fotografias do autor)... - 53 -
- Figura 14. Duodeno flácido, com conteúdos mucoides esbranquiçados e multicolorados (1 e 3); Duodeno flácido e inflamado, observando-se tonalidade avermelhada e vasos sanguíneos congestionados (2); (fotografias do autor). - 56 -

Figura 15. Jejunos com conteúdos multicolorados (1 e 2), muco (3 e 4), alimento por digerir identificado com setas pretas (1 e 5) e enterite catarral (2) (fotografias do autor).- 57 -

Figura 16. Jejuno de um animal infetado por *Spirotrunculus meleagridis* onde se pode observar conteúdos intestinais cilíndricos e ao mesmo tempo excesso de líquido (fotografia do autor). - 58 -

Figura 17. Ceco com conteúdo líquido; 2 – Ceco com conteúdo líquido e vasos sanguíneos congestionados; 3 – Ceco com conteúdo caseoso conferindo uma tonalidade bege; 4 – Cecos pouco dilatados (fotografias do autor). - 58 -

Figura 18. 1- Cecos dilatados (2 e 3) com conteúdo líquido (1) e gasoso (2) (fotografias do autor). - 59 -

Figura 19. Imagem de microscopia ótica da mesma lamina que revelam a heterogeneidade de coloração. - 71 -

Figura 20. Imagem de microscopia ótica de 4 conteúdos cecais de animais com a mesma idade, do mesmo lote, revelando heterogeneidade entre animais. - 71 -

Figura 21. Imagem de microscopia ótica de lamina onde não se conseguiu diferenciar com clareza bactérias Gram-positivas de Gram-negativas. - 72 -

Figura 22. Imagem de microscopia ótica de um esfregaço do segmento jejuno/íleo onde se diagnosticou *Hexamita meleagridis*. Circulo azul – bactérias do género *Sarcina* (fotografias do autor). - 73 -

Figura 23. Imagem de microscopia ótica de um esfregaço de conteúdo cecal onde se encontraram protozoários da família *Trichomonadidae* (fotografias do autor). - 73 -

Figura 24. Imagem de microscopia ótica de conteúdo cecal onde se encontraram protozoários flagelados da família *Trichomonadidae* (fotografias do autor). - 74 -

Figura 25. Imagem de microscopia ótica de um esfregaço jejunal onde se encontrou *Hexamita meleagridis* (fotografias do autor). - 75 -

Figura 26. Imagem de microscopia ótica de um esfregaço do segmento jejuno/íleo onde se detectou *Hexamita meleagridis* (fotografias do autor). - 75 -

Figura 27. Imagem de microscopia ótica de conteúdo cecal onde se encontram parasitas da família *Trichomonadidae* (seta verde) e é possível observar bactérias com um formato atípico (seta preta). - 76 -

Figura 28. Coloração Mgg de um esfregaço duodenal, onde se observa com clareza merozoítos (setas pretas), oocistos (círculo preto) e, provavelmente, microgamontes com microgametas em formação (círculo vermelho) (fotografia do autor). - 77 -

Figura 29. Coloração Mgg de um esfregaço duodenal, onde se observa com clareza merozoítos (setas pretas), oocistos (círculo preto) (fotografia do autor). - 78 -

Figura 30. Coloração Mgg de um esfregaço duodenal, onde se observa com clareza microgametas (círculo preto) e um oocisto (círculo vermelho) (fotografia do autor).- 78 -

Figura 31. Coloração Mgg de um esfregaço duodenal, onde se observa com clareza um meronte em fase de libertação de microgâmetas (círculo azul) e microgâmetas livres no lumen intestinal (setas pretas) (fotografias do autor)..... - 79 -

Figura 32. Coloração de um esfregaço de conteúdo cecal onde se detetou presença de protozoários da família *Trichomonadidae* (setas pretas). - 80 -

Figura 33. Coloração de um esfregaço por aposição do jejuno/íleo onde se detetou *Spironucleus meleagridis* (fotografia do autor)..... - 80 -

Figura 34. Coloração de um esfregaço por aposição do jejuno onde foi detectada a presença de *Spironucleus meleagridis*, onde a forma dos parasitas parece estar distorcida e perdendo a arquitetura original (fotografia do autor)..... - 81 -

Figura 35. Animal da exploração B com evidente coccidiose ao nível do ceco e duodeno. Podem observar-se focos necróticos semelhantes às lesões de *Eimeria kofoidi* (setas pretas). Este animal, apesar da evidente coccidiose, apresenta a condição corporal ótima (fotografias do autor). - 88 -

Figura 36. Fotografias de animais infetados por *Eimeria* spp.: 1- Condição corporal de classificação 2 (magro); 2- Ceco em fase inicial de coccidiose com alterações ao nível do conteúdo (pastoso); 3- Ceco com alterações ao nível do conteúdo (líquido); 4- Ceco com diminuição da dilatação e presença de um nódulo caseoso (seta preta), responsável pela tonalidade bege do conteúdo cecal; (fotografias do autor). - 90 -

Figura 37. Fotografia de animal magro, com infeção concomitante de *Spironucleus meleagridis* no intestino delgado e tricomonas no ceco. Setas pretas - conteúdo intestinal cilíndrico verde acompanhado de conteúdo líquido; Setas verdes – Conteúdo cecal líquido com gás; (fotografias do autor)..... - 91 -

Figura 38. Fotografia de um animal onde o teste rápido revelou positividade: enterite catarral de cor verde com alto conteúdo líquido e multiparasitismo; (fotografias do autor). - 97 -

Figura 39. Fotografias tirada em vários casos, com patologias completamente diferentes, no entanto, a falta de saúde intestinal é comum a todos eles: 1 – Inflamação (hiperemia e tonalidade avermelhada); 2 – Duodeno flácido; 3 – Duodeno flácido com conteúdo mucoide esbranquiçado, multicolorado e líquido; 4 – Jejuno com parede intestinal fina, sendo possível observar através da mesma; 5 – Duodeno com conteúdo líquido e formação de gás; 6 – Jejuno apresentando alimento por digerir; 7 – Jejuno apresentando conteúdo viscoso alaranjado e uma partícula de alimento por digerir (seta preta); 8 – Jejuno flácido apresentando conteúdo mucoide, multicolorado e líquido; 9 – Fezes amarelas fluidas e com gás, sinalizando falta de saúde intestinal; (fotografias do autor). - 99 -

Figura 40. Diferentes morfologias bacterianas. As delimitações vermelhas referem-se às morfologias que se observaram no presente trabalho em animais infetados com protozoários flagelados (adaptado de Talaro & Talaro, 1999)..... - 101 -

Figura 41. Na imagem da esquerda é possível observar um ceco muito dilatado com conteúdo gasoso e líquido infetado com protozoários flagelados. Na imagem da direita é possível observar uma fotografia feita durante uma coprologia, onde se detetaram bactéria do tipo Sarcina. (fotografias do autor) **NOTA:** As fotografias não correspondem ao mesmo animal. Estes indivíduos não entraram no presente estudo..... - 102 -

Figura 42. Coloração Gram de um esfregaço cecal, onde se pode observar bactérias com um formato semelhante ao género Brachyspira, demonstrando o potencial do uso da coloração na identificação de bactérias atípicas. **NOTA:** Este animal não pertence ao grupo de estudo..... - 103 -

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Gráfico 1. Mortalidade semanal observada na exploração A (eixo da esquerda). Estão presentes as informações relativas à saída para o parque de voo, média da condição corporal (eixo da direita) dos 5 animais eutanasiados semanalmente e o uso de antibióticos. - 46 -
- Gráfico 2. Mortalidade semanal observada na exploração B. Estão presentes as informações relativas à saída para o parque de voo, média da condição corporal (eixo da direita) dos 5 animais eutanasiados semanalmente e o uso de antibióticos - 47 -
- Gráfico 3. Valores semanais de temperatura e pH da água na Exploração A..... - 48 -
- Gráfico 4. Valores semanais de temperatura e pH da água na Exploração B..... - 49 -
- Gráfico 5. Média do score microscópico dos 5 animais eutanasiados semanalmente. Cocx: coccídias - 50 -
- Gráfico 6. Média do score microscópico, mortalidade (eixo da direita) e média da condição corporal (eixo da esquerda) semanal. Cocx: coccídeas..... - 50 -
- Gráfico 7. Média do score microscópico dos 5 animais eutanasiados semanalmente. Cocx: Coccídias; Tricho cecal: parasitas da família *Trichomonadidae* no ceco; Hexamita: *Spironucleus meleagridis* (*Hexamita meleagridis*) encontrados no jejuno/íleo..... - 54 -
- Gráfico 8. Média do score microscópico dos 5 animais eutanasiados, mortalidade e média da condição corporal semanal. Cocx: Coccídias; Tricho cecal: parasitas da família *Trichomonadidae* no ceco; Hexamita: *Spironucleus meleagridis* (*Hexamita meleagridis*) encontrados no jejuno/íleo. - 55 -
- Gráfico 9. Análise de correspondência do segmento duodenal. Circulo azul – delimita um grupo que tem em comum as 4 variáveis: CBa, Env, Ooc e Eim..... - 61 -
- Gráfico 10. Análise de correspondência do segmento duodenal. Circulo azul – delimita um grupo que tem em comum as 4 variáveis: CBa, Env, Ooc e Eim; Circulo vermelho – grupo que tem em comum as 3 variáveis: SBR,Ent e Eco; Circulo amarelo – grupo que tem em comum WTe, ABi, Bod e ExN. - 62 -
- Gráfico 11. Análise de correspondência do segmento Jejuno/íleo..... - 64 -
- Gráfico 12. Análise de correspondência do segmento Jejuno / Íleo..... - 65 -
- Gráfico 13. Análise de correspondência do ceco. - 67 -
- Gráfico 14. Análise de correspondência do ceco após retirada das variáveis: conteúdo caseoso (“Cas”) e cor Bege (Bei) - 68 -
- Gráfico 15. Análise de correspondência do ceco após retirada das variáveis: conteúdo caseoso (“Cas”), cor bege (“Bei”), trichomonas (“tri), ausência de cor (“Npr”) e conteúdo duro (“tou”). - 69 -

Gráfico 16. Score de *Campylobacter* spp. nos 3 segmentos intestinais na exploração B ao longo das 10 semanas de avaliação: pode observar-se que o acesso ao parque de voo a partir da 7ª semana (círculo) influenciou a presença e carga desta bactéria em todo o intestino..... - 94 -

Gráfico 17. Score de *Campylobacter* spp. nos 3 segmentos intestinais na exploração A ao longo das 10 semanas de avaliação: pode observar-se que o acesso ao parque de voo a partir da 5ª semana (círculo) influenciou a presença e carga desta bactéria em todo o intestino..... - 94 -

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de alterações intestinais nos três segmentos intestinais.	- 38 -
Tabela 2. Scoring microscópico para os parasitas analisados	- 39 -
Tabela 3. Score microbiológico utilizado. Min – mínimo de colônias observadas Max – máximo de colônias observadas.	- 42 -
Tabela 4. Soma dos scores de oocistos encontrados em cada segmento e soma do número de segmentos infetados com oocistos na exploração A e B.	- 88 -

ÍNDICE DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SÍMBOLOS

ACP – Anticoccidial product

ABi – Antibioterapia

Bro – Conteúdo cecal cor castanha

Bei – Conteúdo cecal cor bege

CA – Análise de correspondências

C – Colunas

CBa – *Score* de *Campylobacter* spp.

Cas – Conteúdo cecal caseoso

Cor – Detecção de *Coronavirus* através do teste rápido

Cre – Conteúdo cecal cremoso

Dim1 – Dimensão 1

D1 – Dimensão 1

Dim2 – Dimensão 2

D2 – Dimensão 2

EUA – Estados Unidos da América

ELISA – Enzyme-Liked Immunosorbent Assay

Eco – *score* de *Escherichia coli*

Ent – *score* de *Enterococcus* spp.

Eim – Lesões típicas de *Eimeria* spp.

Env – Acesso ao exterior

Fig. – Figura

Hex – *Spironuclues meleagridis* (*Hexamita meleagridis*)

ISH – In-situ hibidization

Inf – Infamação

Liq – Conteúdo intestinal líquido

L - linhas

Muc – Conteúdo intestinal mucoso

Mgg – May-grunwald-giemsa

Ndf – Alimento não digerido

Ooc – *score* de oocistos

OPG – Ocysts per Gram

Sof – Flacidez do intestino

Tri – Protozoários da família *Trichomonadidae*

Tou – Conteúdo cecal duro

TGI – Trato gastrointestinal

WTe – Temperatura da água

® – Marca registada

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem-se assistido a uma diminuição do número das espécies cinegéticas na Europa, afetando principalmente a Perdiz-vermelha (*Alectoris rufa*) e o Coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculi*). Supõe-se que, tal facto, se deve à diminuição de recursos naturais, excesso de predação, uso de pesticidas, pressão cinegética e doenças (Garcia-Abad et al., 2014). Assim, o recurso aos repovoamentos com espécies criadas em cativeiro tornou-se um hábito regular por parte das zonas de caça, representando uma grande parte dos animais que hoje são abatidos no campo.

O princípio de criar perdizes em cativeiro tem como objetivo produzir aves em condições controladas por forma a que os mecanismos fisiológicos e os hábitos adquiridos durante todo o ciclo sejam reversíveis, e os animais uma vez libertados no campo sejam capazes de sobreviver (Rodríguez-Ponga, 1994). À semelhança da avicultura industrial, a criação de aves cinegéticas (perdizes e faisões, p.e.) é feita num sistema intensivo\semi-intensivo em que o ambiente é controlado, quase na totalidade. Estas formas de explorações denominam-se de “Explorações Cinegéticas”.

As enterites parasitárias das aves cinegéticas são o problema que mais afeta os produtores, requerendo uma constante vigilância e prevenção. A Coccidiose é uma doença provocada pelo protozoário do género *Eimeria*, presente por todo o Mundo, sendo extremamente importante na produção animal, estando ligada a uma rutura no eixo hospedeiro-ambiente-parasita, responsável pela destruição do epitélio da mucosa intestinal traduzindo-se numa diarreia crónica ou aguda e, raramente, hemorrágica em aves cinegéticas (Schrike, 1991c).

As enterites provocadas por protozoários flagelados também representam um papel importante, conseguindo-se distinguir, facilmente, parasitas da família *Trichomonadidae* e do género *Hexamita*.

A tricomonadidose caracteriza-se pela proliferação exagerada de parasitas desta família no tubo digestivo, com tropismo para os cecos, resultando numa diarreia clara amarelada, por vezes líquida, asas tombadas e prostração (Schrike, 1991d). A hexamitose, também devido a uma proliferação exagerada do parasita, caracteriza-se pela diarreia líquida crónica, cloaca húmida, penas eriçadas e heterogeneidade no lote (Chatenet, 2014b).

A saúde intestinal é uma intrigante e complexa área combinando nutrição, microbiologia, imunidade e fisiologia, sendo a chave para o crescimento, saúde e bem-

estar das aves. Assim, e tal como em todas as aves de produção, é importante manter a saúde intestinal, perceber como atuar de modo a promover a sua integridade e reduzir fatores de risco.

Deste modo, para valorizar o estado de integridade intestinal em frangos surgiram diversos métodos, sendo o método de avaliação de Maarten De Gussem um dos mais eficazes (Garcia, 2017; Teirlink et al., 2011; De Gussem, 2010) e que consiste em avaliar parâmetros macroscópicos do trato gastrointestinal, como: existência de timpanismo, inflamação dos vasos sanguíneos, flacidez, conteúdo anormal, fragilidade da parede intestinal e ainda a existência, ou não, de alimento por digerir. Os resultados desta avaliação determinarão o tipo de abordagem.

Neste âmbito, utilizar alguns destes métodos em aves cinegéticas poderia ser interessante, mas tendo em conta os diferentes sistemas de produção e a falta de bibliografia, a informação proveniente da avicultura industrial poderá não ser útil para aplicação em aves cinegéticas.

Surge então a ideia deste trabalho, que se prende na avaliação das alterações intestinais macroscópicas, correlacionando-as com a informação parasitológica e microbiológica em cada segmento intestinal (duodeno, jejuno/íleo e ceco).

Assim, metodologicamente, procedeu-se ao seguimento de lotes de produção e execução semanal de necrópsias desde a primeira semana de idade, aplicando-se um protocolo integrado de parasitologia, microbiologia, fotografia e registo de alterações intestinais, bem como recolha de informação relativa à mortalidade, tratamentos e qualidade de água.

1.1. OBJETIVOS DO TRABALHO

1. Compreender o funcionamento do sector cinegético, com foco nas explorações de Perdiz-vermelha em França e as funções do Médico Veterinário na promoção da sanidade animal;
2. Contextualizar as enterites em Perdizes e o seu impacto;
3. Estudar, caracterizar e registar alterações ao nível do intestino em correlação com a evolução da microbiota intestinal e existência de parasitas;
4. Melhorar o conhecimento de fatores de risco para as diferentes enterites;
5. Identificar possíveis medidas corretivas e preventivas no combate aos problemas intestinais;
6. Criar uma base para o desenvolvimento de métodos de avaliação e diagnóstico mais práticos e úteis em situação de campo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A PERDIZ VERMELHA NA NATUREZA

2.1.1. Taxonomia e distribuição

Pertencente ao reino animal, tipo vertebrado, classe aves, ordem dos galináceos e família *Phasianidae*. Os animais desta família caracterizam-se por um aspeto robusto e compacto, com dimensões muito diversas: as asas são curtas e arredondadas; patas grossas, potentes e providas de quatro dedos com unhas; tarsos nus, com esporões que são maiores nos machos; cabeça pequena (relativamente ao tamanho do corpo); bico curto, forte e encurvado; levantam voo de forma “explosiva”; fazem posturas numerosas e os ninhos são instalados no solo (Beça, 2005a; Costa et al., 2011).

Visualmente elegantes, os adultos apresentam o bico e patas vermelhos, colar de cor negra e barras ou listas nos flancos, podendo apresentar cerca de 38cm de longitude e 50 a 60 de envergadura (Vilanova, 1991). O peso pode variar entre 400 e 500 gramas (Alonso de la Varga & Garcia-Abad, 2011). Os juvenis têm uma tonalidade creme homogénea, com indícios de colar e listas nos flancos. Esta espécie caminha de forma rápida no solo, voa em caso de extrema necessidade e se o fizer é possível ouvir um vibrante bater de asas. Os voos são baixos e intercalados com alguns períodos de planado (Costa et al., 2011). Percebe-se que a evolução da perdiz se refletiu em adaptações do sistema ósseo e muscular para a função de voo e paralelamente para a função bípede, permitindo correr, saltar e escavar (Pérez, 1981a).

Provenientes do Paleártico ocidental, na zona Mediterrânica, as perdizes do género *Alectoris* sofreram um processo de especificação simpátrica, originando cinco espécies diferentes: *Alectoris melanocephala*, *Alectoris barbara*, *Alectoris graeca*, *Alectoris chukar* e a *Alectoris rufa* (Beça, 2005b).

Segundo a IUCN *red list* (2016), a espécie *Alectoris rufa* ou Perdiz-vermelha tem forte presença na Península Ibérica, ocorre também na Itália, Alemanha, França e Andorra. Foi introduzida no Reino Unido, Irlanda, Grécia, Nova Zelândia, Algéria e nas ilhas dos Açores, Madeira e Canárias.

Esta ave cinegética de grande importância socioeconómica é também crucial a nível ecológico uma vez que desempenha um papel chave como presa (Duarte et al, 2014; Moleón et al., 2012).

2.1.2. Habitat e alimentação

Pode considerar-se que as características de um bom habitat incluem os recursos alimentares, as características climáticas, boa interação presa-predador-homem, oferecendo lugares para refúgio e alimentação (Beça, 2005d). Assim, e sendo a Perdiz uma ave selvagem sedentária, significa que detém a capacidade de responder a alterações edafo-climáticas e permanecer na mesma zona durante todas as estações do ano, facto que em outras espécies motiva a migração (Pérez, 1981a).

A perdiz apresenta dependência por terrenos agrícolas, áreas secas e também pedregosas. As culturas cerealíferas de sequeiro (trigo, centeio e aveia p.e.) revelam-se cruciais, no entanto a perdiz também tem aptidão para culturas leguminosas.

Entre outros fatores, Borrallho et al. (1999) concluíram e referenciou alguns tópicos como importantes para o aumento da densidade da espécie: vegetação “suja” nas bordas de caminhos; trilhos; faixas de vegetação “suja” (arbustos p.e.) entre zonas de cultivo; olivais como boa zona de alimentação e cobertura; zonas de pousio recente (1 ano, p.e) apresentando algum alimento (sementes) e cobertura; diversidade de planícies, tanto baixas como montanhosas.

A alimentação está limitada pelas características naturais de cada zona e alteração entre estações. Tipicamente a perdiz adota uma alimentação fitófaga, podendo também recorrer aos frutos, folhas, raízes, flores e rebentos. Também é possível ser considerada omnívora, uma vez que inclui sempre uma certa percentagem de seres invertebrados na sua alimentação, especialmente os perdigotos nas primeiras semanas de vida (Vilanova, 1991; Beça, 2005c).

2.1.3. Comportamento

Mesmo sendo sedentária, a Perdiz-vermelha apresenta diferentes estratégias de vida em função das alterações e desafios ambientais. Assim, podemos caracterizá-las ao nível do comportamento da seguinte forma:

- Acasalamento e nidificação: começando no final de Janeiro e variando em função da latitude e longitude, os casais começam a formar-se antes da separação definitiva dos bandos invernais onde as relações ainda não estão bem estabelecidas e ainda se pode observar disputas entre machos. Após a separação e em função das características ambientais, a partir de Abril os casais começam a formar os ninhos. A incubação dura cerca de 23-24 dias (González-Redondo et al., 2012) e a quantidade de

ovos pode variar entre 7 a 18 (Alonso de la Varga & Garcia-Abad, 2011) dependendo da quantidade de alimento disponível. Não só a fêmea, mas também o macho tem a capacidade de incubar os ovos;

- Bandos Familiares: após o nascimento dos perdigotos, os progenitores levarão a cabo a criação e proteção dos mesmos. O número de perdigotos por casal no final do Verão pode variar entre 2 e 9 em função do tipo de zona e a sua gestão (Alonso de la Varga & Garcia-Abad, 2011). Jesús Nadal Garcia (1998) referenciou que durante o primeiro mês de vida desaparecem mais de metade dos perdigotos e no fim do segundo mês apenas sobrevivem 21%;

- Bandos invernais: começando no Outono e conforme a escassez alimentar os bandos começam a agrupar-se e concentrar-se em zonas de maior qualidade (alimentação, refúgio, etc.).

De acordo com a etapa do ciclo biológico, pode assim perceber-se que as diferenças no comportamento da Perdiz-vermelha oscilam em função da qualidade do habitat, disponibilidade alimentar e pressão predatória e cinegética.

2.1.4. Situação atual

A situação atual da Perdiz-vermelha é de escassez, sendo numerosos os fatores que influenciam as suas populações. Muñoz (2013) apontou como principais fatores:

- Desaparecimento do habitat idóneo para a espécie como os pequenos cultivos de cereal (trigo, centeio, aveia), de largo ciclo, com colheita depois da cria dos perdigotos;

- Desaparecimento de zonas de pousio (para aliviar a pressão agrícola sobre o terreno), onde a nidificação poderá ter lugar;

- Desaparecimento de muitas margens de caminhos, ribeiras e separações de terrenos através de vegetação. Podendo ser lugar de cria e refúgio para a espécie;

- Aplicação de fitossanitários organoclorados, herbicidas e fertilizantes em vinhas, olivais, pastagens e outros cultivos o que leva a um grande impacto na fertilidade das perdizes, bem como na quantidade de insetos no terreno, sendo um dos principais componentes de alimentação dos perdigotos;

- Elevada pressão de caçadores e predadores naturais, dada a escassez do coelho-bravo (*Oryctolagus coniculus*);

- Elevada presença de gado, sobretudo bovinos, que pisam ninhos e pastam em zonas de refúgio e nidificação da perdiz;

- Incremento de populações de predadores, como o Saca-rabos (*Herpestes ichneumon*), Toirão (*Mustela putorius*), Raposas (*Canis vulpes*), Javalis (*Sus scrofa*), Pega-rabuda (*Pica pica*) e Charneco (*Cyanopica cyanus*) que destroem os ninhos de perdiz e outras aves cinegéticas.

Perante uma redução abrupta no número de exemplares disponíveis para caçar, e face à importância que os caçadores depositam na área cinegética, o recurso aos repovoamentos, com espécies criadas em cativeiro, surge como a solução mais fácil. Esta situação revelou-se, ao longo dos anos, bastante controversa uma vez que levanta inúmeras questões em relação à adaptabilidade dos animais no terreno, sendo alvo de inúmeras discussões e investigações.

2.2 CRIAÇÃO DA PERDIZ VERMELHA EM CATIVEIRO

Do ponto de vista histórico, segundo Sanchez et al., (2009), o início da produção cinegética em Espanha não é recente, tendo-se iniciado entre 1949 e 1959. Já segundo Schricke (1991b), as primeiras tentativas de criar caça em cativeiro em França e Inglaterra terão começado por volta da segunda metade do século XIX, ganhando real importância após a segunda guerra mundial, com posterior disseminação pelo resto da Europa.

Em termos numéricos, Etienne Schricke (1991a) relatou que na altura só em França, mais de 10 milhões de aves cinegéticas (principalmente faisões) entravam anualmente no mercado e mais recentemente Vallance (2006) reportou que a produção anual de perdizes era de 15 milhões. Em relação à realidade espanhola, estima-se que, anualmente sejam libertadas mais de 4 milhões de perdizes (Gortázar et al. 2000; Garrido, 2002; Millán et al. 2003; MAPA, 1993; Millán, 2001) e no Reino Unido cerca de 10 milhões (Millán, 2009). A informação relativa à produção portuguesa é escassa, no entanto informações oficiais de 2003 apontavam para a introdução de 1 milhão de perdizes criadas em cativeiro (Silva, 2004).

Consegue assim perceber-se a importância económica da criação de espécies cinegéticas em Portugal, Espanha, França e Inglaterra.

A criação de espécies cinegéticas em cativeiro difere completamente da criação de outras espécies (frango p.e.) pois as exigências em termos de adaptabilidade, robustez, rusticidade e capacidade de procriação têm de ser semelhantes às das espécies selvagens. Assim, pressupõe-se que serão requisitos para uma boa exploração, a qualidade genética, manejo e infraestruturas (Borges, 2007).

As explorações cinegéticas são habitualmente de ciclo completo, compreendendo todas as fases de produção (multiplicação, incubação e criação). No entanto, como foi possível compreender durante o presente trabalho, quando a dimensão de uma exploração é mediana ou pequena haverá a possibilidade de comprar os animais com um dia de idade vindos de outra exploração (evitando custos de reprodução e incubação).

2.2.1 Reprodução

2.2.1.1 Instalações para reprodutoras

Habitualmente as instalações para reprodutoras estão em ambiente exterior, coberto ou não com rede, albergando reprodutoras que se agrupam em pares no interior de jaulas. As mesmas estão dispostas em grupos de 4\6 em fileira chegando até mais de 40 alinhadas, formando várias filas de jaulas num só espaço.

Todo o local de reprodução deverá ser bem delimitado e isolado com estrito acesso a pessoas e outros animais.

No que concerne à jaula em si, alberga uma só fêmea reprodutora, uma vez que as perdizes são monogâmicas, tendo por medidas gerais: 70 a 150 cm de comprimento, 40 a 50 cm de largura, paredes em metal com cerca de 30\40 cm de altura para evitar que um casal veja outro (Munõz, 2013). As jaulas são cobertas com uma rede ou malha, para que a fêmea possa receber luz solar direta. A base de contacto com as perdizes será em grade metálica para permitir uma eficiente e higiénica eliminação de fezes e ao mesmo tempo inclinada para que os ovos rebolem para uma zona de difícil acesso por parte da perdiz, evitando a conspurcação e destruição do ovo (ovofagia). Isto facilita a recolha diária de ovos uma vez que esta zona é de fácil acesso pelo pessoal.

O interior das jaulas é composto por um comedouro e bebedouro, com disponibilidade *ad libitum* na altura produtiva.

Neste método de produção é necessário ter em conta o bem-estar das aves, requerendo constante vigilância principalmente aquando da formação de pares, sendo possível observar certos comportamentos de agressividade: picacismo, competição por espaço e “head tilt”, principalmente por parte do macho (Alonso et al., 2012).

2.2.1.2 Maneio reprodutivo e postura

O começo dosaios pode ser observado entre Janeiro e Fevereiro, em função da latitude (Muñoz, 2013), sendo possível encontrar alguns animais adiantados ou desfasados. Assim, é possível ter posturas já em Fevereiro ou em Março, estando bastante antecipada em relação a uma perdiz no campo, prolongando-se até meados de Julho (Pérez, 1981b). Não obstante, a perdiz é muito dependente do clima, alimentação e fotoperíodo, sendo possível observar algumas diferenças entre explorações.

Pode perceber-se que a época de postura, habitual e transversal a um grande número de explorações será entre Fevereiro e Junho. Este facto foi comprovado, em machos, por Santiago-Moreno et al. (2015) uma vez que observou maior quantidade de ejaculado espermático entre os meses de Março e Maio, com reduzidas quantidades nos meses antecedentes e seguintes, tendo também observado um pico máximo de testosterona entre os meses de Março e Abril. Na mesma ótica, González-Redondo (2006) comprovou que os ovos com maiores taxas de nascimento e fertilidade provieram de posturas em Março.

Em termos de ritmo circadiano, fotoperíodo e sexualidade, de uma forma transversal entre o macho e a fêmea, pode-se considerar que o hipotálamo desempenhe um papel chave. Dos núcleos neurosecretores do encéfalo chegam, ao lobo posterior e também anterior, oxitocina e arginina, cuja transferência parece ser influenciada pela luminosidade (Pérez, 1981c). A forma como a luminosidade atua sobre o organismo é bastante complexa, mas sabe-se que estimula a função procriativa favorecendo a transformação da provitamina D em vitamina D que tem um papel importantíssimo na produção de esteroides (Pérez, 1981d).

Tendo em conta a dependência pelo fotoperíodo, a performance reprodutiva poderá ser maior sobre protocolos de luminosidade artificial (González-Redondo, 2006) para estimular a atividade sexual e adiantar o início da postura em Fevereiro, incrementando a produção (5-10 ovos por casal) (Munõz, 2013).

No que concerne ao horário de luz diário (natural + artificial) deverá estar compreendido entre 14h e 17h e o incremento diário ou semanal deverá ser tanto ao amanhecer, como entardecer (Pérez, 1981e; González-Redondo 2006; Muñoz, 2013).

É possível dizer que a postura anual de uma perdiz-vermelha pode alcançar cerca de 25 a 50 ovos, em função da luminosidade, alimentação, sanidade e latitude (Muñoz, 2013).

O pico produtivo é alcançado aos 2 anos de idade e aos 3 a postura entra em regressão, pelo que se aconselha manter um casal até ao 3º ano de idade (Fronte, 2010).

Em 2010, Mourão et al. confirmaram, no norte de Portugal, o referido anteriormente (53 ovos por fêmea com 2 anos) e ainda que após o segundo ano de idade, para além de reduzirem a produção (46,6 ovos), começam a pôr ovos mais pequenos e leves (<17,6g), com consequente redução da taxa de eclosão.

Os parâmetros zootécnicos mais importantes a ter em conta na produção de ovos são a taxa de eclosão (rácio entre o total de ovos e os eclodidos), taxa de fertilidade (rácio entre o total de ovos postos e os embrionados) e a quantidade de ovos por fêmea.

Estes dados poderão variar muito em função dos parâmetros anteriormente referidos (principalmente idade) mas de um modo geral, pode ter-se em conta que a fertilidade rondará os 80% e a taxa de eclosão os 75% (González-Redondo, 2006; Fronte et al., 2010; Mourão et al., 2010).

Em relação aos ovos, podem classificar-se através de parâmetros morfológicos ou peso. Assim, no que toca à morfologia, é possível encontrar ovos com manchas grandes, manchas pequenas, manchas grandes e pequenas e descolorados. Em relação ao peso, é possível diferenciar 4 tipos de peso: 12-16g, 16-18g, 18-22g e maiores que 22g. Os ovos com maior possibilidade de incubar são os maiores, pigmentados e brilhantes (Pérez, 1981b).

2.2.1.3 Maneio do ovo

O maneo do ovo fértil desde a postura à eclosão desempenha um papel chave. Tanto as condições ambientais de conservação como de incubação (temperatura, humidade relativa, concentração em CO₂, posicionamento, entre outros) influenciam a viabilidade do embrião, ritmo de desenvolvimento, taxa de eclosão e vigor dos perdigotos, podendo dar ênfase aos seguintes passos:

2.2.1.3.1 Recolha e seleção

Nas 3 horas seguintes após a postura a câmara de ar forma-se, uma vez que o ovo se esfria e seca, provocando uma contração do conteúdo, permitindo a entrada de ar pelos poros da casca. Esta etapa é de grande importância, uma vez que se o ovo estiver com a superfície contaminada poderá permitir a entrada de microrganismos e consequente infeção. Por este motivo, recomenda-se fazer a recolha dos ovos no mínimo 2 vezes por

dia, para que se proceda a uma rápida seleção dos ovos, limpeza e fumigação (Cancho, 1991; Separas, 1992).

A recolha dos ovos deverá ser feita sempre à mesma hora e pela mesma pessoa, de modo a provocar o mínimo *stress* possível nas aves. Os ovos devem ser selecionados em cestos em função da contaminação (Cancho, 1991).

Após a recolha, os ovos devem sofrer triagem, eliminando ovos paridos ou com fissuras, muito sujos, despigmentados e prematuros. Este processo vai evitar incubar ovos infetados e diminuir o incremento de germes, que por vezes resulta em explosões, provocando disseminação de microrganismos pela incubadora (Cancho, 1991; Separas, 1992).

2.2.1.3.2 Fumigação

A fumigação é um processo que decorre a seguir à recolha e seleção, cujo objetivo é diminuir a carga microbiana. Desta forma, deve ser efetuado antes da formação da câmara de ar, para diminuir a passagem de microrganismos através dos poros (Cancho, 1991). Este processo é efetuado numa câmara específica, onde os ovos se dispõem sobre bandejas (Saperas, 1992).

2.2.1.3.3 Conservação

Esta etapa é de grande importância uma vez que os produtores de perdizes necessitam de armazenar os ovos até que reúnam um número considerável para encher uma câmara incubadora. Para esta etapa é necessário controlar essencialmente 3 fatores: temperatura, humidade e tempo (Cancho, 1991)

O armazenamento de ovos férteis deve ser acompanhado de uma regulação adequada da temperatura e humidade relativa na câmara, para que haja desenvolvimento embrionário e evitar a desidratação, respetivamente. Assim, deve-se ter sempre em conta que o mau manuseio ao nível do armazenamento poderá levar a perdas embrionárias (García Martín & Dalmau, 2003)

No que concerne a valores, na maior parte das explorações, rondam os 10-15 dias (Pérez, 1981b). No entanto, González-redondo (2010) demonstrou que é possível conservar ovos férteis de perdiz-vermelha até 28 dias a 15°C e 80% de humidade relativa, sem perda de taxa de eclosão. Já outros autores, como Cancho (1991) e García Martín & Dalmau (2003) apontam para um ajuste de valores em função do tempo: 20°C para ovos armazenados até 3 dias, 13-16°C para ovos armazenados até cerca de 7 dias e 11-12°C

para ovos armazenados acima de 7 dias. Em relação à humidade relativa, estes autores apontam para valores na casa dos 65, 70 e 85% respetivamente.

2.2.1.4 Incubação

Antes de introduzir os ovos na incubadora, procede-se ao pré-aquecimento dos mesmos, deixando-os à temperatura ambiente na sala de incubação (20-25°C) durante 8-12h. Este procedimento vai evitar a condensação de gotas de água na superfície do ovo, que se produz ao introduzir ovos frios (12-15°C) dentro da incubadora (37,8°C) (Saperas, 1992).

Como referido anteriormente, a duração da incubação nesta espécie varia entre 23 e 24 dias (González-redondo et al., 2012; Llauradó, 1987; Cancho, 1991), ainda que se possam observar nascimentos desde o dia 21,5 até ao dia 26 (González-redondo et al., 2012). As diferenças nestes valores poderão estar relacionadas com os reprodutores, exploração origem, maneiço do ovo e incubação.

A maior parte dos autores defende que os ovos devem ser mantidos na incubadora até aos dias 20-21 (Pérez, 1981b; González-redondo et al., 2012; Llauradó, 1987; Saperas, 1992; Cancho, 1991), antes de serem colocados na eclosora, no entanto Gómez-de-Travededo (2014) no sul de Espanha demonstrou que mantê-los até ao dia 22 à temperatura de 37,8°C poderá ser benéfico resultando em incubações mais curtas e síncronas.

Neste local a temperatura deverá ser de 37,8°C e a humidade relativa de 50-60% (Saperas, 1992, Cancho, 1991, Pérez, 1981b), com constante ventilação para que haja renovação do ar e um sistema de viragem dos ovos (45° a cada 30-120 minutos, no mínimo até ao dia 20) (Muñoz, 2013; González-Redondo & De la Rosa Sánchez, 2009). Este último, permite mimetizar a rotação periódica que a fêmea exerce nos ovos, favorecendo a mobilidade das estruturas internas e, assim, evitar que o embrião adote posturas incorretas que poderão provocar aderências e deformações (New, 1957).

As incubadoras mais usadas e modernas fornecem oxigénio, temperatura e humidade relativa de forma controlada e automática (Pérez, 1981b; Muñoz, 2013).

Após esta etapa, os ovos deverão ser transferidos para uma câmara específica, denominada “eclosora” ou “câmara de nascimento”, uma vez que irá finalizar o processo de incubação, onde poderão ficar até 4 dias. Para potenciar a eclosão este ambiente irá ser diferente da incubadora em vários aspetos, tais como:

- Diminuição da temperatura: 37,2-37,5°C (Saperas, 1992; Llauradó, 1987) para compensar o calor extra provocado pelo aumento do metabolismo do embrião;
- Aumento da humidade relativa (Llauradó, 1987) para facilitar a rotura da casca (Cancho; 1991; Muñoz, 2013).
- Aumento da renovação do ar para secar a pluma e fazer face às necessidades em oxigénio (Cancho, 1991, Muñoz, 2013).
- Parar de voltar os ovos (Muñoz, 2013).

Assim, com cerca de 14g de peso (Gómez-de-Travecedo, 2014), após nascidos e secos, os perdigotos devem ser retirados e transportados para os locais de criação.

2.2.2 Criação e Venda

Nas explorações cinegéticas os métodos de produção assemelham-se em grande parte à avicultura industrial, desta forma é importante referir que o uso do método “tudo-dentro tudo-fora” é imperativo. Assim, o objetivo de uma exploração será obter incubações de grande número, no menor tempo possível e animais homogéneos entre si, para que possam ocupar o maior número de setores de criação de uma só vez (Fernández, 1998).

No entanto, devido à sua pequena dimensão, algumas explorações não conseguem alcançar este objetivo, tendo como consequência principal a existência de lotes com animais de diferentes idades (“multi-idades”) repercutindo-se sempre na qualidade dos animais.

Outro fator, que nunca se pode esquecer neste tipo de produção, é que o objetivo principal dos animais é a libertação na natureza para caça e, por este motivo, são necessários animais com carácter asilvestrado. Este fato irá influenciar todo o processo uma vez que o produtor tem de eliminar ao máximo o contacto entre o humano e os animais dificultando todo o maneio (Fernández, 1998). Deste modo é possível compreender que a componente de bem-estar animal é crucial, devendo ser bem gerida e pensada em todas as ações a tomar (medicações, manutenção, recolha de cadáveres, etc).

No que diz respeito à criação, podemos definir três etapas importantes: primeira idade (dia 0 até à 3ª semana), segunda idade (3ª semana até 7ª) e adultas ou preparação para a venda (Soyez, 1991). Em Portugal a venda é geralmente em adulto, no entanto, em

outros países a venda é feita muitas vezes em idades juvenis (França e Inglaterra p.e). Informações relativas ao preço são escassas, no entanto dados não oficiais apontam para um custo médio de 7,5€ para uma perdiz adulta.

A definição de etapas, tendo em conta as idades, poderá ser mal interpretada, uma vez que na prática apenas interessa saber quando é que é necessário efetuar mudanças no ambiente. As instalações diferem de produtor para produtor, em função da sua necessidade, desde cabanas, antigos pavilhões de avicultura industrial e instalações específicas para espécies cinegéticas. Neste capítulo será explicado o maneiio e criação da perdiz no modelo mais comum em Portugal. Assim, no que concerne às instalações, podemos definir 3 áreas (Borges, 2007):

2.2.2.1 Salas aquecidas

Chão em cimento, medidas variáveis (p. e. 15-20 m²), paredes com bom isolamento e superfícies de fácil limpeza. O aquecimento poderá ser feito através de gás ou eletricidade, consistindo em lâmpadas com uma campânula por cima suspensas a uma altura de 0,7-0,8 m (Borges, 2007). A cama poderá ser de vários tipos de material, sendo as rasas e a palha os mais interessantes (Soyez, 1991). Neste local são colocados os perdigotos de primeiro dia, que devem chegar com a sala já aquecida e água fresca, estes dois objetivos poderão ser inversamente proporcionais uma vez que quando se aquece o ambiente, também se aquece as linhas de água, no entanto através de um “*flushing*” das tubagens alguns minutos antes da chegada dos perdigotos poderá ser o suficiente (Lopez, 2016)

Nas primeiras semanas, dada a baixa emplumação e conseqüente déficit na termorregulação, os perdigotos necessitam de estar confinados num espaço restrito (círculo) que lhes permite estarem mais próximos da fonte de calor, dos bebedouros e dos comedouros. (Borges, 2007; Soyez, 1991; Fernández, 1998), evitando-se amontoamentos por frio, calor ou stress. Este círculo irá abrir-se gradualmente em função do tamanho e comportamento dos animais, até que não seja necessário.

Nesta fase a densidade aconselhada será de 30-50 perdigotos por metro quadrado, com redução gradual de 20 sujeitos por m² até à 6ª semana (Fernandez, 1998; Soyez, 1991; Borges, 2007).

A temperatura ambiente nos locais de cria deverá rondar os 20-25°C (Muñoz, 2013; Borges, 2007), no entanto, debaixo dos focos de calor a temperatura deve ser no

primeiro dia cerca de 35-37°C com redução de 2-3°C por semana até atingir os 17-18°C na sétima semana (Pérez, 1981f). A humidade relativa deverá situar-se entre 60 e 70% (Pérez, 1981f). A termorregulação é também influenciada pela atividade dos animais (correr, raspar, alimentar) que permite um aumento da temperatura corporal (Pérez, 1981f), assim é muito importante que a luminosidade nos primeiros 15-20 dias seja tanto diurna como noturna (Muñoz, 2013), evitando que os animais parem a atividade devido à escuridão, traduzindo-se em amontoamentos. Também será importante referir que a luminosidade deverá ser ténue (Soyez, 1991) e de preferência branca-azulada (Pérez, 1981f) para que não estimule em demasia a atividade dos animais (*stress*) e mimetize a luminosidade da natureza.

2.2.2.2 Pré-Parques

São pequenos parques (20-30m²) contíguos à sala aquecida, que têm como principal função a adaptação dos animais à temperatura ambiente e à passagem ao parque de voo (Borges, 2007). A passagem para esta zona está descrita por alguns autores às 6 semanas, no entanto, dever-se-á ter em conta se a evolução dos animais está a acompanhar as mudanças no ambiente. Assim, é importante perceber quando é que os animais necessitam de mais espaço e se a variação térmica irá ser tolerada.

2.2.2.3 Parques de voo

Constituem o último elemento de mudança no ciclo de produção da perdiz, tendo por características ser uma zona em forma de retângulo com um comprimento de cerca de 100 m por 6m de largura e uma altura que ronda os 2,5m (Borges, 2007). Nesta etapa, as perdizes poderão experienciar o máximo de espaço possível (1-3 m² por ave), para que haja um constante treino do voo e preparação para a libertação (Borges, 2007; Fernandez, 1998). Será importante referir que à medida que os animais crescem, o rácio de pontos de alimentação/animal deverá alterar, com o objetivo final de proporcionar um bebedouro por 100 animais e um comedouro por 75 animais (Muñoz, 2013).

2.3 DOENÇAS INTESTINAIS DA PERDIZ-VERMELHA

2.3.1 Coccidiose

Eimeria spp., conhecida desde o final dos anos 1800 (Railliet & Lucet, 1890; Salmon, 1899), é responsável por uma das doenças mais importantes na avicultura com distribuição Mundial, a coccidiose (Schricke, 1991c).

Infeta várias classes de vertebrados, sendo um grande e complexo grupo de parasitas intracelulares obrigatórios do filo *Apicomplexa*, com especial tropismo para as células epiteliais do intestino das aves. No entanto, é importante referir que *Eimeria* spp. raramente causa doença em animais selvagens, sendo que animais sob *stress* e não saudáveis poderão estar mais predispostos (Yabsley, 2008). Este último argumento revela-se de extrema importância na temática presentemente abordada, uma vez que a perdiz é um animal selvagem, que ao ser criado em cativeiro irá estar imperativamente em condições de *stress*.

Em aves de caça, principalmente na perdiz, a coccidiose é bastante problemática, sendo um dos maiores entraves à produção e venda (Gibbs & McDougald, 2008). Representou nos anos 80 cerca de 20% dos diagnósticos feitos por necrópsia no Reino Unido e França (Schricke, 1991c), podendo atingir mortalidades que rondam os 50% (Bolognesi et al., 2006).

Waldenstedt et al. (2004) estimou que, na avicultura industrial na Suécia, as pedas económicas devido a esta doença atinjam 2,3 biliões de euros, sendo que 70% deste custo estava associado à forma subclínica da doença a qual se reflete na diminuição do ganho médio diário e aumento do índice de conversão. Este custo em perdizes não está bem definido, no entanto Keifer & Reines (1983) relataram, nos EUA, que a perda anual por coccidiose em perdizes chucar, sem tratamento, era aproximadamente 2,5 milhões de dólares.

2.3.1.1 Etiologia

É um protozoário unicelular do género *Eimeria*, da família *Eimeriidae*, ordem Eucoccidiorida e filo *Apicomplexa*, sendo a coccidia mais comum dos galiformes que poderá ser diferenciada das outras através dos seus característicos oocistos que contêm 4 esporocistos, os quais albergam 2 esporozoítos cada (Yabsley, 2008).

