

**Curso: Mestrado**

**Nome do Aluno: *Rafaela Carolina Lopes Assis***

**Ano: 2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**Instituto de Ciências Biomédicas**

**Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**EFICIÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE CONTROLE SOBRE  
OOCISTOS DE *Eimeria acervulina* NA CAMA REUTILIZADA DE FRANGOS  
DE CORTE**

**RAFAELA CAROLINA LOPES ASSIS**

**UBERLÂNDIA**

**Fevereiro - 2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**Instituto de Ciências Biomédicas**

**Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**EFICIÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE CONTROLE SOBRE  
OOCISTOS DE *Eimeria acervulina* NA CAMA REUTILIZADA DE FRANGOS  
DE CORTE**

**Dissertação apresentada ao  
Colegiado do Programa de Pós-  
Graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas como  
requisito parcial a obtenção do  
título de Mestre em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas.**

**Aluna: Rafaela Carolina Lopes Assis**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Doutora Márcia Cristina Cury**

**UBERLÂNDIA**

**Fevereiro - 2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

A848e Assis, Rafaela Carolina Lopes, 1981-

Eficiência de diferentes métodos de controle sobre oocistos de *Eimeria acervulina* na cama reutilizada de frangos de corte / Rafaela Carolina Lopes Assis. - 2009.

70 f. : il.

Orientadora: Márcia Cristina Cury.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Pro-

grama de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Coccidiose em animais - Teses. 2. Coccidiose em ave - Teses.  
3. Aves - Doenças - Teses. I. Cury, Márcia Cristina. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU:

619:616.993.19

---

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela minha existência. Obrigada por mais esta vitória pessoal e profissional.

Aos meus pais, por sempre me apoiarem.

Ao meu marido Fábio e a minha irmã Raquel por, além de me apoiarem, terem participado ativamente deste trabalho.

À Professora Dra. Márcia Cristina Cury, pelo tempo dedicado em orientação e paciência, e pela amizade e sinceridade.

Ao Professor Jackson Victor de Araújo, por minha iniciação na pesquisa científica, pelo apoio e amizade.

Ao Dr. Juan Solis, pelos ensinamentos, generosidade e conselhos neste aprendizado.

Ao Professor Marcelo Beletti pelo apoio laboratorial e orientações.

À Universidade Federal de Uberlândia, aos professores e as secretárias Lucineide e Lucélia, pelo apoio e oportunidade de realização deste Mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

À EMBRAPA Suínos e Aves de Concórdia-SC, especialmente à Dra. Doralice Pedrosa, pelo fornecimento do isolado e orientações.

Ao Laboratório BIOVET pela manutenção e ajuste do isolado para este estudo.

À SADIA, pela abertura de seus aviários integrados, e a todos os funcionários que ajudaram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Aos amigos de trabalho da SADIA, principalmente Flávio, Kátia e Alysson, que me ajudaram com as coletas e Fabrício, pelo tratamento estatístico.

Aos laboratoristas Elaine Faria, da Parasitologia; Rui, da Histologia, e a estagiária Natália de Melo Nasser, pela boa vontade, amizade e apoio durante todo o processamento do material.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e deste sonho.

## LISTA DE FIGURAS

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 1.</b> Representação esquemática da distribuição da população de estudo. ....   | 19. |
| <b>Figura 2.</b> Curva de eliminação diária de oocistos recuperados das fezes de frangos inoculados experimentalmente com <i>Eimeria acervulina</i> , na primeira etapa experimental.....   | 27. |
| <b>Figura 3.</b> Curvas de eliminação diária de oocistos de <i>E. acervulina</i> recuperados nas fezes dos frangos, após tratamentos de controle da coccidiose. Grupo 1 (G1): Controle positivo (cama não tratada no intervalo sanitário), Grupo 2 (G2): Fermentação. Grupo 3 (G3): Fermentação e Amônia quaternária. Grupo 4 (G4): Amônia quaternária. Grupo5 (G5): Diclazuril via oral. ....                    | 29. |
| <b>Figura 4.</b> Médias (desvio padrão) das contagens totais de oocistos recuperados da cama de frangos de corte infectados naturalmente com <i>E. acervulina</i> , após tratamentos de controle da coccidiose, na cama reutilizada (P<0,05). (G1: Controle positivo, G2: Fermentação, G3: Amônia quaternária, G4: Fermentação e amônia quaternária, G5: Diclazuril via oral). ....                               | 32. |
| <b>Figura 5.</b> Correlação entre os valores médios do número de oocistos e dos escores de lesões macroscópicas intestinais, por grupo de tratamento, em frangos de corte experimental (Inoculado) e naturalmente infectados com <i>E. acervulina</i> , após metodologia de controle (G1: Controle positivo, G2: Fermentação, G3: Amônia quaternária, G4: Fermentação e amônia quaternária, G5: Diclazuril). .... | 41. |
| <b>Figura 6.</b> Fotomicrografia de corte longitudinal da região duodenal de frangos infectados com <i>E. acervulina</i> (corada com HE em medição de vilosidade intestinal pelo programa HL Image 97, aumento de 40x). ....  | 44. |
| <b>Figura 7.</b> Observações histopatológicas dos padrões de vilosidades intestinais (aumento de 40x) em frangos de corte infectados com <i>Eimeria acervulina</i> . Figuras 7A: 1ª etapa: Inoculação; 2ª etapa: 7B: Grupo controle (G1); 7C: Fermentação (G2); 7D: Amônia quaternária (G3); 7E: Fermentação + Amônia (G4); 7F: Diclazuril (G5). ....   | 45. |

## LISTA DE TABELAS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 1.</b> Médias de oocistos recuperados das fezes (desvio padrão) e picos de eliminação, observados na primeira etapa experimental (inoculação) e na segunda (infecção natural por contato com cama reutilizada), em frangos de corte, infectados com oocistos de <i>E. acervulina</i> . .....   | 34. |
| <b>Tabela 2.</b> Valores médios dos parâmetros zootécnicos: peso médio final (35 dias), conversão alimentar real (CAR) e conversão ajustada (CAj) em frangos de corte infectados com <i>E. acervulina</i> experimentalmente (1ª etapa) e, naturalmente, por oocistos na cama reutilizada, após tratamentos de controle da coccidiose (2ª etapa), calculados ao final do período experimental. .... | 35. |
| <b>Tabela 3.</b> Valores médios dos pesos semanais (7, 14, 21, 28 e 35 dias) em frangos de corte infectados com <i>E. acervulina</i> experimentalmente (1ª etapa) e, naturalmente, por oocistos na cama reutilizada, após tratamentos de controle da coccidiose (2ª etapa). ....   | 37. |
| <b>Tabela 4.</b> Valores absolutos e médios (desvio padrão) dos escores de lesões macroscópicas (conforme Johnson e Reid, 1970) em frangos necropsiados aos 21 dias de idade, infectados experimental e naturalmente por <i>E. acervulina</i> . (n = 10, número de aves avaliadas). ....   | 38. |
| <b>Tabela 5.</b> Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre os resultados médios obtidos para as contagens de oocistos de <i>Eimeria acervulina</i> e os escores de lesões macroscópicas dos frangos necropsiados aos 21 dias de idade. ....   | 40. |
| <b>Tabela 6.</b> Valores médios (desvio padrão) da morfometria intestinal (em microns) de frangos de corte infectados experimental (1ª etapa) e naturalmente (2ª etapa) com <i>E. acervulina</i> e necropsiados aos 21 dias de idade. (n = 10, número de aves avaliadas). ....   | 43. |
| <b>Tabela 7.</b> Valores absolutos da área de absorção da mucosa intestinal de frangos de corte infectados com <i>E. acervulina</i> , calculados por parâmetros de morfometria intestinal (larguras de cripta e vilosidade e comprimento de vilosidade) conforme cálculo de Kisielinski et al. (2002). ....  | 46. |
| <b>Tabela 8.</b> Correlação entre desempenho zootécnico (ganho de peso e conversão alimentar) e padrões morfométricos intestinais nas aves infectadas experimental e naturalmente com <i>Eimeria acervulina</i> . ....   | 48. |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                       |   |
|-----------------------|---|
| °C .....              | Graus Celsius   |
| °GL .....             | Graus Gay Lussac  |
| ANOVA .....           | Análise de variância                                    |
| Aw .....              | Atividade de água                                       |
| CA .....              | Conversão alimentar                                     |
| CA Cor 2,00.....      | Conversão alimentar corrigida para 2,00 kg de peso vivo |
| Caj .....             | Conversão alimentar ajustada                            |
| CEUA .....            | Comitê de Ética de Utilização Animal                    |
| CFMV.....             | Conselho Federal de Medicina Veterinária                |
| Cm <sup>2</sup> ..... | Centímetro quadrado                                     |
| CR .....              | Conversão alimentar real                                |
| DAI .....             | Dia após a infecção                                     |
| DIC.....              | Delineamento inteiramente casualizado                   |
| EMBRAPA .....         | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária             |
| G1 .....              | Grupo 1   |
| G2 .....              | Grupo 2   |
| G3 .....              | Grupo 3   |
| G4 .....              | Grupo 4   |
| G5 .....              | Grupo 5   |
| g .....               | Gramas  |
| GP .....              | Ganho de peso   |
| HE .....              | Hematoxilina-eosina                                     |
| IBGE .....            | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística         |
| Km <sup>2</sup> ..... | Quilômetro quadrado                                     |
| m <sup>2</sup> .....  | Metro quadrado  |
| mg .....              | Miligrama   |
| mL .....              | Mililitro   |
| µm .....              | Micrômetro ou micron                                    |
| nm .....              | Nanômetro   |
| OIE .....             | Organização Internacional de Epizootias                 |
| OOPG .....            | Contagens de oocistos por grama de fezes                |
| pH.....               | Potencial hidrogeniônico                                |
| ppm.....              | Parte por milhão  |
| PV.....               | Peso vivo dos frangos                                   |
| UBA.....              | União Brasileira de Avicultura                          |



## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....  | iv |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....  | v  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....                                   | vi |
| <b>RESUMO</b> .....  | ix |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | x  |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 1  |
| <b>1.1. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....                              | 3  |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....  | 16 |
| <b>2.1. OBJETIVO GERAL</b> .....                                     | 16 |
| <b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....                              | 16 |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                                   | 17 |
| <b>3.1. Área de estudo</b> .....                                     | 17 |
| <b>3.2. Local do experimento</b> .....                               | 17 |
| <b>3.3. Comitê de Ética</b> .....                                    | 18 |
| <b>3.4. População de estudo</b> .....                                | 18 |
| <b>3.5. Manejo das aves</b> .....                                    | 19 |
| <b>3.6. Obtenção do inóculo</b> .....                                | 20 |
| <b>3.7. Delineamento experimental</b> .....                          | 20 |
| <b>3.8. Separação dos grupos de tratamentos</b> .....                | 20 |
| <b>3.8.1 1ª etapa experimental (1º alojamento)</b> .....             | 21 |
| <b>3.8.1.1. Inoculação das aves da 1ª etapa</b> .....                | 21 |
| <b>3.8.1.2. Coletas de fezes/cama e exames parasitológicos</b> ..... | 21 |
| <b>3.8.1.3. Desempenho zootécnico</b> .....                          | 22 |
| <b>3.8.1.4. Procedimentos de necropsia</b> .....                     | 22 |
| <b>3.8.1.5. Avaliação de lesões macroscópicas</b> .....              | 23 |
| <b>3.8.1.6. Avaliação de lesões microscópicas</b> .....              | 23 |
| <b>3.9. Intervalo sanitário e tratamento da cama</b> .....           | 25 |
| <b>3.10. 2ª etapa experimental (2º alojamento)</b> .....             | 26 |
| <b>3.10.1. Análises experimentais da 2ª etapa</b> .....              | 26 |
| <b>3.11. Análise estatística</b> .....                               | 26 |

|  |    |
|--|----|
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                   | 27 |
| 4.1. Curva de eliminação de oocistos .....               | 27 |
| 4.2. Números médios de eliminação de oocistos .....      | 32 |
| 4.3. Desempenho zootécnico .....                         | 35 |
| 4.3.1. Sinais clínicos .....                             | 37 |
| 4.4. Escore de lesões intestinais macroscópicas .....    | 38 |
| 4.5. Lesões microscópicas e morfometria intestinal ..... | 42 |
| <b>5. CONCLUSÕES</b> .....                               | 50 |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                  | 51 |
| <b>ANEXOS</b> .....                                      | 67 |

## RESUMO

Este estudo teve como principal objetivo avaliar a eficiência de diferentes métodos de controle sobre oocistos de *Eimeria acervulina* em frangos de corte. Foram testados métodos preventivos na cama reutilizada como a fermentação e a desinfecção por amônia quaternária, além do tratamento anticoccidiano dos frangos com Diclazuril. Utilizou-se 300 frangos de corte da linhagem Cobb, sendo estes distribuídos em duas etapas de 150 frangos cada. Cada etapa foi realizada em delineamento de blocos inteiramente casualizados, com cinco grupos de 30 frangos, subdivididos em três repetições de 10 cada. Na 1ª etapa experimental, 150 frangos foram inoculados aos 12 dias de idade, por via oral, com  $3 \times 10^3$  oocistos. Após o intervalo sanitário de 15 dias, no qual a cama reutilizada passou pelos diferentes métodos de controle testados foi realizada a 2ª etapa do experimento. Outras 150 aves foram alojadas sobre a mesma cama das aves inoculadas, para avaliar a dinâmica da reinfecção coccidiana, por contato natural com esta cama, após os tratamentos. Nas duas etapas o estudo foi concluído aos 35 dias de idade dos frangos. Foram realizadas contagens de oocistos por grama de fezes, observação de sinais clínicos, avaliação de desempenho zootécnico pelos índices de ganho de peso e conversão alimentar, determinação de escores de lesões macroscópicas intestinais e análise histomorfométrica intestinal. Os resultados demonstraram que apenas a desinfecção da cama reutilizada com amônia quaternária não controlou a reinfecção das aves. O método de fermentação da cama, associado ou não à desinfecção por amônia quaternária, foi capaz de reduzir o número de oocistos recuperados das fezes dos frangos por controlar a contaminação ambiental. Apesar de o Diclazuril ter reduzido a carga infectante de oocistos nas aves, este não foi capaz de controlar a recontaminação ambiental. Os frangos alojados sobre cama reutilizada fermentada, associada ou não a desinfecção por amônia quaternária, apresentaram melhor desempenho zootécnico. Conclui-se que a fermentação da cama reutilizada é um método eficiente de controle da coccidiose aviária por *E. acervulina*.