Eimeria spp. é um parasita espécie-específico (Chatenet, 2014a; Gibbs, 2008; Yabsley, 2008; McDougald & Fitz-Coy, 2008), embora que hajam algumas exceções, como o exemplo de *Eimeria dispersa* que poderá infetar galinhas, perus, perdiz-chucar e faisões (Doran, 1978; Long & Millard, 1979).

Em perdizes vermelhas conhecem-se três espécies de *Eimeria*: *E. kofoidi*, *E. caucasica* e *E. legionensis*. São morfologicamente próximas e a sua distinção é difícil, não sendo praticada com frequência. Ademais, sabe-se que infeções com uma só espécie são raras em situação de campo, pelo que é muito frequente encontrar associações de espécies (Chatenet, 2014a, Naciri et al., 2014).

2.3.1.2 Ciclo de vida

As coccídeas têm um ciclo de vida direto, completando a fase sexuada e assexuada no interior do mesmo hospedeiro (células epiteliais do intestino), podendo fazer a transmissão de um indivíduo para outro sem que haja um vetor ou hospedeiro intermediário (Yabsley, 2008).

O primeiro passo do ciclo de vida deste parasita é a esporulação, que se dá no exterior após expulsão do oocisto pelas fezes, onde os esporocistos e esporozoítos são formados. Esta fase é condicionada pelo ambiente (temperatura, oxigénio, luz p.e.) e marca a passagem do oocisto a um modo infetante. De seguida, assim que seja ingerido, alterações físicas e químicas no trato gastrointestinal vão permitir que o oocisto roture e liberte os esporocistos, que por sua vez irão libertar os esporozoítos (Yabsley, 2008; McDougald & Fitz-Coy, 2008; Guérin et al, 2011a).

Os esporozoítos penetram nas células epiteliais do intestino e converter-se em trofozoítos, estes reproduzir-se-ão assexuadamente dando origem a merontes, que mais tarde se transformarão em merozoítos que causam a rotura celular e poderão invadir outras células iniciando um ciclo novo. A esta via de reprodução assexuada dá-se o nome de merogonia, a qual pode ser perpetuada por mais que uma geração através dos merozoítos (tipo I ou II), no entanto os mesmos poderão começar uma via de reprodução sexuada, mais conhecida como gametogonia (Yabsley, 2008).

Na gametogonia, os merozoítos dão origem a macrogametocitos (células fêmea) e microgametocitos (células macho), que mais tarde maturam transformando-se em macrogâmetas (célula única) e microgâmetas flagelados (vários), respetivamente. A fertilização dá-se após migração por parte dos microgâmetas até às células onde estão os

macrogametas, invadindo-as (Yabsley, 2008; McDougald & Fitz-Coy, 2008;). Assim que fertilizado, um macrogameta desenvolve uma parede externa, dando origem a um oocisto, que será eliminado nas fezes (Yabsley, 2008; Guérin et al, 2011a).

Vários estudos têm sido levados a cabo de modo a perceber as particularidades desta doença em perdizes, pelo que de um modo geral, para as 3 espécies, o período pré-patente é de 5 dias, no entanto o período patente parece persistir por vários dias (mais que 10) e em alguns casos nunca cessa (Naciri et al.,2011; Naciri et al., 2014). Esta extensão do período patente gera uma alta contaminação ambiental, que poderá explicar a peculiaridade da coccidiose em perdizes.

2.3.1.3 Sinais clínicos

Surgem como sinais clínicos mais comuns a prostração, perda de peso, diarreia, olhos meio-fechados e eventualmente mortalidade (Chatenet, 2014a; Naciri et al, 2014). A diarreia poderá tomar diferentes aspetos e cores, podendo ser mucoide, líquida, esverdeada e amarelada. A existência de sangue e pseudomembranas também pode ser observada em alguns casos (Naciri et al., 2014)

No que concerne à mortalidade, Naciri et al. (2014) demonstrou que as percentagens mais elevadas correspondem a infeções múltiplas, sendo que as triplas revelaram extrema importância (28%) face às duplas (4% e 11%). Neste mesmo estudo foi possível concluir que infeções únicas poderão demonstrar patogenicidade, em especial por *E. legionensis*, sem causar mortalidade significativa. No entanto, o mais frequente em campo serão infeções múltiplas que pioram os sinais clínicos sem que haja um aumento das lesões e excreção de oocistos.

2.3.1.4 Patogenia

De acordo com os dados reportados pelos artigos acima citados, consegue-se perceber que, tal como em outras espécies (galinhas e perus p.e.), as lesões e alterações no intestino diferem de espécie para espécie deste parasita. Assim, foi bem entendido que *E. kofoidi* e *E. caucasica* atingem o intestino delgado, gradualmente, desde o duodeno até ao íleo, enquanto que *E. legionensis* invade o ceco. O efeito de *E. caucasica* na performance dos animais parece ser mais curto e precoce, no entanto, mais forte que *E.*

kofoidi. Será também importante salientar que parece haver um efeito sinérgico em infeções provocadas pelas duas espécies, aumentando os efeitos adversos. (Naciri et al., 2014).

Noutro estudo levado a cabo por Naciri et al. (2011) observaram-se e registaram-se lesões e alterações ao nível do intestino provocadas por cada um dos 3 parasitas em separado. Foi interessante perceber que as lesões por *E. kofoidi* parecem ser reminiscentes de *E. acervulina* nas galinhas (focos necróticos esbranquiçados que podem ser observados na superfície da mucosa ou através da serosa), enquanto que lesões provocadas por *E. caucasica* dão uma tonalidade rosada/avermelhada à superfície da serosa onde poderão ser observadas petéquias e falsas membranas. Já ao nível do ceco, para o qual *E. legionensis* tem tropismo, foram observados nódulos caseosos de vários tamanhos, parede intestinal espessada e edematosa e uma típica inflamação catarral.

Não se percebe bem porque é que diferentes espécies têm tropismo para diferentes locais, no entanto pensa-se que certas moléculas na superfície das células epiteliais agem como recetores ou zona de reconhecimento para invasão por parte dos esporozoítos (Vervelde et al., 1993). O posterior desenvolvimento dos esquizontes leva à rotura e morte da célula, traduzindo-se em lesões típicas, como por exemplo as de *E. kofoidi* (Chatenet, 2014a).

2.3.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico de coccidiose está dependente da deteção e identificação de oocistos em amostras de fezes e transversalmente pela existência de sinais clínicos e lesões observadas na necrópsia. As amostras poderão ser recolhidas de animais vivos (fezes na cama) ou durante a necrópsia (Yabsley, 2008).

Um dos métodos mais básicos e simples é o *score* de lesões, tendo em conta que algumas espécies produzem lesões típicas em lugares específicos, como anteriormente descrito, onde se considera que a severidade destas é proporcional à quantidade de oocistos (McDougald & Fitz-Coy, 2008). Um dos métodos mais utilizados em avicultura industrial é o de Johnson e Reid (1970).

Dos métodos coprológicos, principalmente em aves cinegéticas, pode salientar-se o *scoring* microscópico, que consiste na simples observação ao microscópio das amostras fecais entre a lâmina e a lamela, pelo que neste método, será importante analisar 3/4 partes do intestino em separado (duodeno, jejuno/íleo e ceco) (Shcricke, 1991; McDougald &

Fitz-Coy, 2008). Outro método, bastante utilizado em avicultura industrial é a contagem de oocistos por grama de fezes (OPG) através da câmara de *MacMaster*, onde se poderão utilizar amostras recolhidas da cama dos animais. Este método parece não ter uma boa relação com o impacto do parasita na performance do bando e requer muita experiência na diferenciação dos oocistos (De Gussem, 2007).

Outros métodos que, embora não adaptados a espécies cinegéticas, estão disponíveis na avicultura, são por exemplo os bioquímicos e moleculares, onde se encontram as técnicas de *Polimerase Chain Reaction* (PCR), análise *Southern Blot* e diversos tipos de eletroforese (Morris & Gasser, 2006) e os tecnológicos, como é o caso do *Coccimorph*, baseado num programa inovador que através de vários algoritmos identifica espécies de *Eimeria* spp. por foto (Gruber et al., 2007).

Especificamente em perdizes, os métodos de diagnóstico não estão avançados, pelo que o mais frequente em laboratório é o *scoring* microscópico (observação semi-quantitativa de oocistos) de cada segmento intestinal, que irá apenas dar uma apreciação da carga parasitária (McDougald & Fitz-Coy, 2008). Isto, em junção com a observação detalhada das lesões anteriormente referidas, permite uma boa aproximação ao diagnóstico. Como anteriormente referido, as infeções em situação de campo são na maior parte das vezes múltiplas, pelo que não há um grande interesse prático em fazer uma detalha distinção das espécies.

No entanto, a observação do tamanho dos oocistos, cor, forma, espessura da parede e os seus constituintes (micrópilo, granulo polar e *residuum*) poderão ajudar na identificação, uma vez que apresentam bastantes diferenças entre si (Naciri et al., 2011).

2.3.1.6 Tratamento e controlo

Para o controlo da coccidiose estão disponíveis poucas opções: os produtos terapêuticos (uso em casos agudos), coccidicidas ou coccidiostáticos (quimioprevenção), vacinas e produtos alternativos.

Dentro das medidas mais corretas, encontra-se a vacina que, ao contrário dos frangos, não está disponível para aves cinegéticas, e os produtos alternativos, como extratos de plantas ou acidificantes, que parecem ter uma resposta apreciável, mas não muito forte (Chatenet, 2014a). Oviedo-Róndon et al. (2006), com recurso a análises

genéticas da microflora intestinal demonstrou que a suplementação de óleos essenciais poderá modular a microflora evitando alterações abruptas após infecção por coccídias.

Os produtos terapêuticos são, como anteriormente referido, para uso em casos de coccidiose clínica e as moléculas disponíveis são apenas 3: toltrazuril, amprolium e sulfonamidas. O comportamento particular das aves cinegéticas e a sensibilidade destes animais à coccidiose, obrigam frequentemente o veterinário a modificar os protocolos de tratamento, principalmente em relação à dose e duração, ao contrário do verificado nas outras espécies (Chatenet, 2014a).

No que concerne à quimioprofilaxia, existem disponíveis na avicultura alguns produtos, que são frequentemente chamados de coccidiostáticos, no entanto o termo mais correto a usar é coccidicidas ou ACP's (do inglês: "*anticoccidial products*") uma vez que a maior parte destes produtos são coccidicidas e não apenas coccidiostáticos. Podem então distinguir-se 2 famílias: antibióticos ionóforos e os fármacos sinteticamente produzidos, também chamados de químicos (De Gussem, 2007).

Dentro dos antibióticos ionóforos encontram-se 3 classes, com a denominação de: monovalentes (monensina p.e.), monovalentes glicosídeos (senduramicina p.e.) e divalentes (lasalocida de sódio p.e.). Na gama dos produtos químicos, sendo apenas uma família, podemos salientar moléculas como a nicarbazina e o decoquinato de sódio.

O facto de as moléculas existentes serem escassas, leva cada vez mais a um aumento de resistências, e é neste ponto que surgem as grandes diferenças entre os antibióticos ionóforos e os químicos. A maior parte dos químicos foram retirados do mercado devido à rápida seleção de parasitas resistentes, enquanto que os antibióticos ionóforos parecem apresentar um risco menor, ou mais lento, de criar resistência completa (De Gussem, 2007; Gerhold et al., 2016). No entanto, a resistência cruzada ou capacidade de criar resistência a um produto através de outro, já foi bem descrita (Chapman, 2007), pelo que muitos autores creem que o desenvolvimento de resistências entre produtos de classes diferentes torna-se menos evidente (Marien et al., 2007).

Em aves cinegéticas, principalmente na Europa, o problema torna-se mais grave uma vez que só se pode utilizar um produto preventivo para incorporação no alimento, o Lasalocida de sódio (Chatenet, 2014a; Naciri et al., 2014). Eventualmente, o decoquinato de sódio também poderá ser usado, com um estatuto intermediário (Chatenet, 2014a).

2.3.1.7 Relação entre a microbiota intestinal e a coccidiose

Após os antibióticos promotores de crescimento serem banidos do sistema de produção Europeu, uma grande incidência de distúrbios intestinais foi observada na avicultura industrial, com associação ao elevado crescimento bacteriano (Van immerseel et al., 2004). Mais tarde estes distúrbios intestinais acabaram por adquirir várias designações, como: disbacteriose, enterite bacteriana, clostridiose, sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado, entre outros.

Maarten de Gussem (2007) contextualizou essas lesões e alterações frequentemente observadas em frangos: intestino delgado frágil, paredes finas e por vezes translúcidas, *balloning*, hiperémia dos vasos sanguíneos (mesentéricos e da camada serosa), flacidez ao corte e falta de tónus, conteúdo aquoso ou espumoso, partículas de alimento mal digerido no fim do trato gastrointestinal (TGI) e conteúdos multi-colorados em contacto com a mucosa. Da mesma forma, nestes casos, ao nível da exploração é normal observar-se camas húmidas e com aspeto gorduroso, fezes com alimento mal digerido, diminuição do consumo de alimento com um aumento inicial do consumo de água e posterior diminuição.

Nestes animais afetados, isola-se frequentemente *Clostridium perfringens*, em grandes números e muito proximal no TGI, em comparação com animais saudáveis, pelo que a enterite bacteriana é muitas vezes confundida com a enterite necrótica erroneamente (De Gussem, 2007).

C. perfringens é uma espécie bacteriana muito comum e abundante no ceco em condições normais, e assume-se que ela poderá realocar-se em zonas mais proximais no intestino quando as condições o permitem (disponibilidade de nutrientes), não se sabendo ao certo se este microrganismo é a causa, consequência ou apenas indicador de enterite bacteriana (De Gussem, 2007).

No mesmo artigo, em cima citado, De Gussem refere 3 principais fatores predisponentes para enterite bacteriana: fatores alimentares, coccidiose (subclínica) e manejo. Pelo que os danos da coccidiose no funcionamento do TGI são bem conhecidos, sendo provavelmente o fator principal que permite o crescimento de *C. perfringens*.

A relação entre populações bacterianas e a coccidiose em frangos tem sido estudada desde muito cedo (1937), principalmente na coccidiose cecal provocada pela *Eimeria tenella*. Já se pensava que havia processos bacterianos que podiam influenciar negativamente a síndrome, principalmente o aumento dos coliformes fecais (Johansson

& Sarles, 1948, Visco & Burns, 1972) e a presença de algumas bactérias como, *Streptococcus faecalis*, *Echerichia coli*, *Bacterioides* e *Clostridium perfringens* (Bradley & Radhakrishnan, 1972). Kimura (1975) revelou que, durante o processo de coccidiose cecal, parece haver um decréscimo nas populações bacterianas ácido-lácticas (*Lactobacillus* e *bifidobacteria*) enquanto que se observa um aumento das enterobactérias e clostrídios, pelo que parece haver um antagonismo entre populações benéficas (ácido-lácticas, que ajudam na digestão e inibição do grupo coliforme) e bactérias potencialmente patogénicas (coliformes, uma vez que podem atravessar a mucosa e entrar na circulação sistémica) (Tortuero, 1973; Turk & Littlejohn, 1986).

Mais recentemente, Martynova-Van Kley et al. (2012), através de análises genéticas concluíram que o efeito da infeção ao nível cecal se refletiu no predomínio de espécies do género *Escherichia/Shigella* e *Bacterioides*, relatando que infeção não afeta a riqueza da microbiota cecal, mas sim a sua composição.

Em aves cinegéticas a informação é escassa, no entanto, Chatenet (2014a) afirma que em certas situações as lesões criadas pelas coccídias favorecem o desenvolvimento de floras oportunistas que potenciam as diarreias, principalmente os clostrídios, obrigando, por vezes, a associação de um antibiótico.

2.3.2 Enterites provocadas por protozoários da família *Trichomonadidae*

2.3.2.1 Etiologia e ciclo de vida

Com importância em perdizes, nesta família deve salientar-se o género *Tetratrichomonas* spp. e essencialmente a sua espécie *Tetratrichomonas gallinarum* (Chatenet, 2014b; Amin et al. 2014) que prolifera no ceco, estando bem descrita em avicultura, no entanto sabe-se que outros géneros como *Pentatrichomonas* spp., *Tritrichomonas* spp. e *Trichomitus* spp. podem também habitar o ceco e estar presentes em diarreias líquidas (Bowman, 2010).

Os parasitas desta família apresentam-se essencialmente no estado de trofozoitos que são unicelulares, microaerófilos, apresentam 5-6 flagelos, uma membrana ondulante e possuem hidrogenossomas (organelo que produz energia) ao invés de mitocôndrias (Amin, 2014; Cepicka et al, 2010; Muller, 1993). No caso específico do *T. gallinarum*, possui um formato piriforme, 4 flagelos livres e 1 recorrente e uma membrana ondulante que acompanha todo o comprimento do corpo (Amin, 2014; Clark et al., 2003).

O ciclo de vida é monóxeno, onde a transmissão se dá principalmente de forma direta (animal a animal) ou indireta através da cama (via oral ou cloacal), alimento contaminado, insetos, molúsculos e fomites (Chatenet, 2014b; Amin, 2013; Schricke, 1991c). Será de referenciar que na forma de trofozoito este parasita não resiste muito tempo no ambiente exterior, pelo que a formação de pseudoquistos é possível, podendo proteger o parasita durante a transmissão fecal-oral (Friedhoff et al., 1991; Mehlhorn et al., 2009). Guérin et al. (2011b) descreveram a forma secundária do protozoário, que caracteriza como redonda, de cor cinza fusco, movimento ameboide e resistente em meio húmido.

O período pré-patente, poderá ser tão curto quanto dois dias, tal como observado por Amin (2011) ao infetar experimentalmente frangos e perus.

Até ao momento assume-se que o parasita se reproduz de forma assexual, onde tem lugar a fissão binária, sendo uma simples divisão da célula-mãe, dando origem a duas células-filhas (Clipsham, 1995), o que em teoria, vai permitir um parasita ficar no mesmo animal tempo ilimitado (Schricke, 1991c).

2.3.2.2 Sinais clínicos e patogenia

Em relação à sintomatologia, pode referir-se que geralmente estes animais apresentam-se emaciados, com diarreia amarela tipo “mousse” ou líquida, com odor intenso e a cama encontra-se muitas vezes húmida (Chatenet, 2014b; Schricke, 1991c). No geral, os lotes parecem encontrar-se heterogéneos, instáveis do ponto de vista digestivo e as recidivas são muito frequentes (Chatenet, 2014b).

Durante a necrópsia estes animais apresentam geralmente os cecos afetados, distendidos, com conteúdo líquido abundante de coloração amarelada, por vezes gasoso e presença de nódulos caseosos (Chatenet, 2014b; Shricke, 1991; Errington, 2017). Se a carga parasitária for grande, o íleo e o jejuno poderão estar afetados. Foi demonstrado por Liebhart et al. (2014) que o quadro lesional em infeções por *Tetratrichomonas gallinarum* poderá ir para além da tiflite, sendo possível observar também hepatite, resultando numa tifohepatite muito semelhante à provocada por *Histomonas meleagridis* nos perus.

Após períodos de diarreia e subsequente desidratação, os rins aparecem muitas vezes hipertrofiados, com deposição de uratos essencialmente nos ureteres (Chatenet, 2014b).

Ao nível microscópico, Lee (1972) observou, após a infecção experimental por *T. gallinarum* em broilers, a perda significativa dos microvilos, redução do glicocálix e perda completa da matriz de polissacáridos. Mesmo assim, o papel que desempenham estes protozoários no ceco e principalmente os mecanismos que os fazem ser virulentos são pouco conhecidos, no entanto, sabe-se que existe um grande polimorfismo molecular dentro da espécie *Tetratrichomonas gallinarum* (5 grupos e 11 subgrupos), fazendo Cepicka et al. (2005) especular que diferentes subespécies poderão ter diferentes manifestações patológicas.

Outro facto interessante, referido por Chatenet (2014b) em aves cinegéticas e Amin (2013) é a existência de portadores sãos, contribuindo para a disseminação do parasita, o que poderá explicar a sua persistência e as consecutivas recidivas.

2.3.2.3 Diagnóstico

Identificar a etiologia tem como base tradicional a observação da sintomatologia e das lesões na necrópsia, bem como deteção do parasita móvel ao microscópio (Schricke, 1991c; Chatenet, 2014b; Amin, 2013). Isto porque nem todas as diarreias amarelas líquidas têm como etiologia parasitas da família *Trichomonadidae* e por vezes os nódulos caseosos brancos relembram infecções por *E. legionensis* (Chatenet, 2014a).

Para o exame ao microscópio, tal como na coccidiose, observam-se amostras entre a lâmina e a lamela retiradas diretamente de cada segmento intestinal. Neste momento é importante que se execute a técnica rapidamente e em animais recentemente eutanasiados uma vez que o parasita resiste pouco tempo à temperatura ambiente (Schricke, 1991c). A adição de soro fisiológico quente à amostra ou a platina de microscópio aquecida poderão ser vantajosos (Schricke, 1991c).

A identificação depende imperativamente da observação da mobilidade individual do parasita, em *zig-zag*, e principalmente da membrana ondulante que tem um movimento muito típico que acompanha a face lateral (Chatenet, 2014b; Schricke, 1991c; Amin, 2013). Algumas colorações (*Giemsa* p.e) poderão ser usadas de modo a observar o axostilo no interior do parasita.

O método descrito é sem dúvida o mais popular, permitindo que se alcance um diagnóstico rápido com precisão, no entanto existem outros métodos, como a cultura *in-vitro*, PCR, hibridização *in situ* (ISH) e técnicas baseadas em anticorpos (Amin, 2013), que se revelam interessantes ao nível da investigação.

2.3.3 Enterites provocadas por *Spironucleus meleagridis*

Conhecido nos Estados Unidos da América (EUA) como etiologia da enterite infecciosa catarral dos perus que causou um impacto muito grande aquando do início da sua produção nos EUA entre 1942 e 1951, fazendo a USDA estimar um custo anual devido à doença de \$667,000 (McDougald, 2008). Nos dias de hoje o parasita não revela grande importância em perus, pelo que a sua persistência pode ser também observada em outras espécies como perdizes, codornizes e faisões (McDougald, 2008).

O seu nome genérico é *Hexamita meleagridis* (McDougald, 2008), pertencente à ordem Diplomadida e à família *Hexamitidae* (Wood & Smith, 2004), tendo sido reconhecido como pertencente ao género *Spironucleus* (Kulda & Nohynkova, 1978), pelo que a maior parte dos autores se referem a este parasita como *Spironucleus meleagridis*. No que concerne à doença provocada pelo mesmo, é possível observar diferentes denominações como “*Hexamitosis*”, “*Hexamitiasis*” e “*Spironucleosis*” (Lloyd & Gibson, 2006; Wood & Smith, 2004; McDougald, 2008).

2.3.3.1 Etiologia e ciclo de vida

Este parasita é conhecido e reconhecido no estado típico de trofozoito, que tem como características específicas a existência de 8 flagelos (4 anteriores, 2 antero-laterais e 2 posteriores), o rápido movimento em linha reta e o facto de ser pequeno comparando com a família *Trichomonadidae*, proliferando essencialmente no intestino delgado (Schricke, 1991d; Chatenet, 2014b; McDougald, 2008).

O ciclo de vida deste parasita é bastante complexo, gerando controvérsia entre quem o estuda, no entanto assume-se que o seu ciclo de vida alterne entre a forma de trofozoito (com motilidade) e quisto (sem motilidade) (Kulda & Nohynkova, 1978; Wood & Smith, 2004). Autores como Slavin & Wilson (1953; 1955; 1960) dedicaram-se ao seu estudo, propondo um modelo de ciclo de vida bastante diferente de outros parasitas e refutando teorias anteriormente publicadas, como é o exemplo da reprodução por fissão binária, que não foi observada em nenhum dos seus ensaios, propondo um modelo não usual de divisão celular e ainda uma via através da esquizogonia (libertação de merozoitos e formação de esquizontes). Embora bastante robusto, este trabalho (Slavin & Wilson, 1960) foi amplamente criticado (Kulda & Nohynkova, 1978).

Um facto interessante, confirmado por Wood & Smith (2004), é a presença em grande quantidade de trofozoitos no fluido intestinal enquanto que os quistos (forma resistente) ocorrem quase exclusivamente no muco, possível de observar no interior do intestino e nas fezes. Este muco, descrito como coágulo, desempenha um papel muito importante na transmissão, proteção e disseminação desta forma resistente do parasita (Wood & Smith, 2004). O facto de os quistos se encontrarem aglomerados e concentrados no muco confere-lhes proteção (Slavin & Wilson, 1960), a consistência viscosa permite que se adira a superfícies (paredes, bebedouros e comedouros p.e) perpetuando a sua existência (Wilson & Slavin, 1955) e ainda que permaneça coeso na água (Wood & Smith, 2004). Outra conclusão, retirada por Wood & Smith, foi que o facto de os quistos estar concentrados e aglomerados permite a ingestão de uma grande quantidade de parasitas, contribuindo para o sucesso da transmissão, influenciando a virulência da doença.

Os quistos geralmente são multinucleados sendo possível observar 2, 3 ou 4 núcleos, e esta forma parasitária enquistada apenas dá origem a um trofozoito (Wood & Smith, 2004; Wilson & Slavin, 1955). A existência de quistos está confirmada, no entanto, o modo de transmissão (quisto ou forma adulta) e o modo como o parasita altera a sua forma ao longo do ciclo permanecem difíceis de explicar (GWCT, 2004)

2.3.3.2 Sinais clínicos e patogenia

Nos lotes afetados com este parasita é usual observar uma diarreia aquosa em animais prostrados, heterogéneos, com asas pendentes, pouco ativos, cloaca húmida, penas eriçadas e emaciados (Schricke, 1991d; Chatenet, 2014b), pelo que o peito fica sem músculo evidenciando-se a quilha (“*knife-bone breast*”) (Lloid et al., 2005).

Chatenet (2014b) referenciou que este parasita não se revela muito problemático, tendo em conta que precede muitas vezes a uma diarreia difícil de tratar, por parasitas da família *Trichomonadidae*, resultando algumas vezes numa infeção concomitante dos dois.

Na necrópsia, é possível observar inflamação, congestão do intestino delgado e conteúdo líquido (duodeno e jejuno/íleo) (Schricke, 1991d), bem como a aparecia bulbosa (Lloid et al., 2005). Para além disso, certos autores referenciam a observação de uma enterite catarral.

Estudando a absorção de fluidos em aves cinegéticas, Lloid et al. (2005) puderam constatar que a absorção por parte de animais extremamente infetados por *Spiroucleus meleagridis* é reduzida para metade, deduzindo que o parasita interfere com os processos normais de absorção (consumindo a glucose p.e), resultando em diarreias aquosas. Os danos intestinais provocados pelo parasita ainda não estão bem estudados, no entanto, Cooper et al. (2004), reportando um caso de massiva mortalidade em perdizes pelo agente, observaram a fusão de villus e edema no estroma, bem como a presença dos trofozoitos profundamente nas criptas intestinais, ancorados entre células epiteliais e até mesmo no interior de células do epitélio.

2.3.3.3 Diagnóstico

O diagnóstico desta espécie de parasita segue a mesma metodologia que para os parasitas da família *Trichomonadidae*, pelo que a correlação entre a sintomatologia, quadro lesional e deteção do parasita móvel ao microscópio devem ser imperativos. Assim, o objetivo principal será distinguir este parasita de outros, principalmente da família anteriormente referida, onde devemos salientar o especial tropismo para o intestino delgado (duodeno e jejuno/íleo) e as características morfológicas (tamanho pequeno e movimento frenético retilíneo) (Schricke, 1991d; Chatenet, 2014b).

Para isto, a utilização de amostras retiradas rapidamente do interior do intestino (conteúdo ou mucosa) será o suficiente (Schricke, 1991d; Chatenet, 2014b), no entanto, esfregaços do conteúdo intestinal corados (Giemsa ou Hematoxilina de ferro p.e) também se revelaram úteis, não na deteção de mobilidade, mas sim de trofozoitos típicos ou quistos (Wood & Smith, 2004). Corados e observados ao microscópio, os trofozoitos demonstram facilmente os seus 8 flagelos, os canais citofaríngeos que se cruzam e o complexo nuclear (núcleo) na zona anterior em forma de ferradura de cavalo (“*horseshoe-shaped*”) (Wood & Smith, 2004). Os quistos apresentam como característica especial a aparência redonda delimitada por uma parede não corada, onde se consegue por vezes ver núcleos e outros organelos (Wooth & Smith, 2004).

2.3.4 Controlo de enterites provocadas por protozoários flagelados

Para o controlo e prevenção destas diarreias, vários autores consideram que a abordagem deve ser a mesma para ambos os parasitas (*Spirotrichomonas meleagridis* e família *Trichomonadidae*), sendo indispensável um correto reconhecimento dos fatores de risco, pelo que se deve ter em conta que a sua incidência é maior em bandos jovens, alturas quentes (Verão) e ambientes húmidos (Chatenet, 2014b; Errington, 2017; Schricke, 1991d). Chatenet (2014b) referiu o “*stress no sentido amplo*” como maior fator de risco, colocando em evidência os golpes de calor, chuva, qualidade da água e fatores associados à cama (piolhos p.e) que impedem as aves de se refugiar do frio no interior das instalações.

Assim sendo, este autor mencionou como imperativo diminuir ao máximo os fatores referidos, e ainda que uma estrita e correta higiene geral e qualidade da água (utilização de peróxido e ácidos orgânicos p.e) serão fulcrais. A utilização de óleos essenciais a título preventivo, parece ter algum sucesso, bem como do lasalocid como será abordado no próximo capítulo.

É importante referir a utilização de antibióticos de largo espectro a título preventivo como uma má prática que tem sido feita ao longo de muitos anos, levando a uma grande perda de eficácia dos mesmos (Chatenet, 2014b).

Em casos agudos, onde a utilização de uma terapêutica agressiva é necessária, os produtos eficazes e utilizados no passado estão hoje fora do mercado, sendo especialmente a família dos nitromidazóis (dimetridazol e ronidazol p.e.) (Schricke, 1991d; Chatenet, 2014b; Errington, 2017) que apresentam um possível efeito carcinogénico para o consumidor (EEC Council Regulation, 1995).

Por este motivo, o combate aos protozoários flagelados tem sido muito problemático, não só em aves cinegéticas, mas também em perus face à histomonose.

Assim, apenas restam à disposição as associações de antibióticos, como por exemplo macrólidos (lincomicina p.e), pleuromotilinas (tiamulina p.e.) e tetraciclina (oxitetraciclina p.e.) associados a antibióticos de espectro Gram negativo (Chatenet, 2014b). Antes de banirem os nitromidazóis do sistema de produção europeu, os antibióticos apenas se utilizavam em casos graves e em associação com os anteriormente referidos (dimetridazol + neomicina p.e) (Schricke, 1991d), podendo-se deduzir que o afastamento de certas moléculas do sistema de produção nem sempre poderá ser benéfico, levando neste caso a um excesso de uso indiscriminado de antibióticos contra um agente para o qual não é sensível. A ação apenas parece ser indireta uma vez que o parasita

apresenta dependência de certas populações bacterianas, o que será explicado posteriormente.

Outras soluções que têm aparecido no mercado com resultados interessantes são os produtos à base de óleos essenciais e extratos de plantas (Chatenet, 2014b), onde ganham relevância plantas como *Cinnamomum aromaticum* (canela), *Citrus limon* (limão) e *Allium sativum* (alho) (Anthony et al., 2005; Zenner et al, 2003).

Para além da utilização de produtos, evitar a formação de zonas húmidas principalmente na zona de alimentação e abeberamento (Errington, 2017) e a troca da cama (Chatenet, 2014b) são procedimentos que embora caros e laboriosos são eficazes.

Em específico, nos casos de *Hexamita meleagridis*, onde a diminuição abrupta da absorção de fluidos e perda de eletrólitos é observada, Lloid et al. (2005) provaram que o uso da glucose pode aumentar a absorção intestinal, propondo o desenvolvimento de soluções contendo eletrólitos e glucose no combate à perda de fluidos observada.

2.3.5 Interação entre a microbiota intestinal e protozoários flagelados

Pensa-se que os parasitas desta família se alimentam de bactérias, células ou outros componentes dissolvidos no conteúdo intestinal (Schricke, 1991d), o que poderá explicar o especial tropismo para o ceco, uma vez que ao contrário de outros segmentos, apresenta um constante processo bacteriano a decorrer (McDowell, 1953).

Schricke (1991d), explorando o problema da tricomonose em faisões defendeu que estes parasitas apenas se multiplicam em ambiente favorável tendo em conta que, em meios de cultura ordinários, o seu crescimento apenas tem sucesso na presença de bactérias. Referiu ainda que a adição de um antibiótico nestes meios é o suficiente para inibir o seu desenvolvimento. O autor deduz assim que há imperativamente uma interação entre a microflora intestinal e o parasitismo, e que a composição da mesma será crucial para o desenvolvimento do parasita, sendo que este último poderá influenciar outras populações secundárias de bactérias e parasitas. Por último, salientou que as características do alimento como a proteína e a energia (elevadas) poderão estar associadas ao crescimento do parasita, por levarem a um desequilíbrio intestinal.

Em *Trichomonas vaginalis*, Muller (1990) relatou que o desenvolvimento do parasita depende em grande parte de metabolitos pré-formados como nutrientes, o que poderá explicar a ausência de mecanismos biossintéticos. Ainda que diferente das espécies em questão, esta teoria levanta algumas questões em relação ao começo das

diarreias, fazendo pensar que o desenvolvimento do parasita pode ser secundário a outros processos.

Outro facto que à partida parece intrigante, será o referido por Chatenet (2014b) em relação ao uso do lasalocide (coccidicida), que após bastantes anos de ausência, o seu uso incorporado no alimento traduziu-se não só na diminuição de coccidias mas também de protozoários flagelados. Supondo a referida dependência entre os protozoários e a microbiota intestinal, este facto pode ser explicado, tendo em conta que os antibióticos ionóforos poderão ter uma ação sobre certas populações bacterianas. Esta suposição assenta na atividade preventiva dos antibióticos ionóforos contra a enterite bacteriana, pelo que certos autores referem que poderá haver alguma atividade sobre o crescimento de *C. perfringens* (Elwinger et al., 1998; De Gussem, 2007), para além da atividade direta contra coccidias, já conhecida.

2.4 QUALIDADE DA ÁGUA EM AVICULTURA

A água é um componente biológico que está envolvido em muitas funções vitais, tais como, digestão, absorção, termorregulação, lubrificação de articulações e órgãos, eliminação de metabolitos, composição de fluidos corporais e participação ativa nas reações químicas e enzimáticas (Kirkpatrick & Fleming, 2008; Fairchild & Ritz, 2012). Por vezes, este nutriente não recebe a atenção devida, no entanto a sua influência nos comportamentos alimentares é notória. Sabe-se que um frango de carne pode ingerir entre 1,6 e 2 vezes mais água que comida (Fairchild & Ritz, 2012).

Assim, pela sua importância e pela grande relação entre ingestão de alimento e de bebida, o consumo de água é usado como monitorizador de bandos, sendo um dos melhores indicadores de performance (Fairchild & Ritz, 2012).

Neste âmbito, sabe-se que o consumo de água pode ser influenciado e afetado pela idade, sexo, temperatura ambiente e da água, sistemas utilizados, eletrólitos, alimentação, programa de iluminação e características da água (pH, contaminação, dureza p.e) (Kirkpatrick & Fleming, 2008; Fairchil & Ritz, 2012).

No presente trabalho, irá ser desenvolvido, em particular, o papel da temperatura da água e do Ph.

2.4.1 Temperatura e pH

Como a temperatura ambiental afeta diretamente a temperatura da água, uma breve abordagem sobre a mesma é importante, pelo que é necessário ter em conta que o consumo de água aumenta com o aumento de temperatura ambiente, uma vez que a perda de calor é maioritariamente por evaporação através do sistema respiratório (Fairchild & Ritz, 2012). Ao arfar, as aves perdem água e, deste modo, o consumo desta aumenta para fazer face à perda. Em frangos de carne, estima-se que o consumo aumente cerca de 6-7% por cada grau acima da temperatura ideal (Fairchild & Ritz, 2012; Singleton, 2004).

No que concerne à temperatura da água, muitos autores têm-se dedicado ao seu estudo e interpretação. Fairchild & Ritz (2012) defenderam que a temperatura da água deve permanecer abaixo da temperatura ambiente, no entanto outros autores tentaram definir temperaturas ideais, pelo que parece haver preferência e melhores resultados em temperaturas iguais ou abaixo de 24°C (Harris et al., 1974; Eagleson, 2014) e perda de performances em temperaturas altas como 26°C (ou acima) (Beker & Teeter, 1994; Eagleson, 2014). É fácil perceber que há uma grande perceção da temperatura por parte dos animais, pelo que é imperativo manter a água fresca (abaixo de 24°C). Outro facto que deve ser tido em conta é o desenvolvimento bacteriano, uma vez que as temperaturas frequentemente praticadas em avicultura (20-30°C) favorecem o crescimento populações bacterianas (mesófilas p.e.) (Prescott et al., 2008).

Da mesma forma que a temperatura, o pH tem sido investigado afincadamente, pelo que se sabe que os animais detetam facilmente a sua alteração (Tabler et al., 2013; Watkins et al., 2004), tolerando variações entre os 4 e os 8 (Fairchild & Ritz, 2012). No entanto, a escolha do pH com um compromisso entre palatibilidade, segurança e qualidade microbiológica não está bem definido. Alguns autores defendem que deverá rondar os 6 (Fairchild & Ritz, 2012) e variar entre 6 e 8 (Kirkpatrick & Fleming, 2008) ou 5 e 7 (Tabler et al., 2013). Watkins (2004) observou que há melhorias de performance (índice de conversão e ganho médio diário p.e) quando é consumida água mais ácida (3, 4 e 5) com conseqüente redução de pH ao nível do papo, o que poderá ter explicado a consistência positiva das fezes, relatada pelos produtores, contribuindo para camas menos húmidas.

Este último facto é de extrema importância uma vez que há um grande desenvolvimento bacteriano nesta zona de armazenamento de alimento, que poderá

influenciar toda a digestão (Watkins, 2004) e, assim, ao diminuir ao máximo certas populações bacterianas permite-se indiretamente a qualidade da ingesta.

A cama húmida é das temáticas mais discutidas na produção avícola, sendo que poderá influenciar toda a performance do bando, qualidade da carcaça, lesões podais e aspetos básicos de bem-estar (Jong et al., 2014), estando relacionado com o aumento dos níveis de amónia nas instalações (Liu, 2007).

3. MATERIAL E METODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO E RECOLHA DE DADOS

Este estudo foi conduzido do dia 27 de Fevereiro e o dia 30 de Setembro de 2017, através do acompanhamento de dois lotes de criação de perdizes (*Alectoris rufa*) de duas explorações cinegéticas diferentes, no departamento de Loiret no centro de França. Para este estudo foram recolhidas informações de dois tipos: zootécnicas e laboratoriais.

3.1.1 Exploração A

Nesta exploração foi acompanhado um lote de 2080 perdizes-vermelhas criadas desde o primeiro dia de vida, num sistema convencional de avicultura tipo “pavilhão” (20x30) com um parque de voo adjacente (20x50), tal como descrito na bibliografia.



Figura 1. Exploração A, pavilhão de avicultura convencional (fotografia do autor).

3.1.2 Exploração B

Nesta exploração foi acompanhado um lote de 4400 Perdizes-vermelhas criadas desde o primeiro dia de vida, num sistema recente e peculiar tipo “túnel” (20x30) com um parque de voo adjacente (20x50).



Figura 2. Exploração B. Pavilhão de avicultura tipo “túnel” (fotografias do autor).

3.1.3 Laboratório de análises

As necrópsias e análises laboratoriais foram executadas no laboratório da equipa especializada em avicultura “MCVET Conseil” em Quiers-sur-bezonde (figura 3) no centro de França, onde decorreu o estágio. Este local, para além de laboratório, também funciona como local administrativo e armazém de produtos destinados ao uso avícola.

O laboratório é de pequena dimensão, apresentando serviços de diagnóstico como necrópsia, parasitologia, microbiologia e ensaios de imunoabsorção enzimática (“ELISA”).



Figura 3. Laboratório onde decorreu o presente trabalho. 1 - Local se faz a ocisão das aves, onde se pode encontrar o equipamento utilizado para eletronarcose (1a) e a zona de sangramento (1b); 2 - Mesa de necrópsias e local de armazenamento de material; 3 – Caixa de transporte (3a) e instrumento de medição da temperatura e pH da água (fotografias do autor).

3.2 METODOLOGIA

Desde o primeiro dia de idade até à 10^a semana, conforme explicado nos capítulos anteriores, procedeu-se ao registo e avaliação de informações relativas ao desempenho zootécnico e laboratoriais.

Assim, aquando da chegada ao lote, após cumprimento de todas as normas de biossegurança requeridas (uso de vestuário descartável, botas protetoras, luvas, touca e respeito da zona limpa/suja), foram registadas informações relativas ao comportamento das aves, mortalidade e tratamentos, bem como, medição do pH e temperatura da água de bebida com um dispositivo eletrónico. De seguida, procedeu-se à recolha aleatória de 5 animais.

Os 5 animais recolhidos semanalmente, foram eticamente eutanasiados através da electronarcose, seguida do corte da veia jugular (fig. 3).

Concluída a eutanásia e devidamente identificados, os animais foram analisados através da necrópsia com registo das alterações visíveis, bem como fotografia do peito para posterior avaliação da condição corporal. Uma vez que o presente trabalho se focou no trato intestinal, procedeu-se ao corte do mesmo, individualizando-se os 3 segmentos

intestinais principais (duodeno, jejuno\íleo e cecos) facilitando o registo fotográfico antes e depois da abertura. O registo fotográfico permitiu a análise pormenorizada mais tarde.

Após a abertura de cada segmento, com a ajuda de uma ansa de 10 µl, procedeu-se imediatamente à recolha de 10 µl de conteúdo intestinal para execução de um pool (5 animais) de amostras diluído em 9 ml de peptona salina, para posterior avaliação microbiológica. A técnica foi executada rapidamente (5 min) após a eutanásia de modo a evitar alterações bacterianas *post-mortem*.

Depois de recolhido o conteúdo intestinal para estudo microbiológico, procedeu-se à citologia da mucosa de cada segmento, com o objetivo de incluir material fecal e epitélio, para observação ao microscópio entre a lâmina e a lamela. Este processo permitiu a visualização de parasitas.

Por último, em cada segmento, executaram-se dois esfregaços, para posterior coloração Gram, *May-Grunwald-Giemsa* (Mgg) e *Hemacolor*[®].

3.3 ANÁLISE DO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

Os indicadores usados para medir a performance geral do bando foram a condição corporal dos 5 animais eutanasiados semanalmente, a mortalidade semanal, o recurso a farmacos e ainda a saída dos animais para o parque de voo. Este último parâmetro, embora que relativo, é muito importante uma vez que o objetivo de qualquer produtor é que os animais deixem o ambiente confinado e que vão para o parque de voo o mais rápido possível. Esta altura de passagem é determinada pela qualidade dos animais e robustez para suportar a alteração.

A necessidade de tratamentos também dará informação a cerca da qualidade do bando, pelo que neste trabalho apenas foi registada a terapêutica com recurso a antibióticos (sem especificação) e coccidicidas.

Em relação à condição corporal, foi usada uma escala de classificação de 1, 2 e 3, com correspondência respetiva de caquético, magro e bom (fig. 4). Em cada semana foi executada uma média dos 5 animais.

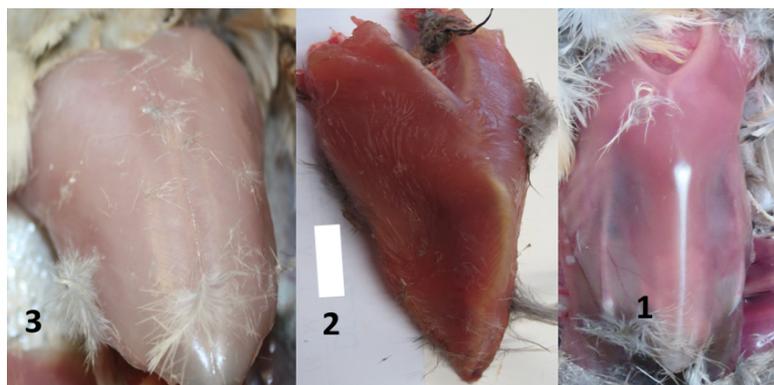


Figura 4. Classificação de condição corporal. 3 – Bom; 2 – Magro; 1- Caquético (fotografias do autor).

3.4 ANÁLISE MACROSCÓPICA DO INTESTINO

Conforme explicado no capítulo anterior, as fotografias foram feitas com o objetivo de serem observadas posteriormente com atenção e tempo. A observação detalhada de cada segmento intestinal permitiu a avaliação, registo de alterações e execução de *scores*.

Foi usada uma tabela de registo tipo “*check-list*” para a avaliação de todos os parâmetros macroscópicos onde podemos encontrar em cada segmento vários parâmetros, por vezes com diversos graus, como podemos observar na tabela 1.

Tabela 1. Classificação de alterações intestinais nos três segmentos intestinais.

Duodeno	inflamação	0	Jejuno íleo	inflamação	0	Ceco	Dilatação	0			
		1			1			1			
		2			2			2			
		3			3			3			
	Muco	0		Muco	0		Líquido	0	Conteúdo	Consistência	Caramelo
		1			1			1			Pastoso
		2			2			2			Caoso
		3			3			3			Creimoso
		4			0			0			Líquido
		0			1			1			Gasoso
		1			2			2			Duro
		2			3			3			Verde
líquido	0	Conteúdo	Sangue	Alimento n dig	Ausência	Conteúdo	Cor	Verde			
	1							1	1	Castanho	
	2							2	2	Bege	
	3							3	3		
Alimento dig	0	Flacidez									
	1										
	0										
	1										
Alimento n dig	0										
	1										

3.5 ANÁLISE PARASITOLÓGICA

As citologias retiradas da superfície da mucosa, contendo matéria fecal e parte do epitélio, observadas ao microscópio entre a lâmina e a lamela, tiveram como objetivo a análise parasitológica. Com esta análise pretendeu-se essencialmente identificar oocistos de *Eimeria* spp. e trofozoítos de protozoários flagelados da família *Trichomonadidae* ou da espécie *Spironucleus meleagridis* (*Hexamita meleagridis*).

O método de contagem utilizado foi a contagem semi-quantitativa, aquando da observação ao microscópio, para execução do “*Scoring microscópico*” (Shcricke, 1991; McDougald & Fitz-Coy, 2008). Este *score* é dado pela apreciação geral da quantidade de oocistos presentes no campo visual (tabela 2). Embora que pouco preciso, é o método de diagnóstico mais utilizado em aves cinegéticas que permite a rápida apreciação geral da quantidade de oocistos, que é posteriormente correlacionada com as lesões e outras informações (mortalidade e comportamento p.e.).

Para os protozoários flagelados foi utilizado o mesmo método de contagem que para os oocistos. No entanto, foi tido em conta que este tipo de parasita perde rapidamente a sua capacidade móvel quando exposto a condições adversas (temperatura fora do intestino p.e.), pelo que a técnica foi feita com a máxima rapidez.

Tabela 2. Scoring microscópico para os parasitas analisados

Coprologia (<i>Eimeria</i> spp, <i>Hexamita</i> spp e <i>Trichomonadidae</i>)		
score	min	max
0	0	0
1	1	5
2	6	15
3	16	30
4	Impossível de contar	

NOTA: Este método foi sugerido pela equipa MCVET Conseil, uma vez que é o utilizado em situação prática.

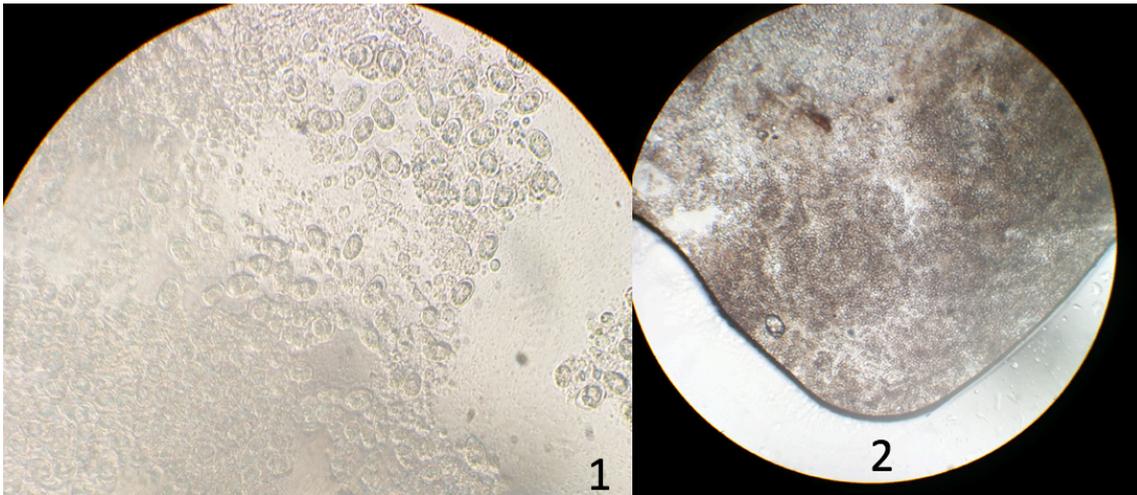


Figura 5. Oocistos de *Eimeria* spp.

3.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Como anteriormente descrito, para cada um dos três segmentos, fez-se um pool com as amostras dos 5 animais. Este pool continha 10 µl de conteúdo intestinal de cada segmento, fazendo 5 µl de conteúdo intestinal diluídos num tubo de ensaio de 9 ml de peptona salina.

Finalizados os 3 pools (3 segmentos intestinais) procedeu-se a um protocolo que tinha como finalidade semear 1 µl de cada pool em 3 tipos de meios:

- ChromID[®] CPS[®] Elite : *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli*.
- CASA[™] agar: *Campylobacter* spp.
- Sabouraud Dextrose Agar: Fungos e leveduras.

A técnica de recolha de conteúdo intestinal pode ser observada na figura 6 e o protocolo usado está esquematizado na figura 7. A diluição foi a mesma para todos os segmentos intestinais e meios de cultura, à exceção do meio de cultura cromogénico para o ceco. O ceco é o local com maior atividade bacteriana onde decorrem processos de fermentação, por este motivo foi necessário diluir o pool inicial duas vezes. O objetivo desta avaliação foi perceber se as disbioses e diferentes enterites são acompanhadas de algum padrão normal de alteração da microflora, entre *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli*, bem como a observação do comportamento de outras populações (*Campylobacter* spp., fungos e leveduras).

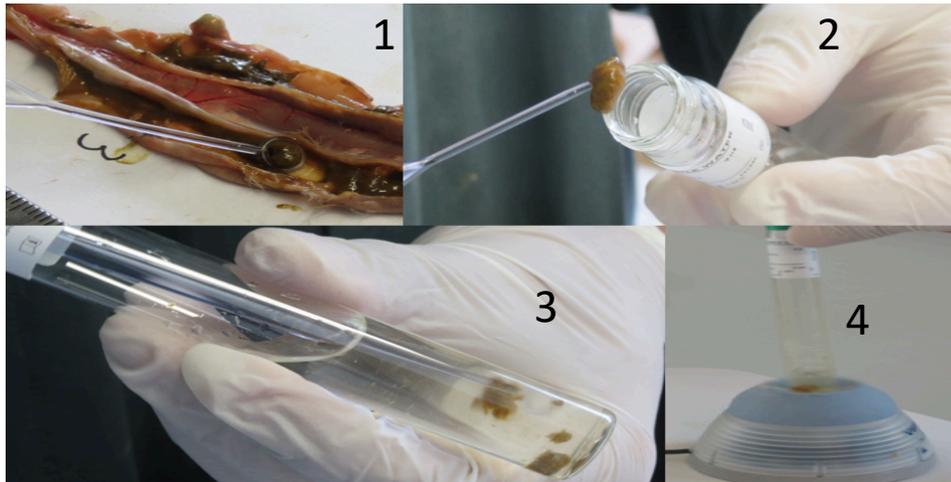


Figura 6. Técnica de recolha de conteúdo intestinal. 1 – recolha; 2/3 – diluição em peptona salina; 4 – homogeneização com a ajuda do vortex (fotografias do autor).

Para a contagem bacteriana adotou-se o mesmo método que na coprologia, uma vez que o objetivo deste trabalho é avaliar técnicas práticas, uteis e exequíveis. Embora que pouco rigoroso, o método semi-quantitativo permite fazer uma apreciação geral e rápida das populações bacterianas estudadas, fazendo uma comparação semanal.

Os *scores* usados podem ser observados na tabela 3.

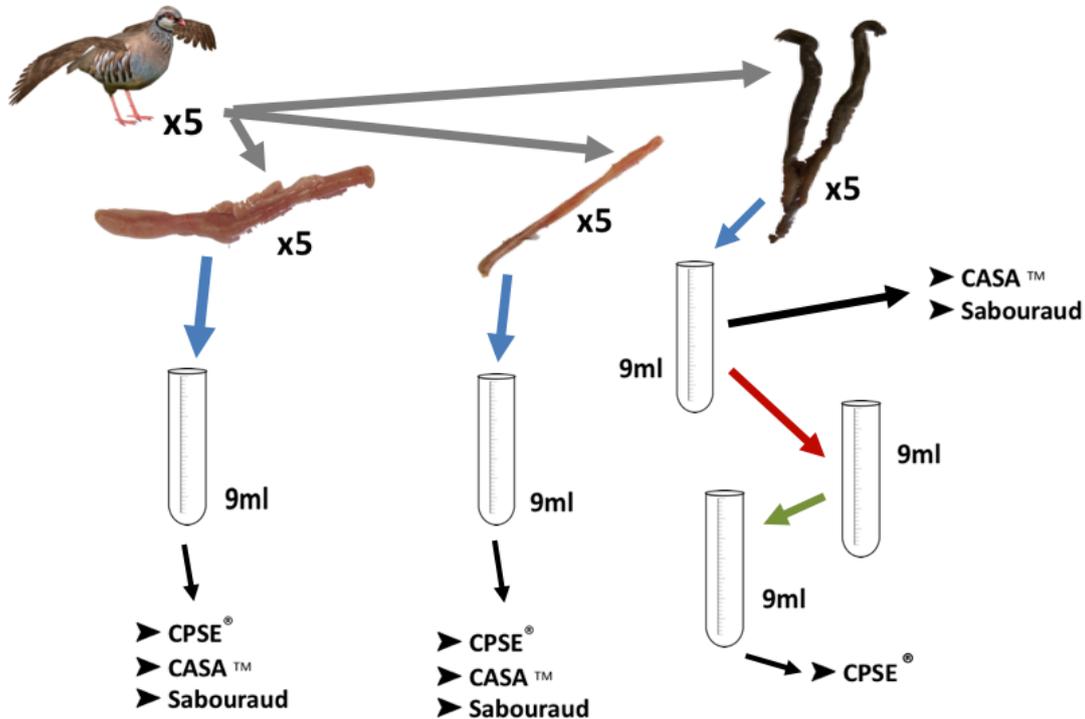


Figura 7. Protocolo de recolha e diluição utilizado. Setas azuis – recolha de 10 µl de fezes com a ajuda de uma ansa e diluir em 9 ml de peptona salina; Setas pretas – Semear 10 µl da amostra diluída nos meios de cultura indicados; Seta vermelha – Diluição da amostra cecal 10x (1 ml da amostra em 9ml de peptona salina); Seta verde – Diluição da amostra cecal 100x (100 µl da amostra em 9 ml de peptona salina)

Tabela 3. Score microbiológico utilizado. Min – mínimo de colônias observadas Max – máximo de colônias observadas.

CASA - <i>Campylobacter</i> spp			Sabouraud - Fungos			CPSE		
score	min	max	score	min	max	<i>Escherichia coli</i> e <i>Enterococcus</i> spp.		
						Score	min	max
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	20	1	1	7	1	1	10
2	21	50	2	7	16	2	11	20
3	Difícil de contar*		3	17	30	3	21	50
4	Impossível de contar*		4	>30		4	>50	

3.7 TESTE RÁPIDO *CORONAVIRUS*

Para deteção do vírus utilizou-se o teste *Anigen Rapid IBV Ag test Kit* comercializado pela empresa coreana *Bionote, Inc.* Baseado no método de imuno-ensaio cromatográfico (ELISA), concebido na sua forma comercial para diagnóstico da Bronquite Infeciosa em galinhas, este teste permite a deteção qualitativa de *Coronavirus*.

O teste rápido apresenta uma letra “S” (poço), “T” (teste) e “C” (controlo) na sua superfície. A banda de controlo deverá surgir sempre que o teste for bem feito e os reagentes funcionem. Na linha “T” (teste) estão presentes anticorpos do vírus da Bronquite Infeciosa que iram capturar e detetar o vírus. Uma banda roxa aparecerá na zona “T” sempre que houver antígenos suficientes na amostra.

Este teste é capaz de detetar antígenos em amostras da traqueia, rins ou fezes, com a sensibilidade de 94,1% (vs RT-PCR) e especificidade de 95,2% (vs RT-PCR).

Este meio de diagnóstico foi concebido para fazer controlos rápidos e em situação de campo, sendo que um diagnóstico positivo carece imperativamente de confirmação através de testes genéticos. Neste trabalho não se recorreu à confirmação através testes genéticos por motivos monetários.

No presente trabalho usaram-se amostras fecais (conteúdo intestinal). Foi feita a recolha com uma zaragatoa esterilizada e de seguida a amostra foi diluída num diluente específico. Com a ajuda de uma pipeta, colocaram-se 4 gotas da amostra diluída na zona “S” (poço). Todos estes materiais são fornecidos pelo fabricante. Após 10 minutos é possível interpretar o resultado.

Encontram-se anexadas mais informações sobre do teste rápido.

3.8 COLORAÇÕES

As colorações usadas (Gram, *May Grunewald Giemsa e Hemacolor*[®]) foram feitas com o intuito de perceber se o seu uso poderá aportar alguma informação adicional para diagnósticos em situação prática.

May Grunewald Giemsa (Mgg) e *Hemacolor*[®] são técnicas de coloração tipo Romanowsky, com o mesmo objetivo de coloração. Utilizou-se a técnica convencional (*Mgg*) e o *kit* de coloração rápida (*Hemacolor*[®]) com o objetivo de comparar uma técnica de 25-30 minutos (*Mgg*) e outra de 3 minutos.

Tanto *Mgg* como *Hemacolor*[®], permitem observar diferentes formas parasitárias de *Eimeria* spp. (oocistos, esquizontes, merozoitos e gametócitos p.e.) enquanto que a coprologia básica de observação ao microscópio entre a lâmina e a lamela apenas permite a observação de oocistos. Este facto é importante, uma vez que a quantidade de oocistos pode não ser o espelho da agressão à mucosa, tendo em conta que certas espécies têm uma grande capacidade de provocar lesões sem aumentar a produção de oocistos. Ao nível dos protozoários flagelados, a grande limitação da coprologia básica é a identificação incorreta, principalmente ao nível da família *Trichomonadidae*, pelo que a coloração poderá ser útil de modo a identificar organelos e diferenciar espécies.

As lâminas coradas com Gram e observadas ao microscópio permitem diferenciar bactérias Gram-positivas de Gram-negativas e identificar morfologias bacterianas (coccos, bacilos e espirais p.e.). A sua utilização neste trabalho objetivou a compreensão destas duas populações em situação normal e patológica, com o intuito de encontrar um padrão de mudança geral entre o rácio de Gram-positivas e Gram-negativas, bem como alterações morfológicas.

No que concerne à técnica, ao nível do intestino delgado foi executado o esfregaço por aposição para obter uma imagem característica da superfície da mucosa intestinal, enquanto que no ceco se utilizou uma técnica semelhante à usada no esfregaço sanguíneo, com conteúdo cecal.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.9.1 Análise de correspondências

A análise de correspondências (CA) foi desenvolvida na sua forma atual principalmente por Michael Greenacre (2007). Tem por objetivo analisar uma tabela de C colunas por L linhas, organizando e mostrando de forma gráfica as principais estruturas dos dados contidos na tabela. Esta análise pode operar com dados contínuos, desde que em escalas comparáveis e de magnitude semelhante, mas está principalmente orientada para a análise de dados não paramétricos, com destaque para as situações em que as variáveis são do tipo ordinal.

Neste estudo, as variáveis são as colunas da tabela (parâmetros analisados), e os animais estudados são as linhas, sendo cada linha correspondente a um animal.

A Tabela tem dimensão $L \times C$, e a CA desenvolve um conjunto de dimensões igual ao menor dos valores $[L-1, C-1]$. Por exemplo, no estudo do duodeno, a tabela de dados iniciais tem $C=27$ e $L=105$, pelo que o menor valor é 26. Então, a análise procura a primeira dimensão, indicada por D1, ou Dim 1, que representa o maior conjunto de grupos de animais semelhantes que são semelhantes entre si no maior conjunto de variáveis. Em seguida, a análise procura uma segunda dimensão, D2 ou Dim 2, que corresponde ao segundo maior número de grupos de animais com perfis semelhantes, e assim por diante, até à D26.

As dimensões estão ordenadas da D1 até à D26, por ordem decrescente de importância. Diz-se então que a CA ordena a informação, de tal modo que as primeiras dimensões são as mais importantes, ao passo que as últimas contêm apenas informação irrelevante ou aleatória e são descartadas. Em geral, na CA, analisam-se apenas as duas primeiras dimensões, produzindo-se gráficos de $D1 \times D2$, sendo a D1 sempre o eixo dos XX' e a D2 o eixo dos YY' .

A interpretação dos gráficos faz-se através da análise de grupos de animais próximos (com perfis semelhantes, i.e., com valores semelhantes num conjunto grande de variáveis) e das variáveis que lhes estão próximas (se o número C e L forem semelhantes), ou na mesma direção (se os números C e L forem muito diferentes).

3.9.2 Análise de correlações

As relações entre as variáveis em estudo foram analisadas através do coeficiente de correlação de Spearman (Conover, 1971). Trata-se de uma medida da relação entre duas variáveis, especialmente adaptada às variáveis ordinais. Consideraram-se significativamente diferentes de zero todos os coeficientes com $p \leq 0.05$.

3.9.3 Software

As análises estatísticas (análise de correspondências e respectivos gráficos, e o coeficiente de correlação de Spearman) foram realizadas com o software Statistica for Windows (2004). As restantes análises e gráficos foram produzidas com o Excel versão 16.12 (2018).

4. RESULTADOS

4.1. DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

4.1.1 Exploração A

Na exploração A o desempenho zootécnico geral foi bom, onde não se observaram perdas significativas por mortalidade, diminuição da condição corporal e uso excessivo de farmacos.

Como se pode observar, no gráfico 1, a mortalidade semanal do bando não foi alta, alcançando um pico na segunda semana de idade devido a uma diarreia, onde se recorreu à antibioterapia. É possível perceber, na curva da média de condição corporal dos animais eutanasiados semanalmente, que há uma diminuição muito ligeira na 5ª semana, devido a um animal que se encontrava magro (score 2).

A passagem para o parque de voo deu-se à 5ª semana e a mortalidade final atingiu um total de 7% em 2080 animais.

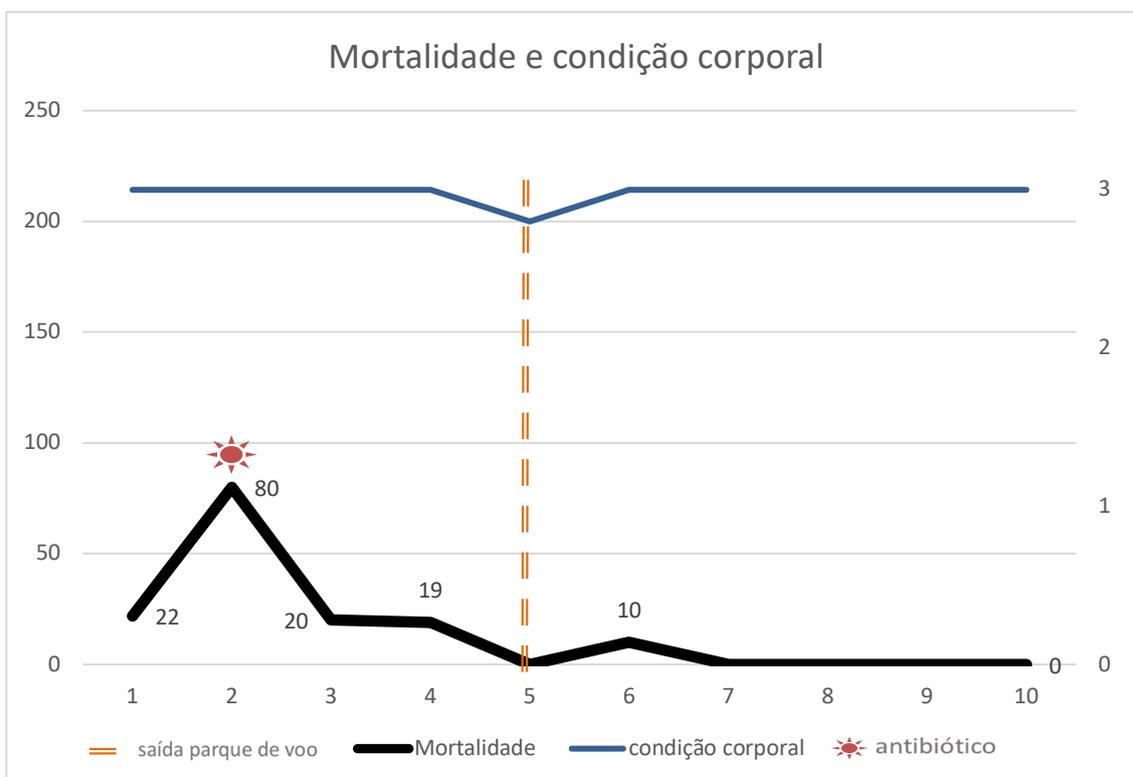


Gráfico 1. Mortalidade semanal observada na exploração A (eixo da esquerda). Estão presentes as informações relativas à saída para o parque de voo, média da condição corporal (eixo da direita) dos 5 animais eutanasiados semanalmente e o uso de antibióticos.

4.1.2 Exploração B

Na exploração B, o desempenho zootécnico geral foi insatisfatório, onde se observam grandes perdas por mortalidade, heterogeneidade do lote e recurso frequente a antibióticos.

Como é possível observar, no gráfico 2, a mortalidade semanal do bando ao longo das 10 semanas de avaliação foi sempre alta, tendo-se alcançado cerca de 20% de sujeitos mortais num total de 4400, perfazendo cerca de 850 perdizes.

O uso de antibióticos foi recorrente ao longo da avaliação devido à instabilidade intestinal do lote, tendo-se utilizado antibiótico todas as semanas, à exceção da terceira.

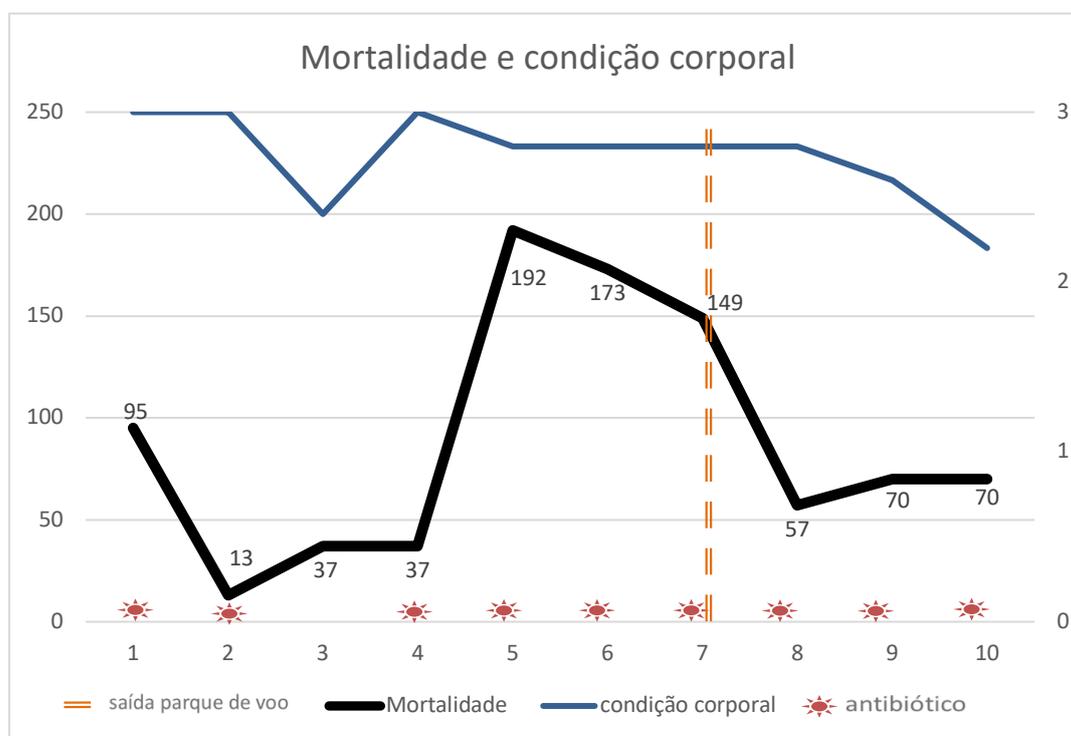


Gráfico 2. Mortalidade semanal observada na exploração B. Estão presentes as informações relativas à saída para o parque de voo, média da condição corporal (eixo da direita) dos 5 animais eutanasiados semanalmente e o uso de antibióticos

4.2 TEMPERATURA E PH DA ÁGUA

4.2.1 Exploração A

É possível observar a evolução geral da temperatura e pH da água de bebida no gráfico 3, pelo que se conclui que a temperatura foi diminuindo desde a primeira semana de vida, até estabilizar entre 22°C e 21°C a partir da 4ª semana. Já no que concerne ao pH, foi utilizada uma mistura de ácidos orgânicos para acidificação da água de bebida até à 6ª semana de vida. Esta acidificação permitiu os valores de pH situarem-se entre 3,4 e 4 durante as alturas mais críticas da criação dos perdigotos.

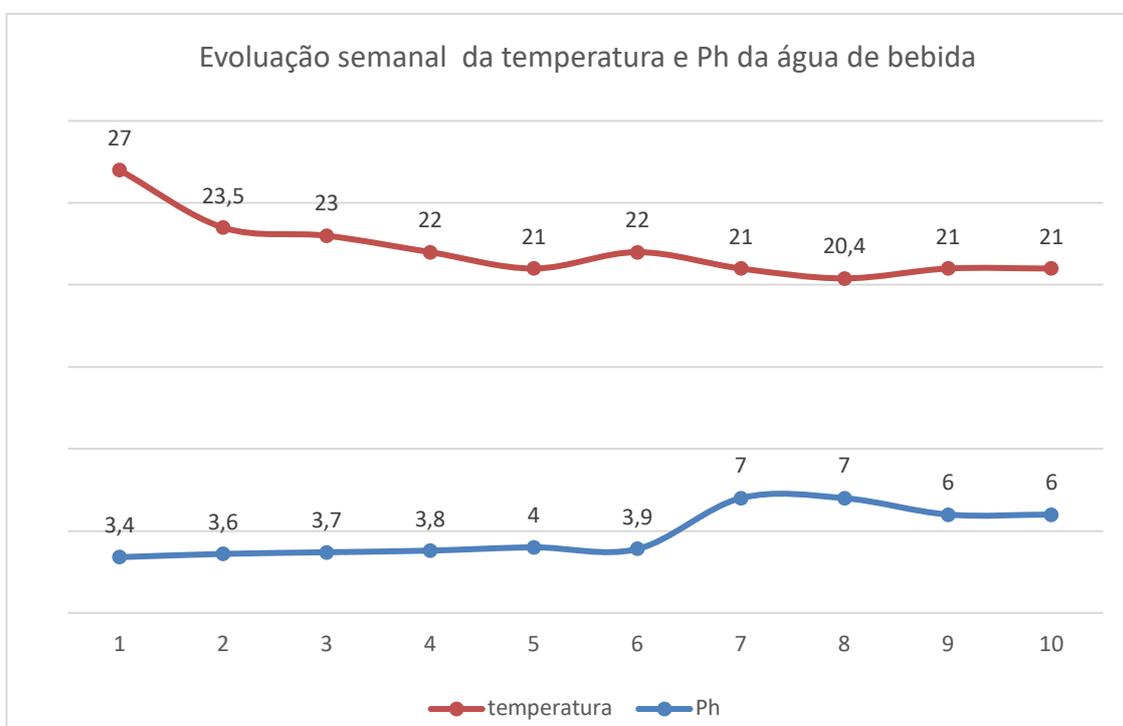


Gráfico 3. Valores semanais de temperatura e pH da água na Exploração A

4.2.2 Exploração B

É possível observar a evolução geral da temperatura e pH da água de bebida no gráfico 4, pelo que se conclui que a temperatura se manteve entre 28°C e 29°C durante as primeiras 4 semanas de vida, baixando gradualmente até aos 10. Já no que concerne ao pH, foi utilizada uma mistura de ácidos orgânicos para acidificação da água de bebida até à 6ª semana de vida. Esta acidificação permitiu os valores de pH situarem-se entre 3,4 e 4 durante as alturas mais críticas da criação dos perdigotos.

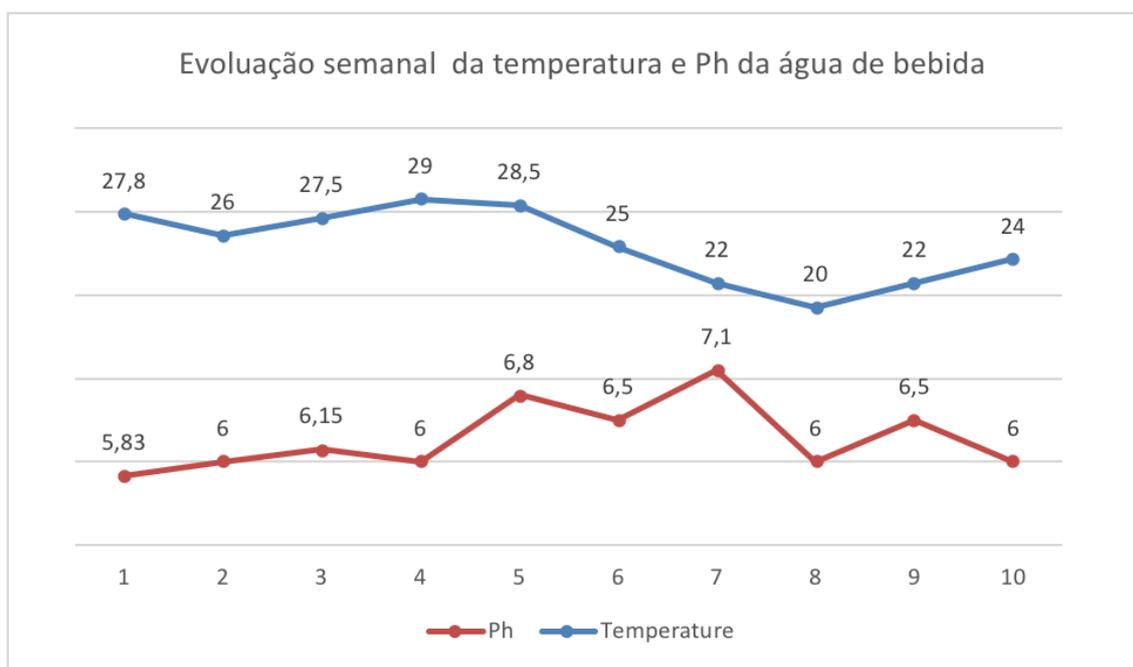


Gráfico 4. Valores semanais de temperatura e pH da água na Exploração B.

4.3 PARASITOSSES E LESÕES

4.3.1 *Scoring* microscópico: Exploração A

Abordando as parasitoses diagnosticadas, só se observou coccídeas. Com os dados obtidos da coprologia, foi feita uma média do *score* microscópico dos 5 animais eutanasiados semanalmente, como é possível observar no gráfico 5.

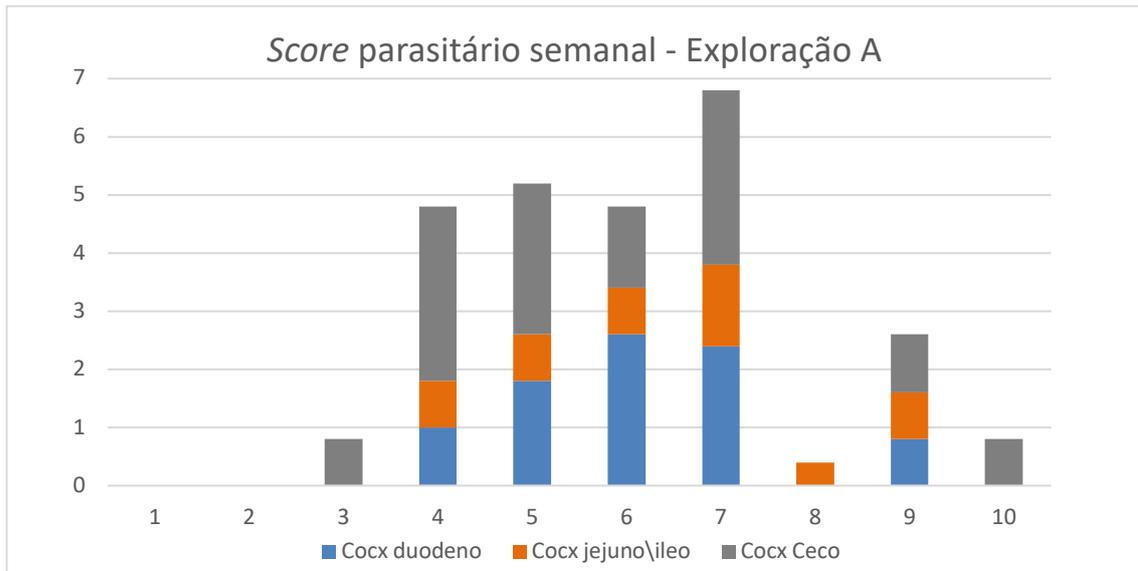


Gráfico 5. Média do score microscópico dos 5 animais eutanasiados semanalmente. Cocx: coccídias.

Após a análise deste gráfico, é possível entender que a primeira infecção se deu à terceira semana de idade, tendo sido uma espécie de coccídea com tropismo cecal e a partir dessa semana as infecções múltiplas foram recorrentes e em maior quantidade.

De modo a compreender melhor o impacto que as parasitoses observadas tiveram no lote, foi cruzada a informação da análise parasitária com a informação zootécnica como podemos observar no gráfico 6.

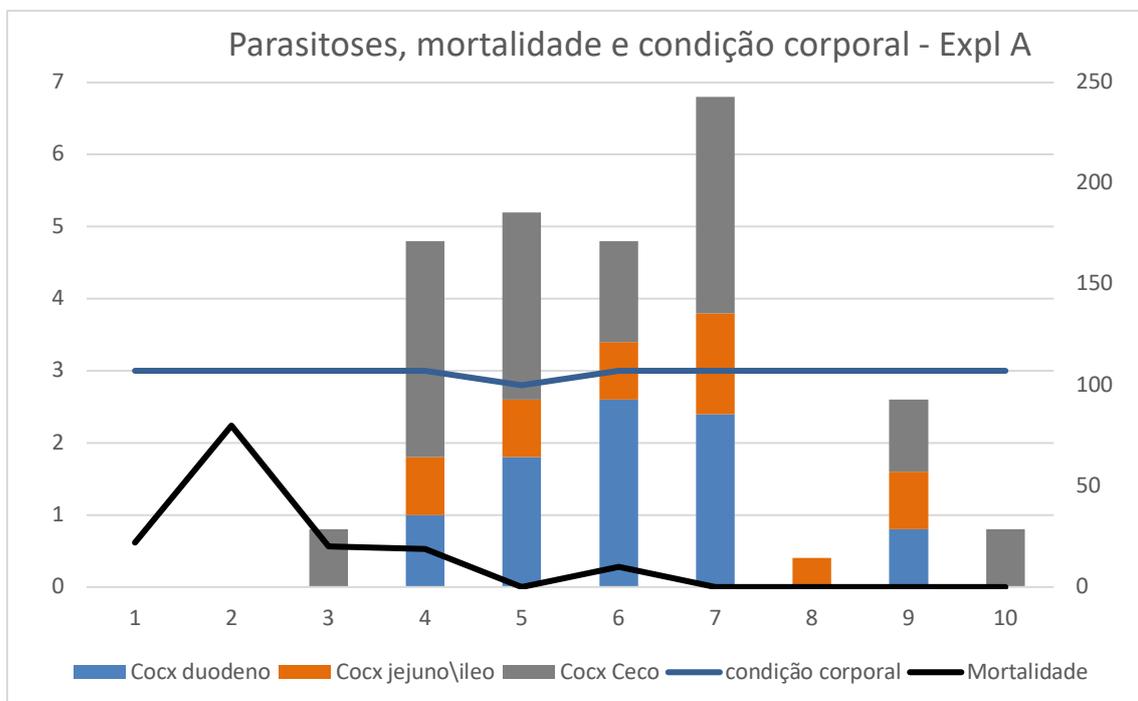


Gráfico 6. Evolução semanal da média do score microscópico, mortalidade (eixo da direita) e média da condição corporal (eixo da esquerda). Cocx: coccídeas.

Esta análise permitiu concluir que a mortalidade ligada à infecção pode ter sido cerca de 49 sujeitos (2,3%), no máximo, embora que a causa de mortalidade possa ter sido devido a outros fatores não mensurados, independentes das coccídeas.

No que diz respeito ao impacto dos parasitas na condição corporal, é possível entender que não foi relevante, tendo-se observado apenas um animal magro na 5ª semana.

O produtor não recorreu ao uso de produtos coccidicidas em nenhuma altura do acompanhamento.

4.3.2 Lesões e alterações intestinais: Exploração A

Em relação às lesões e alterações do duodeno, observaram-se focos necróticos brancos na superfície da mucosa, alterações ao nível da espessura da parede intestinal, serosa avermelhada, flacidez e conteúdos mucoides esbranquiçados (fig. 8 e 9).



Figura 8. Duodeno com conteúdo mucoide e líquido (fotografia do autor).



Figura 9. Duodeno com alterações focos necróticos típicos de *Eimeria kofoidi* (fotografia do autor).

No jejuno/íleo foram encontradas alterações menos evidentes que nos outros segmentos, no entanto observou-se inflamação, sangue digerido, gás, alterações da espessura da parede intestinal, flacidez, conteúdos líquidos e multicolorados (fig. 10 e 11).

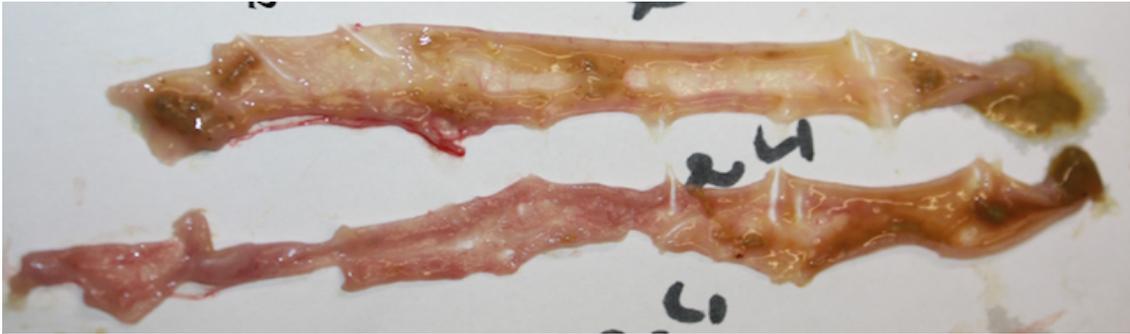


Figura 10. Jejuno com alterações ao nível da espessura da parede intestinal. Parede fina podendo observar-se através dela (fotografia do autor).

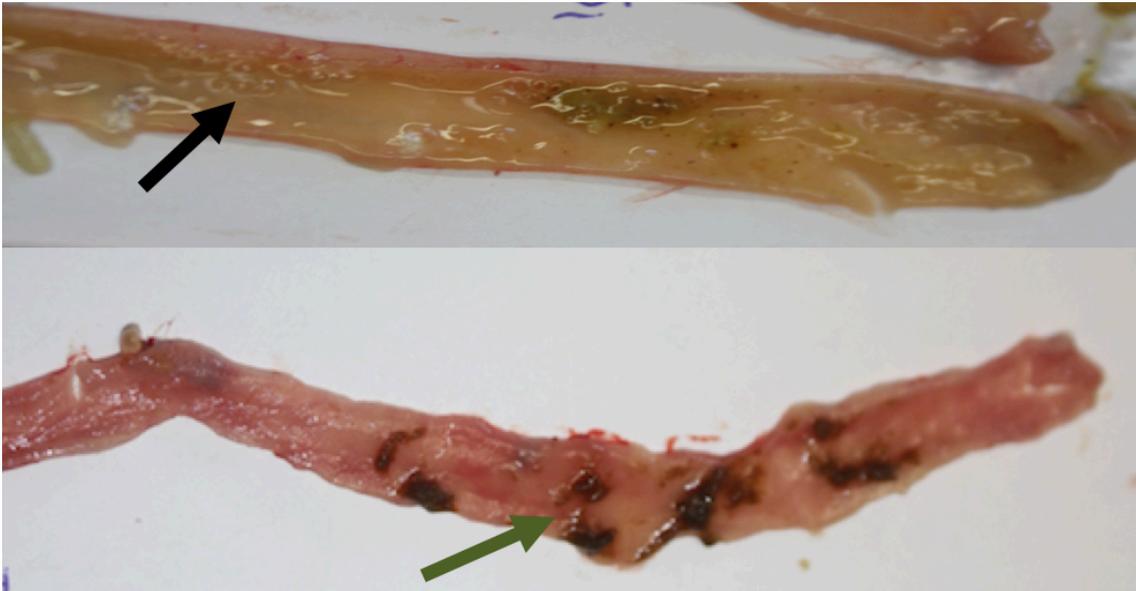


Figura 11. Na imagem superior pode-se observar um segmento jejunal com conteúdo líquido e gás (seta preta). Na imagem inferior: jejuno inflamado (cor avermelhada) apresentando sangue digerido (seta verde) (fotografias do autor).

Em relação às lesões e alterações cecais encontradas, foi possível observar que os cecos se encontravam pouco dilatados, pálidos, esbranquiçados, com conteúdos líquidos de diferentes cores (bege, alaranjado e verde p.e.) e gás (fig. 12 e 13).

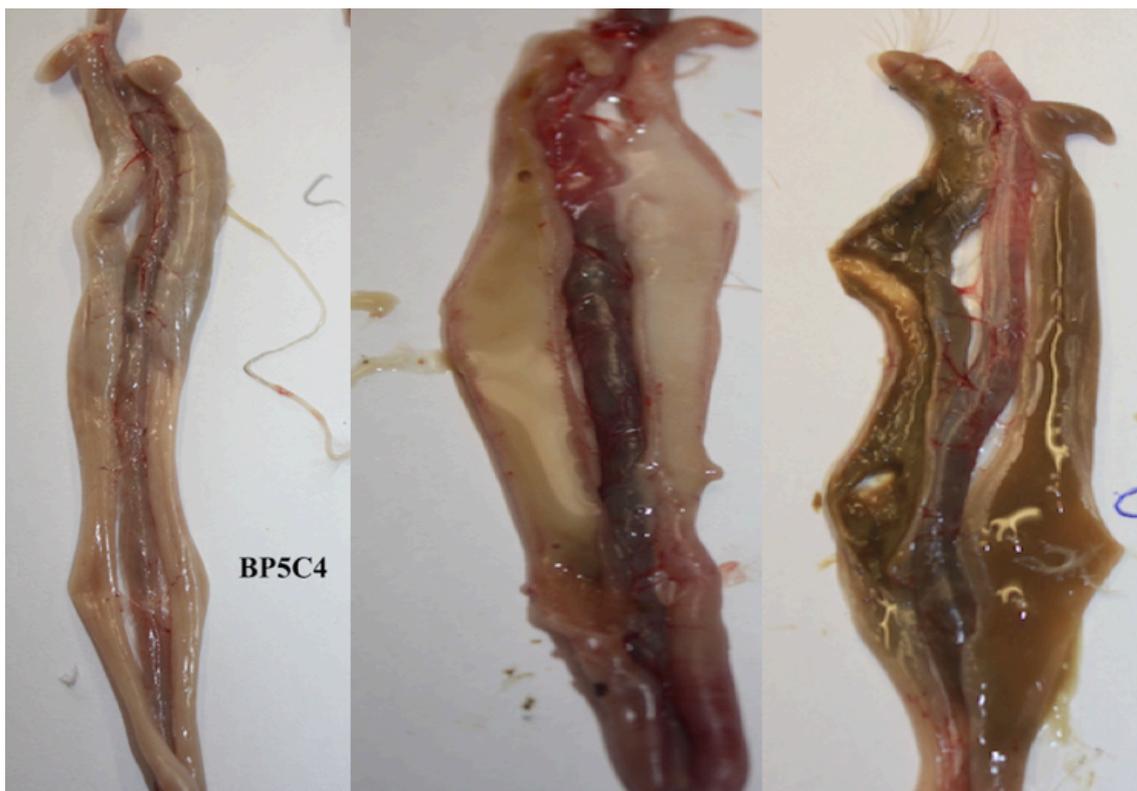


Figura 12. Diferentes alterações: diminuição da dilatação (imagem da esquerda); conteúdo cecal líquido e de cor bege (imagem do centro); conteúdo cecal líquido (imagem da direita); (fotografias do autor).

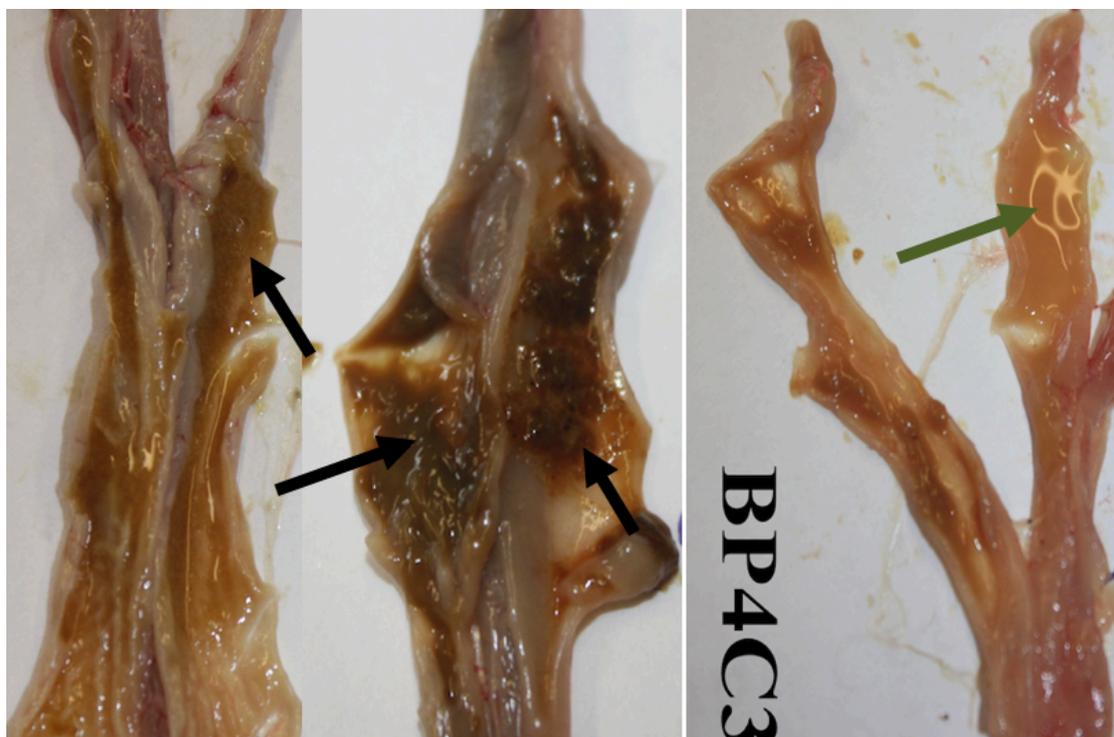


Figura 13. Diferentes alterações: gás (setas pretas); diminuição do conteúdo cecal e por consequência perda de dilatação; conteúdo líquido (seta verde); (fotografias do autor).