**Palavras chave:** *Eimeria acervulina*, frangos de corte, coccidiose, métodos de controle, fermentação, desinfecção.

## ABSTRACT

The efficiency of different methods of control on oocysts of *Eimeria acervulina* in broilers was evaluated. Preventive methods in the reused bed had been tested as the fermentation and the disinfection for quaternary ammonia, beyond the anticoccidian treatment of the chickens of cut with Diclazuril. 300 broilers of the Cobb strain had been used equally distributed in two stages of 150 birds each. Each stage was carried through in delineation of blocks entirely casualized, with five groups of 30 broilers. In 1<sup>a</sup> stage, 150 birds had been inoculated experimentally, at 12 days of age, orally, with  $3 \times 10^3$  oocysts. After sanitary interval of 15 days, in which the bed passed for the different tested methods of control was carried through 2<sup>a</sup> stage. The others 150 birds had been lodged on the same bed of the inoculated birds, to evaluate the dynamics of the coccidian ambient reinfeccion after the treatments. Counting of oocysts per gram of excrements had been carried through (OOPG), comment of clinical signals, evaluation of zootechnical performance for the indices of weight profit and alimentary conversion, determination of scores of intestinal macroscopic injuries and intestinal histomorphometric analysis. The results had demonstrated that the disinfection of the bed reused with quaternary ammonia did not control the reinfeccion of the broilers. The method of fermentation of the bed associated or not with the disinfection for quaternary ammonia, was capable to reduce the number of oocysts recouped of excrements of the birds for controlling the ambient contamination. Although Diclazuril have reduced the infectant load of oocysts in the birds, this was not capable to control the ambient recontamination. The fermentation of the reused bed can be considered an efficient method of control of avian coccidiosis for *E. acervulina*.

**Key words:** *Eimeria acervulina*, broilers, coccidiosis, methods of control, fermentation, disinfection.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango, com 42% de participação nas exportações totais feitas no mundo, seguido pelos Estados Unidos, com 36%. É também o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, precedido dos Estados Unidos e da China (ANUÁRIO DA AVICULTURA INDUSTRIAL, 2007). A região Sudeste, com 27,9% do plantel efetivo brasileiro de frangos de corte, é a segunda maior produtora, após a Região Sul. O setor é, também, importante fonte de emprego e renda no Brasil, gerando 4,2 milhões de empregos diretos e indiretos relacionados à avicultura de corte (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE, 2006).

Segundo a União Brasileira de Avicultura (UBA), em 2007 foram produzidas 10,246 milhões de toneladas de carne de frango, com o expressivo crescimento de 9,75% sobre o ano anterior, números alcançados com abates da ordem de 4,84 bilhões de cabeças. O crescimento das exportações estimado para 2008 foi de 8%, e do mercado interno de 4 a 5%, considerando a abertura de novos mercados, o retorno de alguns destinos importantes e o contínuo trabalho de promoção do frango brasileiro (UBA, 2007/2008). Esse dinamismo da atividade avícola está associado aos constantes ganhos de produtividade e melhor manejo zootécnico, sobretudo pelo baixo custo de produção, melhora dos índices de conversão alimentar, ganhos nutricionais, pesquisa em genética e maior automação dos aviários.

Apesar do progresso do agronegócio avícola brasileiro, a atividade se depara com perdas econômicas causadas pela coccidiose aviária, principalmente devido ao aumento na conversão alimentar e na utilização de medicamentos anticoccidianos.

A coccidiose é uma das doenças infecciosas de maior importância econômica na avicultura industrial mundial, atingindo granjas de frango de corte, matrizes e aves de postura (RUFF, 1999; KAWAZOE, 2000). O parasito causador possui distribuição cosmopolita e pode causar alta morbidade e mortalidade em frangos comerciais (WILLIAMS, 1998).

A coccidiose pode exercer impacto econômico significativo sobre criações industriais de frango de corte, por uma série de mecanismos, reduzindo a eficiência metabólica e imunológica das aves. Além disso, o grande número de espécies, a alta incidência nas aves e a resistência do protozoário aos medicamentos e aos agentes químicos desinfetantes têm criado várias dificuldades no controle desta parasitose (VERTOMMEN, 2004).

A coccidiose resulta em perdas anuais de milhões de dólares para a avicultura industrial (NAIDOO et al., 2008). Segundo Dalloul e Lillehoj (2006), os prejuízos anuais no

mundo associados à coccidiose chegam a US\$3 bilhões. Somente os gastos com prevenção e tratamento chegam a 800 milhões de dólares por ano (KOPKO et al., 2000). No Brasil, não existem cálculos recentes visando determinar as perdas anuais do setor avícola por coccidiose, mas Castro (1994) estimou que os prejuízos associados a essa parasitose chegam a US\$ 19 milhões por ano. De acordo com Kawazoe (2000), as perdas econômicas estão associadas à morbidade persistente, em decorrência da má administração dos medicamentos; à resistência dos isolados de *Eimeria* sp. aos anticoccidianos e coccidiostáticos; ao manejo inadequado dos locais de criação e ao uso inadequado de vacinas vivas virulentas. Estes fatores resultam em redução no ganho de peso e em aumento da conversão alimentar das aves. Na ave infectada, ocorre redução do aproveitamento dos nutrientes pela alteração dos processos digestivos e absorptivos em até 85% (ANUÁRIO DA AVICULTURA INDUSTRIAL, 2000).

Tendo em vista o crescimento da avicultura de corte no país e especificamente o da região do Triângulo Mineiro, torna-se foco de estudo a determinação de métodos de controle da coccidiose eficazes, seguros e de baixo custo econômico.

A escolha da *Eimeria acervulina* como espécie a ser analisada neste estudo relacionou-se à sua comprovada prevalência na avicultura mundial, ampla distribuição nos plantéis brasileiros, evolução subclínica geralmente despercebida, importância econômica e pelo fato de que é comumente monitorada pelo método do escore de lesões no intestino das aves pela indústria agropecuária.

## 1.1. REVISÃO DE LITERATURA

### *Coccidiose em frangos de corte*

Coccidiose é a terminologia utilizada para denominar a enterite associada a mortalidade e redução de desempenho zootécnico. O termo coccidíase é empregado para denominar as infecções subclínicas, que são resultantes da ingestão de poucos oocistos infectantes (SESTI, 2004).

A coccidiose é causada por parasitos do gênero *Eimeria*, pertencente ao filo Protozoa, subfilo Apicomplexa, classe Sporozoa, sub-classe Coccidia, ordem Eucoccidiorida, sub-ordem Eimeriorina, família Eimeriidae. São parasitos intracelulares que atacam as células do epitélio intestinal, existindo várias espécies, que se diferenciam pela localização no intestino, entre outros fatores (JOYNER, 1969; LEVINE, 1988).

Rivolta e Silvestrini (1873) classificaram como *Eimeria avium* as espécies de coccídio que apresentavam oocistos tetrasporocísticos em diversas espécies de aves. Posteriormente, Railliet e Lucet (1891) descreveram o *Coccidium tenellum*, designado *Eimeria tenella* por Fanttam (1909) como espécie causadora de doença em frangos (WILLIAMS, 1998). Em 1929, Tyzzer descreveu três novas espécies de *Eimeria* que acometiam as aves, a *Eimeria acervulina*, *E. maxima* e *E. mitis*, sendo descrito, em 1930, por Johnson, duas espécies, a *E. necatrix* e *E. praecox* (LEVINE, 1973). Em 1938, Levine descreveu uma nova espécie, denominando-a de *E. hagani*, que mais tarde foi considerada por pesquisadores britânicos como subespécie de *E. acervulina*. A *E. brunetti* foi descrita por Levine (1942). Edgar e Siebold (1964) descreveram a espécie *E. mivati*, que, posteriormente, Shirley (1975) identificou pelo método de eletroforese enzimática como sendo amostra mista, na qual estavam presentes as espécies *E. mitis* e *E. acervulina* (LEVINE, 1988).