4.3.3 Scoring microscópico: Exploração B

Abordando as parasitoses diagnosticadas, observaram-se coccídeas, protozoários flagelados da família *Trichomonadidae* e *Spironucleus meleagridis* (*Hexamita meleagridis*). Tal como na exploração A, com os dados obtidos da coprologia, foi feita uma média do score microscópico dos 5 animais eutanasiados semanalmente, como se pode observar no gráfico 7.

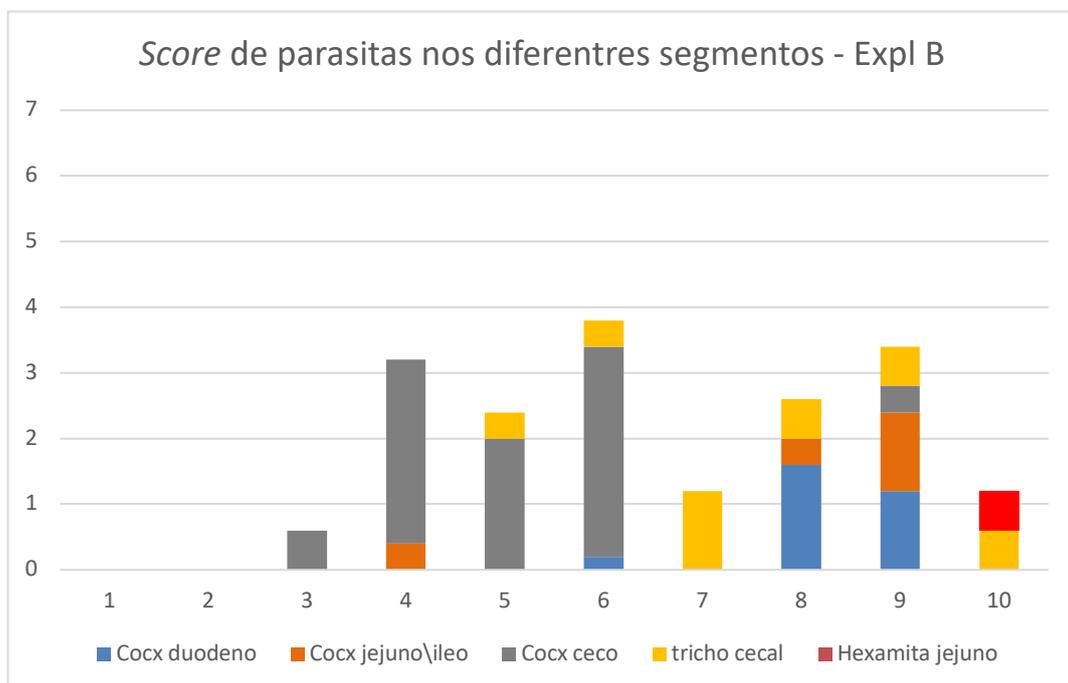


Gráfico 7. Média do score microscópico dos 5 animais eutanasiados semanalmente. Cocx: Coccídias; Tricho cecal: parasitas da família *Trichomonadidae* no ceco; Hexamita: *Spironucleus meleagridis* (*Hexamita meleagridis*) encontrados no jejuno/ileo.

Analisando este gráfico, é possível entender que a primeira infeção por coccídeas se deu à terceira semana de idade, tendo sido uma espécie de coccídea com tropismo cecal, tal como na exploração A. Os protozoários flagelados foram identificados a partir da 5ª semana em baixa quantidade, persistindo no bando até ao fim do acompanhamento.

De modo a compreender melhor o impacto que estes parasitas tiveram no lote, foi cruzada a informação da análise parasitária com a informação zootécnica, tal como feito no capítulo anterior, encontrando-se no gráfico 8.

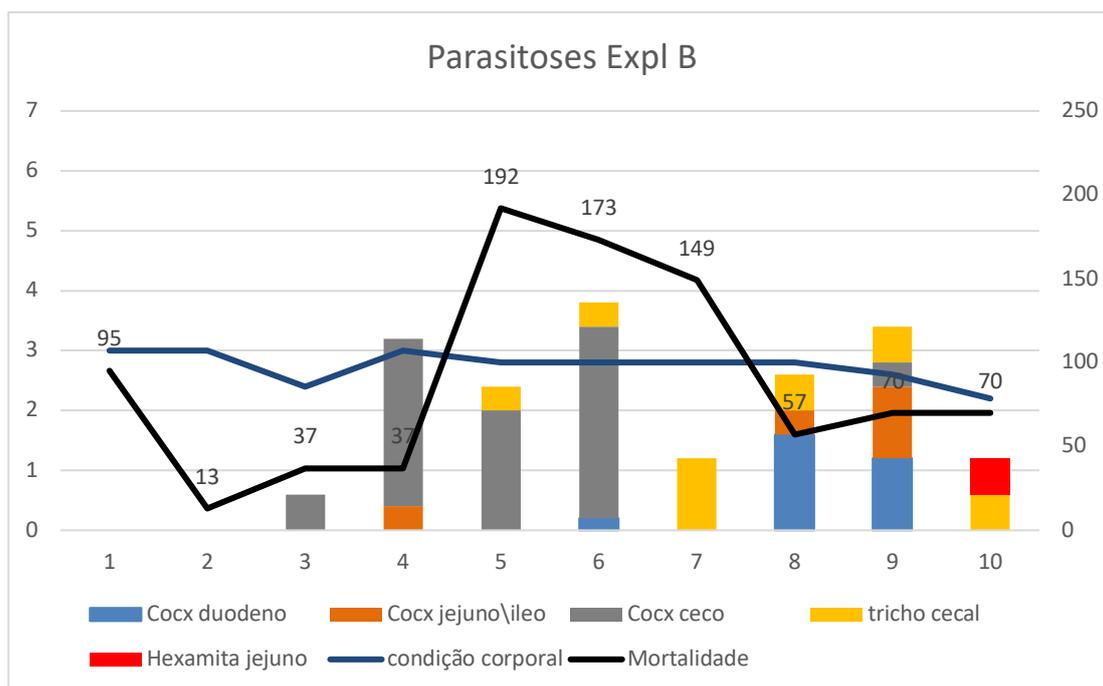


Gráfico 8. Média do score microscópico dos 5 animais eutanasiados, mortalidade e média da condição corporal semanal. Cocx: Coccidias; Tricho cecal: parasitas da família *Trichomonadidae* no ceco; Hexamita: *Spiromucleus meleagridis* (*Hexamita meleagridis*) encontrados no jejuno/íleo.

Esta análise permite concluir que a mortalidade ligada às infeções parasitárias pode ter sido cerca de 785 sujeitos (17,8%), no máximo. A condição corporal parece ter sido influenciada negativamente ao longo do acompanhamento, principalmente na primeira infeção por coccídeas e após os protozoários flagelados terem sido encontrados.

Será importante salientar, mais uma vez, que o produtor recorreu ao uso de antibióticos em todas as semanas à exceção da 3ª e ainda utilizou produtos coccidicidas durante a 5ª e 9ª semanas.

4.3.2 Lesões e alterações intestinais: Exploração B

Em relação ao duodeno, observaram-se alterações ao nível da espessura da parede intestinal, flacidez, reações inflamatórias evidentes (vasos sanguíneos congestionados e serosa avermelhada), conteúdos mucoides esbranquiçados e multicolorados (fig. 14).



Figura 14. Duodeno flácido, com conteúdos mucoides esbranquiçados e multicolorados (1 e 3); Duodeno flácido e inflamado, observando-se tonalidade avermelhada e vasos sanguíneos congestionados (2); (fotografias do autor).

No jejuno/íleo foram encontradas alterações da espessura da parede intestinal, conteúdos intestinais mucoides e de diferentes cores (verde e alaranjado p.e.), flacidez e alimento mal digerido (fig. 15).

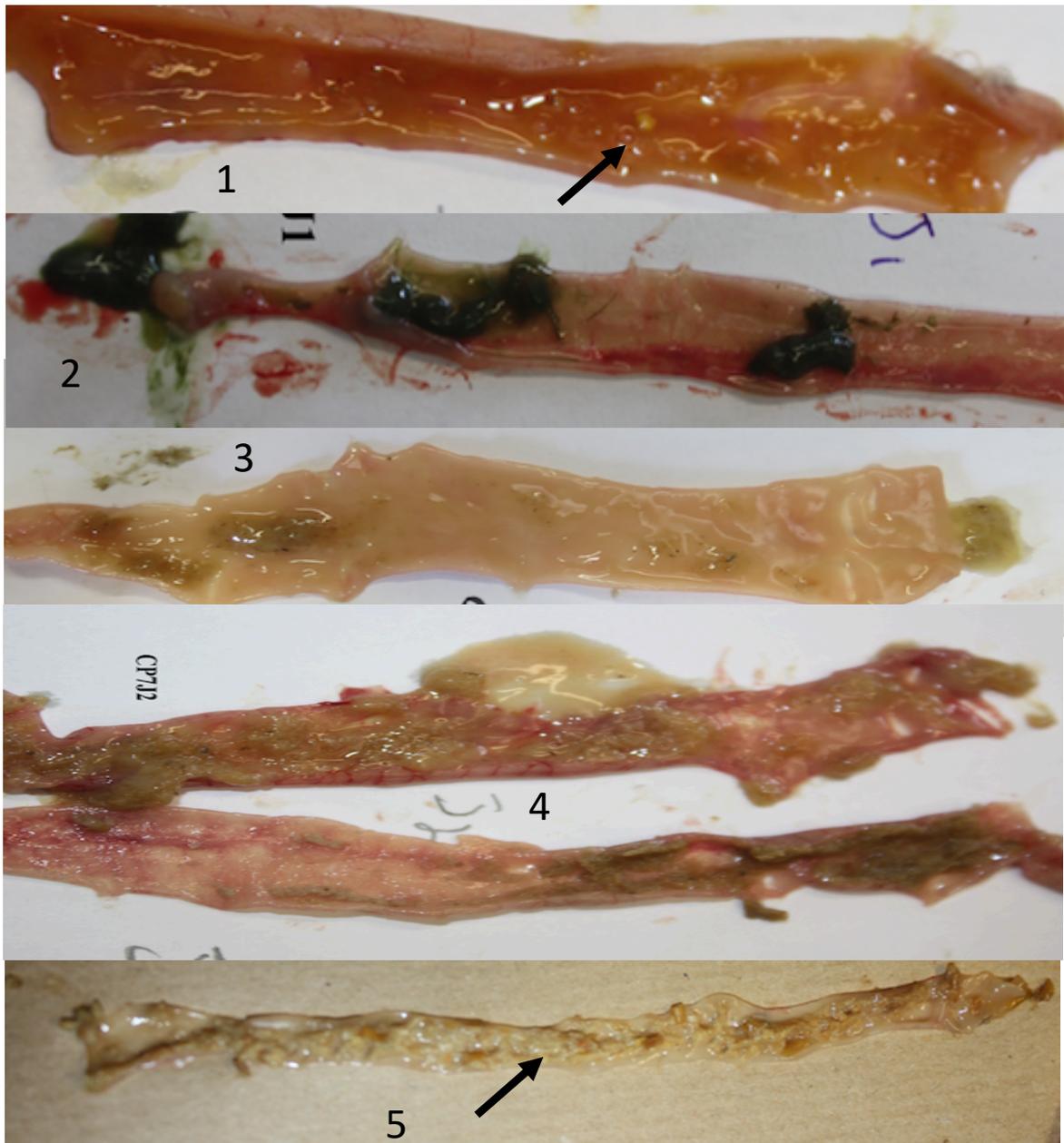


Figura 15. Jejunos com conteúdos multicolorados (1 e 2), muco (3 e 4), alimento por digerir identificado com setas pretas (1 e 5) e enterite catarral (2) (fotografias do autor).

Na infecção por *Spironucleus meleagridis* o segmento jejuno/íleo encontrava-se com a parede fina, conteúdo cilíndrico esverdeado com bastante líquido envolvente (fig. 16)

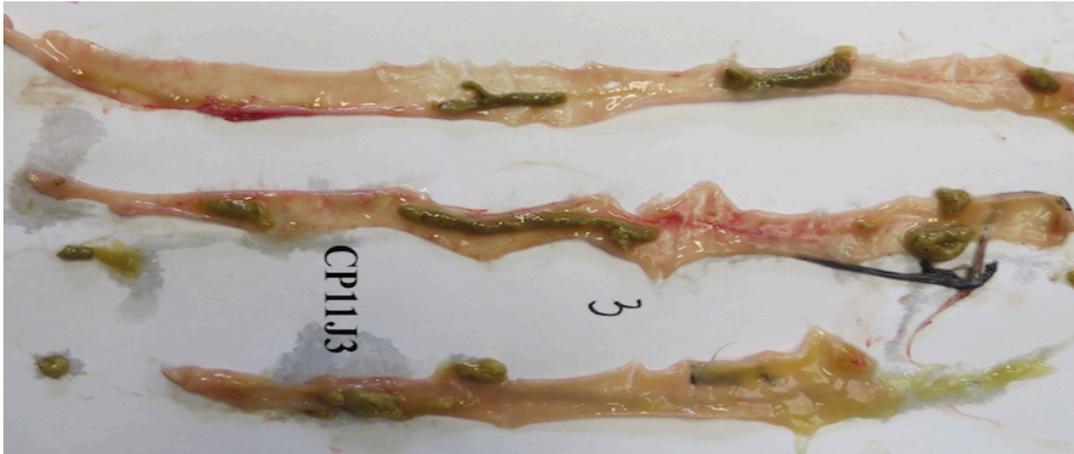


Figura 16. Jejunos de um animal infetado por *Spironucleus meleagridis* onde se pode observar conteúdos intestinais cilíndricos e ao mesmo tempo excesso de líquido (fotografia do autor).

Nestes animais com o intestino delgado afetado, identificaram-se maioritariamente parasitas, no entanto uma grande parte das aves apresentavam sinais evidentes de enterite bacteriana e disbiose sem presença ou elevados *scores* de agentes parasitários.

Em relação às lesões e alterações cecais em casos de coccidiose, foi possível observar que alguns cecos se encontravam pouco dilatados, pálidos, esbranquiçados, com conteúdos líquidos de diferentes cores (bege p.e.), gás e nódulos caseosos (fig. 17).



Figura 17. Ceco com conteúdo líquido; 2 – Ceco com conteúdo líquido e vasos sanguíneos congestionados; 3 – Ceco com conteúdo caseoso conferindo uma tonalidade bege; 4 – Cecos pouco dilatados (fotografias do autor).

No entanto, nos animais onde se observaram grandes *scores* de parasitas da família *Trichomonadidae* o padrão foi diferente, havendo animais com os cecos dilatados e com conteúdos extremamente líquidos e gasosos (fig. 18)

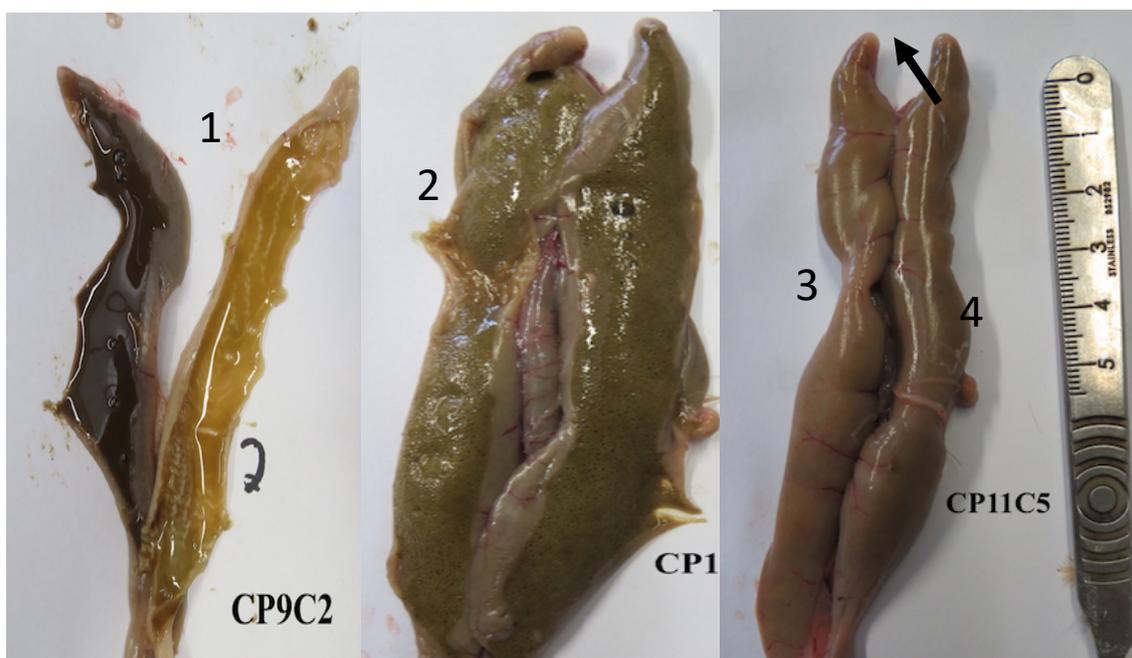


Figura 18. 1- Cecos dilatados (2 e 3) com conteúdo líquido (1) e gasoso (2) (fotografias do autor).

4.4 ANÁLISE DE CORRESPONDÊNCIA

Através desta análise é possível observar todos os 105 animais necropsiados. A análise foi feita em cada um dos segmentos uma vez que as variáveis diferem entre o duodeno, jejuno\íleo e ceco. Nesta análise entraram todas as variáveis estudadas:

- Parâmetros macroscópicos do intestino:
- Coprologia;
- Microbiologia;
- Antibioterapia;
- Condição corporal;
- Temperatura e pH de água de bebida;
- Acesso ao exterior (parque de voo);
- Detecção de coronavírus;

Em função das variáveis mais importantes e relevantes, esta análise irá formar grupos que terão algo em comum, permitindo uma análise global e holística.

4.4.1 Duodeno

Na análise deste segmento intestinal, retiraram-se as variáveis “Tri” (protozoários da família *Trichomonadidae*) e “Hex” (*Hexamita meleagridis*), uma vez que não foram observados em nenhum dos animais.

Analisando o gráfico 9, observa-se uma ligeira separação entre dois grupos (direita e esquerda). Um dos grupos (círculo azul) parece ter em comum o acesso ao exterior ou parque de voo (“Env”) e a alta carga de *Campylobacter* spp. (“CBa”), havendo correlação positiva ($\rho = 0,95$).

Os animais com este perfil (“CBa” e “Env”) poderão não ser só os delimitados, no entanto a sobreposição de indivíduos não permite a visualização.

A variável “Ooc” (*score* de oocistos) parece, também, influenciar a diferenciação dos grupos, uma vez que os animais delimitados apresentam grandes contagens de oocistos. Para além disso, as variáveis “Env” (acesso ao exterior) e “Ooc” (*score* de oocistos) estão correlacionadas positivamente ($\rho = 0,44$), pelo que é presumível que a tendência destas 3 variáveis seja semelhante.

Por último, ainda neste grupo isolado, encontra-se a variável “Eim” (lesões típicas de coccidiose) que é diretamente proporcional ao *score* de oocistos (“Ooc”) havendo correlação positiva entre os dois ($\rho = 0,26$).

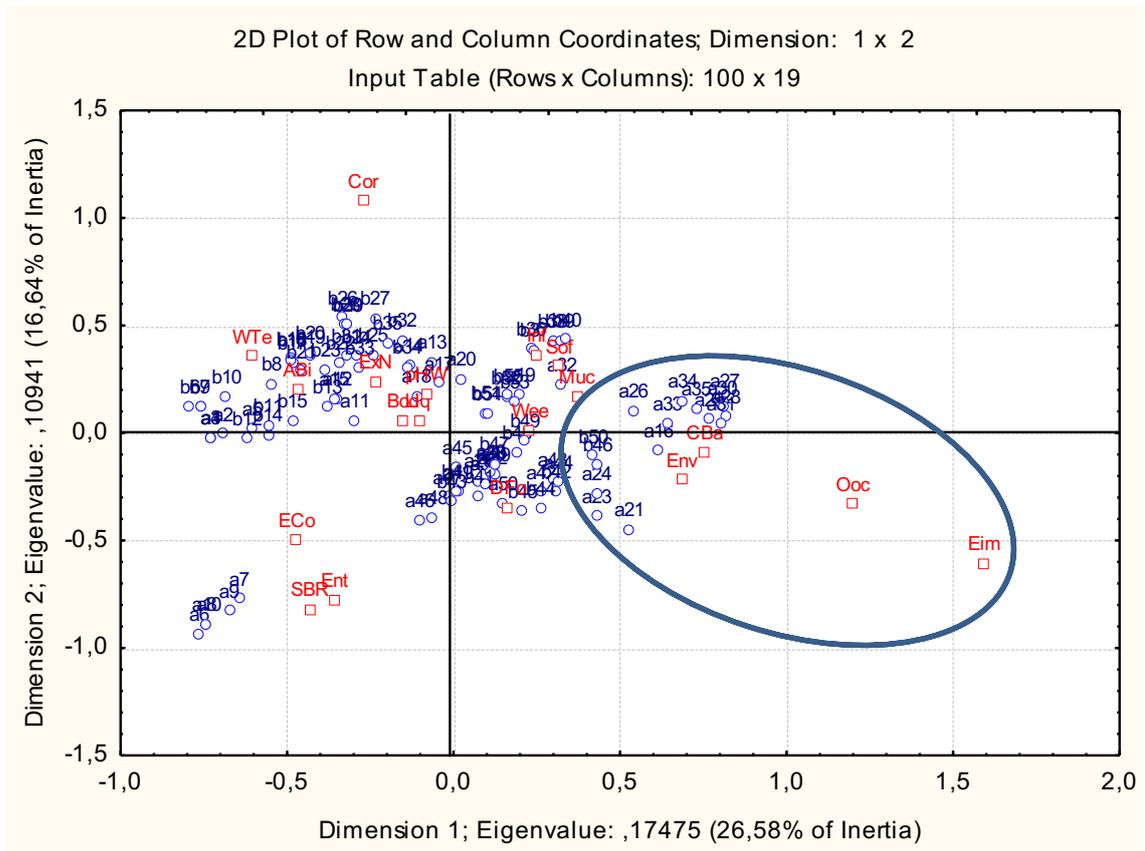


Gráfico 9. Análise de correspondência do segmento duodenal. Circulo azul – delimita um grupo que tem em comum as 4 variáveis: CBa, Env, Ooc e Eim.

No entanto, pelo fato de demonstrarem uma preponderância exagerada, as variáveis como “Ooc” (*score* de oocistos) e “Eim” (lesões típicas de coccidiose) terão que ser eliminadas com objetivo de tornar mais clara a análise e perceber o que torna os dois grupos diferentes. Dando origem ao gráfico 10.

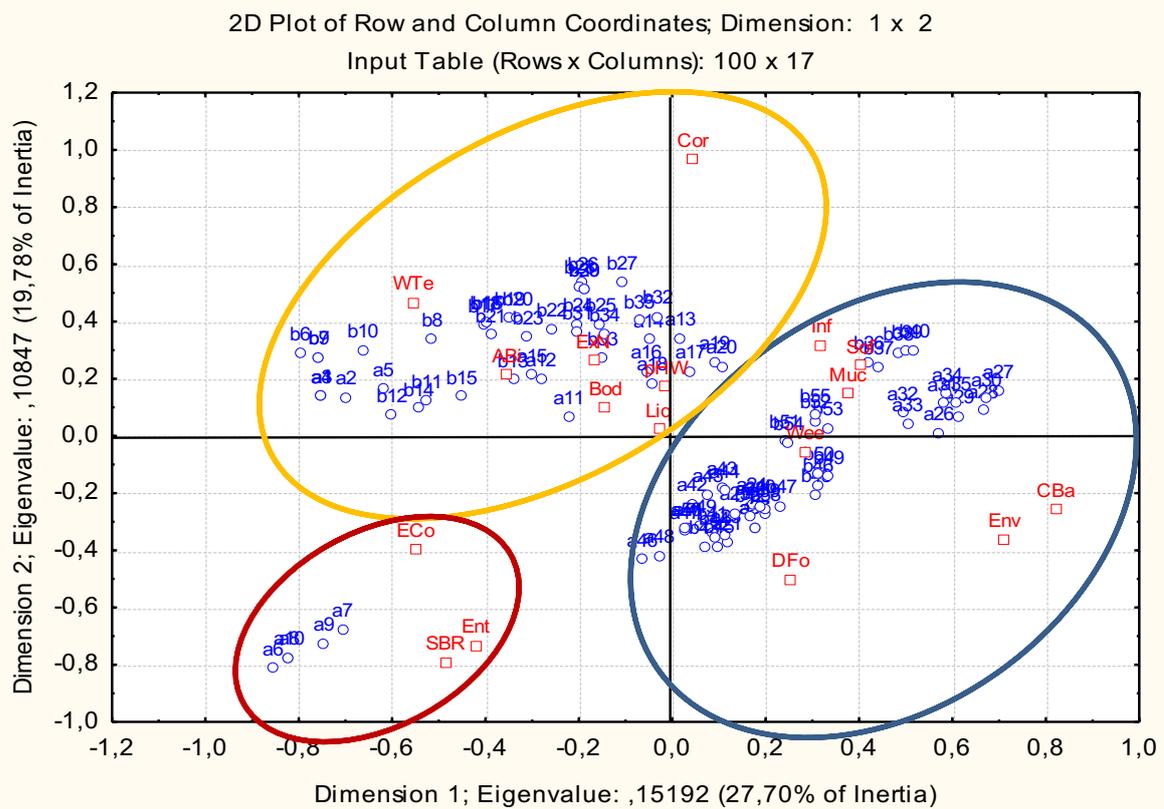


Gráfico 10. Análise de correspondência do segmento duodenal. Circulo azul – delimita um grupo que tem em comum as 4 variáveis: CBa, Env, Ooc e Eim; Circulo vermelho – grupo que tem em comum as 3 variáveis: SBR, Ent e Eco; Circulo amarelo – grupo que tem em comum WTe, ABi, Bod e ExN.

Após refazer a análise, é evidente a distanciação entre dois grupos, continuando a haver forte influência de “CBa” e “Env” no grupo delimitado a azul reforçando a sua correlação ($\rho = 0,95$).

É agora possível perceber que neste grupo (azul) apenas se posicionam animais mais velhos, ou seja, com acesso ao exterior/parque de voo (Exp 1: a partir da 5ª semana e Exp 2: a partir da 7ª semana).

Ainda no grupo delimitado azul, parece haver influência de variáveis macroscópicas como inflamação (“Inf”), Muco (“Muc”) e flacidez (“Sof”)

Estas variáveis estão todas correlacionadas positivamente com o acesso ao exterior (“Env”) ($\rho = 0,2$, $\rho = 0,3$ e $\rho = 0,3$ respectivamente) e com o *score* de *Campylobacter* spp (“CBa”) ($\rho = 0,2$, $\rho = 0,3$, $\rho = 0,2$ respectivamente) percebendo-se o porquê da sua tendência.

Inflamação (“Inf”) e Muco (“Muc”) também estão correlacionados positivamente com o *score* de oocistos ($\rho = 0,2$ e $\rho = 0,36$, respectivamente) e embora que esta variável

tenha sido eliminada, foi observado no primeiro gráfico que parte dos animais que estão no grupo azul têm *scores* altos de oocistos.

Abordando agora o grupo delimitado a vermelho, encontram-se animais da exploração A que passaram por uma diarreia na segunda semana de idade, onde se administrou antibiótico. Os *scores* das populações bacterianas *Enterococcus* spp (“Ent”), *Escherichia coli* (“Eco”) e fungos (“SBR”) foram máximas, tendo sido por este motivo que o grupo se afastou com as variáveis referidas.

Estas populações (bactérias e fungos) são difíceis de avaliar, no entanto, parece haver uma sinergia entre *E. coli* e *Enterococcus* spp (correlação positiva $\rho = 0,47$) e relação direta entre o uso de antibióticos e o *score* de fungos ($\rho = 0,43$).

De uma forma pouco evidente, parece haver correlação negativa entre a população de *E. coli* e os parâmetros macroscópicos inflamação, flacidez e muco ($\rho = - 0,3/ - 0,28/ - 0,21$ respetivamente). No gráfico, este facto é possível de se observar uma vez que estão em quadrantes opostos.

Em relação à população no segundo quadrante (indicada a amarelo), é difícil perceber a sua tendência, mas entende-se que ao contrário do que vimos no grupo isolado a azul, é possível observar animais jovens que ainda se encontram no interior das instalações (confinados). Neste mesmo grupo parecem posicionar-se, da mesma forma, animais que estão sob antibioterapia (“ABi”) e a beber água com temperaturas elevadas “WTe”.

Através de uma observação detalhada, conclui-se que grande parte dos animais que se posicionam nesta zona são da exploração “B”. Na exploração B a performance geral foi fraca, com animais muito débeis que tiveram acesso ao exterior muito tarde (7^a semana) e que estiveram sobre antibioterapia muito tempo.

Nos anexos podem ser observados os gráficos da evolução do *score* das populações bacterianas ao longo das semanas no duodeno.

4.4.2 Jejuno e Íleo

Na análise deste segmento intestinal, retiraram-se as variáveis “Tri” (protozoários da família *Trichomonadidae*), uma vez que não foram observados em nenhum dos animais.

Neste gráfico parece haver separação entre 2/3 grupos, no entanto, as variáveis “Hex” (*Hexamita meleagridis*) e “Ndf” (alimento mal digerido), pelo fato de apresentarem preponderância exagerada (gráfico 11) terão que ser retiradas para clarificar o gráfico.

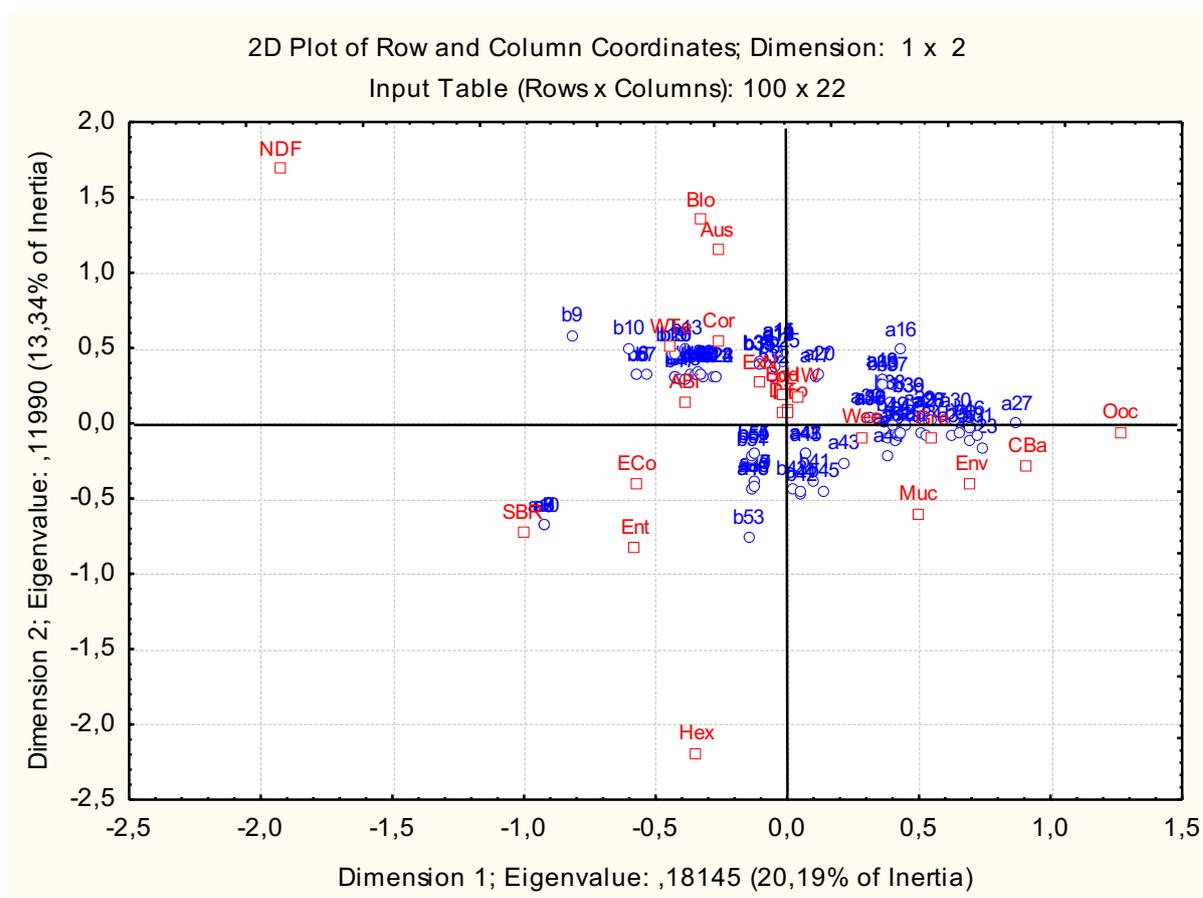


Gráfico 11. Análise de correspondência do segmento Jejuno/Íleo.

Embora que não evidente na análise de correspondências, *Hexamita meleagridis* (“Hex”) apresenta correlação positiva com o conteúdo intestinal líquido ($\rho = 0,20$).

Após refazer o gráfico, como se pode observar no gráfico 12, o posicionamento dos indivíduos e variáveis tornou-se mais claro, sendo possível evidenciar um grande grupo (círculo azul).

Neste grupo (azul), da mesma forma que no segmento duodenal, posicionam-se animais mais velhos (“Wee”) e com acesso ao exterior (“Env”) que, em parte, têm

elevadas contagens de oocistos (“Ooc”) e presença de *Campylobacter* spp. (“CBa”). Estas variáveis correlacionam-se positivamente entre si (“Env” e “CBa”: $\rho = 0,86$ / “Env” vs “Ooc”: $\rho = 0,28$ / “Wee” e “CBa”: $\rho = 0,61$)

A variável Muco (“Muc”) também parece influenciar o grupo, embora que não correlacione com a contagem de oocistos nem com o acesso ao exterior, no entanto correlaciona-se positivamente com o *score* de *Campylobacter* spp. (“CBa”) ($\rho = 0,28$).

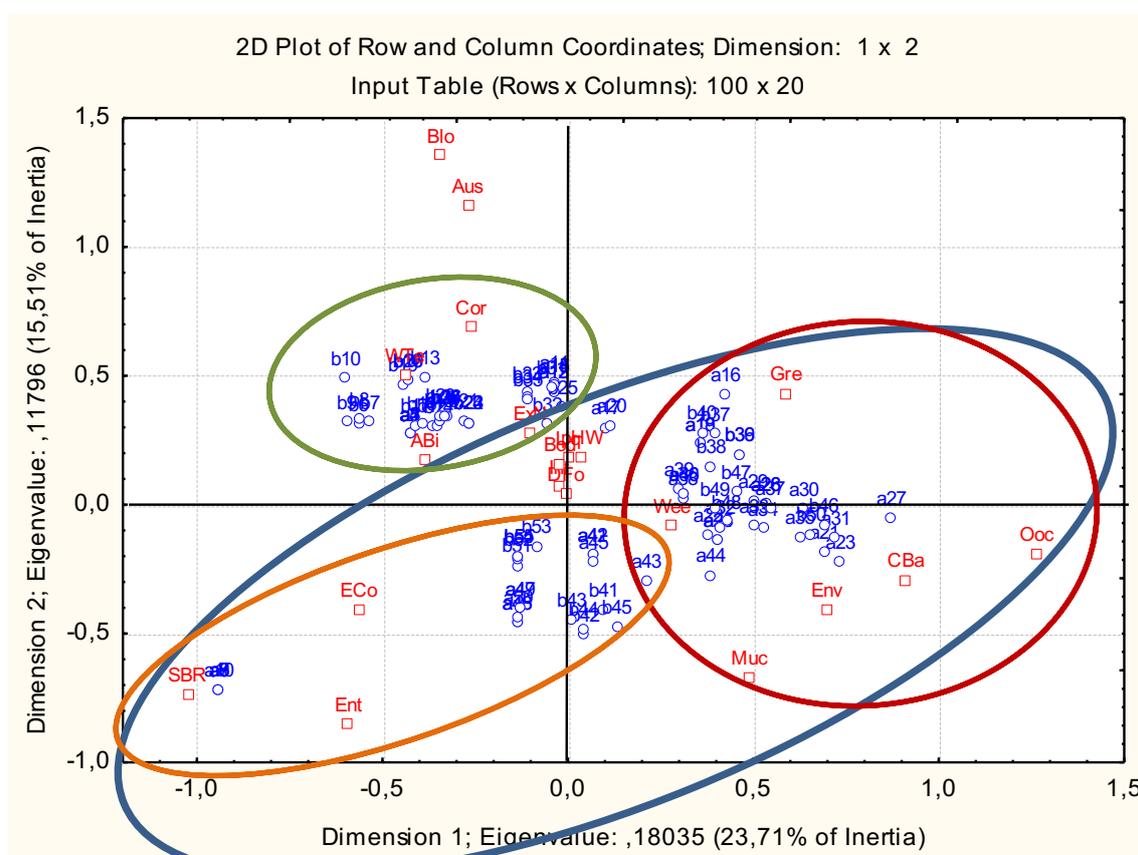


Gráfico 12. Análise de correspondência do segmento Jejuno/Íleo.

Dentro do grupo abordado (azul), após detalhada observação, consegue-se perceber que há uma separação pouco evidente entre animais com altas e baixas/nulas contagens de oocistos (círculo vermelho e laranja, respetivamente).

Os animais delimitados no círculo laranja parecem estar também influenciados pelas variáveis *E. coli* (“Eco”) e *Enterococcus* spp. (“Ent”).

Mais uma vez, como observado no segmento duodenal, as populações bacterianas *Enterococcus* spp e *Echerichia coli*, parecem evoluir de forma sinérgica havendo correlação positiva entre as duas (Eco vs Ent $\rho = 0,64$).

No entanto, parece haver uma correlação negativa entre a população de *E. coli* (“Eco”) e *Campylobacter* spp. (“CBa” e “Eco”: $\rho = -0,20$), bem como, contagem de oocistos (“Ooc” e “Eco”: $\rho = -0,20$), confirmando-se no gráfico que as posições destas variáveis estão opostas. Os animais que se deslocam em direção ao 3º quadrante têm tendência a ter menor *score* de *Campylobacter* spp. e oocistos e maior *score* de *E. coli*.

No círculo vermelho posicionam-se os animais com maior *score* de oocistos, no entanto, mesmo dentro desse grupo há diferenças. Os animais com maior *score* têm tendência a evoluir ao longo da dimensão 1 em função da carga parasitária.

Abordando o grupo delimitado a verde, no segundo quadrante, embora que difíceis de identificar por estarem muito sobrepostos, os indivíduos aí posicionados parecem ser animais jovens, sem acesso ao exterior, sobre antibioterapia e que estavam a beber água com temperaturas elevadas. Uma grande porção dos animais neste grupo são da exploração B, pelo que se percebe a tendência das variáveis acima indicadas (indicadores de manejo), uma vez que esta exploração teve um desempenho zootécnico geral insatisfatório.

Embora que não evidente no gráfico, foi encontrada uma correlação positiva entre a deteção de *Coronavirus* (“Cor”) e o conteúdo intestinal verde (“Gre”) ($\rho = 0,29$), e correlação negativa entre o vírus e a condição corporal (“Bod”) ($\rho = -0,42$).

No que concerne ao *score* de fungos (“SBR”), correlacionou-se positivamente com o uso de antibióticos (“ABi”) ($\rho = 0,25$) e deteção de *Coronavirus* ($\rho = 0,36$).

Por último e importante de salientar, observou-se uma correlação negativa entre o conteúdo intestinal líquido (“Liq”) e a condição corporal ($\rho = -0,20$).

Nos anexos podem ser observados os gráficos da evolução do *score* das populações bacterianas ao longo das semanas no jejuno / íleo.

4.4.3 Ceco

A primeira análise deste segmento (gráfico 13) demonstra preponderância exagerada de duas variáveis.

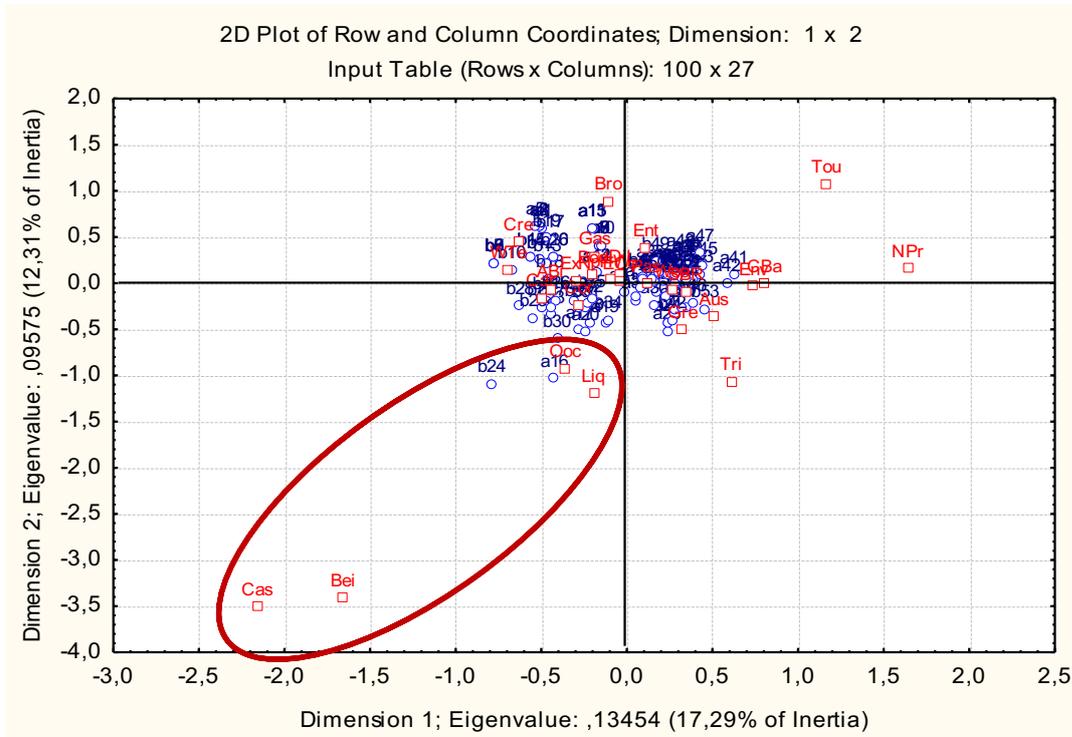


Gráfico 13. Análise de correspondência do ceco.

Sendo variáveis macroscópicas “Cas” (conteúdo caseoso) e “Bei” (conteúdo de cor bege), forçam a localização de alguns indivíduos para o 3º quadrante, onde também se situam, com menos evidência, a presença de oocistos (“Ooc”) e conteúdo líquido (“Liq”) (círculo vermelho).

O comportamento destas variáveis é compreensível, uma vez que os animais que se estão a posicionar neste quadrante apresentam elevado *score* de oocistos (“Ooc”).

Pode-se observar que existe correlação entre o *score* oocistos e o conteúdo líquido ($\rho: 0,22$), bem como entre o último e o conteúdo de cor bege (“Bei”) ($\rho: 0,27$). Este por sua vez correlaciona-se positivamente com o conteúdo caseoso ($\rho: 0,70$), provavelmente por conferir a cor branca/bege.

O *score* de oocistos correlaciona-se negativamente com a população bacteriana *Enterococcus* spp (“Ent”) ($\rho = -0,42$) e este facto observa-se no gráfico uma vez que as duas variáveis se posicionam em quadrantes opostos.

As variáveis “Cas” (conteúdo caseoso) e “Bei” (conteúdo cor bege) foram retiradas, dando origem ao gráfico 14.

Continua difícil de compreender a dispersão dos elementos, uma vez que algumas variáveis continuam a demonstrar uma preponderância exagerada, como é o exemplo da variável “Tri” (presença de protozoários da família *trichomonadidae*).

Esta variável (“Tri”) parece influenciar o movimento dos indivíduos delimitados com o círculo preto (alto *score* do parasita), e igualmente, mas de forma menos exagerada, este grupo parece ser influenciado pela variável conteúdo líquido (“Liq”) (fig. 31).

Estas duas variáveis (“Tri” e “Liq”) apresentam correlação positiva (ρ : 0,34).

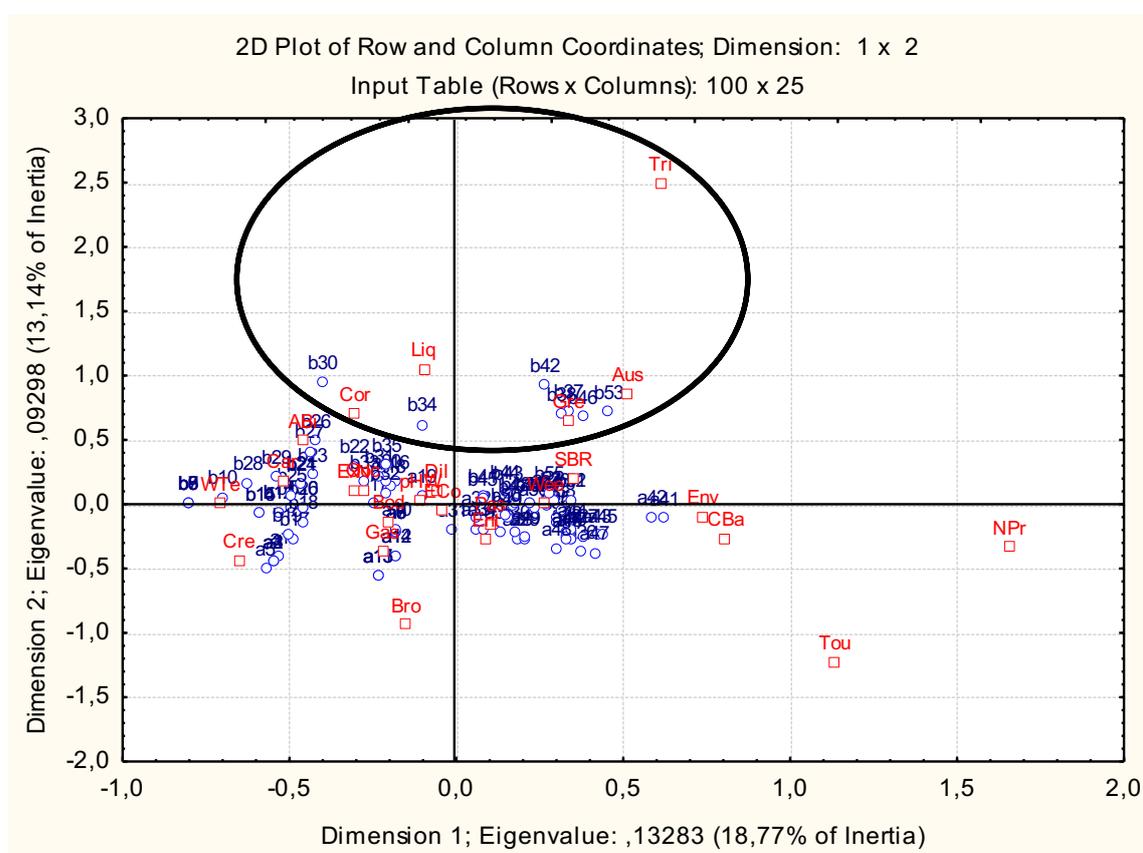


Gráfico 14. Análise de correspondência do ceco após retirada das variáveis: conteúdo caseoso (“Cas”) e cor Bege (Bei)

De modo a entender melhor a dispersão dos outros indivíduos, procedeu-se à exclusão de “Tri”, “Npr” e “Tou”. Originando assim o gráfico da figura 15.