Atualmente, são reconhecidas sete espécies de *Eimeria* que parasitam a galinha doméstica, sendo elas *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria praecox* e *Eimeria tenella* (SCHNITZLER; SHIRLEY, 1999).

As espécies de *Eimeria* estão presentes em todo o mundo e são de proeminente importância na avicultura industrial (SHIRLEY, 1999). As espécies e prevalências das mesmas possuem caráter variável, sendo a *E. acervulina* a mais comumente diagnosticada no mundo, seguida das *E. tenella*, *E. maxima*, *E. necatrix* e *E. brunetti* (DANFORTH; RUFF, 1999).

Williams (1998) relatou que é extremamente raro encontrar qualquer lote avícola comercial não afetado pela coccidiose, sendo considerada de caráter endêmico nas granjas

praticamente em todo o mundo. As perdas na Grã-Bretanha, em frangos de corte, matrizes e poedeiras e custos com anticoccidianos e vacinas usadas na prevenção, chegam a US\$ 77 milhões por ano, sendo 80% ocasionado pela perda de peso e mortalidade e 20% devido ao custo da terapia. Na Etiópia, foram identificadas em frangos de corte as seguintes espécies de *Eimeria*: *E. brunetti*, *E. tenella*, *E. acervulina* e *E. necatrix*, com taxas de prevalência de 45,3%, 40,8%, 9,7% e 4,1%, respectivamente (LOBAGO et al., 2005). Na Jordânia, foram identificadas as sete espécies, sendo as mais prevalentes *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. brunetti* e *E. maxima* com 39, 12, 12 e 10%, respectivamente (AL-NATOUR et al., 2002).

Em países como a Suécia e o Irã, a coccidiose subclínica apresenta prevalência de 31% e 38%, respectivamente (LUNDEN et al., 2000), sendo encontradas, neste último país citado, prevalências de *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella* de 97, 41 e 12%, respectivamente (REZA RAZMI; KALIDERI, 2000). Em aviários do Brasil e da Argentina, McDougald et al. (1987) encontraram oocistos viáveis em 90% das propriedades. Em análises subseqüentes nas Américas do Norte e Sul, observaram a presença da *Eimeria* sp. em quase todo o território pesquisado (McDOUGALD; REID, 1997).

Nos Estados Unidos da América, a coccidiose é a doença mais comumente diagnosticada na avicultura, respondendo por 6,48% das perdas econômicas (DANFORTH; RUFF, 1999) que custam à indústria avícola mais de 200 milhões de dólares por ano. Na África do Sul são gastos, atualmente, US\$ 12,5 milhões por ano em profilaxia com anticoccidianos na ração (CARRINGTON et al., 2007). Na Holanda, as perdas anuais associadas à coccidiose são estimadas em US\$ 11,6 milhões, não incluindo custos associados com profissionais veterinários (GRAAT et al., 2001), sendo a *E. acervulina* a espécie mais prevalente neste país (GRAAT et al., 2001; PEEK; LANDMAN, 2003).

No Brasil, são descritas quatro espécies de *Eimeria* de importância econômica na avicultura industrial, sendo estas a *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella* e *E. necatrix*. A *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella* são comuns em frangos de corte e têm a ocorrência monitorada, nessas criações, pelas lesões macroscópicas no intestino das aves. A *Eimeria necatrix* é encontrada em poedeiras e matrizes (SCHNITZLER; SHIRLEY, 1999). Apesar de comuns na avicultura mundial, *E. mitis* e *E. praecox* não são monitoradas, por não serem consideradas importantes pela cadeia produtiva e não produzirem lesões macroscópicas que facilitem esse monitoramento (CHAPMAN, 1978).

No Brasil, as perdas decorrentes da coccidiose subclínica chegam a US\$ 19,1 milhões anuais, sendo US\$ 11,85 milhões referentes às perdas na produção de carne e US\$ 7,25



milhões devido ao aumento do consumo de ração (CASTRO, 1994). Na região Sul, principal produtora de frangos de corte do país, a *E. acervulina* foi encontrada em 90% das granjas comerciais e *E. maxima* e *E. tenella* em 60% destas (PRADO, 2005). Em outro estudo realizado na região Sul do país, Cardozo e Yamamura (2004) verificaram a ocorrência das espécies de *Eimeria* também em frangos tratados com anticoccidianos e vacinados que foi de, respectivamente, 46% e 49% para *Eimeria maxima* e de 35% e 28% para *Eimeria tenella*. Estes autores relatam ainda a prevalência de *Eimeria acervulina*, *Eimeria necatrix* e *Eimeria praecox*, em ambos os grupos estudados. No Rio Grande do Sul, foram identificadas as sete espécies de *Eimeria* com prevalências de 45,52% de *E. maxima*, 14% de *E. acervulina* e 12,32% de *E. tenella* (PRADO, 2005).

A região Sudeste, segunda produtora do país, também apresenta alta disseminação das espécies e relevante prevalência de coccidiose. Em Campinas, estado de São Paulo, Kawazoe e Figueiredo (1990) verificaram a presença de coccidiose aviária, sendo identificadas seis espécies de *Eimeria*: *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella*. As espécies e o número de oocistos variaram conforme a época da coleta das amostras fecais, tendo prevalecido nas granjas a coccidiose subclínica. Nesta mesma região, foram detectadas por Franco (1993) cinco espécies de *Eimeria* em criações de aves de postura, sendo estas: *Eimeria acervulina*, *E. mitis*, *E. maxima*, *E. necatrix* e *E. tenella*. Gonçalves et al. (2006), em levantamento epidemiológico no município de Botucatu, São Paulo, verificaram que os coccídios foram os parasitos mais frequentes nas análises de aves silvestres, estando presentes em 76,6% das amostras analisadas, sendo 95,45% destas amostras positivas provenientes de Passeriformes. Kawazoe et al. (2005) descreveram o isolamento de cepas de *E. acervulina* na região do Parque Nacional de Itatiaia, estado de Minas Gerais e na cidade de Cunha, estado do Rio de Janeiro.

As regiões Sul e Sudeste são as maiores produtoras de frango de corte do país, entretanto há poucos estudos epidemiológicos referentes a estas localidades, tendo em vista a importância e tamanho do plantel brasileiro e os impactos da coccidiose (GUIMARÃES; GUIMARÃES JÚNIOR, 1991).

As aves se infectam com as espécies de *Eimeria* quando ingerem água, ração ou cama de aviário contaminadas com oocistos esporulados (LOWENTHAL et al., 2004). Os meios de contaminação são mecânicos, sendo os oocistos transportados no manuseio de materiais, no vestuário das pessoas e, principalmente, nos calçados. Os oocistos podem ser carregados pelo vento, em partículas secas de dejetos contaminados, permanecendo ativos no ambiente por muitos meses, em condições ideais de temperatura e umidade (COMES et al., 1996). Os

parasitos, dificilmente, são eliminados do plantel e a reinfecção pode ocorrer. O confinamento de frangos, na avicultura industrial, particularmente em condições de densidade elevada, favorece a ingestão de maior quantidade de oocistos infectantes (GRAAT et al., 2001).