Agora na figura 33, delimitado a vermelho, o grupo descrito no primeiro gráfico analisado parece mais evidente, animais com elevados *scores* de oocistos (“Ooc”) e com conteúdo líquido (“Liq”), correlacionando-se positivamente (ρ = 0,22).

Conforme delimitado a azul e da mesma forma que nos segmentos intestinais anteriores, pode-se observar animais que têm em comum o fato de serem mais velhos ("Wee"), acesso ao exterior ("Env") e presença ou elevado score de *Campylobacter* spp.

A correlação, é mais uma vez observada, entre o acesso ao exterior e a população bacteriana descrita ($\rho = 0,81$).

Entende-se que ao longo da dimensão 1 os animais se deslocam de forma positiva em função do *score* de *Campylobacter* spp. e acesso ao exterior. Já ao longo da dimensão 2 parecem deslocar-se de forma negativa os animais com maior carga parasitária (oocistos). E tal como nos outros segmentos, o *score* de oocistos parece correlacionar negativamente com o *score* de *Enterococcus* spp ($\rho = -0,42$), fato que se pode confirmar no gráfico devido à posição oposta das duas variáveis.

Ainda dentro do círculo azul, é possível observar o posicionamento da variável "SBR" (*score* de fungos) que está correlacionada positivamente com o acesso ao exterior ($\rho = 0,45$) e embora que pouco perceptível no gráfico, também correlaciona com a variável *E. coli* ($\rho = 0,58$).

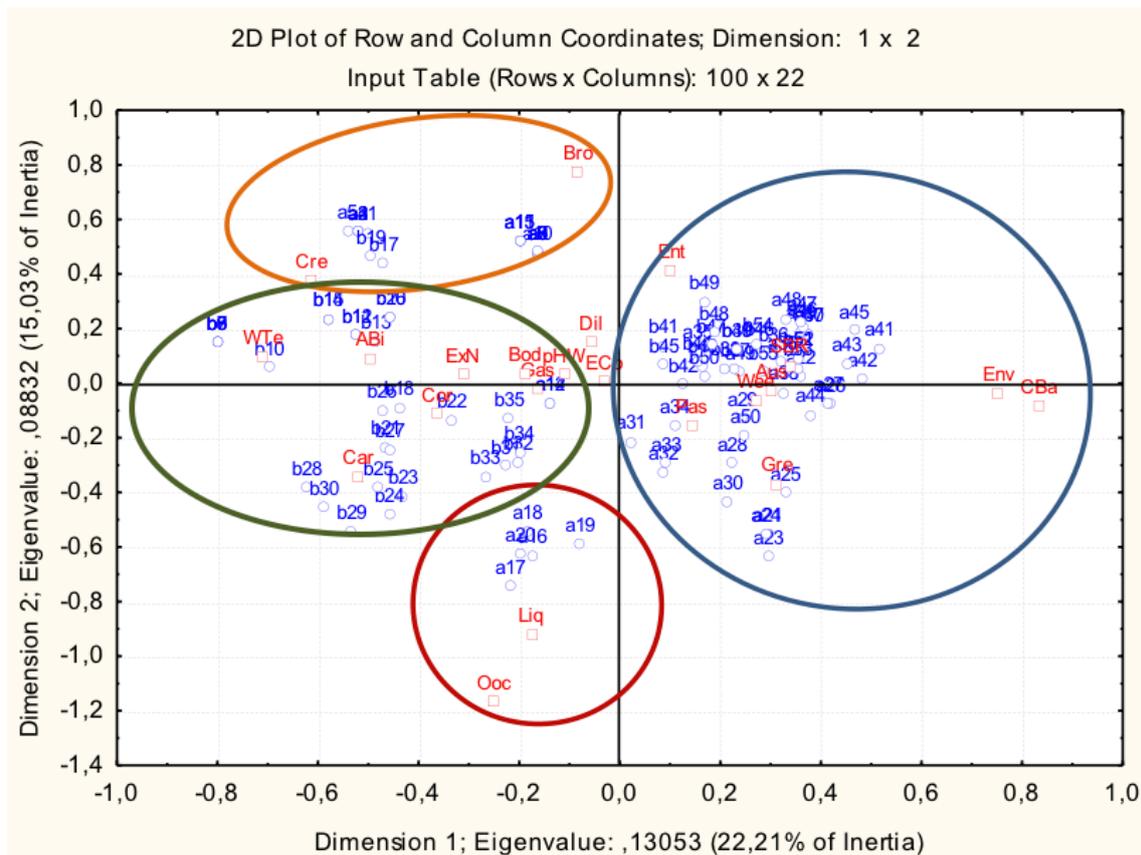


Gráfico 15. Análise de correspondência do ceco após retirada das variáveis: conteúdo caseoso ("Cas"), cor bege ("Bei"), trichomonas ("tri), ausência de cor ("Npr") e conteúdo duro ("tou").

No círculo laranja, é possível observar animais com o conteúdo cecal castanho (“Bro”) e consistência cremosa (“Cre”). A variável “Bro” correlaciona-se negativamente com o *score* de protozoários da família *Trichomonadidae* ($\rho = - 0,20$), antibioterapia ($\rho = - 0,41$), presença de coronavírus ($\rho = - 0,24$) e conteúdo líquido ($\rho = - 0,20$). Por esse motivo, estes animais encontram-se isolados dos outros grupos.

Por último, abordando o círculo verde, é possível observar o posicionamento de animais mais jovens, em grande parte da exploração B, sobre antibioterapia prolongada, sem acesso ao exterior e água de bebida com temperaturas elevadas, tal como relatado nos outros segmentos.

Nos anexos podem ser observados os gráficos da evolução do *score* das populações bacterianas ao longo das semanas no ceco.

4.7 Coloração GRAM

Após corar as lâminas de todos os segmentos intestinais, procedeu-se à observação e fotografia de campos de observação no microscópio para registo e execução de rácios entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como identificação de morfologias.

O presente método revelou que a identificação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas por vezes é impossível, gerando dúvidas na maior parte dos casos (figura 19, 20 e 21).

No intestino delgado, a observação de bactérias foi mais fácil que no ceco, ainda que por vezes difíceis de identificar.

No ceco, a observação e identificação dependeu muito do tipo de consistência e conteúdo intestinal, tendo sido impossível de fazer qualquer registo na maior parte das vezes, tendo em conta que se observou muitos aglomerados de bactérias sem que se consiga claramente perceber a composição (fig. 21).

Ainda assim, mesmo nas situações em que foi possível observar com clareza, encontrou-se uma grande variação de rácios e aparência, entre os 5 indivíduos analisados semanalmente (fig. 20), entre zonas diferentes do intestino e ao longo da mesma lâmina (fig. 19), tornando inexecutável qualquer tentativa de registo e quantificação.

No entanto, embora que o registo tenha sido impossibilitado, a coloração foi útil ao detetar bactérias com morfologias atípicas (arranjos em *Sarcina* p.e.) que foram

encontradas em animais infetados com protozoários flagelados, com conteúdos intestinais líquidos e gasosos (fig. 18). Estas bactérias podem ser observadas nas figuras 22-27.

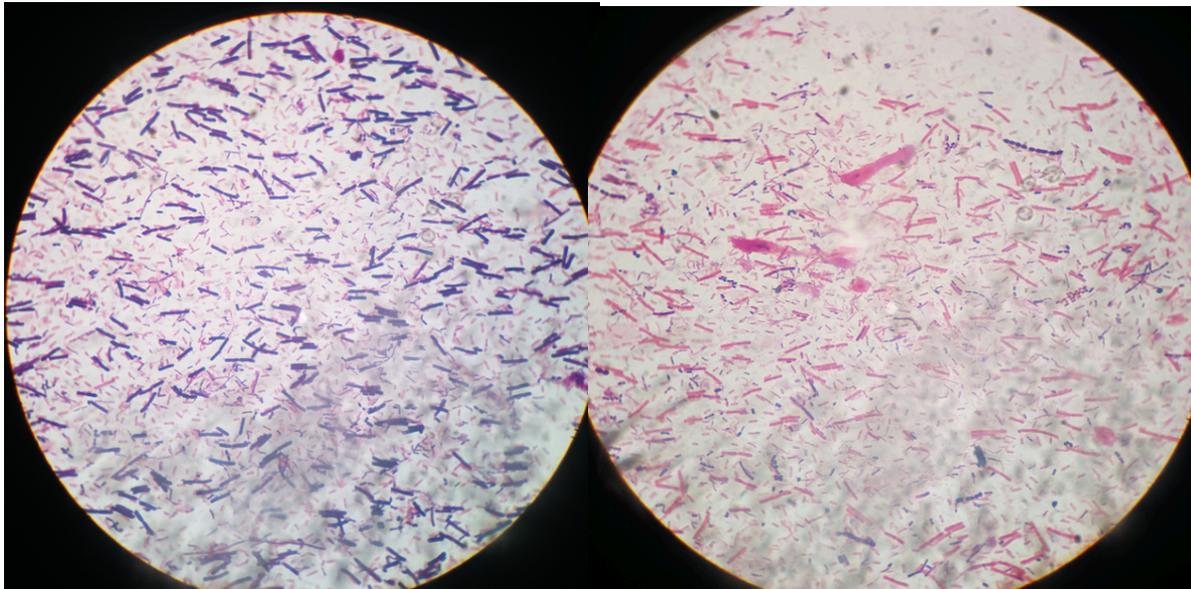


Figura 19. Imagem de microscopia optica da mesma lâmina que revelam a heterogeneidade de coloração (fotografias do autor)

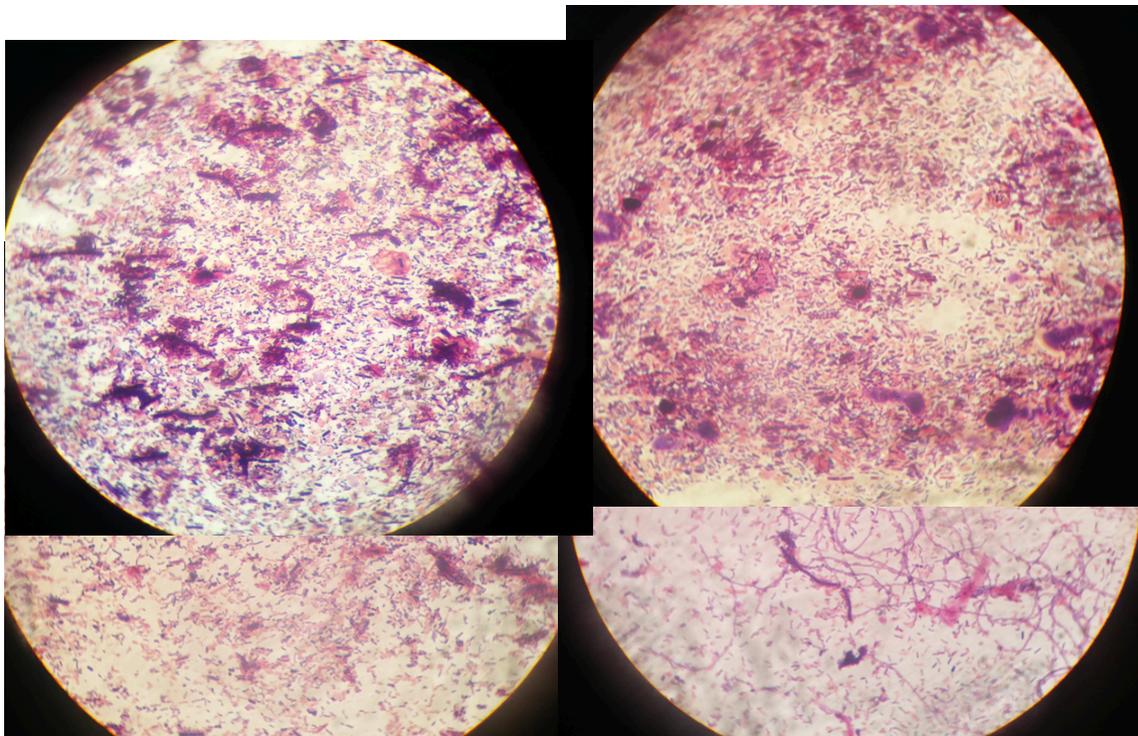


Figura 20. Imagem de microscopia optica de 4 conteúdos cecais de animais com a mesma idade, do mesmo lote, revelando heterogeneidade entre animais (fotografias do autor).

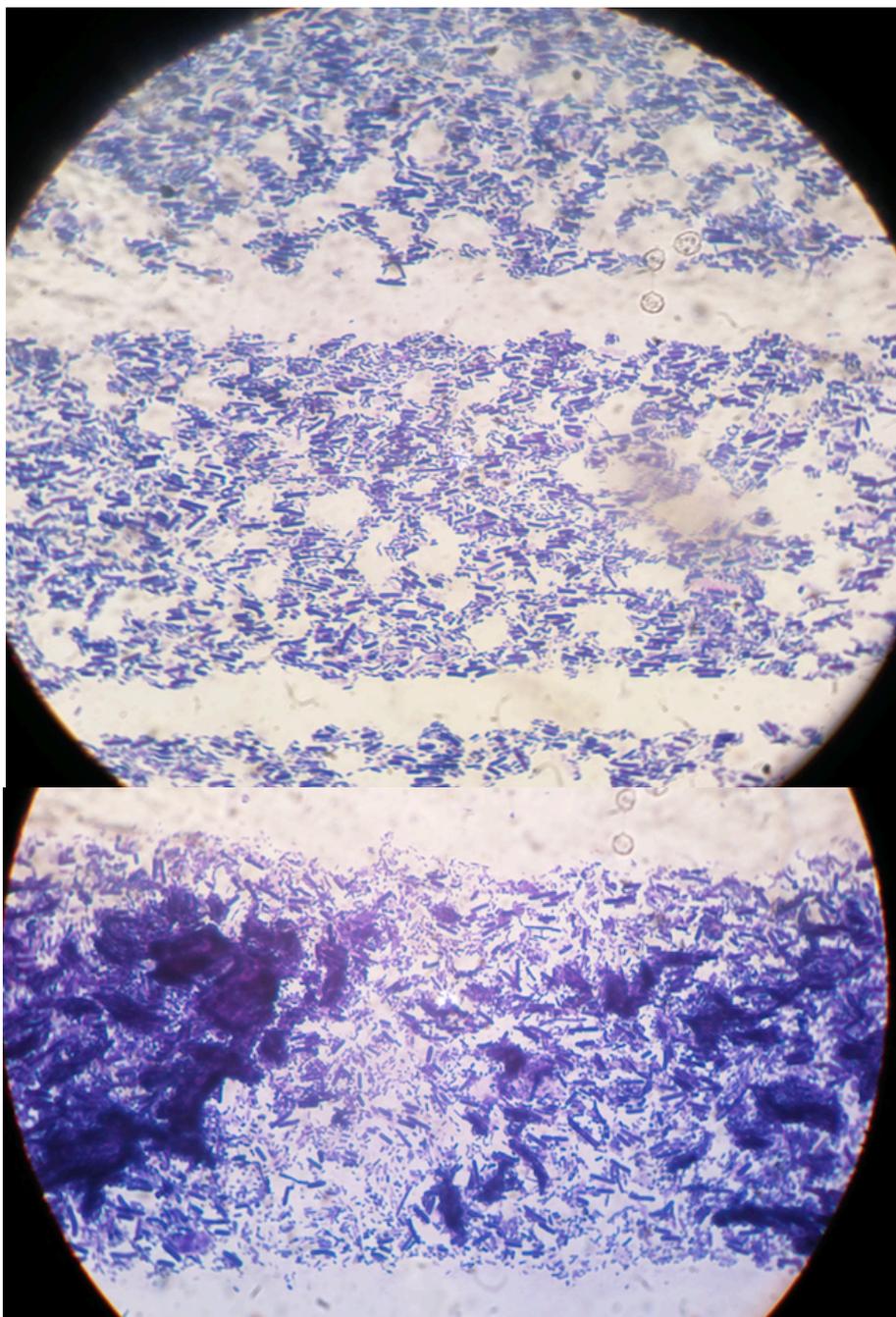


Figura 21. Imagem de microscopia otica de lâminas onde não se conseguiu diferenciar com clareza bactérias Gram-positivas de Gram-negativas (fotografias do autor)

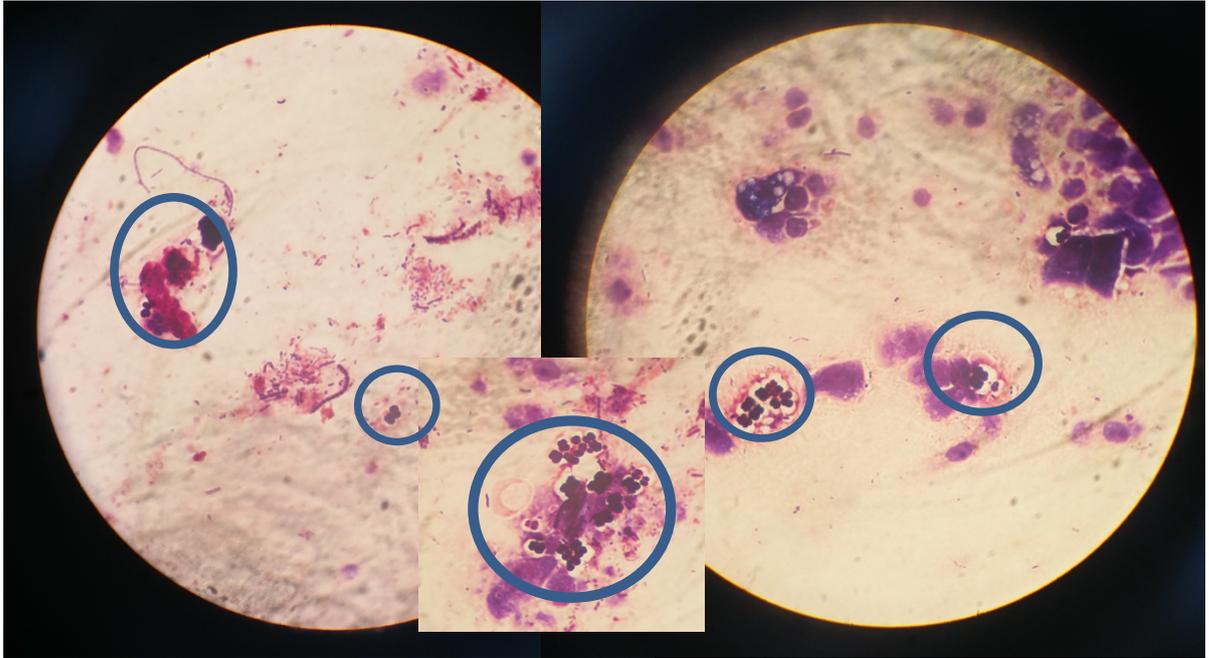


Figura 22. Imagem de microscopia ótica de um esfregaço do segmento jejuno/íleo onde se diagnosticou *Hexamita meleagridis*. Circulo azul – bactérias do género *Sarcina* (fotografias do autor).

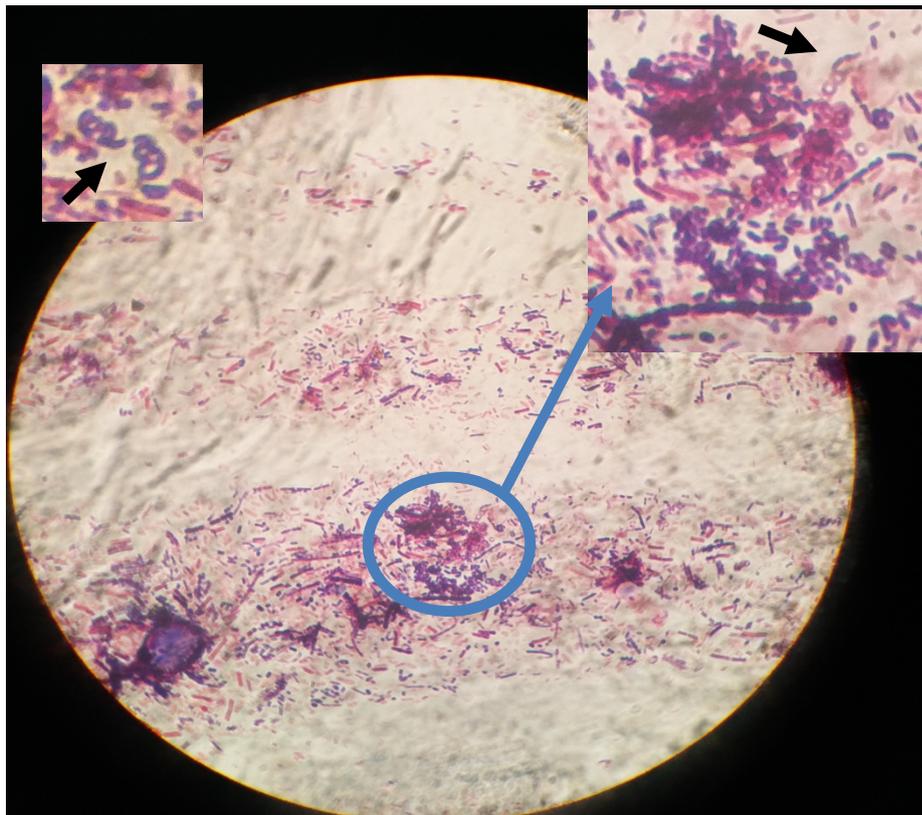


Figura 23. Imagem de microscopia ótica de um esfregaço de conteúdo cecal onde se encontraram protozoários da família *Trichomonadidae* (fotografias do autor).

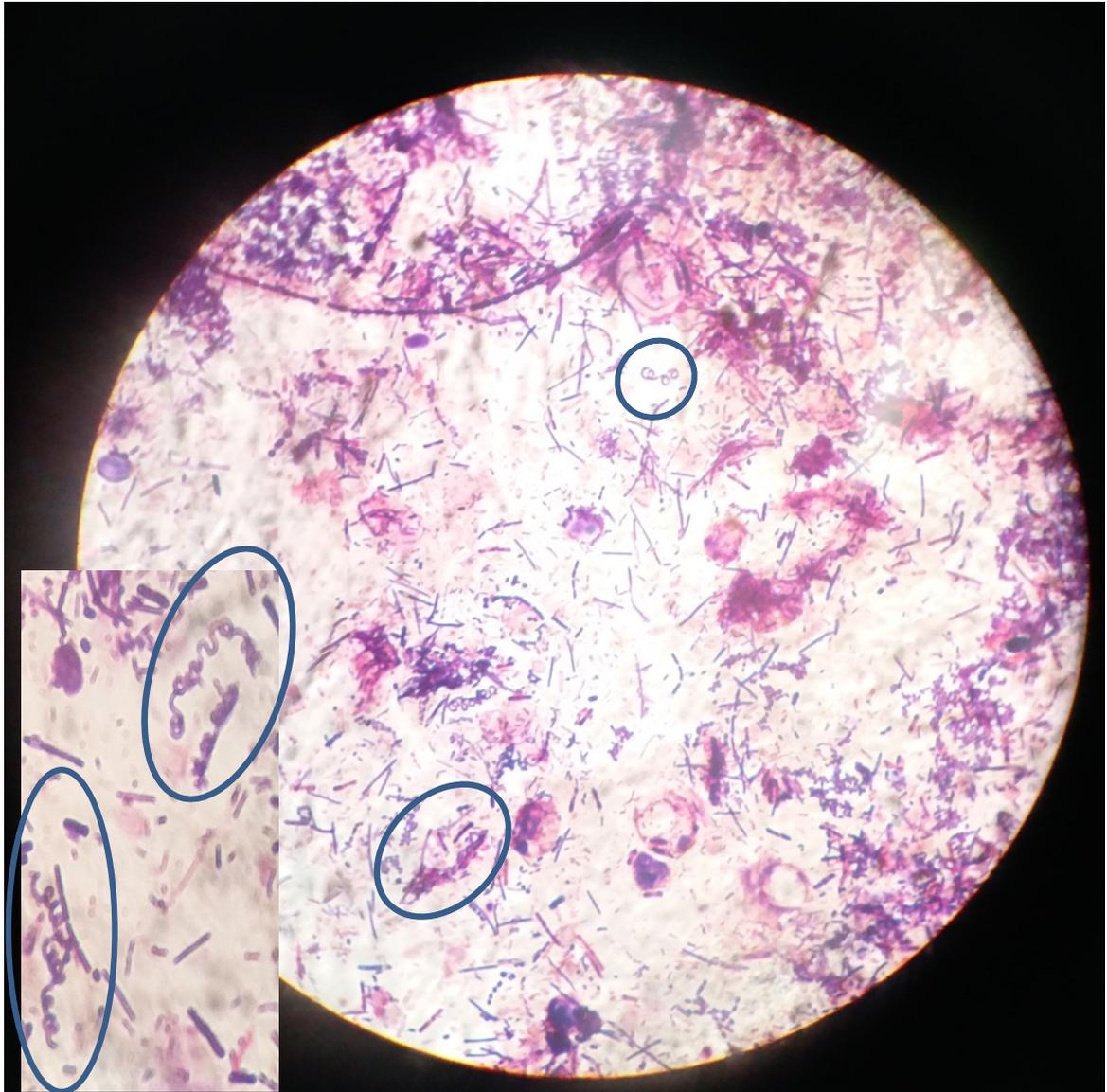


Figura 24. Imagem de microscopia ótica de conteúdo cecal onde se encontraram protozoários flagelados da família *Trichomonadidae* (fotografias do autor).

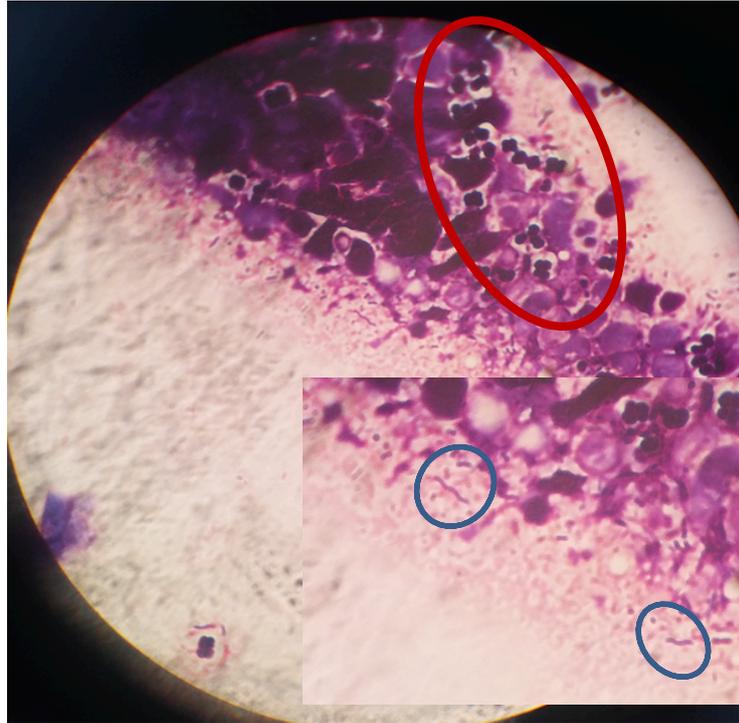


Figura 25. Imagem de microscopia otica de um esfregaço jejunal onde se encontrou *Hexamita meleagridis* (fotografias do autor).

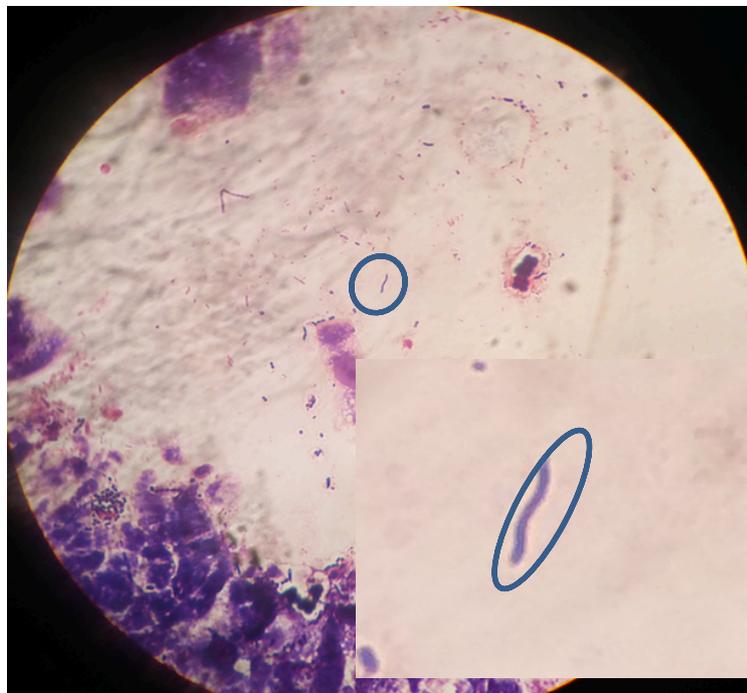


Figura 26. Imagem de microscopia otica de um esfregaço do segmento jejuno/íleo onde se detectou *Hexamita meleagridis* (fotografias do autor).

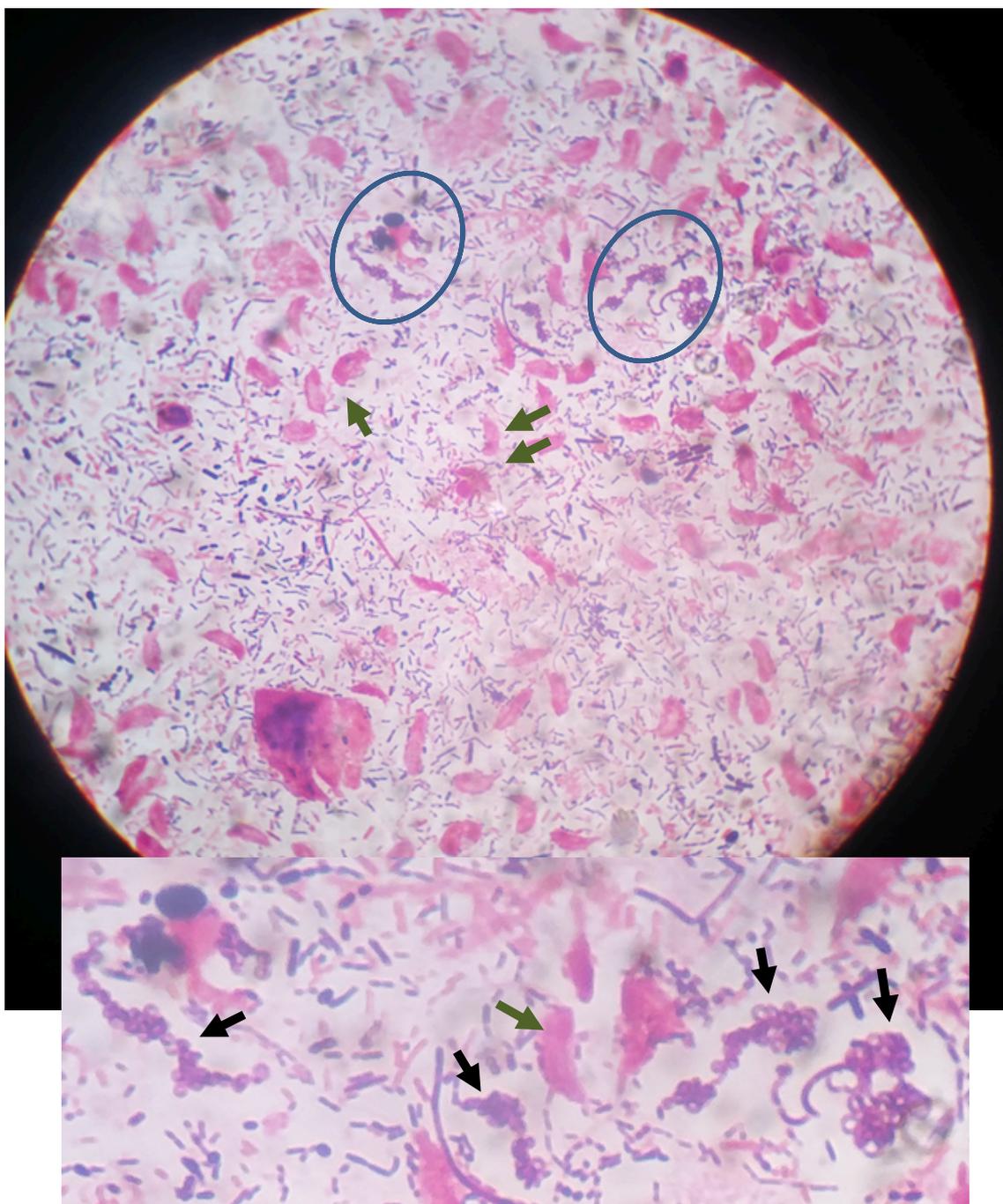


Figura 27. Imagem de microscopia ótica de conteúdo cecal onde se encontram parasitas da família *Trichomonadidae* (seta verde) e é possível observar bactérias com um formato atípico (seta preta).

4.8 May Grunwald Giemsa e Hemacolor®

Da mesma forma que a coloração Gram, após corar todos os segmentos intestinais, procedeu-se à observação e fotografia de campos de visão no microscópio óptico.

Não se observaram diferenças significativas entre a qualidade de coloração da técnica *Mgg* e o *kit* comercial *Hemacolor*®. Desta forma, o *kit* comercial revelou-se rápido e eficiente.

Neste estudo, o trabalho e experiência exigidos para a correta observação, identificação e quantificação de todos os estados parasitários tornou inválida a sua execução. No entanto, o registo fotográfico foi feito para apreciação geral e discussão da utilidade deste meio de diagnóstico.

No que concerne a animais infetados por *Eimeria* spp. a coloração revelou-se útil, uma vez que cora com facilidade os estados intermediários (fig. 28, 29, 30, 31), assim como protozoários da família *Trichomonadidae*, corando o parasita e os seus organelos (fig. 32).

No entanto, para protozoários da espécie *Spironucleous meleagridis* (*Hexamita meleagridis*) a coloração não permitiu uma correta identificação, resultando por vezes em imagens insatisfatórias (fig. 33 e 34).

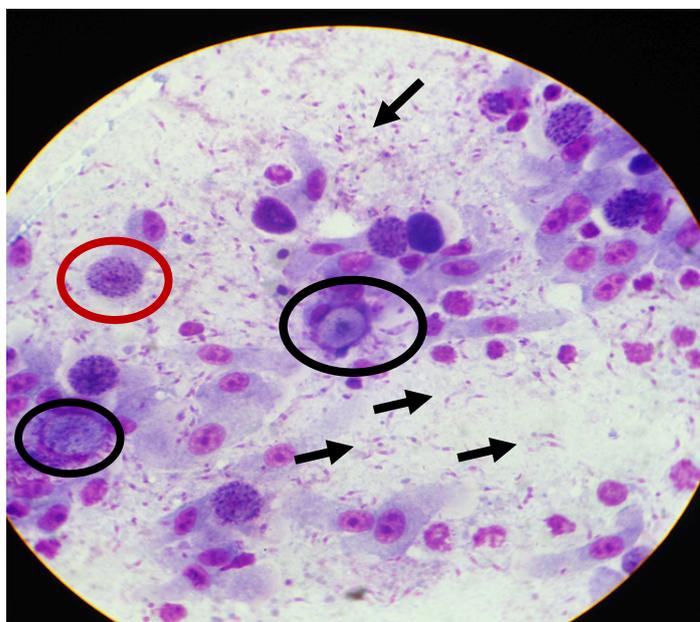


Figura 28. Coloração Mgg de um esfregaço duodenal, onde se observa com clareza merozoitos (setas pretas), oocistos (círculo preto) e, provavelmente, microgamontes com microgâmetas em formação (círculo vermelho) (fotografia do autor).

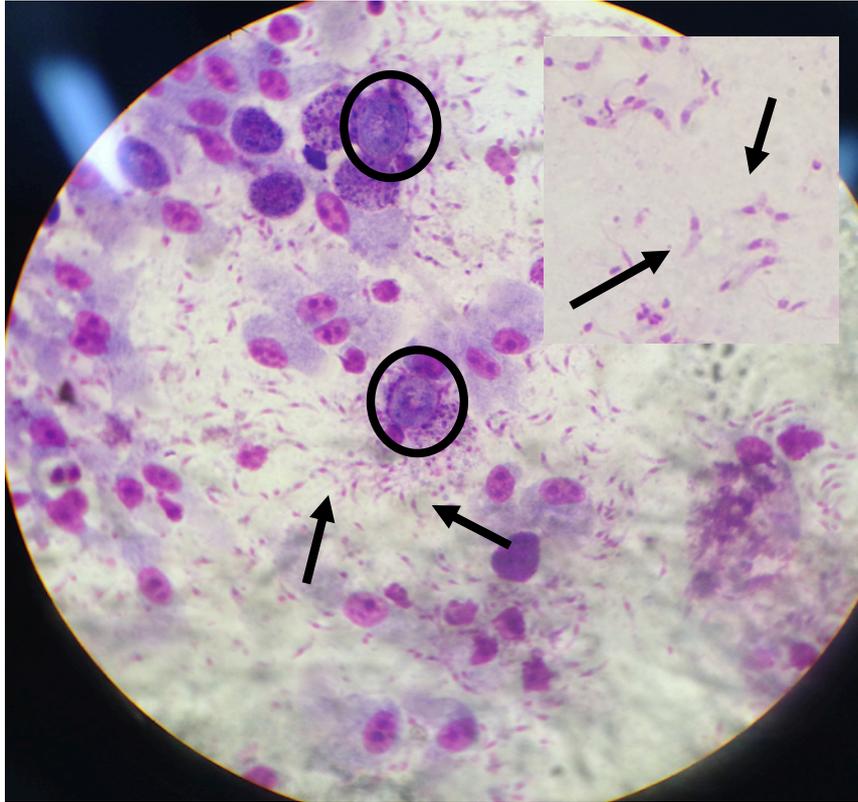


Figura 29. Coloração Mgg de um esfregaço duodenal, onde se observa com clareza merozoitos (setas pretas), oocistos (círculo preto) (fotografia do autor).

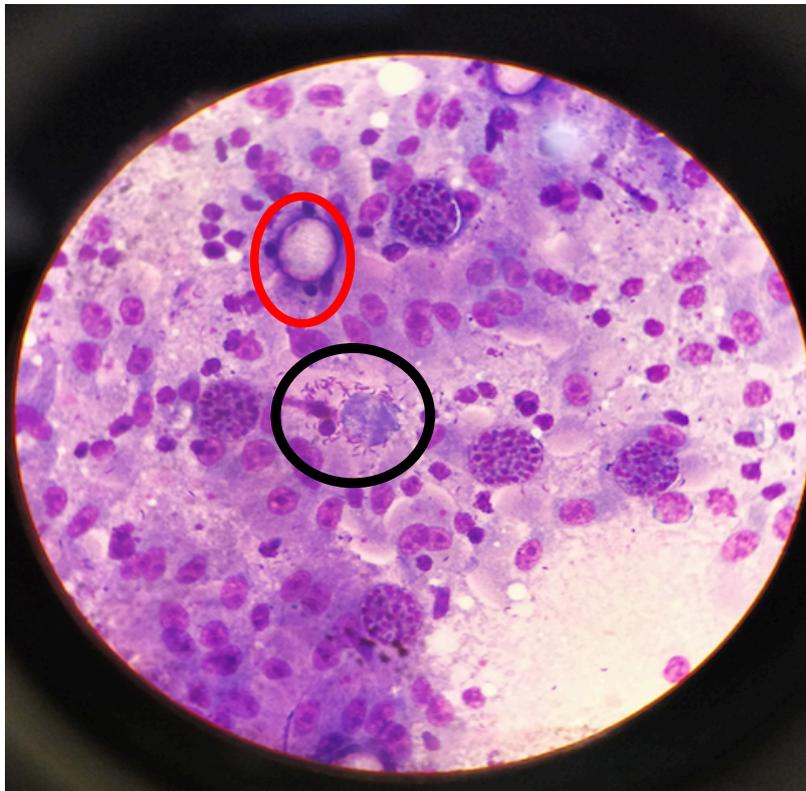


Figura 30. Coloração Mgg de um esfregaço duodenal, onde se observa com clareza microgametas (círculo preto) e um oocisto (círculo vermelho) (fotografia do autor).

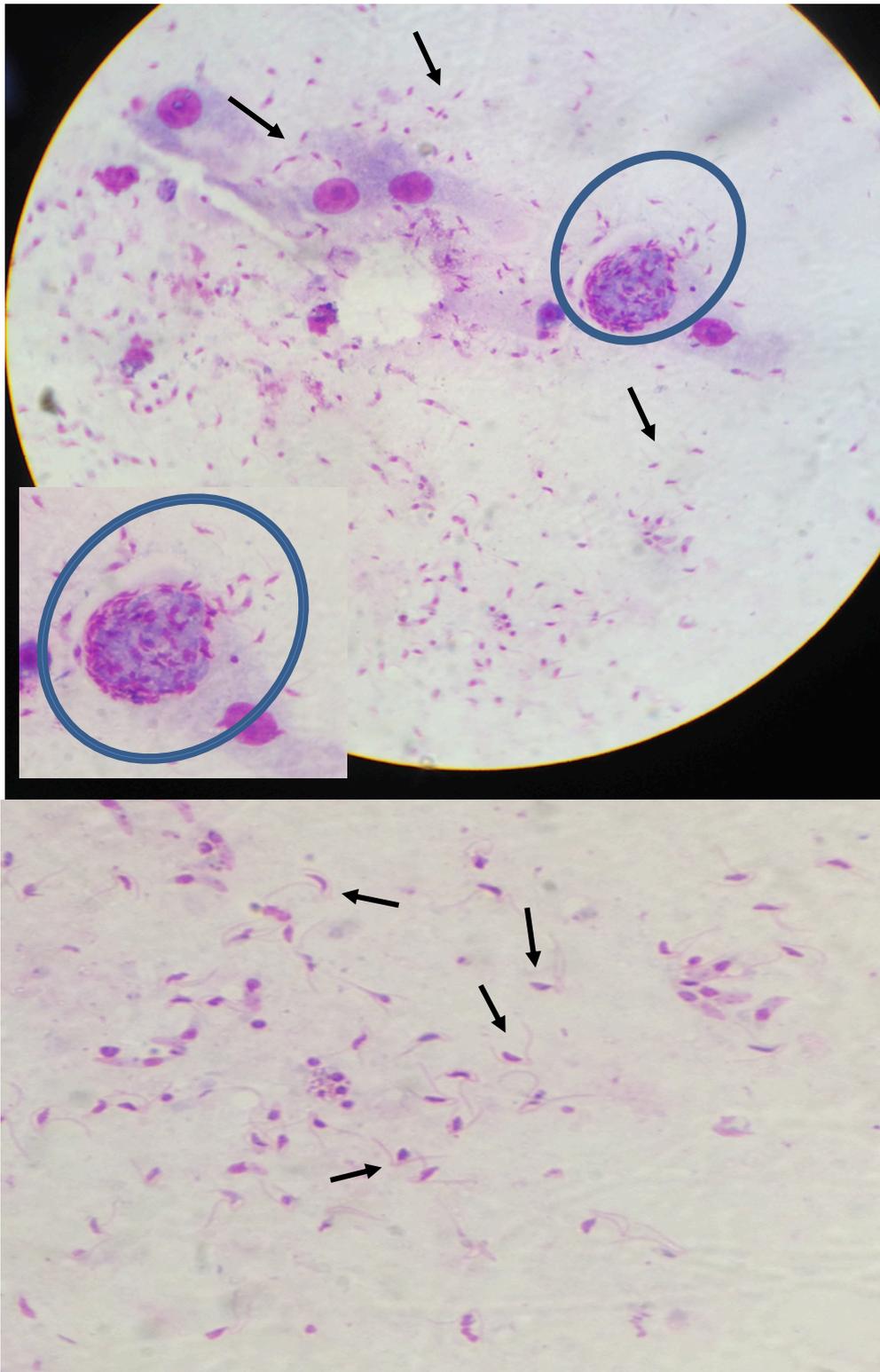


Figura 31. Coloração Mgg de um esfregaço duodenal, onde se observa com clareza um meronte em fase de liberação de microgâmetas (círculo azul) e microgâmetas livres no lumen intestinal (setas pretas) (fotografias do autor).

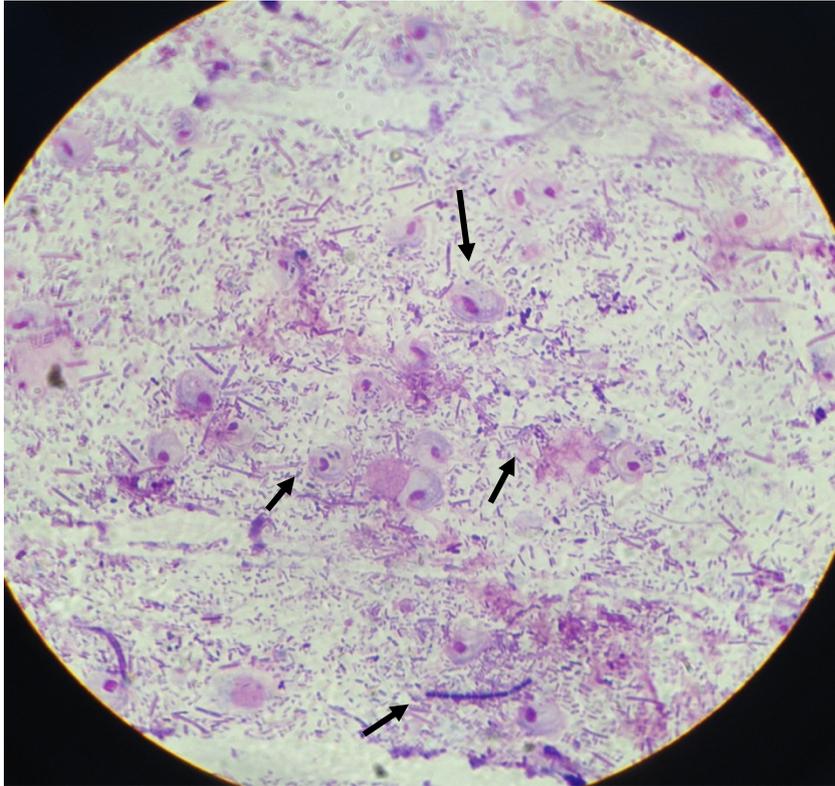


Figura 32. Coloração de um esfregaço de conteúdo cecal onde se detetou presença de protozoários da família *Trichomonadidae* (setas pretas) (fotografia do autor)

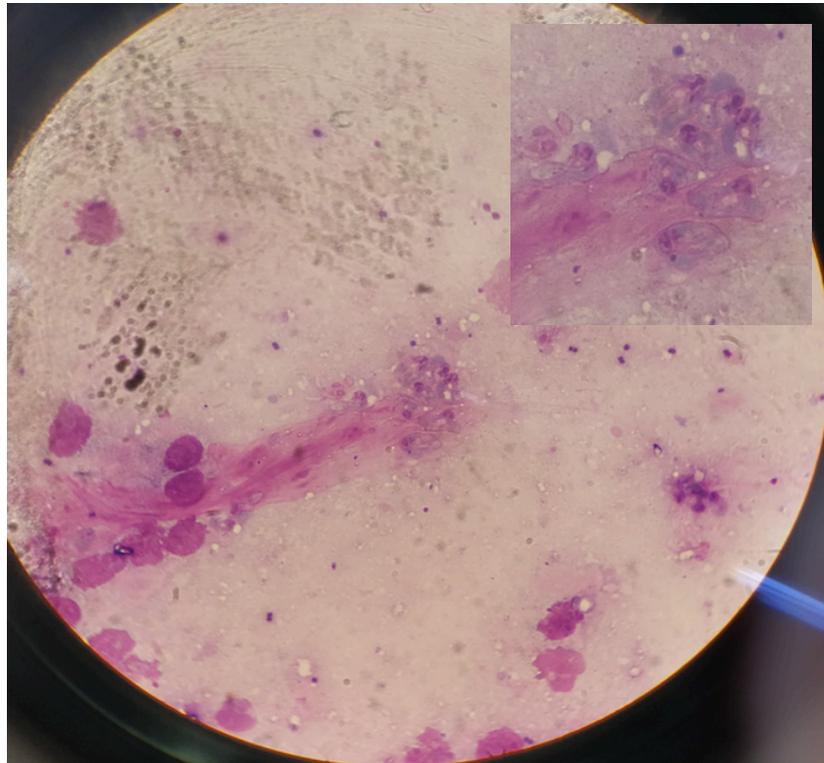


Figura 33. Coloração de um esfregaço por aposição do jejuno/íleo onde se detetou *Spirotrichus meleagridis* (fotografia do autor).

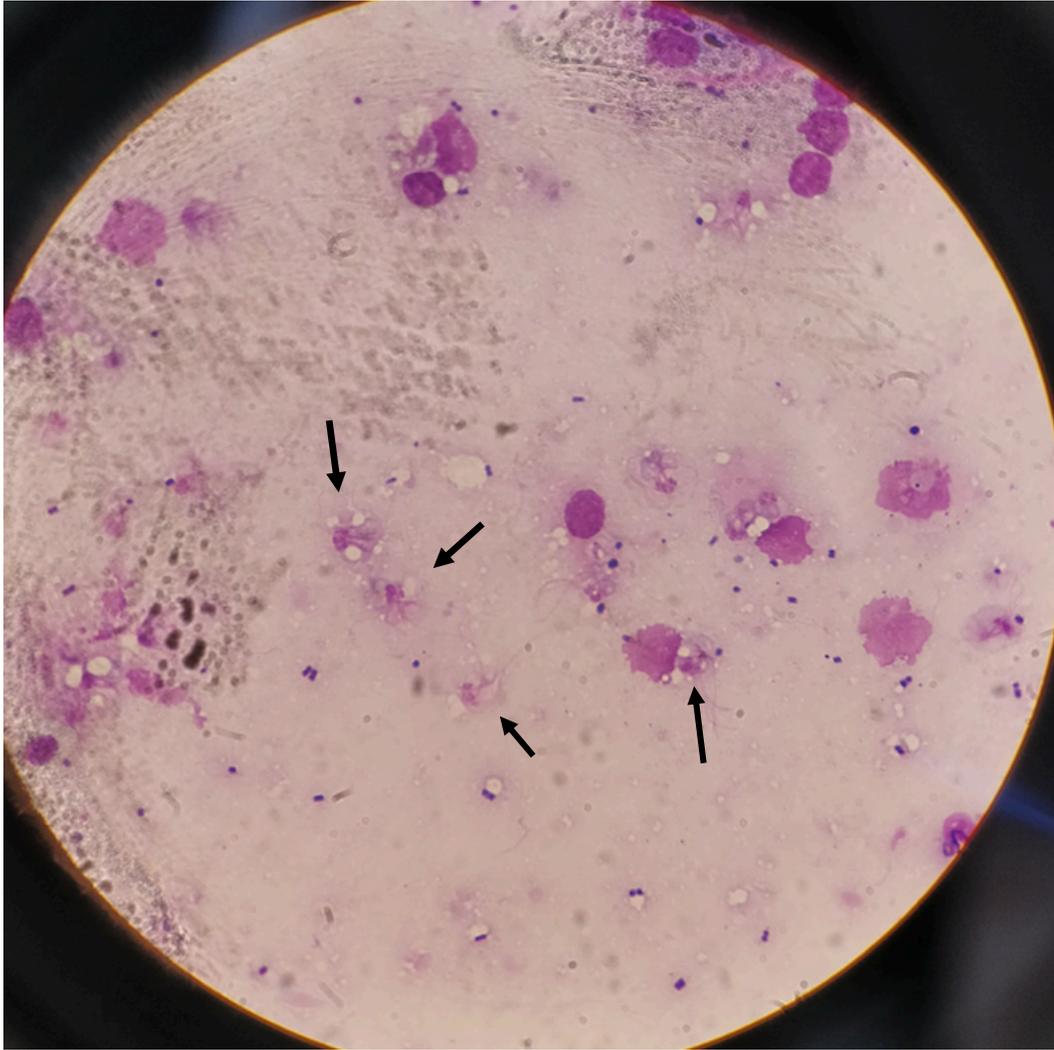


Figura 34. Coloração de um esfregaço por aposição do jejuno onde foi detectada a presença de *Spironucleus meleagridis*, onde a forma dos parasitas parece estar distorcida e perdendo a arquitetura original (fotografia do autor).

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Como foi possível observar, as duas explorações tiveram resultados completamente diferentes, permitindo uma análise de correspondências bastante elucidativa que possibilitou a comparação crítica ao nível de muitas variáveis.

É essencial referir que, embora a população estudada tenha sido aleatoriamente escolhida, o presente trabalho poderá ter sido influenciado por variáveis não mensuráveis inerentes a cada animal capturado e à exploração em si, não havendo qualquer grupo de controlo apropriado. Para além deste facto, a utilização de tratamentos poderá ter influenciado os resultados. Assim, os dados deverão ser analisados cuidadosamente e com sentido crítico.

5.1. DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E MANEIO

Após análise dos dados, através da interpretação dos gráficos e da análise estatística executada, é possível perceber que o desempenho geral da exploração A foi mais satisfatório que a exploração B.

Durante as dez semanas de avaliação, a mortalidade na exploração A (7%) foi cerca de um terço da observada na exploração B (20%). Etienne Schricke (1991e) concluiu que em explorações cinegéticas onde haja um plano profilático rigoroso e adaptado, a mortalidade normal poderá variar entre 5% a 8%, num período semelhante. No entanto, outros autores relatam que pela sua sensibilidade aos agentes intestinais, a mortalidade normal em perdizes pode alcançar 10 a 15% até ao fim do ciclo (J. Duperray, comunicação pessoal, 2010).

Através destes dados, conclui-se que a exploração A se encontra dentro dos parâmetros normais, e que a B, ao longo das 10 semanas, excedeu o limite tido como normal.

A saída para o parque de voo deu-se às 5 semanas na exploração A e às 7 semanas na exploração B. A altura ideal de saída para o exterior (parque de voo ou apenas pre-parque) é relativa, uma vez que depende do bando, das características meteorológicas e do tipo de instalações. No entanto, existem algumas referências que reportam para 5 a 6 semanas de idade (Muñoz, 2013) ou até mesmo 3 a 4 semanas (Schricke, 1991e).

Desde o início da criação, o objetivo é dar as condições necessárias às aves enquanto a sua capacidade termorreguladora não seja autossuficiente, no entanto, em contrapartida o grande desafio será acompanhar o crescimento dos animais e perceber a

sua necessidade de espaço, que culminará na saída para o parque de voo. O parque de voo, embora que possa representar muitos desafios para os animais, é importante para o treino do voo, qualidade do ar e espaço.

Todas estas variáveis deverão ser gradualmente interpretadas mimetizando o que acontece em situação natural.

Analisando a evolução da condição corporal nos gráficos anteriores, ainda que imperceptível, uma vez que é apenas uma média, pode perceber-se que foi muito mais instável na exploração B do que na A (gráfico 1 e 2). Na exploração A apenas se verificou 1 animal com condição corporal abaixo do ideal, enquanto que na exploração B se verificaram 11 ao longo das 10 semanas, num universo total de 100 animais eutanasiados e analisados. Embora que estes 12 animais possam não ser representativos, esta informação poderá refletir a heterogeneidade do lote.

Outro fator que diferencia o bom do mau resultado, é a instabilidade intestinal que se traduz em diarreia e por consequência em cama húmida (influenciando a qualidade do ar e o bem-estar das aves), obrigando o produtor muitas vezes a usar antibióticos de largo espectro, durante longos períodos de tempo. Este indicador (cama húmida) embora que não tenha sido registado e mensurado, foi observado com frequência na exploração B, com alteração perceptível da qualidade do ar.

A utilização de antibióticos na exploração A foi única, devido a uma diarreia na segunda semana de idade, não tendo sido necessária a sua utilização até ao fim do estudo. Na exploração B, observou-se a utilização recorrente de antibióticos ao longo do ciclo, à exceção da terceira semana.

No que concerne às características da água de bebida que foram mensuradas ao longo deste trabalho, pode-se observar uma grande diferença entre explorações, tanto ao nível do pH como da temperatura.

A temperatura correta da água é difícil de encontrar, no entanto, tal como foi demonstrado por Harris et al. (1974) e Eagleson (2014) parece haver preferência e melhores resultados em temperaturas iguais ou abaixo de 24°C e perda de performances em temperaturas altas como 26°C (ou acima) (Beker & Teeter, 1994; Eagleson, 2014).

Na exploração A, embora que na primeira semana excede-se os 26°C, pode-se observar ao longo das restantes semanas temperaturas iguais ou abaixo de 23°C, estando dentro dos parâmetros corretos.

Já a exploração B, manteve temperaturas iguais ou superiores a 26 °C durante as primeiras 5 semanas, com redução para 25°C na 6ª semana e apenas na 7ª semana se alcançou temperaturas menores que 24°C, coincidindo com a saída para o parque de voo.

Esta variável sofre a influência de vários fatores, incluindo meteorologia, sistema de abeberamento, tubagens e temperatura ambiental no interior do local de criação. Este último fator revela-se o mais importante, uma vez que as altas temperaturas requeridas nas primeiras semanas, alcançadas com o uso de aquecimento artificial, acabam por aquecer as tubagens e os bebedouros, fazendo com que a água aqueça, diminuindo o seu consumo.

No que concerne ao pH utilizado, a exploração A apresentou valores entre os 3 e 4 durante as primeiras 6 semanas, com a utilização de uma mistura de ácidos orgânicos, cessando o seu uso na 7ª semana, elevando os valores até ao fim do acompanhamento (valores entre 7 a 6).

A exploração B apresentou ao longo das 10 semanas, valores de pH entre 6 e 7, recorrendo, da mesma forma, ao uso de ácidos orgânicos.

Como relatado anteriormente, a escolha do pH é um compromisso entre segurança, palatabilidade e qualidade microbiológica. As aves poderão tolerar variações de pH entre 4 e 8 (Fairchild & Ritz, 2012), pelo que, nesse ponto de vista, as duas explorações tiveram resultados corretos. No entanto a exploração A parece apresentar níveis de pH muito ácido (3-4), que se afastam dos valores referenciados por Fairchild & Ritz (2012) (6), Kirkpatrick & Fleming (2008) (6-8) ou Tabler et al. (2013) (5-7).

Pensa-se que o pH ácido (4-3) possa representar um risco de dissolução de compostos das tubagens (chumbo e cobre p.e.) (Watkins, 2004) ou que seja perigoso para o trato gastrointestinal dos animais, no entanto, ao nível microbiológico parece ser a única forma de inibir a atividade microbiana, tornando o meio desfavorável ao desenvolvimento de *Clostridium*, *E. coli* e *Salmonella* (Hardin & Roney, 1989). Ao nível zootécnico, Watkins (2004) relatou a melhoria de performances e a correta consistência das fezes com o pH entre 3 e 5.

Nos animais da exploração A, analisados semanalmente, não se encontrou nenhuma lesão ao nível gastrointestinal que possa ter sido associada ao uso do ácido. Ao nível do lote, não se detetou cama húmida e diarreias frequentes, à exceção da segunda semana, pelo que os níveis de pH praticados pareceram satisfatórios ainda que haja muitas variáveis envolventes e parâmetros não avaliados.

Reunindo os fatores zootécnicos e fazendo um balanço geral, entende-se que embora dependente de outras variáveis não abordadas neste capítulo (parasitoses p.e.) há uma junção de fatores de mau manejo na exploração B. Este fato foi comprovado na análise de correspondência ao nível de todos os segmentos intestinais, havendo sempre um posicionamento tendencioso de um grupo de animais entre o segundo e o terceiro quadrante. Neste grupo posicionam-se, maioritariamente, animais da exploração B que parecem ter em comum o facto de não ter acesso ao exterior (confinamento), água de bebida quente, tratamento antibiótico e por vezes diminuição da condição corporal.

Embora difícil de retirar quaisquer conclusões, entende-se que as primeiras idades (iniciação) são das alturas do ciclo de produção mais problemáticas, uma vez que os perdigotos necessitam de muitas condições, pelo facto de ainda não regularem corretamente a temperatura corporal e não serem imunocompetentes.

Estas condições fazem com que o confinamento seja obrigatório e ao mesmo tempo complicado, correndo-se o risco de haver stress (térmico essencialmente), quebras de consumo de água e alimento e diarreias, instalando-se um ciclo difícil de quebrar.

5.2. PARASITOSSES

Começando pela coccidiose, em espécies cinegéticas é difícil de definir, no entanto a sua presença num bando poderá significar mortalidades superiores a 50%, com grande morbidade e perdas associadas a infeções bacterianas e problemas comportamentais (picacismo p.e.) (Eva Pendleton, comunicação pessoal, 2009).

A epidemiologia referenciada em perdizes é escassa, no entanto, Bolognesi et al. (2006) observaram mortalidades entre 46,5% e 52%, com início entre a 4ª e a 5ª semana de idade. Naciri et al. (2014), de uma forma pormenorizada, através da inoculação de oocistos revelaram que em infeções únicas a mortalidade é baixa, tendo sido nula em infeções no intestino delgado (*E. caucasica* e *E. Kofoidi*) e cerca de 2% em infeções ao nível do ceco (*E. legionensi*). A infeção única cecal traduziu-se por impacto no crescimento, revelando mortalidade

Nesse mesmo trabalho, foi observado que em infeções triplas (duodeno, jejuno\íleo e ceco afetados) a mortalidade chegou aos 28% com impacto no crescimento e que os dados das infeções duplas se encontram entre os valores anteriormente referidos (*E. caucásica* e *E. legionensis*: 11%).

Em situação de campo as infeções triplas são mais frequentes e o aparecimento da sintomatologia parece dar-se entre a 3ª e a 5ª semana de idade (Pagés, 1991; Bolognesi et al., 2006), tal como em frangos de carne (3ª- 6ª semana) (MacDougald & Fitz-Coy, 2008).

Tanto na exploração A como na B, a primeira infeção foi à 3ª semana de idade, ao nível do ceco, tal como reportado por Pagés (1991), representando mortalidades de cerca de 1% nessa semana, à semelhança da mortalidade referenciada por Naciri (2014) em infeções únicas ao nível do ceco (2%). No entanto, o impacto ao nível do crescimento foi mais evidente na exploração B, onde se pode observar uma diminuição geral da condição corporal (gráfico 2 e fig. 36)

Após a 3ª semana, os tipos de infeção diagnosticados divergiram nas duas explorações. Na A continuou a observar-se coccidiose, com evolução para outros segmentos, enquanto que na B houve complicação por outros parasitas.

5.2.1 Exploração A

Observaram-se nas semanas seguintes os 3 segmentos intestinais afetados (duodeno, jejuno/íleo e ceco) à exceção da 8ª (apenas jejuno/íleo) e 10ª semana (apenas ceco). Através da observação do gráfico, entende-se que os *scores* de oocistos máximos alcançados foram entre a 4ª e a 7ª semana de idade demonstrando sinais evidentes de coccidiose.

Com os dados de Naciri (2011; 2014) é possível perceber que, embora neste trabalho não se tenham identificado espécies de *Eimeria* spp., pela localização dos oocistos encontrados (intestino delgado e ceco) esteve-se perante uma infeção tripla ou dupla. Provavelmente, por *Eimeria legionensis*, tendo em conta que é a única com tropismo cecal, e *Eimeria kofoidi* uma vez que as suas lesões características foram encontradas (fig. 35).

Pelo facto de não se ter diferenciado oocistos e de *E. caucasica* não ter lesões patognomónicas é difícil perceber se esteve envolvida na infeção do intestino delgado.

A mortalidade total desde o primeiro diagnóstico foi de 2,35%, embora que possa ter sido devido a outros fatores, este valor é o máximo atribuível à coccidiose, não corroborando com os valores de Naciri et al. (2014) para infeções triplas (28%), nem para infeções duplas por *E. caucasica* e *E. legionensis* (11%). No entanto parece aproximar-se dos valores dos mesmos autores para infeções duplas por *E. kofoidi* e *E. legionensis* (4%) que provavelmente estiveram presentes neste caso.

Abordando as lesões encontradas neste lote, ao nível do intestino delgado, foi possível observar duodenite mucoide, enterite catarral, focos necróticos, conteúdos líquidos, por vezes multicolorados, sangue digerido, alterações ao nível da parede intestinal (variações da espessura p.e.) e flacidez geral.

Estes dados coincidem quase na totalidade com os descritos por Naciri et al. (2011) após inoculação de oocistos, no entanto estes autores observaram alterações acentuadas ao nível da cor do conteúdo (amarelo, verde, verde-florescente) e falsas membranas, que não foram observadas neste caso. O sangue digerido encontrado, também não foi descrito pelos autores referidos, no entanto Naciri et al. (2014) descreveram a existência de manchas de sangue no muco presente em diarreias.

No ceco, as alterações observadas foram a falta de dilatação, palidez, conteúdos líquidos de diferentes cores (bege, alaranjado e verde p.e.) e gás.

Estas alterações corroboram, mais uma vez, com os dados de Naciri et al. (2011) no entanto, os autores observaram nódulos caseosos no lúmen cecal, hemorragias na mucosa e fortes alterações inflamatórias catarrais, que não foram detetadas nesta exploração.

Relativamente aos sinais clínicos, tal como descrito anteriormente, a condição corporal foi boa ao longo da avaliação, não se tendo observado heterogeneidade do lote, nem animais prostrados, sendo a mortalidade apenas de 2,35%. Não se presenciou a existência de cama húmida, no entanto, embora não se tenham detetado animais com diarreia é provável que tenha existido, tendo em conta que era um lote grande e a visita era feita uma vez por semana.

Os dados relativos à sintomatologia e à forma como os animais deste lote responderam à infeção revelam que a coccidiose não se refletiu na performance nem na qualidade do bando. Na necrópsia foi possível observar aves em condições corporais excelentes, no entanto com sinais evidentes de coccidiose a nível intestinal (fig. 50).

Estes dados não corroboram com a sintomatologia típica referenciada nas mais variadas publicações, como a existência de heterogeneidade, animais despigmentados, olhos semi-cerrados, penas eriçadas (Borges, 2007), asas tombadas, diarreias líquidas, alterações no consumo de água e alimento (Schericke, 1991) e odor a sangue digerido (Chatenet, 2014a).

É difícil perceber o porquê de os animais terem respondido tão bem à coccidiose, não evidenciando quaisquer sinais de doença antes da necrópsia, no entanto os bons

parâmetros zootécnicos (boa gestão das temperaturas, acidificação da água e biossegurança) poderão ter sido cruciais e suficientes para evitar maior mortalidade.

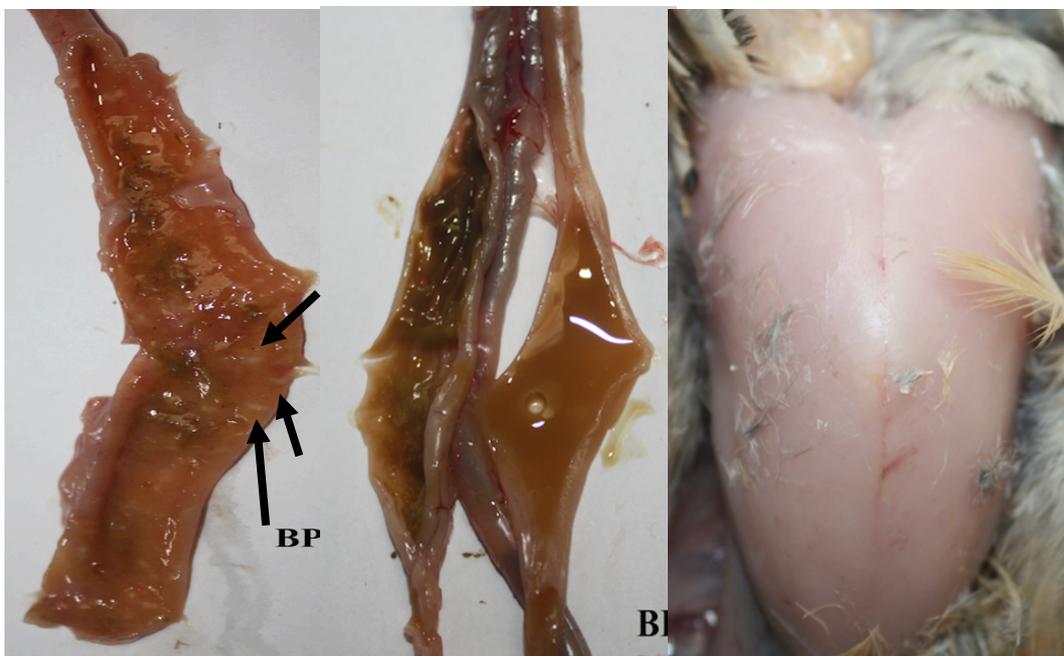


Figura 35. Animal da exploração B com evidente coccidiose ao nível do ceco e duodeno. Podem observar-se focos necróticos semelhantes às lesões de *Eimeria kofoidi* (setas pretas). Este animal, apesar da evidente coccidiose, apresenta a condição corporal ótima (fotografias do autor).

5.2.1 Exploração B

Deve-se salientar que, ao contrário do que se observou na exploração A, neste caso diagnosticaram-se 3 tipos de parasitas diferentes, todos eles em baixa quantidade.

Na tabela 4 é possível compreender que, tanto o número de segmentos infetados com oocistos, como o *score* em cada um, foi mais elevado na exploração A que na B, no entanto a exploração A demonstrou melhores resultados em comparação à B.

Este facto sugere que a infeção por *Eimeria* spp. poderá não ter sido a responsável pela alta mortalidade e baixa performance da exploração B, ainda que se deva ter em conta que foi usado tratamento coccidicida na semana 4 e 9.

Tabela 4. Soma dos scores de oocistos encontrados em cada segmento e soma do número de segmentos infetados com oocistos na exploração A e B.

	Soma dos <i>scores</i> de cada segmento			Numero de segmentos afetados		
	Duodeno	Jejuno/íleo	Ceco	Duodeno	Jejuno/íleo	Ceco
A	51	25	63	21	14	26
B	15	10	45	6	5	16

Observou-se neste caso que a coccidiose diagnosticada foi, praticamente, única até à 6ª semana ao nível cecal, tendo-se alcançado 10% de mortalidade durante as 3 semanas, não estando de acordo com a mortalidade descrita por Naciri et al. em 2014 (2%), nem pelos mesmos autores em 2011 (4%) para infeções únicas cecais.

Um facto que poderá ter potenciado o aumento da mortalidade foi a existência concomitante de protozoários da família *Trichomonadidae* que se detetou à 5ª semana de idade, coincidindo com o pico de mortalidade, permanecendo presente em baixas/médias quantidades até ao fim da avaliação.

O multiparasitismo acentuou-se ao longo da avaliação, tendo-se detetado a presença de oocistos em todo o intestino delgado, bem como presença de *Spironucleus meleagridis* no jejuno/íleo.

Estes factos corroboram com a descrição de Schricke (1991d) sobre a forma crónica da infeção por tricomonas (início à 4ª/5ª semana de idade) relatando que estão frequentemente associados a outros parasitas.

O mutiparasitismo e a existência constante de utilização de antibióticos, fazem com que não se consigam atribuir valores corretos de mortalidade a agentes específicos, como na exploração A, invalidando quaisquer tentativas de corroborar os valores alcançados.

Em relação às alterações cecais encontradas nas infeções únicas por *Eimeria* spp., pôde-se registar, da mesma forma que na exploração A, alterações do conteúdo (essencialmente líquido), palidez, perda de dilatação e existência de nódulos caseosos (fig. 36), que não se observaram na exploração A. Mais uma vez, todas estas informações corroboram com os dados de Naciri et al. (2011), embora que as alterações que os autores observaram nos cecos foram mais exuberantes.

O impacto no crescimento foi evidente, observando-se vários animais em condições corporais como a da figura 36 (magro), ao contrário do que se observou na exploração A.

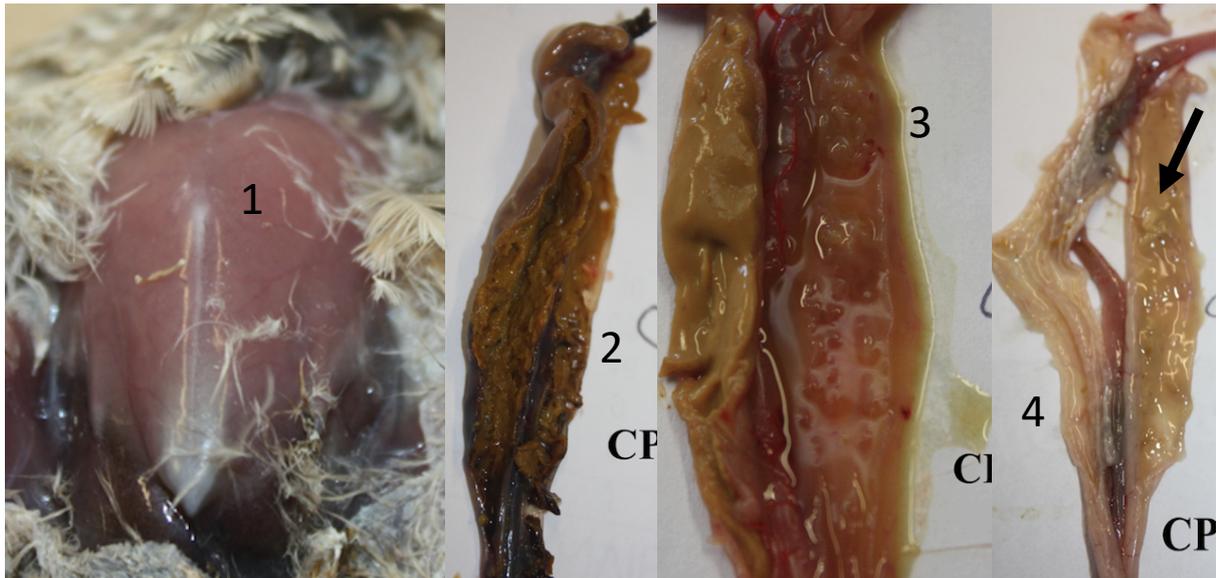


Figura 36. Fotografias de animais infetados por *Eimeria* spp.: 1- Condição corporal de classificação 2 (magro); 2- Ceco em fase inicial de coccidiose com alterações ao nível do conteúdo (pastoso); 3- Ceco com alterações ao nível do conteúdo (líquido); 4- Ceco com diminuição da dilatação e presença de um nódulo caseoso (seta preta), responsável pela tonalidade bege do conteúdo cecal; (fotografias do autor).

No que diz respeito às alterações provocados pelos protozoários da família *Trichomonadidae*, foi possível encontrar os cecos dilatados em excesso, conteúdos líquidos, gasosos na maior parte das vezes, com cores entre o verde e o amarelo. Estes animais encontravam-se frequentemente magros, prostrados e com diarreias líquidas (fig. 18 e 37).

Estes dados (lesões e sintomatologia) coincidem com a descrição de Chatenet (2014b), Schricke (1991d) e Guérin et al. (2011b), embora que não se tenham detetado lesões no fígado como descritas por Liebhart et al. (2014). O conteúdo cecal líquido correlacionou-se positivamente com a existência do parasita ($\rho = 0,34$).

Na infecção por *Spironucleus meleagridis*, observou-se conteúdo líquido no jejuno/íleo (fig. 37) e sintomatologia semelhante à da infecção anteriormente descrita, estando de acordo com os dados de Chatenet (2014b). O autor relata também que este parasita precede com frequência as infecções por tricomonas, tal como observado neste caso.

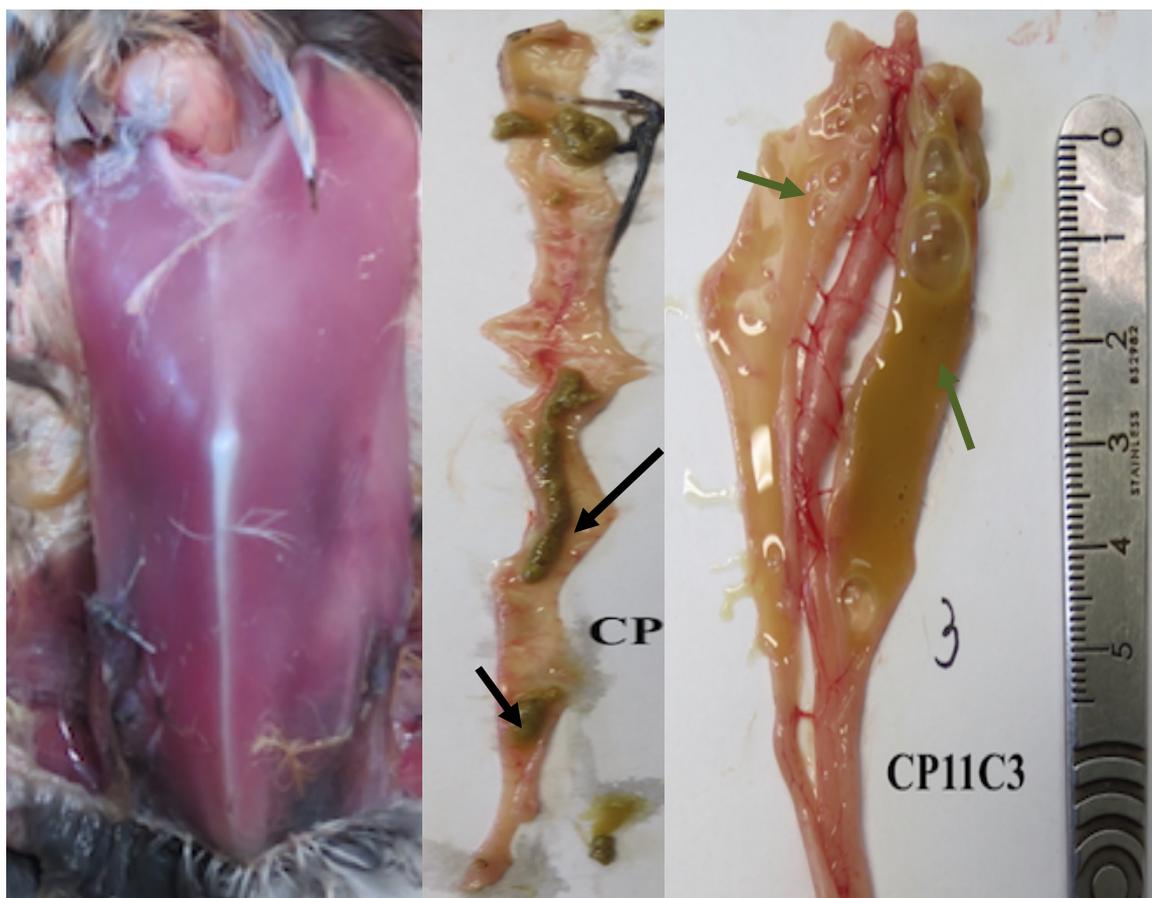


Figura 37. Fotografia de animal magro, com infecção concomitante de *Spiroucleus meleagridis* no intestino delgado e tricomonas no ceco. Setas pretas - conteúdo intestinal cilíndrico verde acompanhado de conteúdo líquido; Setas verdes – Conteúdo cecal líquido com gás; (fotografias do autor).

No que diz respeito às lesões e alterações no intestino delgado em animais com coccidiose, foram semelhantes às encontradas na exploração A (enterites mucoides essencialmente), à exceção da deteção de lesões típicas de *Eimeria kofoidi*, deixando a dúvida à cerca dos tipos de infecção. As alterações corroboram com os dados de Naciri et al. (2014; 2011).

Abordando a terapia dos protozoários flagelados é crucial referir, mais uma vez, que as associações de antibióticos frequentemente praticadas não são eficazes no combate aos protozoários, uma vez que apenas atingem as bactérias que servem de alimento para o parasita. Chatenet (2014b), referiu que o uso indiscriminado dos mesmos levou a uma perda de eficácia, possível de se observar neste caso, uma vez que mesmo sobre associações de antibióticos os protozoários continuaram a ser detetados ao longo da avaliação.

Abordando, da mesma forma, a eficácia dos produtos coccidicidas, foi possível observar que o uso de toltrazuril, na 5ª semana, não se revelou eficaz tendo-se observado

coccidias e lesões nas semanas seguintes. Talvez o seu uso possa ter reduzido a possibilidade de observar mais oocistos em outros segmentos, bem como lesões, no entanto a perda de eficácia por parte dos produtos coccidicidas químicos ou sintéticos é frequentemente documentado pela existência de poucas moléculas, seleção de parasitas resistentes e essencialmente uso a longo-termo (Gerhold et al., 2016).

5.3. POPULAÇÕES BACTERIANAS

5.3.1 Relação entre o parque de voo e microorganismos

Após a análise de correspondências, foi possível identificar em todos os segmentos, que há um grupo a apresentar uma forte tendência para o 1º e 4º quadrante. Este grupo arrastou consigo variáveis como: *score* de *Campylobacter* spp. no intestino, acesso ao exterior ou parque de voo, idade e *score* de oocistos.

É fácil perceber o porquê do *score* de oocistos se deslocar na mesma direção de “acesso ao exterior”, uma vez que no parque de voo o meio é muito contaminado e a sua desinfecção é difícil, sendo por vezes um *trigger-point* para coccidioses. Estas variáveis correlacionaram positivamente entre si, tanto no duodeno ($\rho = 0,44$) como no jejuno/íleo ($\rho = 0,38$).

O posicionamento da “idade” também é presumível uma vez que só animais maturos é que têm acesso ao parque de voo (5ª semana na exploração A e 7ª na exploração B).

No entanto e de forma inesperada, *Campylobacter* spp. posicionou-se neste grupo, revelando que todos os animais com acesso ao exterior apresentaram presença ou elevados scores de *Campylobacter* spp. em todos os segmentos intestinais, observando-se uma forte correlação no duodeno ($\rho = 0,95$), jejuno/íleo ($\rho = 0,86$) e ceco ($\rho = 0,81$). Esta circunstância pode ser observada nos gráficos 16 e 17.

Este facto revela-se importante, não só por ser a maior correlação encontrada durante o trabalho, mas também pelo facto anteriormente abordado sobre os parques de voo, uma vez que são espaços naturais delimitados por rede, onde é difícil fazer uma correta desinfecção. Estes parques são semelhantes aos utilizados na produção de frangos ao ar livre, que são considerados, frequentemente, um fator de risco para colonização de *Campylobacter* spp. em sistema de produção orgânico (Vandeplas et al., 2010; Rivoal et al., 2005; Huneau-Salaun et al., 2007).

Campylobacter spp. não é frequentemente patológico em aves de produção, no entanto, as mesmas parecem ser o reservatório da bactéria no trato digestivo, tornando a carne de ave a principal fonte de contaminação para o humano (Guérin et al., 2011c), sendo considerado a causa mais comum de gastroenterite de origem bacteriana a nível global (Heuer et al., 2001). Apesar deste facto frequentemente relatado em avicultura industrial, Bezille (2015) descreveu que em aves cinegéticas *Campylobacter* spp. pode estar envolvido em certos distúrbios intestinais.

É fácil perceber o porquê de não se ter detetado a sua presença em animais sem acesso a exterior, uma vez que *Campylobacter* spp. é sensível à maior parte dos desinfetantes disponíveis no comércio (Chatenet, 2014c) e no local de criação a desinfeção é feita com regularidade, bem como vazio sanitário.

A contaminação em avicultura parece dar-se de forma horizontal, pelo contacto com aves selvagens, outros animais presentes em quintas, homem, águas contaminadas e insetos (Guérin et al., 2011c). A separação entre o parque de voo e o exterior é feita apenas por uma rede que por vezes não tem nenhuma medida de segurança para afastar a aproximação e contacto de outros animais.

A hipótese de que esta bactéria esteja presente em grande quantidade no parque de voo dando origem à presença e altas contagens no trato digestivo é sustentável. No entanto é importante referir que a passagem ao parque de voo representa muitas alterações e desafios para o animal, como por exemplo:

- Alimentação (folhas e insetos p.e.).
- Stress (stress de passagem ao parque de voo e contacto com o novo ambiente).
- Contacto com novos agentes patogénicos (fungos, bactérias e parasitas p.e.).
- Contacto com aves selvagens que atravessam as redes do parque de voo.

Estes desafios poderão ser o suficiente para desencadear alterações intestinais que poderão culminar no favorecimento do crescimento e estabelecimento de algumas bactérias patogénicas (*Campylobacter* spp e *Salmonella* spp.).

Dois exemplos disso são as correlações positivas observadas entre o acesso ao parque de voo e *score* de fungos ao nível do ceco ($\rho = 0,45$), *score* de oocistos no duodeno e jejuno/íleo ($\rho = 0,44$ e $0,28$ respetivamente) e aumento de muco no duodeno ($\rho = 0,30$).

O muco e mucinas desempenham um papel crucial contra o estabelecimento e desenvolvimento de bactérias no intestino, mas em particular, *Campylobacter jejuni* parece ter adaptações específicas que permitem a colonização do muco intestinal com

sucesso (Alemka et al., 2012). Curiosamente, embora que difícil de corroborar, o *score* de *Campylobacter* spp. correlacionou-se positivamente com o aumento de muco duodenal ($\rho = 0,27$) e jejunal ($\rho = 0,28$).

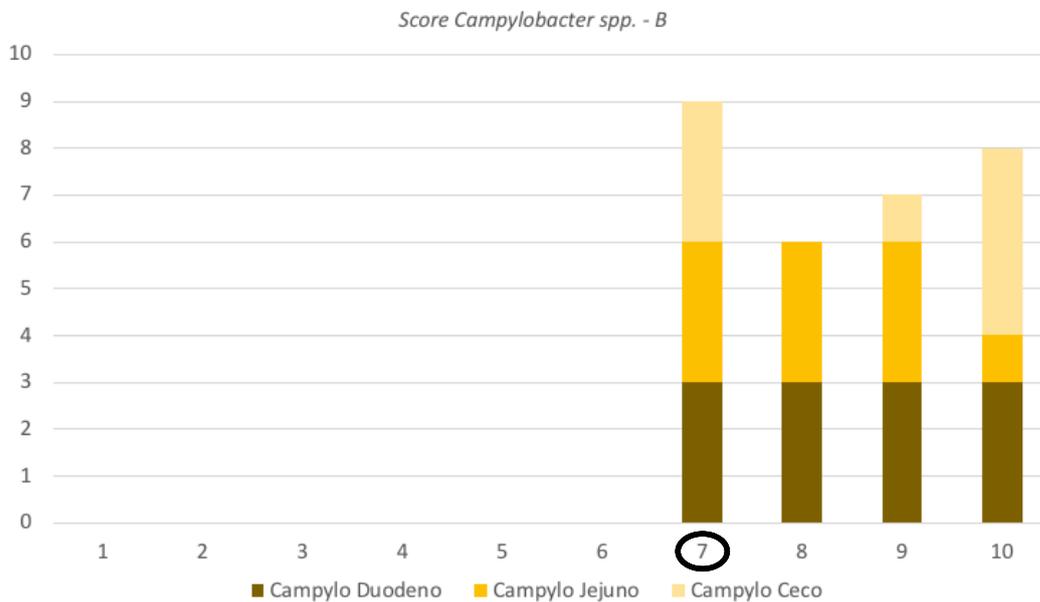


Gráfico 16. *Score* de *Campylobacter* spp. nos 3 segmentos intestinais na exploração B ao longo das 10 semanas de avaliação: pode observar-se que o acesso ao parque de voo a partir da 7ª semana (círculo) influenciou a presença e carga desta bactéria em todo o intestino.

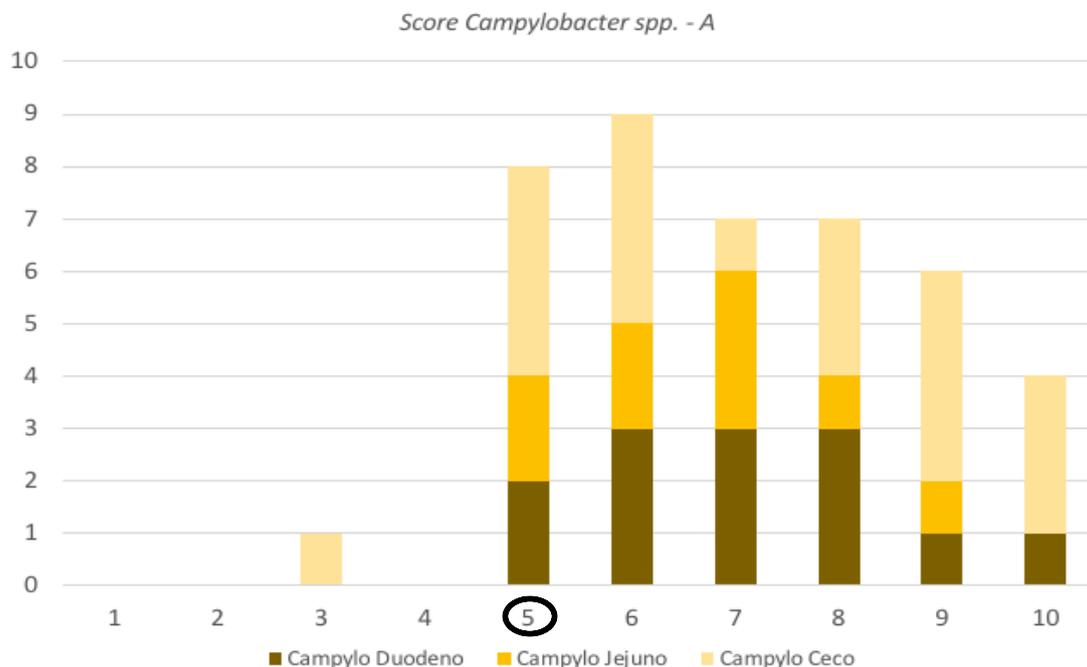


Gráfico 17. *Score* de *Campylobacter* spp. nos 3 segmentos intestinais na exploração A ao longo das 10 semanas de avaliação: pode observar-se que o acesso ao parque de voo a partir da 5ª semana (círculo) influenciou a presença e carga desta bactéria em todo o intestino.

5.3.3 *Echerichia coli*, *Enterococcus* spp. e fungos

De uma forma generalista estas bactérias estão presentes no intestino como microrganismos comensais, que poderão ser potencialmente patogénicos.

Echerichia coli é uma bactéria frequentemente reportada como agente septicémico em avicultura industrial (Guérin et al., 2011d), no entanto a frequência com que é diagnosticada em aves cinegéticas é menor que em frangos ou perus. O seu papel deve ser tido em conta sempre como agente patogénico secundário (Chatenet, 2014d).

Enterococcus spp. também tem um papel semelhante ao de *E. coli* como comensal.

Certos microrganismos (comensais essencialmente) têm efeitos positivos quando as condições intestinais são estáveis, no entanto, os mesmos microrganismos podem contribuir negativamente com metabolitos perigosos para o hospedeiro quando as condições intestinais alteram (Oviedo-Róndon, 2013). Daí surge o interesse de monitorizar estas populações.