A patogenia e os sinais clínicos dependem da espécie da *Eimeria*, do número de oocistos ingeridos, da idade da ave (quanto mais jovem mais suscetível), presença e severidade de outras doenças, eficácia do anticoccidiano, estado nutricional das aves e nível de medicação na ração (LILLEHOJ; LILLEHOJ, 2000). Essa parasitose pode apresentar-se como doença grave, principalmente em frangos de corte jovens e em crescimento (de duas a seis semanas de idade), levando à mortalidade e redução de desempenho zootécnico (WOODS et al., 2000a). A forma aguda pode causar alta mortalidade e a forma subclínica cursa com baixo ganho de peso e conversão alimentar elevada (CAPRARA et al., 2005). Atualmente, a alta mortalidade não é comum na avicultura industrial, mas a forma subclínica é de ampla prevalência (COELHO; BORGES, 2007).

Em aves expostas a episódios de coccidíase, ou até mesmo coccidiose sem mortalidade, a imunidade se desenvolve e confere proteção contra futuros episódios de doença que possam ser causados pela mesma espécie de *Eimeria*. No entanto, níveis baixos de infecção podem ser suficientes para comprometer ganho de peso, conversão alimentar e pigmentação, além de favorecer a ocorrência de infecções bacterianas secundárias intestinais. Os sinais clínicos característicos desta parasitose envolvem fezes pastosas, ou com muco, diarréia amarelada, com estrias de sangue ou negras com sangue digerido (BARTA, 2002). Alimento mal digerido nas fezes, perda de peso, aumento excessivo de apetite, apatia e prostração, penas arrepiadas e anemia também são sinais comuns em frangos de corte infectados com coccídios (SHIRLEY, 1994).

O gênero *Eimeria* apresenta como característica ciclo evolutivo direto e oocistos contendo quatro esporocistos com dois esporozoítos cada (GREIF et al., 2000). O ciclo de vida desenvolve-se em um único hospedeiro (monoxeno), com multiplicação assexuada (merogonia ou esquizogonia) e sexuada (gametogonia) nas células do hospedeiro (estádios endógenos); e esporogonia no meio exterior (estádio exógeno) (BARTA, 2002). O processo de liberação dos esporozoítos infectantes no hospedeiro inicia-se pela ação mecânica da moela sobre a membrana do oocisto, com posterior estimulação dos esporozoítos pela temperatura corpórea, enzimas pancreáticas e sais biliares (KAWAZOE, 1994). Segundo Bordin (1994), quando os oocistos ingeridos atingem o intestino delgado, a tripsina quinase do suco pancreático digere o fechamento da micrópila (pequeno poro em um dos pólos do

oocisto), e através desta abertura, denominada Corpo de Stieda, os esporozoítos são liberados. Uma hora após a ingestão do oocisto esporulado, já é possível encontrar esporozoítos na secreção intestinal. Livres na luz intestinal, os esporozoítos invadem ativamente as células hospedeiras, formando o vacúolo parasitóforo, geralmente em um enterócito, células da lâmina própria ou criptas epiteliais intestinais (CHAPMAN, 1978). A merogonia inicia-se a partir destes esporozoítos, que penetram na parede intestinal e invadem células epiteliais, formando os merontes uninucleados ou esquizontes. Estes esquizontes, após diversas divisões mitóticas por merogonia, originam merozoítos, que rompem e escapam da célula hospedeira, invadindo novas células, onde passam por mais gerações de merogonia, formando novas gerações de merontes (BERCHIERI JÚNIOR; MACARI, 2000). Os merozoítos iniciam a fase sexuada endógena e em seguida diferenciam-se em microgamontes e macrogamontes. Após a maturação, os microgametas flagelados rompem as células hospedeiras e fecundam os macrogametas, dando origem aos zigotos. Posteriormente, é formada a parede do oocisto. Os oocistos imaturos formados são então liberados na luz intestinal e eliminados para o meio exterior juntamente com as fezes do hospedeiro (BERCHIERI JÚNIOR; MACARI, 2000). Os oocistos imaturos, no meio exterior, irão sofrer processo de esporogonia, isto é, divisão meiótica seguida de divisão mitótica a dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada, sob condições ideais de temperatura (28 a 30°C), oxigenação e umidade do ambiente (CRANE et al., 2001).

As paredes do oocisto consistem em camadas elétron-densas, de 10 nanômetros (nm) a camada exterior e 90 nm a camada interna. A externa constitui 25% da massa da parede total e contém ácidos lipídicos, álcoois, fosfolipídios e colesterol. O composto P-Hexacosanol compõe 23% da parede do oocisto e permite apenas a passagem de moléculas descarregadas pequenas, estando esta característica diretamente associada à efetividade dos desinfetantes. Somente a camada interna é glicoproteica e prontamente solúvel a qualquer agente capaz de quebrar as cadeias de disulfeto (CARDOZO; YAMAMURA, 2004). Os autores McDougald e Seibert (1998) e Williams (1998), mencionaram que os oocistos deste protozoário são muito resistentes à maioria dos desinfetantes comerciais. Estes autores classificam os oocistos como os agentes etiologicamente mais resistentes aos desinfetantes, após os “Prions”. São imunes a iodo, ácido cresílico, hipoclorito de sódio, formalina, formaldeído, sulfato de cobre, ácido sulfúrico, diclorato de potássio, iodóforos, ácido paracético e outros ácidos e alcalóides, nas concentrações comerciais utilizadas em desinfecção avícola (GASSER et al., 2004).

As células caliciformes, os enterócitos e as células enteroendócrinas são tipos de células intestinais responsáveis pela defesa do epitélio, digestão e absorção dos nutrientes da luz intestinal. Estas células são agrupadas de modo a formar as vilosidades. São responsáveis pela absorção de vitaminas, sais minerais, carotenóides, carboidratos, lipídeos, proteínas, água e alguns medicamentos (BOLELI et al., 2002). Todas as fases celulares do ciclo destroem estas células intestinais do hospedeiro, sendo que 2048 células serão destruídas para cada oocisto ingerido. Como na multiplicação das *Eimerias* sp. pode haver repetição do ciclo assexuado, antes de completar o ciclo sexuado, ocorre um crescimento do parasito em progressão geométrica, acarretando aumento da esfoliação intestinal promovida pelo mesmo (JINNEMAN et al., 2003).

À necropsia, observa-se intestino dilatado, enterite, podendo ser do tipo catarral, hemorrágica e/ou necrótica e lesões de parede intestinal de localizações e profundidade diferentes (JENKINS et al., 2001). Long (1968), Long et al. (1976) e Tsuji et al. (1997) comentaram que o diagnóstico específico da parasitose tem sido feito tradicionalmente pela morfologia dos oocistos nas fezes das aves; localização e morfologia dos parasitos no intestino; pela presença, característica, localização e intensidade das lesões macroscópicas intestinais; período mínimo de pré-patência e período mínimo de esporulação dos oocistos.

Johnson e Reid (1970), em infecção experimental de aves com oocistos de *Eimeria acervulina*, observaram lesões que classificaram em escores: um (até cinco lesões/centímetro quadrado (cm<sup>2</sup>), e uma leve perda de peso num período de sete dias); dois (lesões mais numerosas); três (coalescência das lesões, espessamento da parede do intestino) e quatro (maior coalescência das lesões individuais verificada em rápida inspeção), respectivamente.