O uso de antibióticos observado nas duas explorações poderá ter influenciado toda a evolução registada. Um exemplo que reforça este argumento é a correlação positiva entre o *score* de fungos e o uso de antibióticos, que se observou no duodeno ($\rho = 0,43$), jejuno/íleo ($\rho = 0,25$) e ceco ($\rho = 0,36$).

Deste modo, o registo da evolução correta de *Enterococcus* spp. e *Echerichia coli* (essencialmente) foi invalidado, embora que haja pontos interessantes a salientar no que concerne aos dois microrganismos.

A evolução de *Enterococcus* spp. e *Echerichia coli*, ao longo da análise de correspondências, pareceu ser sinérgica no intestino delgado, revelando correlação positiva tanto no duodeno ($\rho = 0,47$) como no jejuno/íleo ($\rho = 0,64$).

Embora a análise tivesse sido bastante influenciada por vários fatores (antibioterapia, manejo e parasitas p.e.) também se conseguiu verificar que estas duas populações bacterianas parecem apresentar uma correlação negativa com fatores negativos no geral:

- *E. coli* correlacionou-se negativamente com inflamação, flacidez e muco no duodeno ($\rho = -0,39$, $\rho = -0,28$, $\rho = -0,21$ respetivamente).

- *Enterococcus* spp. correlacionou-se negativamente com flacidez no duodeno ($\rho = -0,29$).

- *E. coli* correlacionou-se negativamente com *Campylobacter* spp. e *score* de oocistos no jejuno/íleo ($\rho = -0,20$, $\rho = -0,20$ respetivamente).

- *Enterococcus* spp. correlacionou-se negativamente com o *score* de oocistos no ceco ($\rho = -0,42$).

Estes 4 pontos, ainda que pouco consistentes ao longo dos segmentos, de uma forma muito geral, demonstram que estas duas populações bacterianas parecem diminuir aquando da presença de fatores negativos no sentido amplo, sejam alterações intestinais (inflamação p.e.), parasitas (oocistos p.e.) e até mesmo outras bactérias (*Campylobacter* spp. p.e.).

5.4. CORONAVIRUS

No que diz respeito ao papel deste vírus, ganhou importância na avicultura por ser o agente envolvido na bronquite infecciosa (IBV) em galinhas e responsável por causar enterites em Perus (TCoV), com grande impacto económico (Cavanagh, 2007).

No caso específico do IBV, sabe-se que existem numerosos serotipos, que iram variar em sintomatologia (respiratória, renal, genital p.e.) (Guérin et al., 2011e) e que a capacidade de o vírus se replicar em tantos tecidos poderá contribuir para a diversidade de sequências das suas proteínas, especialmente a proteína S (Cavanagh, 2007).

A sua presença em aves cinegéticas é pouco relatada, no entanto o *Coronavirus* dos faisões (PhCov) está bem documentado, relacionado com sintomatologia respiratória e renal (Lister et al., 1985; Spackman & Cameron, 1983).

Em França, nos últimos anos, o vírus tem sido associado a perdizes com um quadro clínico de prostração, baixo consumo de água e alimento, sintomatologia renal e entérica (Chatenet & Bezille, 2015). Estes autores definiram a síndrome com elevada mortalidade que poderá evoluir durante 3 semanas, onde as respostas terapêuticas parecem ser heterogêneas com frequentes recidivas, presença de multiparasitismo (coccídias e protozoários flagelados) e persistência da sintomatologia durante longas semanas.

Chatenet & Bezille (2015) revelaram ainda que alguns testes genéticos feitos demonstraram a proximidade deste vírus com o dos perus (TCoV), ainda que a identificação completa do agente não tenha sido feita.

No presente trabalho, embora que não se tenha recorrido a testes genéticos, nos casos onde o teste rápido revelou positivo (exploração B), o quadro lesional foi compatível com o descrito. Observando-se conteúdos intestinais líquidos com enterite catarral de cor verde (fig. 38) ao nível do jejuno/íleo, semelhante ao descrito por Chatenet & Bezille (2015), bem como a existência de multiparasitismo e respostas incorretas a diferentes tratamentos antibióticos, relatado.

De modo a reforçar estes factos, foi encontrada correlação positiva entre a positividade ao teste rápido e o conteúdo intestinal verde ($\rho = 0,29$), bem como com o *score* de fungos ($\rho = 0,36$). Esta última correlação revela a recorrência ao uso de antibióticos, pela falta de eficácia, que também correlacionou positivamente com a deteção de coronavírus ($\rho = 0,34$), não como causa, mas como consequência.

Ainda se pode observar correlação negativa entre a positividade ao teste e a condição corporal ($\rho = -0,42$), provavelmente devido à diminuição abrupta do consumo de alimento já descrita (Chatenet & Bezille, 2015).



Figura 38. Fotografia de um animal onde o teste rápido revelou positividade: enterite catarral de cor verde com alto conteúdo líquido e multiparasitismo; (fotografias do autor).

5.5. PARAMETROS MACROSCÓPICOS E A SUA INTERPRETAÇÃO

A avaliação e interpretação cuidadosa dos parâmetros macroscópicos permitiu concluir que aporta muita informação crucial em situações práticas. Exemplos básicos disso são algumas correlações positivas observadas entre:

- Conteúdo mucoide duodenal e *score* de oocistos ($\rho = 0,36$);
- Inflamação no duodeno e *score* de oocistos ($\rho = 0,20$);
- Conteúdo líquido no jejuno/íleo e presença de *Spiroplasma meleagridis* ($\rho = 0,20$);
- Conteúdo líquido no ceco e *score* de oocistos ($\rho = 0,22$);
- Conteúdo líquido no ceco e presença de parasitas da família *Trichomonadidae* ($\rho = 0,34$);

No entanto, apesar destes fatos, foi possível observar que alguns animais apresentavam alterações no intestino delgado sem presença de parasitas, principalmente na exploração B. As alterações referidas são a inflamação (vasos sanguíneos exuberantes, congestionados, e manchas vermelhas na serosa), presença de muco, flacidez, entre outros.

Pensou-se inicialmente que todas estas variáveis se deslocassem uniformemente, no entanto, o que se entendeu foi que estas variáveis indicadoras de falta de saúde intestinal estão presentes, sem que haja necessariamente parasitas e mortalidade.

Estes dados remetem-nos para a sintomatologia de enterite bacteriana ou disbiose descrita por De Gussem (2010) em frangos de carne, como abordado na revisão bibliográfica, esta síndrome de falta de saúde intestinal geral não está estritamente ligada à coccidiose, sendo multifatorial (maneio, alimentação, vírus, parasitas p.e.). O autor aborda o problema do ponto de vista macroscópico e microscópico, referindo que os intestinos irão ficar irritados, resultando em inflamação, que ao nível microscópico se traduz em altas infiltrações e agregações de linfócitos e macroscopicamente pela tonalidade avermelhada na parede intestinal e vasos sanguíneos hiperémicos observados externamente. Ainda relata que a reação intestinal à alteração da microbiota causa “*stress fisiológico*” que leva ao aumento de células caliciformes e produção de muco, bem como conteúdos viscosos e aquosos.

Ainda se entende que o reduzido tónus e distensão do intestino poderá estar relacionado com a redução da espessura da *túnica muscularis*, levando a uma aparência flácida do intestino aquando do corte (De Gussem, 2010; Teirlynk et al., 2011).

Com este tipo de informação, estes autores conseguiram criar uma forma de avaliar a saúde intestinal através de parâmetros macroscópicos simples, que permitem a correlação com outros fatores (nutrição, coccidiose, manejo p.e.), oferecendo uma visão holística, diferente da usual.

Embora que estes avanços científicos tenham sido aplicados apenas à avicultura industrial (frangos e perus), encontram-se semelhanças nas espécies cinegéticas, uma vez que independentemente do agente diagnosticado (coccidiose e vírus p.e.) se conseguiu identificar estes sinais de falta de saúde intestinal com facilidade figura 39.

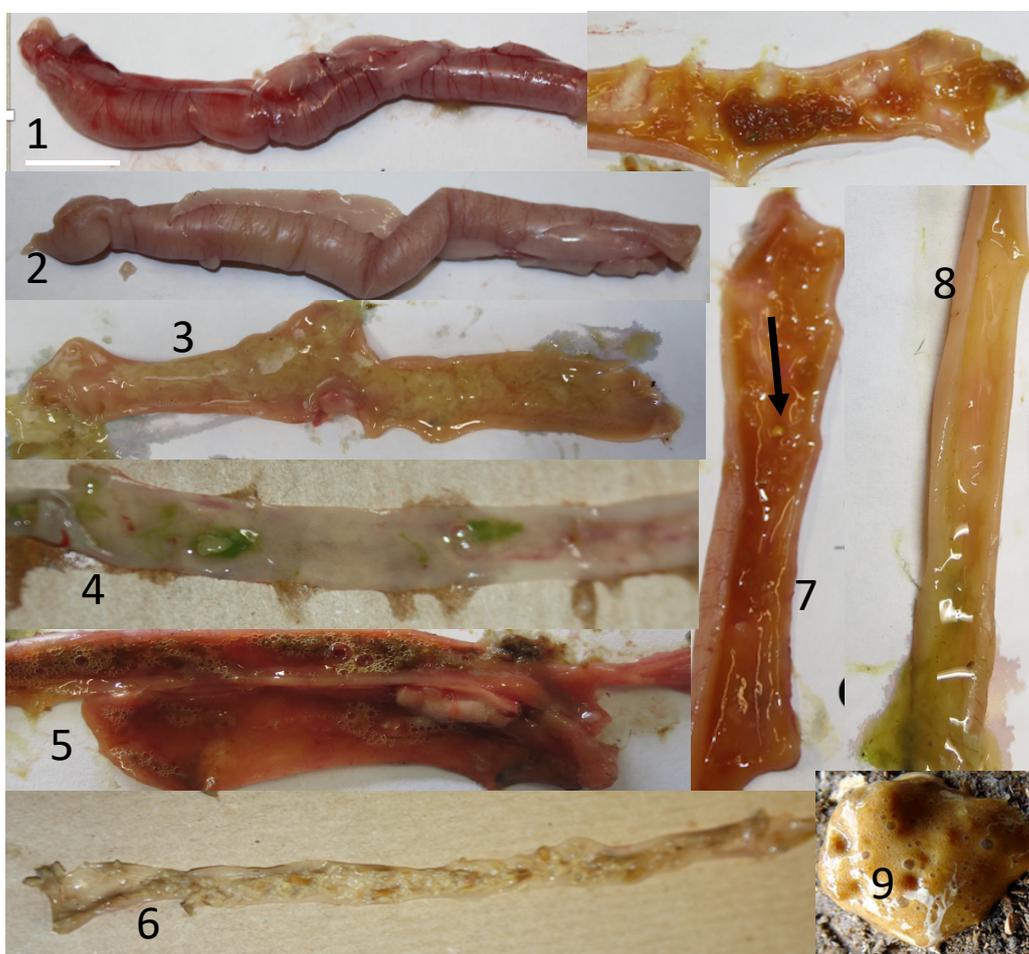


Figura 39. Fotografias tirada em vários casos, com patologias completamente diferentes, no entanto, a falta de saúde intestinal é comum a todos eles: 1 – Inflamação (hiperemia e tonalidade avermelhada); 2 – Duodeno flácido; 3 – Duodeno flácido com conteúdo mucoide esbranquiçado, multicolorado e líquido; 4 – Jejunum com parede intestinal fina, sendo possível observar através da mesma; 5 – Duodeno com conteúdo líquido e formação de gás; 6 – Jejunum apresentando alimento por digerir; 7 – Jejunum apresentando conteúdo viscoso alaranjado e uma partícula de alimento por digerir (seta preta); 8 – Jejunum flácido apresentando conteúdo mucoide, multicolorado e líquido; 9 – Fezes amarelas fluidas e com gás, sinalizando falta de saúde intestinal; (fotografias do autor).

Assim, no futuro poderá ser interessante a avaliação da saúde intestinal geral de espécies cinegéticas, mesmo que apenas qualitativa, de modo a entender se poderá aportar informações interessantes para melhorar diagnósticos em situação de campo e laboratório. Este tipo de avaliação também poderá dar ao produtor uma ferramenta útil de monitorização do bando, embora que deva ser mais explorada.

Por último, abordando os parâmetros macroscópicos avaliados no ceco, pôde-se chegar à conclusão que a avaliação e registo de cores (verde e castanho p.e.) e consistências (cremoso, pastoso e duro p.e.) não revelaram importância estatística à exceção do conteúdo líquido, dilatação e existência de gás ou nódulos caseosos, que já foram referidos.

5.6. COLORAÇÕES

5.5.1 Gram

A utilização desta técnica não correspondeu com as expectativas iniciais de identificar e registar um rácio entre Gram-positivas e Gram-negativas em cada segmento intestinal, embora se tenham conseguido imagens interessantes.

A maior limitação da coloração neste estudo foi a heterogeneidade de bactérias e rácios dentro da mesma lâmina ao nível cecal, tal como demonstrado no capítulo dos resultados, revelando que as bactérias não estão distribuídas uniformemente no conteúdo intestinal.

Para além disto, a coloração pareceu não corar corretamente certas lâminas, fazendo especular que a matéria fecal possa impedir a correta penetração dos corantes, tendo-se encontrado maiores dificuldades em corar esfregaços de conteúdos mais sólidos e duros.

Algumas experiências demonstraram que a diluição do conteúdo cecal em água destilada poderá permitir uma melhor coloração e nitidez das imagens.

Para além de a coloração ser pouco uniforme dentro do mesmo esfregaço, também se revelou uma grande heterogeneidade entre animais do mesmo lote, reforçando a dificuldade do seu uso como ferramenta de monitorização de bandos.

Apesar dos factos negativos descritos, a coloração revelou resultados interessantes na identificação de bactérias com morfologias atípicas, em segmentos intestinais parasitados.

Tal como descrito na revisão bibliográfica, há uma interação entre a microflora intestinal e os protozoários flagelados, e a composição da mesma é crucial para o desenvolvimento do parasita, sendo que este último poderá influenciar outras populações secundárias de bactérias (Schricke, 1991d). Este facto pode explicar que em esfregaços de segmentos intestinais infetados por protozoários flagelados foram encontradas bactérias com morfologias diferentes do que se observou em animais saudáveis.

Embora que através da morfologia não se conheça a espécie, pôde-se constatar que as bactérias observadas são essencialmente em forma espiral ou curvada (espiroqueta, espirais ou vibrios) ou arranjos em forma de *Sarcina* (fig. 40).

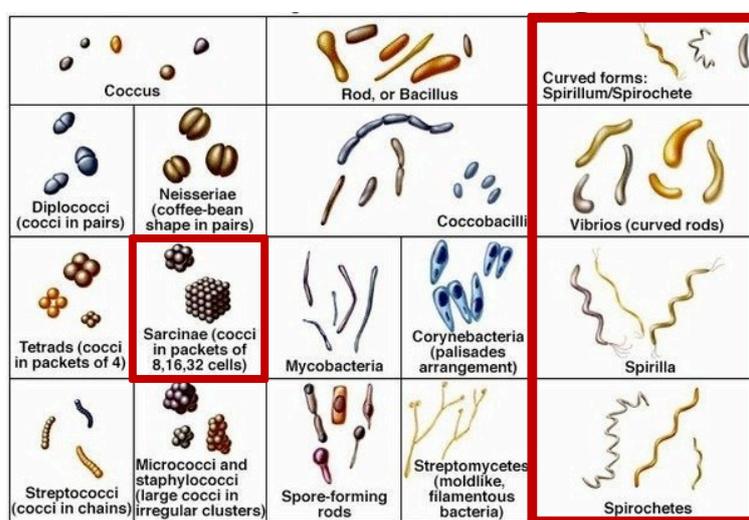


Figura 40. Diferentes morfologias bacterianas. As delimitações vermelhas referem-se às morfologias que se observaram no presente trabalho em animais infetados com protozoários flagelados (adaptado de Talaro & Talaro, 1999).

As bactérias do tipo *Sarcina* são Gram-positivas, da família *Micrococcaceae*, que se arranjam em formas cubicas de oito ou mais células. As duas espécies até agora descritas, anaeróbicas e fermentadoras de açúcar, são *Sarcina ventriculi* e *Sarcina maxima*, ocorrendo de forma natural no ambiente, tendo sido isoladas no solo e grãos de cereal (Canale-Parola, 1970; 1986).

A sua descrição bibliográfica em avicultura é escassa, sendo documentada em dilatações e torções do abomaso em borregos e vitelos, associados a enfisema, edema e acumulação de gás (Edwards, et al., 2008; Vatn et al., 1999). Em medicina humana esta bactéria também parece estar relacionada com alterações gastrointestinais (obstrução gástrica e atraso no esvaziamento do estomago).

A associação entre a sintomatologia e bactérias do tipo *Sarcina* é evidente, ainda que não seja bem compreendido se é a causa primária (Edwards, et al., 2008).

A sua capacidade de resistir e crescer em valores de pH ácido (1 p.e.), produzindo acetato, dióxido de carbono, hidrogénio, etanol (*S. ventriculi*) e butirato (*S. maxima*) (Cabale-Parola, 1986) tornam este microrganismo intrigante. Tolentino et al. (2003) especulou que estes produtos de fermentação (essencialmente de *S. ventriculi*) poderão levar a acumulação local de acetaldeído, causando lesões na mucosa semelhantes à intoxicação por etanol em humanos.

Em avicultura, embora que pouco relatado do ponto de vista bibliográfico, estas bactérias são frequentemente observadas aquando da execução de análises parasitárias, sendo consideradas um achado. Alan Pearson (2014) descreveu a sua aparência como cristalina de formato típico, frequentemente observada em aves cinegéticas infetadas por protozoários flagelados (fig. 41), que foi confundida durante muito tempo com cristais.

Embora que não se tenha registado (pelas limitações referidas), nem correlacionado estatisticamente com as alterações intestinais, pareceu haver uma associação entre disbioses (por protozoários flagelados essencialmente p.e.) e a existência destas bactérias. Outro fator que reforça o anteriormente descrito é a semelhança dos quadros clínicos descritos em outras espécies e o que se observa em cecos infetados por protozoários flagelados (dilatação excessiva e gás p.e.).



Figura 41. Na imagem da esquerda é possível observar um ceco muito dilatado com conteúdo gasoso e líquido infestado com protozoários flagelados. Na imagem da direita é possível observar uma fotografia feita durante uma coprologia, onde se detetaram bactéria do tipo *Sarcina*. (fotografias do autor) **NOTA:** As fotografias não correspondem ao mesmo animal. Estes indivíduos não entraram no presente estudo

Poder-se-á especular à cerca das bactérias espirais/curvadas/helicoidais que se encontraram, no entanto, pelas imagens é difícil compreender que tipo são, se estão segmentadas e se são Gram-positivas ou negativas. Por este motivo, próximos estudos deveriam ser levados a cabo com intuito de perceber que papel é que esta microflora desempenha nas disbioses provocadas por protozoários flagelados, bem como a compreensão das suas características (virulência e resistência a antibióticos p.e.). Este raciocínio também se aplica a bactérias do género *Sarcina*.

A existência concomitante de protozoários e bactérias de morfologias atípicas poderá não ter relação direta e simplesmente pelo facto de os animais estarem prostrados o comportamento de alimentação altera, diminuindo a ingestão de ração e aumentando a ingestão da cama (terra nas aves cinegéticas). Um exemplo disso poderá ser as bactérias do género *Sarcina* que se encontram com frequência na natureza e essencialmente no solo, fazendo esta hipótese aceitável, uma vez que estes animais têm acesso ao solo através do parque de voo.

Outras hipóteses aplicáveis a este caso, poderão ser o facto de os animais estarem imunodeprimidos permitir o crescimento destes microrganismos e a simples alteração inflamatória devido à presença do parasita podendo influenciar o crescimento de outras bactérias diferentes, como o caso da coccidiose (Johansson & Sarles, 1948, Visco & Burns, 1972; Tortuero, 1973; Turk & Littlejohn, 1986; kimura, 1975).

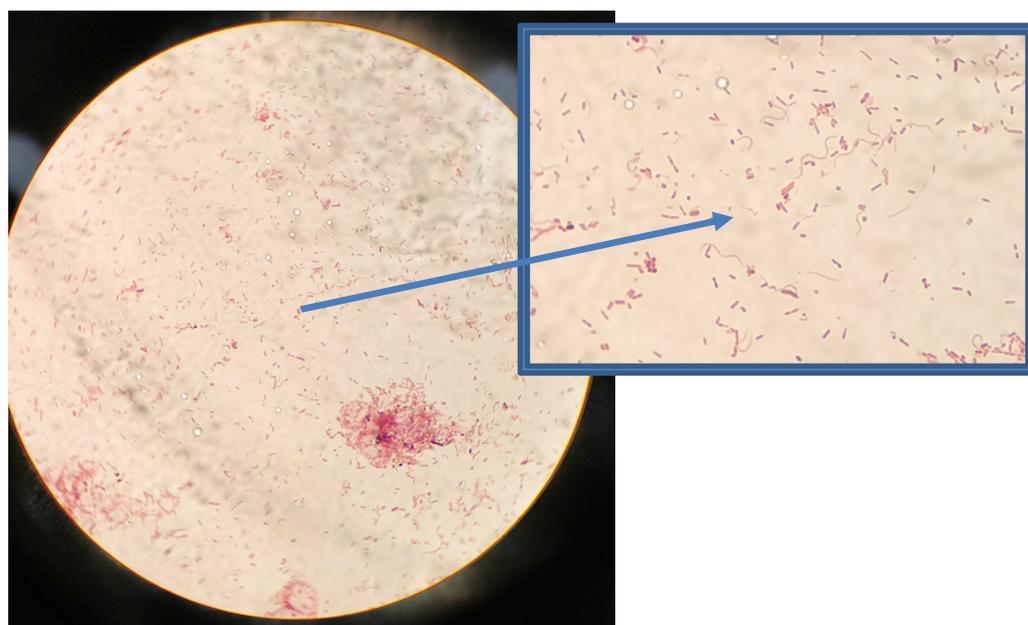


Figura 42. Coloração Gram de um esfregaço cecal, onde se pode observar bactérias com um formato semelhante ao género *Brachyspira*, demonstrando o potencial do uso da coloração na identificação de bactérias atípicas. **NOTA:** Este animal não pertence ao grupo de estudo.

5.5.2 May Grunwald Giemsa e Hemacolor®

A coloração feita com o *kit Hemacolor*® demonstrou-se muito rápida (3 minutos) e eficiente na coloração de parasitas em geral, devendo ser considerada como ferramenta em diagnósticos futuros.

A técnica *Mgg* cora com facilidade, no entanto, revela-se muito longa (25-30 minutos) e laboriosa.

No que concerne ao uso destas colorações em infecções por *Eimeria* spp., pôde concluir-se que pode ser considerado, tanto em situação de campo, como em laboratório. Ao contrário da citologia convencional, permite a visualização de vários estados intermediários e células, dando uma imagem real dos danos na mucosa.

As imagens que se obtiveram foram interessantes, no entanto este método apenas dá informação qualitativa, ao contrário da contagem de oocistos por Grama de fezes (OPG). Mas em relação a técnicas como a histopatologia, revela-se rápido, acessível e exequível por qualquer técnico independentemente da experiência.

Em relação a protozoários flagelados da família *Trichomonadidae*, a coloração revelou-se útil e eficiente a corar organelos, no entanto a identificação de parasitas requer muita experiência e, no caso específico de aves cinegéticas, é mais correta a identificação através da análise genética (Liebhart et al., 2014).

A única coloração que se revelou insatisfatória foi em casos de infecção por *Spirotrichum meleagridis*, uma vez que o parasita pareceu ficar distorcido e com perda de arquitetura tornando a visualização muito laboriosa.

Talvez este facto se explique por erros na execução do esfregaço (pressão, local e tipo de esfregaço p.e.), uma vez que Wood & Simth (2004) relatou que *Hemacolor*® providencia uma correta coloração que permitiu a observação de diferentes estados do ciclo de vida do parasita.

A problemática do diagnóstico em infecções por protozoários flagelados é a perda de motilidade quando a amostra não é observada logo após a recolha, e nesta ótica as técnicas avaliadas permitem a execução do esfregaço, coloração e observação sem limitação do tempo.

6. CONCLUSÕES

No que diz respeito às populações bacterianas avaliadas:

1. O contacto com o ambiente exterior em aves cinegéticas poderá representar um fator de risco para a presença ou aumento da carga de *Campylobacter* spp. em todos os segmentos intestinais, tendo sido a maior correlação observada neste trabalho, corroborando com diversas publicações em fragos de carne produzidos em modelo extensivo (Huneau-Salaum et al., 2007; Vandeplas et al., 2010; Rivoal et al., 2005; Heuer et al., 2001).
2. A utilização de antibióticos conduziu a um aumento do *score* de fungos.
3. A monitorização da microflora através da cultura microbiológica revelou-se difícil, laboriosa e duvidosa, tal como descrito por Oviedo-Róndon & Hume (2013). Os testes genéticos são preferíveis (precisos e corretos), embora que o laboratório onde se desenvolveu o presente trabalho não tenha dimensão e meios para tal. O presente trabalho não tinha como objetivo a caracterização da flora, mas sim a monitorização de certas populações bacterianas comensais e patogénicas de modo a observar a sua reação em função dos diferentes desafios (maneio, vírus, parasitas p.e.). A utilização de antibióticos por parte dos produtores, e a inexistência de grupos de controlo, poderão ter influenciado os resultados negativamente.

No que diz respeito ao uso da coloração Gram:

1. O objetivo inicial de monitorizar o rácio entre populações bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas não foi cumprido, uma vez que se encontrou grande heterogeneidade na mesma lâmina, dentro do mesmo animal e entre animais do mesmo lote. A forma como as bactérias se distribuem no conteúdo intestinal parece não ser uniforme, tendo grande dependência do conteúdo.

2. Apesar do referido, a coloração de amostras fecais revelou-se útil na identificação de bactérias com morfologias atípicas como o género *Sarcina* ou bactérias espirais/curvadas. Estas bactérias só foram identificadas em animais com sinais evidentes de disbiose provocada por parasitas, remetendo para a alteração da microflora nestes casos.
3. O conhecimento destas populações bacterianas poderá ser interessante, de modo a perceber o seu papel em enterites, bem como as suas características (sensibilidade a antibióticos, impacto e virulência p.e.).

No que diz respeito à coccidiose:

1. Apesar das investigações e esforços feitos por certas entidades, resta muito por compreender à cerca da coccidiose em aves cinegéticas. A sua epidemiologia e virulência continua a intrigar os intervenientes do setor, que após longos anos de conhecimento da infeção, continua a ser um dos maiores problemas na produção de perdizes. Este facto obriga, frequentemente, à modificação de protocolos de tratamento (dose e duração), ao contrário das outras espécies.
2. Foi possível observar lotes de animais com lesões evidentes de coccidiose em todos os segmentos intestinais, sem repercussão na condição corporal, comportamento e mortalidade. Poderia ter sido interessante identificar as espécies dos oocistos encontrados, no entanto a identificação é laboriosa e demorada.
3. É difícil de explicar o que compõe este problema, no entanto, a falta de investigação e escassez de bons métodos de diagnóstico em situação prática poderão representar alguns motivos.
4. A coloração *May Grunwald Giemsa* e *Hemacolor*[®] revelaram-se eficientes na coloração de todos os estados intermediários de *Eimeria* spp., obtendo-se uma imagem interessante da agressão à mucosa. Embora que a informação seja apenas qualitativa e dependa de muitos fatores (local de execução e pressão p.e.) o seu uso em situação prática (campo e laboratório) poderá ser considerado como ferramenta de diagnóstico rápida.

5. O uso desta coloração deverá ser estudado e correlacionado com lesões e alterações, bem como comparada a outros meios de diagnóstico (OPG, *scoring* microscópico e análises genéticas por exemplo), com vista em perceber a sua sensibilidade, especificidade e qualidade.
6. *Hemacolor*[®] prevaleceu sobre *Mgg* uma vez que é mais rápido (3 min) sem deterioração da qualidade de imagem.

No que diz respeito às infeções por protozoários flagelados:

1. Apesar dos avanços científicos e de algumas descrições dos seus ciclos de vida, muita informação permanece desconhecida sobre os protozoários da família *Trichomonadidae* que afetam, essencialmente, os cecos das aves cinegéticas. Pensa-se que o género *Tetratrichomonas gallinarum* esteja por detrás da maior parte das infeções. No entanto, continuam a observar-se muitas manifestações patológicas diferentes, que talvez possam ser explicadas pelo grande polimorfismo molecular entre tipos e subtipos (Cepicka, et al., 2005).
2. Neste trabalho, a infeção por protozoários da família *Trichomonadidae* pareceu dar-se pela complicação e junção de uma série de fatores negativos (manejo, coccídeas e higiene p.e.), tendo sido difícil medir e registar o seu impacto.
3. As colorações *Mgg* e *Hemacolor*[®] demonstraram-se eficientes, corando os organelos do parasita corretamente. A identificação e tipificação da espécie através das características morfológicas carece de muita experiência e técnica, levando muito autores a usarem métodos de diagnóstico genéticos. A grande vantagem desta coloração é a possibilidade de diagnóstico sem identificação da motilidade do parasita, que se perde rapidamente pela temperatura da lâmina.
4. A infeção por *Spironucleus meleagridis*, neste trabalho pareceu ser apenas uma complicação de vários fatores (tricomonas, coccídeas, manejo, higiene p.e.).

5. O seu diagnóstico é facilitado pelo formato e movimento característico embora que possa perder a motilidade, tal como os tricomonas. No entanto, as colorações revelaram-se insatisfatórias, observando-se parasitas com formas distorcidas e arquitetura alterada. Talvez este facto se deva ao excesso de pressão exercida aquando da execução do esfregaço por aposição.
6. Através da coloração Gram, em infeções por estes parasitas, observaram-se bactérias de morfologias atípicas (género *Sarcina* e espirais essencialmente), diferentes das observadas nos outros animais (bacilos e cocos). Este facto remete para a alteração abrupta na microflora, que necessita de ser compreendida. Estes parasitas apresentam dependência de certas populações bacterianas e esta relação permanece ainda hoje mal estudada.
7. A utilização de antibióticos não pareceu eficaz no combate aos parasitas flagelados, uma vez que a sua presença foi observada até ao fim do acompanhamento sempre sob antibioterapia.
8. A utilização de antibióticos com vista a eliminar bactérias que são o alimento dos protozoários flagelados é um método ineficaz que só irá contribuir para a criação e perpetuação de resistências a antibióticos. Este método é o único tratamento disponível em caso agudo. O combate passará pela higiene, biossegurança e uso de produtos alternativos profiláticos.

No que diz respeito aos parâmetros macroscópicos:

1. Os parâmetros macroscópicos registados revelaram, em grande parte, semelhança ao descrito por vários autores aquando se referem à disbiose em galinhas e perus (De Gussem, 2010; Oviedo-Rondón & Hume, 2013). Independentemente do agente encontrado e até mesmo na ausência de agentes testados.
2. Esta falta de saúde intestinal geral, de carácter multifatorial, foi presenciada. Conclui-se que a análise pormenorizada e padronizada poderá aportar informação útil, podendo tornar-se uma ferramenta prática em situação de campo para todos os intervenientes da área. Para que isto seja possível, este método terá de ser

testado, avaliado e correlacionado com todos os fatores causadores de enterites em espécies cinegéticas (parasitas, vírus, micotoxinas e manejo p.e.).

No que diz respeito aos parâmetros zootécnicos:

1. Foi evidente a diferença de *performances* entre as duas explorações, podendo refletir, em parte, os diferentes parâmetros de manejo praticados.
2. Este trabalho permitiu concluir e perceber que a iniciação (primeiras semanas de vida) é dos períodos mais importantes, onde se terá de garantir a temperatura ambiental adequada, qualidade do ar, qualidade da água, higiene, conforto, entre outros. Facilmente, o cumprimento de alguns fatores (temperaturas elevadas) poderá entrar em deterioração de outros, como a qualidade do ar (pouca ventilação) e qualidade da água (aquecimento das tubagens e bebedouros).
3. O registo dos parâmetros da água neste trabalho avaliados (pH e temperatura) revelou-se importante. A sua monitorização deverá ser considerada em explorações cinegéticas, mesmo em situação prática, com recurso a dispositivos acessíveis e práticos.
4. Os diferentes valores de pH e temperatura praticados nas duas explorações poderão explicar dos bons e maus resultados embora que tenham sido avaliadas muitas variáveis ao mesmo tempo.
5. O uso de pH ácido próximo de 4 e temperaturas de água próximas ou abaixo de 24 °C revelaram-se interessantes, estando associadas a melhores resultados.

No que diz respeito ao uso do teste rápido de deteção de *Coronavirus*:

1. O teste rápido concebido para diagnóstico do vírus da Bronquite Infeciosa em galinhas poderá ser considerado uma ferramenta de diagnóstico em situação prática. Foi encontrada uma correlação positiva com a sintomatologia e quadro típico de infeção por *Coronavirus* em Perdizes descrita por Chatenet & Bezille (2015), onde permanece dominante o multiparasitismo, enterite catarral de cor

verde, utilização recorrente de antibióticos para controlo dos parasitas flagelados e diarreias, sem eficácia.

2. Foi encontrado alto *score* de fungos nos lotes afetados pelo vírus, com correlação positiva.
3. O uso do teste rápido carece de correlações com testes genéticos e de mais utilizações em situação prática de modo a compreender a sua sensibilidade e especificidade, numa espécie e doença para o qual não foi concebido.

No que diz respeito à análise estatística utilizada:

1. A análise estatística de correspondências revelou-se muito útil, eficaz e adequada na interpretação de dados, procurando a primeira dimensão (D1), que representa o maior conjunto de grupos de animais semelhantes entre si no maior conjunto de variáveis. Em seguida, a análise procura uma segunda dimensão (D2) que corresponde ao segundo maior número de grupos de animais com perfis semelhantes, e assim por diante, até à última dimensão.
2. A grande quantidade de variáveis avaliada com frequência em avicultura inibe a execução de certas análises mais simples. Por este motivo, este tipo de análise poderá facilitar a interpretação de dados neste setor, essencialmente em estudos onde se recolhe muita informação inerente a um só animal (necropsias p. e.).

7. BIBLIOGRAFIA

Aebischer, N.J. & Potts, G.R. (1994). Red-legged Partridge *Alectoris rufa*. In Birds in Europe: Their Conservation Status (G.M. Tucker & M.F. Heath). Bird Life International, Cambridge. pp. 214–215.

Aebischer, N.J. & Lucio, A. (1997). *Alectoris rufa*, Redlegged Partridge. In the EBCC Atlas of European Breeding Birds. Their Distribution and Abundance (W.J.M. Hagemeijer & M.J. Blair). T. & A.D. Poyser, London. pp. 208–209.

Alonso de la Varga, M. E. & Garcia-Abad, C. S. (2011). Breve recuerdo sobre la biología y ecología de las espécies de perdiz em españa: Perdiz roja, perdiz pardilla y perdiz moruna. Apresentado em Seminario Nacional de Perdices. León.

Amin, A., Bilic, I., Liebhart, D. & Hess, M. (2014). Trichomonads in birds – a review. *Parasitology*, 141, 733-747. <https://doi.org/10.1017/S0031182013002096>

Amin, A., Liebhart, D., Weissenböck, H. and Hess, M. (2011). Experimental infection of turkeys and chickens with a clonal strain of *Tetratrichomonas gallinarum* induces a latent infection in the absence of clinical signs and lesions. *Journal of Comparative Pathology* 144, 55–62. doi: 10.1016/j.jcpa.2010.06.002.

Alemka, A., Corcionivoschi, N., & Bourke, B. (2012). Defense and Adaptation: The Complex Inter-Relationship between *Campylobacter jejuni* and Mucus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 15. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00015>

Borges, A. F. (2007). Criação de coelho-bravo e perdiz-vermelha em Cativeiro. Litexa editora. pp:13-14, 50-61.

Borges A. F. (2013). Técnicas de Repovoamento Com Coelho-Bravo e Perdiz-Vermelha. Litexa Editora lda. pp: 13-91.

Beça, A (2005a). Os galiformes. In A Perdiz: Património Natural Transmontano. João Azevedo Editor. pp: 12-30.

Beça, A (2005b). Perdizes Vermelhas. In A Perdiz: Património Natural Transmontano. João Azevedo Editor. pp. 32-37.

Beça, A (2005c). Alimentação Natural. In A Perdiz: Património Natural Transmontano. João Azevedo Editor. pp. 52-59.

Beça, A (2005d). Habitat. In A Perdiz: Património Natural Transmontano. João Azevedo Editor. pp. 60-69.

Bailey A. R. (Agosto, 2013). Gut Health in Poultry: The world within. Ross Tech Note. Disponível online em: http://en.aviagen.com/assets/Tech_Center/Ross_Tech_Articles/RossTechNoteGutHealth2013-EN.pdf (Consultado em 20 de dezembro de 2018)

Borrvalho, R., Stoate, C. & Araujo, M. (2010). Factors affecting the distribution of Red-legged Partridge *Alectoris rufa* in a agricultural landscape of Southern Portugal. *Bird Study*, 47:3, 304-310.

Borrvalho, R., Carvalho, S., Rego, F. & Pinto, P. V. (1999). Habitat correlates of Red-legged partridge (*Alectoris rufa*) breeding density on mediterranean farmland. *Société nationale de protection de la nature et d'acclimatation de France*, Paris.

Bolognesi, P.G., Galuppi, R., Catelli, E., Cecchinato, M., Frasnelli, M., Raffini, E., Marzadori, F., Tampieri, M.P., (2006). Outbreak of *Eimeria kofoidi* and *Eimeira legionensis* coccidiosis in red-legged partridges (*Alectoris rufa*). *Italian Journal Animal Science*. 5, 318–320.

Bradley, R. E., & Radhakrishnan, C.V. (1973). Coccidiosis in chickens: Obligate relationship between *Eimeria tenella* and certain species of cecal microflora in the pathogenesis of the disease. *Avian Diseases*. 17: 461-476.

Bowman (2010). Protozoários: Tricomonadídeos. In *Georgis Parasitologia Veterinária 9ª edição*. (pp. 84-86) Elsevier Editora Ltda.

Beker, A. & Teeter, R.G. (1994). Drinking water and potassium chloride supplementation effects on broiler body temperature and performance during heat stress. *Journal of Applied Poultry Research*, pp 87-92.

BirdLife International. (2016). *Alectoris rufa*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T22678711A85911062. Consultado em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22678711A85911062.en>. (Acedido em 2 de Fevereiro de 2018)

Bezille, A. (2016). *Pathologie du Gibier - Maladies à tropisme digestifs et/ou Septicémique*. Service formation MCVET conseil. Quiers-sur-bezonde. France.

Chatenet, X. & Bezille, A. (2015, Março). Coronavirus de la Perdrix Rouge: Un nouveau syndrome?. Apresentado em: *Congrès du Syndicat National des Producteurs de Gibier de Chasse*. Saint Etienne. France

Costa, H., Juana, E. & Varela, J. (2011). *Aves de Portugal. Incluindo os arquipélagos dos Açores, da Madeira e das Selvagens*. Lynx editions. pp. 34.

Chatenet X. (2014a). Les maladies parasitaires: Les coccidioses. In *Les maladies du gibier à plumes*. Éditions France Agricole. pp. 81-86.

Chatenet X. (2014b). Les maladies parasitaires: Les flagellés parasites du gibier. In Les maladies du gibier à plumes. Éditions France Agricole. pp. 87-91.

Chatenet X. (2014c). Les maladies bactériennes: Les *Campylobacter*. In Les maladies du gibier à plumes. Éditions France Agricole. pp. 163.

Chatenet X. (2014d). Les maladies bactériennes: Les infections colibacillaires. In Les maladies du gibier à plumes. Éditions France Agricole. pp. 126-132.

Coll, M. (1991). Repoblaciones de Perdiz Roja. Bases Etológicas para su repoblación. Los câmbios en el ecosistema para la reintroduccion de la espèce salvaje. Apresentado em Jornadas Técnicas La Perdiz Roja. Fundacion “La caixa”. pp: 61.

Cancho M. (1991). Incubación. Equipo y técnicas de manejo. Control. En: La perdiz roja. Fundación La Caixa-AEDOS, Barcelona, España, pp: 21–27.

Chapman, H. D. (2007). Rotation for coccidiosis control. *International Poultry Production*, 15: 7-9.

Cepicka, I., Hampl, V. & Kulda, J. (2010). Critical taxonomic revision of Parabasalids with description of one new genus and three new species. *Protist* 161, 400–433. doi: 10.1016/j.protis.2009.11.005.

Cepicka, I., Kutisova, K., Tachezy, J., Kulda, J. and Flegr, J. (2005). Cryptic species within the *Tetratrichomonas gallinarum* species complex revealed by molecular polymorphism. *Veterinary Parasitology* 128, 11–21.

Clark, S., De Gussem, K. and Barnes, J. (2003). Flagellated protozoan infections in turkeys. *World Poultry - Turkey Special* 5, 20–23.

Clipsham, R. (1995). Avian Pathogenic Flagellated Enteric Protozoa. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. Vol 4, No 3: pp 112-125. Elsevier

Cooper, G.L., Charlton, B.R., Bickford, A.A. & Nordhausen, R. (2004). *Hexamita meleagridis* (*Spiroucleus meleagridis*) infection in chukar partridges associated with high mortality and intracellular trophozoites. *Avian Diseases*, 48, 706-710.

Canale-Parola, E. (1970). Biology of the sugar fermenting *Sarcinae*. *Bacteriological Reviews* 34, 82-97.

Canale-Parola, E. (1986). Genus *Sarcina*. In *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*. Eds P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt. Baltimore, Williams & Wilkins. pp 1100-1103

Cavanagh, D. (2005). Coronaviruses in poultry and other birds, *Avian Pathology*, 34:6, 439-448, DOI: 10.1080/03079450500367682.

Díaz-Sánchez, S., Moriones, A., Casa, F. & Hofle, U. (2012). Prevalence of *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* and *Campylobacter sp.* in the intestinal flora of farm-reared, restocked and wild red-legged partridges (*Alectoris rufa*): is restocking using farm-reared birds a risk? *European Journal of Wildlife Research*, 58:99–105.

Duarte, J., Farfán, M. Á., Fa, J. & Vargas, J. M. (2014). Habitat-related effects on temporal variations in red-legged partridge *Alectoris rufa* abundance estimations in olive groves. *Ardeola* 61(1), 31-43.

De Gussem, M. (2007). Coccidiosis in poultry: review on diagnosis, control, prevention and interaction with overall gut health. Apresentado em 16th European Symposium on Poultry Nutrition.

De Gussem, M. (2010). Macroscopic scoring system for bacterial enteritis in broiler chickens and turkeys. In WVPA Meeting 01/04/2010. Merelbeke, Belgium.

Errington, E. (2017). *Spironucleus (Hexamita)* and Trichomoniasis in Game Birds. *Nadis*, Animal Health skills.

Eagleson C. (2014). Impact of drinking water temperature during brooding stage on bodyweights of broiler chicks. Proceedings, International Poultry Scientific Forum, Atlanta.

European Economic Community Council Regulation. Annex IV of Council Regulation EEC 1798/95, 1995.

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

Fronte, B., D'Àgata, M. & Bagliacca. (2010). Reproductive Performances of red-legged Partridges (*Alectoris rufa*) in Relation to Age and Season. Artigo apresentado em XIIIth European Poultry Conference.

Fernández, V. M. (1998). Cria y manejo de la Perdiz em cautividad. In *La Perdiz Roja: I curso*. Grupo editorial V. pp. 107-118.

Ferreira, J.D. (2012). Presence of *Cryptosporidium bailey* in different Red Grouse (*Lagopus lagopus scoticus*) moors and its relation with agents of other avian diseases. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa. 1-74.

Friedhoff, K.T., Kuhnigk, C. & Muller, I. (1991). Experimental infections in chickens with *Chilomastix gallinarum*, *Tetratrichomonas gallinarum*, and *Tritrichomonas eberthi*. *Parasitology Research* 77, 329–334.

Fairchild, B.D. & Ritz, C.W. (2012). Poultry drinking water primer. UGA Cooperative extension Bulletin 1301. Athens, GA: University of Georgia Cooperative Extension Service

García-Abad, C.S., Pérez Garrido, J.A., Díaz Cano, J.V., González, F.J. & Monzo, J. F. (2014). Situación actual de la Perdiz Roja en España – Las selecciones avícolas alternativas, nº4, Abril. 47-51.

García-Abad, C.S., Moriones, M. A., Casas, F. & Hofle, U. (2011). Prevalence of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Campylobacter* sp. in the intestinal flora of farm-reared, restocked and wild red-legged partridges (*Alectoris rufa*): is restocking using farm-reared birds a risk? *European Journal of Wildlife Research*. 58:99–105.

García-Abad, C.S., Alonso de La Varga M.E., Martín, R.P, Eguren V. G & Lacasa V.R. (2009). Una visión sobre la avicultura para la producción de caza en España. ITEA, Vol 105 (3), 169-183.

García, J. (2017). La integridade Intestinal: Valoración. Apresentado em I Jornadas Internacionas de Avicultura. Vila Real, Portugal.

García, J.N. (1998) La bioecología de la Perdiz Roja. In La Perdiz Roja: I curso. Grupo editorial V. pp: 35.

García Martín, E. & Dalmau, A. (2003). Reproducción de la perdiz roja y la codorniz. En: Reproducción e incubación en avicultura. Real Escuela de Avicultura, Arenys de Mar, Barcelona, España, pp: 457–495.

González-Redondo, P., Gutierrez-Ecobar, R., Díaz-Merino, R., Panea-tejera, P. & Martínez-Domínguez, A. R. (2012). Duración de la incubación artificial en perdiz roja (*Alectoris rufa*). ITEA, VOL. 108 N.o 3 (289-297), 2012.

González-Redondo, P. (2006) Influence of the laying date on the Fertility and Hatchability of Red-legged Partridge (*Alectoris rufa*) Eggs. *Poultry Science Association*. 15:579-583.

González-Redondo P., 2010. Effect of long-term storage on the hatchability of red-legged partridge (*Alectoris rufa*) eggs. *Poultry Science*. 89:379–383.

González-Redondo, P. & De la Rosa Sánchez S. (2009). Efecto de la duración de la fase de volteo de los huevos de perdiz roja (*Alectoris rufa*) durante la incubación sobre la tasa de eclosión. ITEA-Inf. Tec. Econ. Ag. 105:291–295.

Gómez-de-travecedo, P. (2014). Efectos de la temperatura de conservación y de incubación sobre la viabilidad del huevo fértil de Perdiz Roja (*Alectoris rufa*). Sevilla. pp: 47, 102.

Gibbs, P.S. & McDougald, L. (2008). Coccidiosis in Game Birds part III: A proposal for research on the disease agents, their control by existing drugs, and control by immunization. North Dakota State.

Gruber, A., Pereira, C.A.B., Costa, L.F. & Castañón C.A.B. (2007). COCCIMORPH - A System for Automatic Diagnosis of Coccidia through Morphological Analysis. Acedido em: <http://www.bioinfovir.icb.usp.br/coccisite/CocciRegister/> (consultado em 10 janeiro 2018).

Gerhold, R.W., Fuller, A.L., & McDougald, L.R. (2016). Coccidiosis in the Chukar Partridge (*Alectoris chukar*): A Survey of Coccidiosis Outbreaks and a Test of Anticoccidial Drugs Against *Eimeria kofoidi*. Avian Diseases: December 2016, Vol. 60, No. 4, pp. 752-757.

Guérin, J. L., Balloy, D. & Villate, D. (2011a). Maladies parasitaires: Coccidioses. In Maladies des Volailles 3e. France Agricole Editions. pp. 391-405.

Guérin, J. L., Balloy, D. & Villate, D. (2011b). Maladies parasitaires: Trichomonose. In Maladies des Volailles 3e. France Agricole Editions. pp. 408-410.

Guérin, J. L., Balloy, D. & Villate, D. (2011c). Aviculture et santé publique: Les infections à *Campylobacter*. In Maladies des Volailles 3e. France Agricole Editions. pp. 460-462.

Guérin, J. L., Balloy, D. & Villate, D. (2011d). Maladies bactériennes: Infections à *Escherichia coli*. In Maladies des Volailles 3e. France Agricole Editions. pp. 315-324.

Guérin, J. L., Balloy, D. & Villate, D. (2011e). Maladies virales du poulet, de la dinde et de la pintade: Coronavirose de la poule, la bronchite infectieuse aviaire. In Maladies des Volailles 3e. France Agricole Editions. pp. 212-219.

Game and Wild life Conservancy Trust. (2004). *Hexamita* in pheasants: Glucose key to understanding *Hexamita*. Consultado em: <https://www.gwct.org.uk/research/species/birds/common-pheasant/hexamita-in-pheasants/> (Acedido em 3 de Fevereiro de 2018)

Gortázar, C., Villafuerte, R. & Martín, M. (2000). Success of traditional restocking of red-legged partridge for hunting purposes in areas of low density of northeast Spain, Aragón. Z. Jadwiss 46:23–30

Garrido, J.L. (2002). Capturas de perdiz roja (Economía inducida por la caza de perdiz) In: Aportaciones a la gestión sostenible de la caza, tomo I. FEDENCA. Madrid, 141–147.

Garrido, J. (2011). ¿Es pura nuestra perdiz roja? Primeros datos del mapa genético de la perdiz roja em españa (proyecto Fedenca/Fundación Biodiversidad). Apresentado em Seminario Nacional de Perdices. León.

Heuer, O. E., Pedersen, K., Andersen, J. S. & Madsen, M. (2001). Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 269-274.

Hernandez, M.J. (1991). Producción cinegética: Granjas de perdices. Manual de Ordenación y Gestión Cinegética. IFEBA. Badajoz. pp. 135-154.

Hylands, M. & Elsheikha, H. (2014). Enteric infectious diseases of game birds. *Companion animal*. Volume 19, No 6.

Ameloot, H. (2018). Antibiotiques: Ou en Est-on? Plan Eco-antibio, resultats en elevage gibier. Présenté en Journée Technique: Utiliser moins d'antibiotiques: un enjeu également pour la filiere gibier. Saint-Pere-Sur-Loire, France.

Huneau-Salaün, A., Denis, M., Balaine, L. & Salvat, G. (2007). Risk factors for *Campylobacter* spp. colonization in French free-range broiler-chicken flocks at the end of the indoor rearing period. *Preventive Veterinary Medicine*, 80. 34 – 48.

Harris, G.C., Jr., Nelson, G.S., Seay, R.L. & Dodgen, W.H. (1974). Effect of drinking water temperature on broiler performance. *PoultrySci*.54:77S-779.

Hardin & Roney. (1989). Effects of pH on selected bacteria. Alabama Department of Agriculture and Industry Report.

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

Johansson, K.R., & Sarles, W.B. (1948). Bacterial population changes in the ceca of young chickens infected with *Eimeria tenella*. *Journal of Bacteriology*. 56: 635- 647.

Jong, I.C., Gunnink, H. & Harn, J.V. (2014). Wet litter not only induces footpad dermatitis but also reduces overall welfare, technical performance, and carcass yield in broiler chickens, *The Journal of Applied Poultry Research*, Volume 23, Issue 1, Pages 51–58.

Kiefer, L., & Raines, T. (1983). Break-out group work session on fowl. Pages 1-12 in: Proc. IR-4/FDA Workshop for Minor Use of New Animal Drugs. R. H. Kupelian, ed. Rutgers University, New Brunswick, NJ. Section 6b.

- Kimura, N., Mimura, T., Nishida, S., Kobayashi, A. & Mitsuoka, T. (1976). Studies on the relationship between intestinal flora and cecal coccidiosis in chicken. *Poultry Sci.* 55:1375-1383.
- Kulda, J., & Nohynkova, E. (1978). Flagellates of human intestine and of intestines of other species. In: *Parasitic Protozoa*. vol. 2. J.P Kreier, ed. Academic Press, New York. pp. 2-138.
- Kirkpatrick K. & Fleming, E. (2008). Water quality ROSS TECH 08/47. Aviagen, Cummings Research Park: Huntsville, AL.
- Llauradó, Ll. (1987). Incubación artificial de huevos de perdiz. *Selecciones Avícolas* 29: 144-147.
- Lopez, R.E. (2016, Setembro). Countering Early Losses in Chick Condition. Cobb-Vantress. Disponível: http://cobb-vantress.com/academy/articles/article/academy/2016/09/20/countering-early-losses-in-chick-condition?mbl=f&utm_campaign=Hatchery&utm_source=CounteringEarlyLossesInChickCondition&utm_medium=Facebook&utm_content=ImageLink (Consultado em 25 de janeiro de 2018).
- Liebhart, D., Neale, S., Garcia-Rueda, C., Wood, A.M., Bilic, I., Wernsdorf, P., Jaskulska, B. & Hess, M. (2014). A single strain of *Tetratrichomonas gallinarum* causes fatal typhlohepatitis in red-legged partridges (*Alectoris rufa*) to be distinguished from histomonosis. *Avian Pathol.* 2014; 43(5):473-480.
- Lee, D.L. (1972). Changes in the ultrastructure of the caecum of chickens caused by *Trichomonas gallinarum*. *Parasitology* 65, 71–76.
- Lloyd, S. & Gibson, J.S. (2006). Haematology and biochemistry in healthy young pheasants and red-legged partridges and effects of spironucleosis on these parameters, *Avian Pathology*, 35:4, 335-340.
- Lloyd, S., Irvine, K.L., Eves, S.M. & Gibson, J.S. (2005). Fluid absorption in the small intestine of healthy game birds and those infected with *Spironucleus* spp. *Avian Pathology*, 34, 252-257.
- Liu, ZF, Wang, LJ, Beasley, D and Oviedo, E. 2007. Effect of moisture content on ammonia emissions from broiler litter: A laboratory study. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 58: 41–53.
- Lister, S.A., Beer, J.V., Gough, R.E., Holmes, R.G., Jones, J.M.W. & Orton, R.G. (1985). Outbreaks of nephritis in pheasants (*Phasianus colchicus*) with a possible coronavirus aetiology. *Veterinary Record*, 117, 612-613.
- Long, P. & Millard, B. (1979). Studies on *Eimeria dispersa* Tyzzer 1929 in turkeys. *Parasitology*, 78(1), 41-45.

Moleón, M., Sánchez-Zapata, J.A., Gilsanchez, J.M., Ballesteros-Duperón, E., Barea-Azcón, J.M. & Virgós, E. (2012). Predator-prey relationships in a mediterranean vertebrate system: Bonellis` eagles, rabbits and partridges. *Oecologia*, 168: 679-689.

Muñoz, G.R. (2013). *Espécies Cinegéticas: Instalaciones para la cría y repoblación*. Ediciones Mundi-Prensa, pp. 53-54, 55-69.

Miao, Z. H., Glatz, P. C. & Ru, Y. J. (2005). Free-range Poultry Production – A Riview. *Asian-Australian. Jornal Animal Science*. Vol 18, No. 1 : 113-132

Millán, J. (2009). Diseases of the Red-Legged Partridge (*Alectoris rufa*): a review. *Wildlife Biology in Practice*, 5(1): 70-88.

Millán, J., Gortázar, C., Buenestado, F.J., Rodriguez, P., Tortosa, F.S. & Villafuerte, R. (2003). Effects of a fiber rich diet on physiology and survival of farm-reared red-legged partridges (*Alectoris rufa*). *Comp Biochem Physiol* 134:85–91.

Millán, J., Gortazar, C. & Villafuerte, R. (2001). Marked differences in the splanchnometry of farm- bred and wild red-legged partridges (*Alectoris rufa* L.). *Poult. Sci.* 80:972-976.

Mourão, J.L., Barbosa, A.C., Outor-Monteiro, D. & Pinheiro, V.M. (2010). Age affects the laying performance and egg hatchability of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) in captivity. *Poultry Science*. 89:2494–2498.

Morris, G.M. & Gasser, R.B. (2006). Biotechnological advances in the diagnosis of avian coccidiosis and the analysis of genetic variation in *Eimeria*. *Biotechnology Advances* 24: 590-603.

McDougald, L.R. & Fitz-Coy, S.H. (2008). Coccidiosis. In Saif, Y.M., *Diseases of poultry*. UK: Blackwell Publishing Ltd. pp. 1068-1085.

Marien, M., De Gussem, M., Vancraeynest, D., Fort, G. & Naciri, M. (2007, Agosto). Indication of cross-resistance between different monovalent ionophores as determined by an anticoccidial sensitivity test (AST). Accepted for Proceedings XVIth European Symposium on Poultry Nutrition, Strasbourg, France.

Müller, M. (1993). The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology* 139, 2879–2889.

Mehlhorn, H., Al-Quraishy, S., Amin, A. & Michael, H. (2009). Fine structure of the bird parasites *Trichomonas gallinae* and *Tetratrichomonas gallinarum* from cultures. *Parasitology Research* 105, 751–756.

McDougald, L.R. (2008). Histomoniasis (Blackhead) and other protozoan Diseases of the intestinal tract. In Saif, Y.M., Diseases of poultry. UK: Blackwell Publishing Ltd. pp. 1095-1104.

McDowell, S. (1953). Morphological and taxonomic study of the caecal protozoa of the common fowl, *Gallus gallus*. *Journal of Morphology* 92, 337–399.

Müller, M. (1990). Biochemistry of *Trichomonas vaginalis*. In *Trichomonads Parasitics in Humans* (ed. Honigberg, B.M.). Springer, New York, N, USA. pp. 53–83.

Martynova-Van Kley, A., Oviedo-Rondón, E. Dowd, S., & Armen., N. (2012). Effect of *Eimeria* infection on cecal microbiome of broilers fed essential oils. *International Journal of Poultry Science* 11:747-755.

MAPA. (1993). Estadísticas de caza. Annual Report. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, Spain

McFarlane (2014). Upland Game Bird Industry: \$5 Billion impact and growing. Presented in: Report of the committee on transmissible diseases of poultry and other avian species. Missouri, Kansas.

New, D.A.T. (1957). A critical period for the turning of hen's eggs. *J. Embryol. Exp. Morph.* 5:293–299.

Naciri, M., Fort, G., Briant, J., Duperray, J. & Benzoni, G. (2014). Incidence of single and mixed infections with *Eimeria kofoidi*, *E. caucasica* and *E. legionensis* on the health of experimentally infected red-legged partridges (*Alectoris rufa*). *Veterinary Parasitology* 205(1-2):77-84

Naciri, M., Repérant, J.M., Fort, G., Crespín, J., Duperray, J. & Benzoni, G. (2011). *Eimeria* involved in a case of coccidiosis in farmed red-legged partridges (*Alectoris rufa*) in France: oocyst isolation and gross lesion description after experimental infection. *Avian Pathology*, 40:5, 515-524

Oviedo-Rondón, E. & Hume, M.E. (2012). Equilibrium in the gut Ecosystem for Productive Healthy birds. North Carolina State University. Prestage department of Poultry Science.

Oviedo-Rondón, E., Hume, M., Hernández, C. & Clemente-Hernández, S. (2006) Intestinal microbial ecology of broilers vaccinated and challenged with mixed *Eimeria* spp., and supplemented with essential oil blends. *Poultry Science* 85:854–860.

Pérez y Pérez, F. (1981a). Estudio de las Perdices. In *La perdiz roja española*. Editorial Científico-Médica, Barcelona, Espanha. pp.4-22

Pérez y Pérez, F. (1981b). Cria y explotacion de la perdiz roja: sistemas de cria, puesta. In *La perdiz roja española*. Editorial Científico-Médica, Barcelona, Espanha. pp.325-365

Pérez y Pérez, F. (1981c). Sistema glandular y procriativo. In La perdiz roja española. Editorial Científico-Médica, Barcelona, Espanha. pp.119-132.

Pérez y Pérez, F. (1981d). Habitat de la Perdiz roja: luminosidade. In La perdiz roja española. Editorial Científico-Médica, Barcelona, Espanha. pp.201-230

Pérez y Pérez, F. (1981e). Estación sexual y procriativa. In La perdiz roja española. Editorial Científico-Médica, Barcelona, Espanha. pp.175-188.

Pérez y Pérez, F. (1981f). Cria industrial de pulluelos. In La perdiz roja española. Editorial Científico-Médica, Barcelona, Espanha. pp.365-383.

Prieto, R., Sánchez-García, C., Alonso, M.E, Rodríguez, P.L. & Gaudioso, V.R. (2012). Do pairing systems welfare of captive Red-legged Partridges (*Alectoris rufa*) in laying cages?. Poultry Science. 91:1751-1758

Pagés, A. (1991). Patologías de la perdiz roja. En La perdiz roja. Fundación La Caixa-AEDOS, Barcelona, España, pp: 57-60.

Rivoal, K., Ragimbeau, C., Salvat, G., Colin, P., & Ermel, G. (2005) Genomic diversity of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolates recovered from free-range broiler farms and comparison with isolates of various origins. Appl Environ Microbiol **71**: 6216–6227.

Rodríguez-Ponga, G.D. (1994). La Perdiz. Cria e Explotacion. Tradução de: Elevage des perdrix grises et des perdrix rouges (Office national de la chasse). Editions Mundi-Prensa. pp. 9.

Railliet, A., & Lucet, A. (1890). Une nouvelle maladie parasitaire de l'oise domestique, determine par des coccidies. Comptes rendus des séances et memories do la Société de biologie. Paris 42:292-294

Schricke E. (1991a). Introduction. In Faisan de chasse: Elevage et maladies. Éditions du Point Vétérinaire. pp. 9-11.

Schricke E. (1991b). Faisan sauvage e Faisan de chasse. In Faisan de chasse: Elevage et maladies. Éditions du Point Vétérinaire. pp. 13-50.

Schricke E. (1991c). Protozoaires: coccidioses. In Faisan de chasse: Elevage et maladies. Éditions du Point Vétérinaire. pp. 213-226.

Schricke E. (1991d). Protozoaires: Trichomonose/Hexamitose. In Faisan de chasse: Elevage et maladies. Éditions du Point Vétérinaire. pp. 227-235.

Schricke E. (1991e). Elevage des jeunes. In Faisan de chasse: Elevage et maladies. Éditions du Point Vétérinaire. pp. 127-155.

Silva, F. (2004). Espécies em cativeiro – À conversa com José Faustino – Caça & Cães de Caça, Mar. 77: 20-22.

Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Esteso, M. C., López-Sebastián, A., Gañán, N., Hierro, M. J., Marchal, F., Campo, J. L. & Blesbois, E. (2015) Characterization of red-legged partridge (*Alectoris rufa*) sperm: Seasonal changes and influences of genetic purity. Poultry Science 94:80-87

Saperas J.M., 1992. Manejo del huevo de perdiz roja en instalaciones cinegéticas. Mundo Ganadero 11:76–78.

Soyez, D. (1991) Cría de la Perdiz Roja desde em nacimiento hasta la venta. Control. En: La perdiz roja. Fundación La Caixa-AEDOS, Barcelona, España, pp: 12, 11-14,

Salmon, D.E. (1899). The diseases of Poultry. The Feather library, George E. Howard and Co., Washington, DC.

Slavin, D., & Wilson. J. E. (1960). A fuller conception of the life cycle of *Hexamita meleagridis*. Poultry Science. 39:1559-1576.

Slavin, D., & Wilson J. E. (1953). *Hexamita maleagridis*. Nature, 172: 1179-1181.

Singleton, R. (2004). September issue: Hot weather broiler and breeder management. In Asian Poultry Magazine, pp 26-29.

Spackman, D. & Cameron, I.R.D. (1983). Isolation of infectious bronchitis virus from pheasants. Veterinary Record, 113, 354-355.

Turk, D.E. & Littlejohn, V.P. (1987). Coccidial Infections and Gut Microflora, Poultry Science, Volume 66, Issue 9, Pages 1466–1469

Tortuero, F. (1973). Influence of the implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. Poultry Sci. 52:197-203.

Tabler, T., Wells J. & Zhai W. (2013). Water quality critical to broiler performance. Mississippi State University Extension Service.

Tolentino, L.F., Kallichanda, N., Javier, B., Yoshimori, R. & French, S.W. (2003). A case report of gastric perforation and peritonitis associated with opportunistic infection by *Sarcina ventriculi*. *Laboratory Medicine* 34, 535-537.

Talaro, A. & Talaro, K.P. (1999). *Foundations of Microbiology* 3th edition. McGraw-Hill Companies.

Teirlynck, E., De Gussem, M., Dewulf, J., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. & Van Immerseel, F. (2011). Morphometric evaluation of “dysbacteriosis” in broilers, *Avian Pathology*, 40:2, 139-144.

Vandeplass, S., Dubois-Dauphin, R., Palm, R., Beckers, Y., Thonart, P. & Théwis, A. (2010). Prevalence and sources of *Campylobacter* spp. contamination in free-range broiler production in the southern part of Belgium. *Biotechnologie Agronomie Société Environnement* (2), 279-288.

Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Huyghebaert, G., Haesebrouck, F. & Ducatelle R. (2004). *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health, *Avian Pathology*, 33:6, 537-549, DOI: 10.1080/03079450400013162.

Vilanova, F.H. (1991) *La perdiz roja*. Hojas divulgadas - Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentacion. pp. 1-15.

Vallance, M., Queney, G., Soyez, D. & Ricci J.C. (2006). Mise au point et validation d'un système de marqueurs génétiques pour les perdrix rouges hybrides. ONCSF Rapport scientifique, 76 80. Disponible online em: http://www.oncfs.gouv.fr/IMG/file/oiseaux/galliformes/plaine/vallance_rs06.pdf (Consultado 26 Janeiro 2018).

Vervelde, L., Vermeulen, A. & Jeurissen, S. (1993). Common epitopes on *Eimeria tenella* sporozoites and cecal epithelium of chickens. *Infect. Immun.* 61, 4504–4506.

Visco, R.J. & Burns, W.C. (1972). *Eimeria tenella* in bacteria-free and conventionalized chicks. *J. Parasitol.* 58: 323-331.

Vatn, S., Tranulis, M.A. & Hofshagen, M. (1999). *Sarcina*-like bacteria, *Clostridium fallax* and *Clostridium sordellii* in lambs with abomasal bloat, haemorrhage and ulcers. *Journal of Comparative Pathology* 122, 193-200.

Waldenstedt, L. (2004). An estimation of the cost of coccidiosis to Swedish poultry production. Proceedings of XII World's Poultry Congress, 8-13 June, 2004 Istanbul, Turkey.

Wood, A.M. & Smith, H.V. (2005). Spironucleosis (Hexamitiasis, Hexamitosis) in the Ring-Necked Pheasant (*Phasianus colchicus*): Detection of Cysts and Description of *Spironucleus meleagridis* in Stained Smears. *Avian Diseases* 2005 49 (1), 138-143.

Wilson, J.W. & Slavin, D. (1955). Hexamitiasis of turkeys. *Vet. Rec.* 67: 236-242.

Willey, J.M., Sherwood, L. & Woolverton, C.J. (2008). Microbial Growth. In Prescott, Harley, and Klein's Microbiology. (pp. 119-149). McGraw-Hill Higher Education.

Watkins, S.J., Cornelison, C.T., Wilson, M. & Hubbard, R. (2004). Effect of water acidification on broiler performance. *Avian Advice* 6:2

Yabsley, M.J. (2008). *Eimeria*. In Atkinson, C.T., Thomas, N.J. & Hunter, D.B., Parasitic diseases of wild birds. (pp.162-180). USA: Willey-Blackwell.

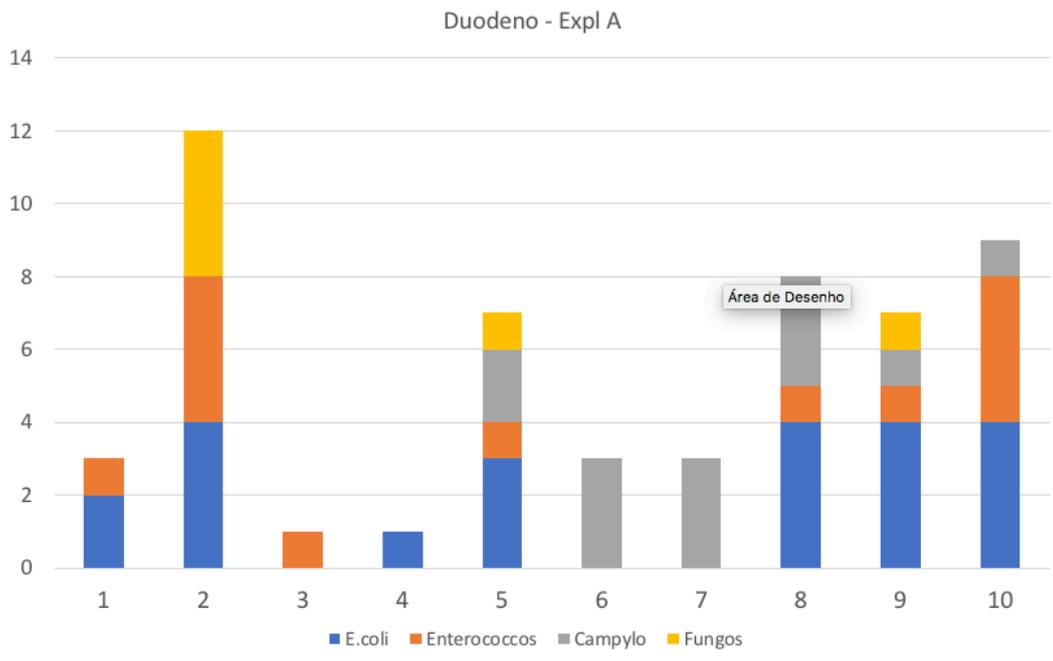
Zenner, L., Callait, M.P., Granier, C. & Chauve, C. (2003) In vitro effect of essential oils from *Cinnamomum aromaticum*, *Citrus limon*, and *Allium sativum* on two intestinal flagellates of poultry, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Histomonas meleagridis*. *Parasite* 10, 153–157.

8. ANEXOS

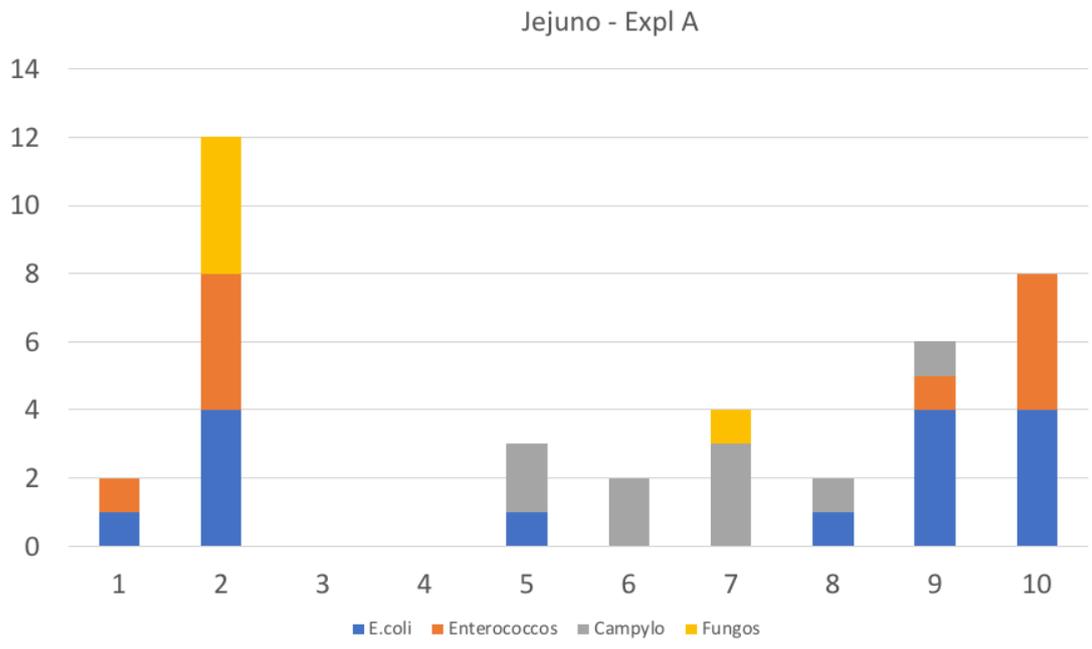
ANEXO I – Evolução das populações bacterianas em cada segmento intestinal

Exploração A

Duodeno

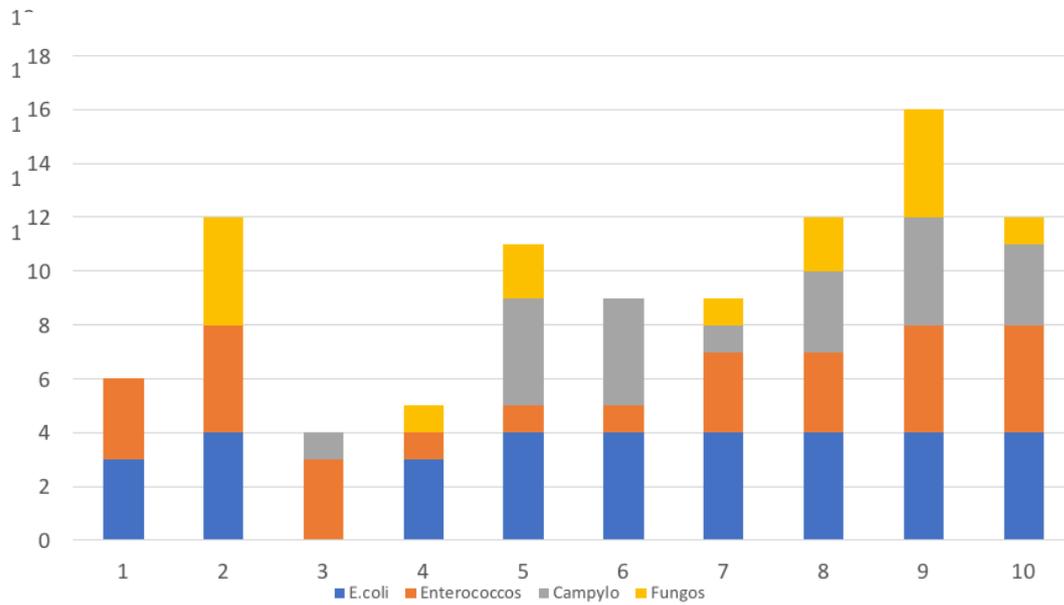


Jejuno/íleo



Ceco

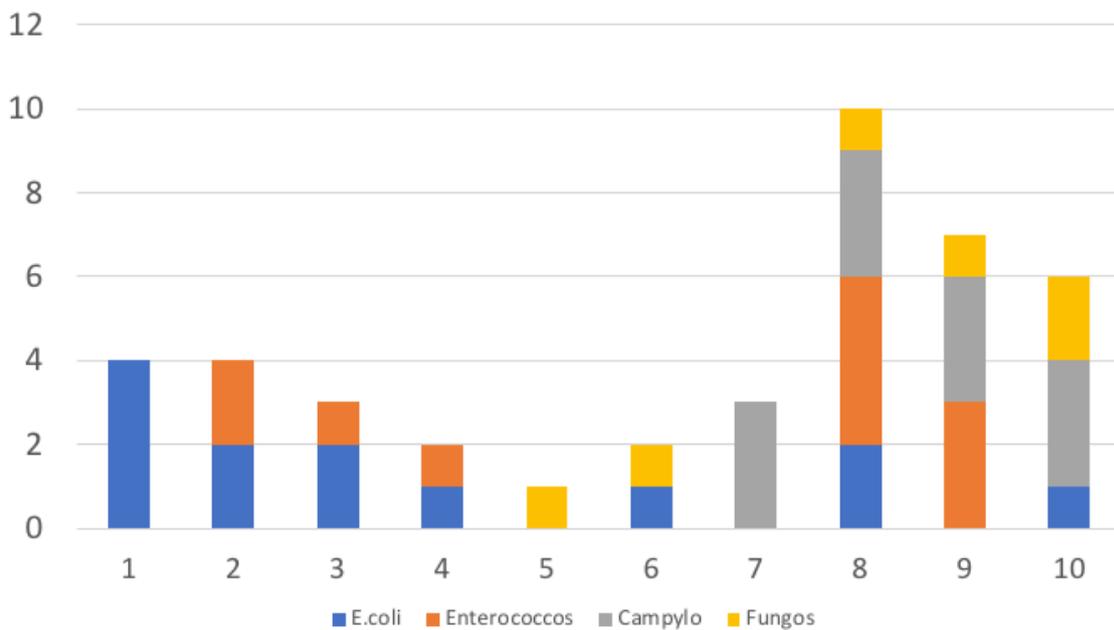
Ceco - Expl A



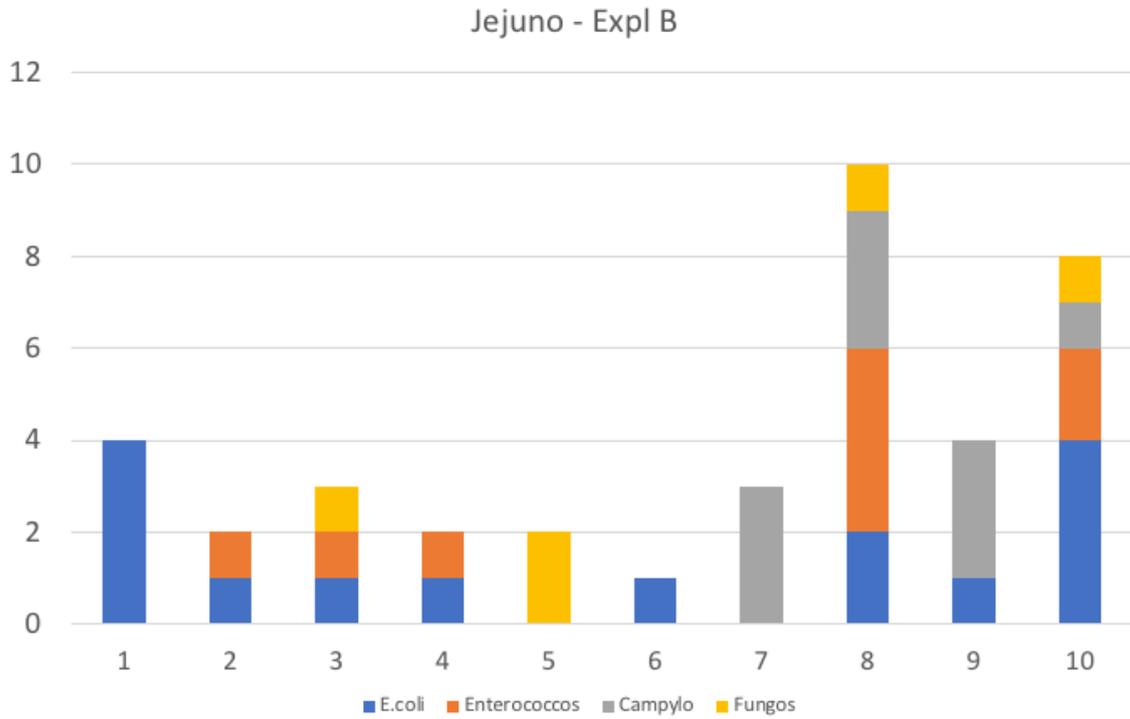
Exploração B

Duodeno

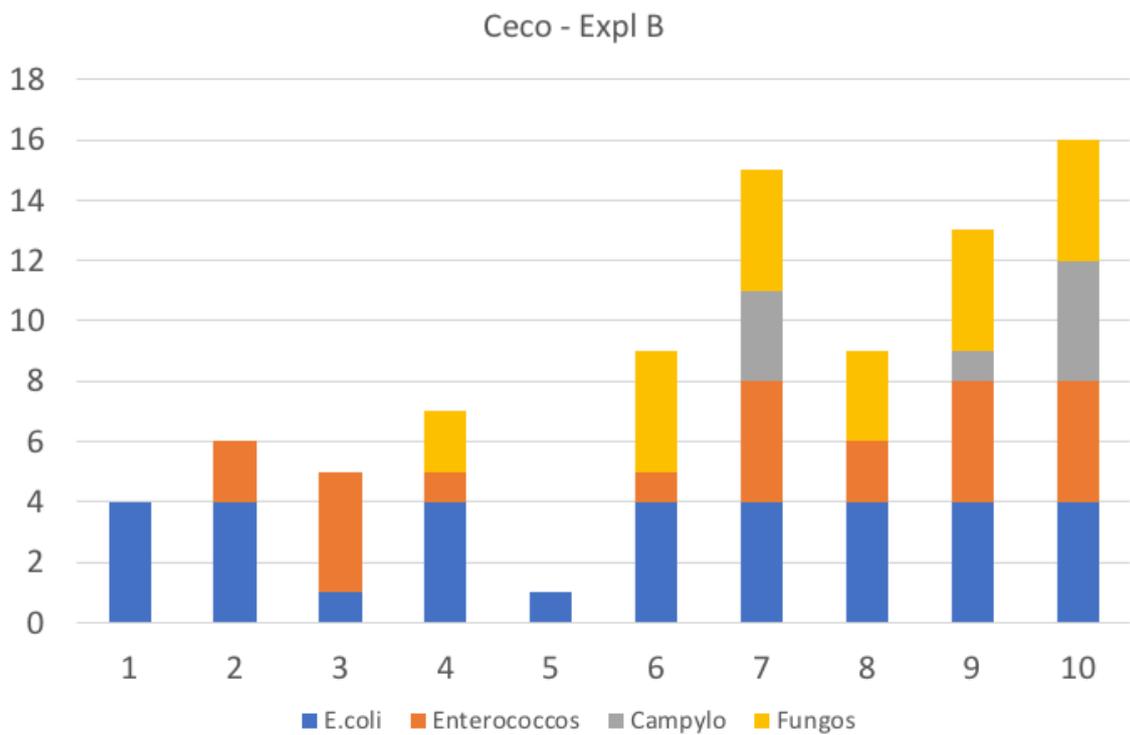
Duodeno - Expl B



Jejuno/ileo



Ceco



ANEXO II – Informações relativas ao kit rápido de diagnóstico de IBV

IBV Ag

Infectious bronchitis virus antigen

Infectious bronchitis (IB) is a worldwide distributed viral disease affecting all age of chickens. The morbidity rate is extremely high and the mortality rate is dependent on the age of the chickens when infected, and the presence of secondary invading organisms such as E. coli. It is highly contagious disease that entire flock can be transmitted within one or two days, through aerosol transmission (sneezing), contaminated organic material, drinking water and equipment. The target organs of the virus are trachea and kidney for the respiratory strain and nephrogenic strain respectively. It is financially important disease in poultry industry because affected layers have decreased egg production and poor egg quality.



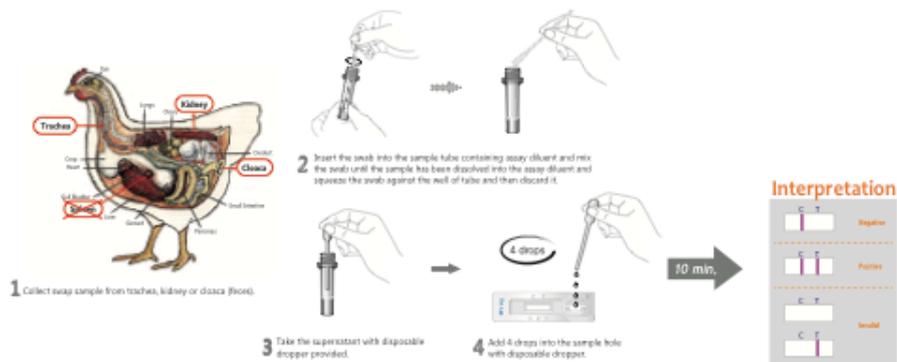
Indications

- Field monitoring of Infectious Bronchitis virus
- Tentative diagnosis for swift control in outbreak suspected situation
- Differential diagnosis of other avian major diseases

Special Features

- Detection of IBV
- No cross-reaction with other avian viruses
- Specimens: Trachea, kidney, cloaca (feces)
- Sensitivity: 94.1% vs. RT-PCR
- Specificity: 95.2% vs. RT-PCR

Test Procedures



Ordering Information

Cat. No.	Description	Type	Pack size
RG15-13	Rapid IBV Ag	Device	1 Test x 10/Kit

One step Infectious Bronchitis Virus antigen test

Anigen Rapid IBV Ag Test Kit

■ Principles

The **Anigen Rapid IBV Antigen Test Kit** is a chromatographic immunoassay for the qualitative detection of Infectious Bronchitis Virus antigen in avian tracheal, kidney or fecal samples.

Anigen Rapid IBV Antigen Test Kit has a letter of “T” as test line and “C” as control line on the surface of the device. The test line and control line in result window are not visible before applying any samples. The control line is used for procedural control. The control line should always appeared if the test procedure is performed properly and the test reagents of control line are working. A purple test line respectively will be visible in the result window if there are enough Infectious Bronchitis Virus antigens in the sample.

The specially selected Infectious Bronchitis Virus antibodies are used in test band as both capture and detector materials. These enable **Anigen Rapid IBV Antigen Test Kit** to identify Infectious Bronchitis Virus antigen in avian tracheal, kidney or fecal samples with a high degree of accuracy.

■ Materials provided (10 Tests/Kit)

- 1) Ten(10) Anigen Rapid IBV Ag Test Devices
- 2) Ten(10) Assay diluents
- 3) Ten(10) Sample collection swabs
- 4) Ten(10) Disposable droppers
- 5) One(1) Instruction for use

■ Precautions

- 1) For veterinary use only.
- 2) For the best result, strict adherence to instruction is required.
- 3) All samples should be handled as being potentially infectious.
- 4) Do not open or remove test kit from their individually sealed pouches until immediately before their use.
- 5) Do not use the test kit if the pouch is damaged or the seal is broken.
- 6) Do not reuse test kit.
- 7) All reagents must be at room temperature before running the assay.
- 8) Do not use reagents beyond the stated expiration date marked on the package label.
- 9) Do not mix components from different lot numbers because the components in this kit have been quality control tested as standard batch unit.

■ Storage and Stability

- 1) The kit must be stored at room temperature or refrigerated (2~30°C). **DO NOT FREEZE.**
- 2) Do not store the test kit in direct sunlight.
- 3) The test kit is stable through the expiration date marked on the package label.

■ Procedure of the test

- 1) Take a swab sample from a cloaca (feces), trachea or kidney with the sample collection swab. Scattered wet feces are also available.
- 2) **For more accurate test result, take 3 part of sampling in cloaca, trachea, or kidney with a swab.**
- 3) Insert the swab into the sample collection tube containing assay diluent.
- 4) Mix the swab until the sample has been dissolved into the assay diluent.
- 5) Leave the tube until the large particles have settled down to the bottom of the tube (Approximately 1 minute).
- 6) Remove the test device from the foil pouch, and place it on a flat and dry surface.
- 7) Using a disposable dropper provided, take an aliquot from the extracted and mixed sample in the tube.
- 8) Add **4 (four) drops** into the sample hole with the disposable dropper.
- 9) As the test begins to work, you will see purple color move across the result window in the center of the test device. If the migration has not appeared after 1 minute, add one more drop of the mixed assay diluent to the sample well.
- 10) Interpret test results at **10 minutes**.

■ Interpretation of the test

1) Negative result

The presence of only one band within the result window indicates a negative result.



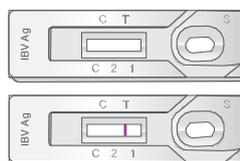
2) Positive result

The presence of two color bands (“T” and “C”) within the result window, no matter which band appears first indicates a positive result.



3) Invalid result

If the control band is not visible within the result window after performing the test, the result is considered invalid. The directions may not have been followed correctly or the test may have deteriorated. It is recommended that the sample be re-tested.



■ Limitation of the test

This kit can detect Infectious Bronchitis Virus antigen. Although the Anigen Rapid IBV Ag Test Kit is very accurate in detecting Infectious Bronchitis Virus antigen, a low incidence of false results can be occurred.

This kit is for screening purpose. Other clinically available tests are required if questionable results are obtained. As with all diagnostic tests, a definitive clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should only be made by the veterinarian after all clinical and laboratory findings have been evaluated.

Doc. No. : I 1513-4E
Issued date : Jun. 18, 2013



BioNote, Inc.
22 Samsung1-ro 4-gil, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-170, Republic of Korea
TEL: 82-31-211-0516 | FAX: 82-31-8003-0618 | www.bionote.co.kr

ANEXO III – Mapa de mortalidade e registos da exploração B

FICHE ÉLEVAGE

Nom : Tunnel n° 1 Espèce : Perruches rouges
 Bat. : Tunnel n° 1 Souche : + Glins
 Barthelemy Arnaud : 02 54 86 61 14 Date mise en place : 13/06/2017 N° mis en place : 4400 Rj + 97 col.
 Thoreau s.a. : 02 38 95 50 14

Date	Semaine	MORTALITÉ							TOTAL mortalité	Cumul %	Traitements observations	Livraison aliment	
		Lun.	Mar.	Mer.	Jeu.	Ven.	Sam.	Dim.				Date	Quantité
1	1			3	6	12	28	15	64	14	o Amoxy 0,4gr/l + Neo 0,5gr/l		
1	1	8	6	7	5	1	2	2	95				+6 victo.
2	2	5	1	10	20	5	0	10	110	25			
3	3	1	3	6	3	4	17	1	145		* Amoxy 0,22gr/l + Neo 0,5gr/l + 6 victo.		
4	4	4	2	1	4	1	1	2	159				
5	5	2	27	9	37	65	22	21	342		Baycox + Amoxy + Neo		
6	6	25	13	26	27	36	40	16	531	12	o Amoxy + Neo		
7	7	6	16	19	8	13	21	24	638		+ Amoxy + Sildan		
8	8	55	9	20	10	5	4	4	742		⊕ Tia + Transg		
9	9	15	2	8	5	8	30	10	810		Baycox Néomaxul Tylas 3ml 115ml 0,15		
10	10	4	4	1	1	1	3	2	834	19	gulla Amoxy Nitro 12ml 0,3ml 3ml ✓ Nitro 2 Amoxy 0,17 Neo 0,17 Sachazol 1		
11	11	16	20	6	29	4	16	14	929				
12	12	18	10	14	36	34	53	39	1137		o Baycox 3ml + Amoxy 0,1gr/l		
13	13	25	24	6	22	28	18	10	1466	33%	Tia + Transg		
14	14	35	14	15	14	12	31	8	1595		+ Tia + Transg		
15	15	8	11	14	10	14	14	14					
16	16	14	8	16							x Tia 2,5 Transgram 2 acix 0,1 acixite 0,5		

ANEXO IV – Mapa de mortalidade e registos da exploração A

PB

PROGIBIER
L'ALIMENT TONIQUE

ELEVEUR / ADRESSE : ST Martin
 ESPECE : 3045 DEMARRAGE LE : 20/08/17
 NOMBRE : 2080 PR 1 ~~3045~~ WS

FICHE ELEVAGE

JOURS	MORTALITE + TRI		ALIMENTS	TRAITEMENTS		OBSERVATIONS
	NOMBRE	CUMUL		NATURE		
1	20/08	US PR				
2	21	1	1			
3	22	5				
4	23		1			
5	24					
6	25					
7	26	12	11			
8	27			-5 PR → Veto (thèse)		Cynidrah 2ml/L Neo 1g/L Phymox 0,4g/L Volavite 1ml/L
9	28					
10	29	55	53			
11	30	4	12	2		
12	01/09					
13	02					
14	03	13	15		-5 PR → Veto (thèse)	
15	04					
16	05					
17	06					
18	07	4	13	3		
19	08					
20	09					
21	10	8	7			
22	11			débecquage	-5 PR → Veto (thèse)	
23	12					
24	13	9	16	débecquage		(PR 16 étouffés)
25	14					
26	15					
27	16			4		
28	17	6	3			
29	18					
30	19					
31	20					
32	21	6			-5 PR → Veto (thèse)	
33	22			5		
34	23					
35	24	10				
36	25					
37	26					
38	27	3	7		-5 PR → Veto (thèse)	
39	28					
40	29			6		
41	30					
42	31	3	3			
	TOTAL 07				-5 PR → Veto	

ANEXO V – Tabela utilizada no registo de alterações e lesões intestinais

WEEK:		DATE:		Weekly Scoring Table														
		FARM:		Macroscopic alterations														
		Duodenum				Jejunum \ Ileum				Cecum								
Chick	Flacid	Inflammation	Content	Mucosa	Inflammation	Content	Flacid	Content (type)	color	Dilatation								
1																		
2																		
3																		
4																		
5																		
		Flagellate Protozoa				<i>Eimeria spp.</i>				Microbiology								
Water parameters		DD	JJ	CC	DD	JJ	CC	DD	JJ	CC	SBR	CPSE	CASA					
	PH																	
	TEMP	1																
		2																
		3																
		4																
		5																