A *Eimeria acervulina* apresenta alta prevalência na avicultura e é amplamente diagnosticada na avicultura brasileira. Como não causa mortalidade das aves, a não ser em casos de infecção de milhões de oocistos, a espécie já foi considerada não patogênica por muitos pesquisadores. Porém, como causa severa diminuição no ganho de peso, e manifesta-se de forma subclínica deve ser, portanto, considerada patogênica (LOWENTHAL et al., 2004). A patogenicidade da *E. acervulina* depende diretamente da cepa, do número e da frequência de oocistos ao qual a ave é exposta (KAWAZOE, 2000) e pode manifestar-se em menor desempenho zootécnico das aves, levando a perdas econômicas, pelo gasto com profilaxia e pela permanência da reinfecção, quando não diagnosticada em caráter subclínico. Esta espécie causa infecções no epitélio do intestino delgado, gerando lesões arredondadas semelhantes a placas esbranquiçadas aderidas à parede intestinal, sendo a infecção mais severa no duodeno, decrescendo até a parte mediana do intestino delgado (COSTA et al.,

2000). O período pré-patente é de no mínimo 97 horas e o período de esporulação é de, no mínimo, 17 horas (LONG; REID, 1982 apud CONWAY; MCKENZIE, 1991). Costa et al. (2000) descreveram as lesões de *E. acervulina* como focos branco acinzentados em forma de pontos coalescentes, formando estrias transversais, que contém zigotos e oocistos em desenvolvimento. Bordin (1994) confirmou a presença de faixa esbranquiçada transversa no intestino delgado com a presença de oocistos, esquizontes e gametócitos sobre as vilosidades. Kawazoe (2000) descreveu que as lesões são visíveis tanto na mucosa como na serosa intestinal.

As perdas na avicultura de corte associadas à coccidiose são acentuadas devido ao ciclo produtivo curto, que promove reinfecção ambiental das aves e dificulta um programa de controle efetivo (ZHAO et al., 2001).

Dificuldades no controle desta parasitose decorrem, principalmente, da resistência dos oocistos à ação dos principais desinfetantes comerciais utilizados na desinfecção ambiental e da resistência parcial ou total aos anticoccidianos, sendo estes últimos o principal método de controle da coccidiose aviária. Esta resistência está relacionada à sobrevivência seletiva de cepas insensíveis aos medicamentos, o que torna necessária a constante monitorização da doença em nível de campo. Este controle medicamentoso se torna oneroso, pois pode se tornar constante e obrigatório (REID, 2000).

Os anticoccidianos são produtos que, adicionados à ração ou água, tem a finalidade de prevenir a coccidiose e que podem, também, ser usados como tratamento à infecção das aves (ANDRIGUETTO, 2000). Andriguetto (2000) classifica anticoccidianos em coccidiostáticos (aqueles que interrompem o ciclo de vida dos parasitos, sem destruí-lo) ou coccidicidas (os que destroem os parasitos), sendo considerados mais efetivos estes últimos, que ainda podem atuar sobre as diferentes fases de desenvolvimento das *Eimerias*, e por isto, são eletivos na alimentação de frangos de corte. McDougald (1984) afirma que a maioria dos anticoccidianos tem as duas propriedades, e sua ação depende da espécie de coccídios, da duração de exposição e da dose da droga.

Estes medicamentos também podem ser classificados em ionóforos e compostos químicos. Os ionóforos provocam o desequilíbrio osmótico dos parasitos, atuando na fase inicial de vida dos mesmos. Entre os ionóforos estão maduramicina, monensina, narasina, salinomicina, semi-duramicina e lasalocida. Os compostos químicos atuam em diferentes pontos do metabolismo e em distintas fases do ciclo de vida, agindo como coccidiostáticos e/ou coccidicidas. Os mais usados no controle da coccidiose são nicarbazina, robenidina, amprolio e diclazuril (JEFFERS, 1989).

O Diclazuril é um anticoccidiano com atividade sobre vários estágios do ciclo de vida de diversas espécies de *Eimeria*. A eficácia anticoccidiana do Diclazuril em frangos de corte foi primeiramente reportada por Vanparijs et al. (1990). Neste trabalho, os autores relataram que uma parte por milhão (ppm) de Diclazuril, na dieta de frangos de corte de 42 dias de idade, foi altamente eficaz contra infecções mistas por *E. tenella* e *E. acervulina* ou *E. necatrix* e *E. brunetti*. Na prática, este anticoccidiano é frequentemente utilizado na ração ou água das aves comerciais, preventivamente, ou como terapêutico (McDOUGALD, 1984; McDOUGALD; SEIBERT, 1998). Maes et al. (1988) demonstraram que um único tratamento com Diclazuril em frangos de corte experimentalmente infectados conduziu a interrupção completa do ciclo de vida e da eliminação de oocistos de *E. tenella*. Os autores concluíram que a dosagem de um ppm de Diclazuril na alimentação das aves é eficiente frente à infecção por *E. tenella*.

Embora os anticoccidianos possam impedir ou controlar a doença, são escassos os relatos da influência destes na capacidade de absorção do epitélio intestinal em frangos de corte contaminados, e, além disso, sabe-se que o controle químico da coccidiose encontra-se desacreditado, devido a resistência a estes compostos (McDOUGALD et al., 1987). O uso de drogas coccidiostáticas na ração de frangos de corte ou postura, na forma de premix não elimina a possibilidade de existir infecções mistas por coccídios, possivelmente, devido ao curto poder residual dos princípios utilizados e da alta taxa de prevalência de oocistos.

Outro fator relevante ao controle da coccidiose é a crescente preocupação em relação a presença de resíduos de medicamentos na carne dos animais tratados habitualmente com anticoccidianos, existindo, atualmente, tendência mundial pela produção de alimentos visando a não utilização de produtos químicos e o máximo conforto dos animais de produção (REID, 2000). Esta nova parcela de mercado consumidor preocupada com possíveis riscos à saúde humana decorrentes da utilização indiscriminada de produtos antibióticos e quimioterápicos na carne das aves comerciais tem despertado grande interesse nas empresas e nos produtores. Além disso, a restrição medicamentosa na carne de frango é uma das importantes barreiras comerciais para acesso à União Européia e ao mercado asiático, que pode ser impactada pelo uso de anticoccidianos no controle da coccidiose (JEFFERS, 1989). Além disso, as estratégias sanitárias adotadas na criação industrial podem apresentar falhas no controle da coccidiose, possibilitando a contaminação entre lotes (FURLAN et al., 2004). Este contexto tem levado a procura de alternativas para tentar reduzir a aplicação de medicamentos químicos no controle da doença. Os resultados mais conhecidos desses esforços, em pleno uso no campo, são as vacinas vivas, atenuadas ou não. Estas vacinas estão presentes no controle da coccidiose em

matrizes, porém, apresentam alto custo, sendo o seu uso restringido para os matrizeiros, excluindo os frangos de corte (MIN et al., 2001). Song et al. (2001) consideram que vacinas formuladas utilizando antígenos definidos, recombinantes ou não, injetados por via intramuscular em aves, não tem proporcionado a proteção desejada contra coccidiose, possivelmente, por não induzirem resposta humoral e celular comparável à induzida pela infecção natural.

A presença de alta variação antigênica nos isolados de *E. acervulina* e *E. maxima* que ocorre de acordo com a distribuição geográfica, também é um agravante frente à utilização das vacinas no campo (MARTIN et al., 1997; DANFORTH; RUFF, 1999). O isolado de *Eimeria* que causa infecção coccidiana pode diferir do isolado vacinal e, dessa forma, a vacina não garante imunidade. Ainda assim, mesmo utilizando vacinas coccidias adequadas no controle e prevenção, há necessidade de desinfecção do ambiente para remover o desafio de campo e permitir que a ave possa agir somente no desafio da vacina, sem gastar energia combatendo o desafio de campo (STUCKI et al., 2003).

O impacto econômico, os benefícios produtivos, as limitações da vacinação e as estratégias de controle deverão ser mais pesquisados ao longo do tempo (SHIRLEY, 1999) e demonstram claramente as dificuldades no controle desta parasitose.

A reinfecção dos frangos de corte com oocistos ou outros parasitos é potencializada pela existência do material da cama de frango sobre os pisos dos aviários comerciais. Em criações intensivas de frangos de corte, a utilização da cama do aviário visa evitar o contato direto da ave com o piso, servir de substrato para absorção da água, incorporação de fezes e contribuir para a redução das oscilações de temperatura no aviário (AVILA et al., 1992). O material para utilização como cama de aviário deve ser macio, seco e bom absorvente de umidade (TOLEDO, 2001).

A cama de aviário é geralmente composta de maravalha (subproduto de madeiras) depositada no chão, urina e fezes, restos de ração, penas, pele e insetos. A cama deve cobrir todo o piso do aviário com o máximo de uniformidade e espessura mínima de cinco a oito centímetros no verão e de oito a dez centímetros no inverno (TOLEDO, 2001).

A cama consiste, em média, de 14% de proteína bruta, 16% de fibra bruta, 13% de matéria mineral e 0,41% de extrato etéreo (EMBRAPA Suínos e Aves, 1991). Esta composição, aliada ao potencial hidrogeniônico (pH) variando entre seis e nove (JEFFREY et al., 1998), a atividade de água ( $A_w$ ) com um índice próximo de 0,90 e temperaturas variando entre 20 a 32°C (AVILA et al., 1992) permitem o desenvolvimento de diversos parasitos na cama. A densidade elevada de aves alojadas sobre cama, por metro quadrado de área

disponível, pode concentrar altas quantidades de oocistos, que se tornam infectantes sob temperatura e umidade adequadas e são causa de episódios de coccidiose. Com a expansão da avicultura e melhoria da tecnologia de produção, o material utilizado como cama, que se restringia a maravalha, tornou-se progressivamente escasso e com maior valor de mercado, sendo necessária a substituição por novos materiais para se evitar o aumento dos custos de produção. Alguns testes foram conduzidos como alternativas, comparando possíveis materiais para a cama de frango (OLIVEIRA et al., 1973; ANISUZZAMAN; CHOWDHURY, 1996), sendo sabugo de milho picado ou palha de arroz, de acordo com a disponibilidade na região, os mais indicados (TOLEDO, 2001).

A utilização de cama nova a cada lote seria o ideal do ponto de vista da saúde animal. O reaproveitamento de cama, porém, surgiu em decorrência da escassez de matéria prima, aumento dos custos e do impacto ambiental da disposição da cama usada, que se tornou um grande volume de resíduos, após ser proibido seu uso na alimentação de bovinos. Esta cama acabaria por poluir demasiadamente o ambiente natural, uma vez que frangos são geralmente criados em áreas de grande densidade populacional e geram grande volume de resíduos em uma área específica. Segundo Kelley et al. (1995), a reutilização de cama, além de reduzir os custos com aquisição de cama nova, reduz a degradação ambiental. Estes fatores justificam a reutilização da cama por vários lotes (FIORENTIN, 2005).

Por apresentar clima que permite a produção em aviários abertos, o Brasil fornece condições de reutilização da cama usada por cerca de seis lotes consecutivos. Essa prática tem sido utilizada e se tornou alternativa aos materiais convencionalmente usados como cama. Para isso, a cama deve ser submetida a diferentes tipos de tratamento objetivando redução de riscos microbiológicos (AVILA et al., 2008). Os parasitos presentes na cama reutilizada podem resultar em contaminação para o ambiente e ser fonte de infecção para os próprios frangos, contribuindo para maior contaminação do trato digestivo (AMIT-ROMACH et al., 2004). Há, portanto, necessidade de esforços de parte da avicultura de corte para reduzir os impactos negativos referentes aos contaminantes na reutilização da cama, sem, porém, aumentar demasiadamente os custos de produção, como seria com a substituição da cama a cada lote. Dentre estes procedimentos merecem destaque a fermentação da cama e a desinfecção do ambiente, técnicas amplamente disseminadas na avicultura brasileira, sendo necessário avaliar a eficiência destas práticas frente ao desafio da coccidiose, a presença de matéria orgânica e o resultado sanitário e econômico na avicultura. Pouca importância é dada a estes métodos, que, se comprovadamente eficientes poderiam ser responsáveis pelo bloqueio



do ciclo de reinfecção das aves, sendo, ainda, metodologias de baixo custo (COSTA; ÁVILA, 2003).

A redução da carga parasitológica nas instalações avícolas e no ambiente do sistema de produção, pela desinfecção ambiental ou fermentação de cama de aviário, pode diminuir o risco de ocorrência de doenças, como a coccidiose, no plantel. Acredita-se que o contato das aves com baixas quantidades de oocistos no meio ambiente, possa até estimular a resposta imune a coccidiose (GONÇALVES et al., 2006).

O procedimento de limpeza e desinfecção das instalações, equipamentos e ambiente tem importância fundamental na manutenção sanitária de aviários. A escolha do método de desinfecção e do produto utilizado é baseada na eficiência deste sobre patógenos, estabilidade do desinfetante na presença de outros produtos químicos, condições adversas de temperatura, inativação e permanência do efeito biocida (SESTI, 2004). No ciclo de produção avícola, a desinfecção no intervalo sanitário (período de dias entre a saída de um lote de frangos de corte para abate e entrada de um novo lote de pintos de um dia, em um aviário) é medida necessária para redução da pressão da infecção dos parasitos e para o controle da coccidiose, embora alguns oocistos ainda sobrevivam ao procedimento (VERMEULEN et al., 2001). De acordo com Dauschies et al. (2002), o objetivo de tal conduta é ajudar na redução dos estágios exógenos de *Eimeria* sp., associada com o uso preventivo de anticoccidianos.

A maioria dos métodos de redução da concentração de patógenos na cama de frango, entre lotes, ou antes de sua deposição no aviário, baseia-se na alteração do pH (POPE; CHERRY, 1999), da umidade (REZENDE et al., 2001) ou da temperatura (HAAPAPURO et al., 1997). A temperatura é agente físico de grande eficiência na inativação de microorganismos. A forma factível de se obter altas temperaturas (60 a 70 graus Celsius (°C)) na cama do aviário é pela fermentação, sendo possível sua realização apenas quando da ausência de frangos, ou seja, em intervalo sanitário (JEFFREY et al., 1998). A desinfecção física, por aumento de temperatura em amontoamento (ou enleiramento) e cobertura da cama, devido a ação de microorganismos, conhecida como fermentação da cama de frango, é preconizada como método mecânico de destruição dos oocistos. A fermentação reduz o nível de infecção ambiental por coccídios, por destruir a parede dos oocistos por aumento da temperatura, quando a cama reutilizada passa pelo processo de amontoamento e cobertura por lona plástica (OUARZANE et al., 1998).

Na desinfecção química, a estrutura da parede dos oocistos os torna altamente resistentes aos desinfetantes dificultando a sua eliminação do ambiente avícola. Estudos no

mundo inteiro foram feitos para avaliar a ação de princípios ativos diferentes com ação desinfetante sobre oocistos de *Eimeria* spp. (DI FÁBIO, 1994).

Dentre os trabalhos que testam a eficiência de desinfetantes em relação aos oocistos, observou-se que esta é condicionada à tensão e ao tempo de exposição. A porcentagem de oocistos não esporulados pode aumentar na consequência de alto tempo de exposição ao desinfetante. Este fato foi verificado em teste realizado com altos tempos de exposição, indicando redução da esporulação, etapa que é primordial para que a infecção das aves ocorra (DAUGSCHIES et al., 2002). Williams (1997) testou a habilidade dos agentes químicos fenol e da solução de amônia quaternária em interromper, *in vitro*, a esporulação de oocistos, observando a concentração eficaz mínima. Oliveira et al. (2004) testaram a inibição da esporulação dos oocistos de *E. tenella*, *E. acervulina* e *E. maxima* frente aos desinfetantes de uso comercial na avicultura, sob tempo de exposição de 30 minutos. Os princípios ativos presentes em solução de formol a 37% e fenol 10,5% + cresol 10,5% foram ineficazes.

Ayeni et al. (1972), avaliando *in vitro* a ação de 11 desinfetantes em oocistos de roedores, obtiveram um índice de eficiência de desinfecção acima de 95%, em tempo de contato de cinco minutos, no teste com amônia a 3,7%, Dekaseptol a 6% (bissulfeto de carbono), Triseptol 5-6% (bissulfeto de carbono, cresol, hidrocarbonetos).

Hilbrich (1975) avaliou no período de 2, 10 e 30 minutos, vários produtos comerciais (Lysococ<sup>®</sup> 5%; Pantek<sup>®</sup> 2%; Incidin Anticoc<sup>®</sup> 6%; Hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) a 4, 3, 2 e 1%; Hidróxido de sódio 10% e Hidróxido de potássio 10%) nos oocistos esporulados. Foram qualificados como eficientes os produtos Lysococ<sup>®</sup> 5% e NH<sub>4</sub>OH 4%, não sendo observada mortalidade das aves e havendo redução de lesões intestinais nestes tratamentos de desinfecção ambiental. A amônia, em moléculas pequenas e descarregadas, como na forma molecular NH<sub>4</sub>OH, é capaz de difundir a parede e também a membrana celular, permitindo a destruição do oocisto. Entretanto, esta formulação pode ser sufocante e de extrema irritação aos olhos, garganta e trato respiratório das aves e humanos. Dependendo do tempo e nível de exposição, podem ocorrer efeitos que vão de suaves irritações a severas lesões no corpo, devido a sua ação cáustica alcalina. A maioria dos produtos disponíveis com ação de desinfecção em oocistos são cáusticos ou tóxicos, assim seu uso nas instalações avícolas deve ser controlado (FAYER, 1980). É desejável que os agentes sejam enxaguados rapidamente, evitando, dessa maneira, o risco de toxicidade aos manipuladores e a depreciação dos equipamentos do aviário, apesar de sua ação depender do tempo de interação com matéria orgânica e sua volatilidade (AYENI et al., 1972; WILLIAMS, 1997).

*Eimeria tenella* é a mais suscetível das coccídiãs testadas aos efeitos de desinfecção por amônia, em formulação anidro. *Eimeria necatrix* e *E. brunetti* possuem grau similar de suscetibilidade. *Eimeria acervulina* é a mais resistente à inativação, necessitando exposição entre uma e seis horas (DAUGSCHIES et al., 2002).

A solução de amônia normalmente usada como produto de desinfecção ambiental é a de amônia quaternária, porém por apresentar carga iônica, pode ser menos eficiente na destruição da parede do oocisto, mas apresenta menor risco de toxicidade. Não foram encontrados relatos a respeito da efetividade da desinfecção por amônia quaternária sobre oocistos infectantes de *Eimeria acervulina* em ambiente criatório composto por cama de frango de palha de arroz reutilizada. Mas, sabe-se que desinfetantes tem níveis diferentes de perda de eficiência na presença da matéria orgânica. Assim, deve-se salientar que a matéria orgânica existente no ambiente, após a saída das aves, como cama de frango, fezes, penas, etc., pode interagir com o princípio ativo usado, causando a alteração de seu poder de desinfecção (AYENI et al., 1972; WILLIAMS, 1997).

Baseado no exposto acima, fica claro que os oocistos contaminam a cama dos galpões, sendo formas altamente resistentes, que disseminam a infecção rapidamente no lote e que a severidade da infecção coccidiana no hospedeiro está diretamente relacionada ao número de oocistos esporulados ingeridos pelas aves. A reinfecção é facilitada pelas condições de confinamento, colocando em cheque o desenvolvimento de vacinas e antibióticos. Aliado a isso, a crescente proibição do uso de quimioterápicos, o problema da resistência, o risco de manipulação de desinfetantes e o impacto ambiental que pode ser gerado pelo grande volume de resíduos de cama, torna-se fundamental a busca de novas alternativas de controle da coccidiose.

Assim, o desenvolvimento de técnicas e ações de controle que diminuam a incidência da coccidiose e suas perdas econômicas no plantel avícola faz-se necessário. Nesse propósito, a realização de tratamentos na cama reutilizada propicia baixo custo de produção e melhor eficiência dos medicamentos utilizados. A metodologia correta de tratamento da cama de frango, no controle da coccidiose, trará ganho sanitário e zootécnico para a avicultura e menor risco da presença de medicamentos residuais na carne.

Este estudo justifica-se na necessidade da implementação de medidas preventivas no setor produtivo brasileiro visando produtividade e agregando valor sanitário à avicultura de corte. Tendo em vista a expansão mundial e brasileira da avicultura de corte e as dificuldades relacionadas ao controle da coccidiose, torna-se importante a avaliação da eficiência de tratamentos de controle na cama reutilizada de frangos de corte.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar e comparar a eficiência dos métodos de controle fermentação, desinfecção com amônia quaternária e fermentação associada à desinfecção com amônia quaternária, além da utilização terapêutica do anticoccidiano Diclazuril por via oral, sobre oocistos de *Eimeria acervulina* presentes na cama reutilizada de frangos de corte.

### **2.2. Objetivos específicos**

- 1- Avaliar a cinética de eliminação de oocistos nas fezes de frangos de corte frente a estes métodos de controle.
- 2- Comparar a eficiência dos métodos de controle da coccidiose na cama reutilizada em relação à eficiência do tratamento químico com anticoccidiano Diclazuril via oral em frangos de corte.
- 3- Avaliar o desempenho zootécnico por ganho de peso semanal e final e conversão alimentar das aves infectadas.
- 4- Classificar em escore as possíveis lesões macroscópicas produzidas pelo parasito *Eimeria acervulina* no intestino delgado de frangos de corte.
- 5- Avaliar, por histologia, o padrão histomorfométrico do intestino delgado dessas aves.
- 6- Comparar o número de oocistos recuperados nas camas com os escores de lesões macroscópicas obtidos.
- 7- Verificar possível correlação de controle da infecção no ambiente e saúde intestinal dos frangos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Área do estudo**

O experimento foi conduzido no município de Uberlândia, Minas Gerais, localizado na Mesoregião do Triângulo Mineiro, sudoeste do Estado, com uma área total de 4.115,822 quilômetros quadrados (km<sup>2</sup>), sendo 219,00 km<sup>2</sup> de área urbana e 3.896,822 km<sup>2</sup> de área rural.

A região do município de Uberlândia é caracterizada pelo tipo climático tropical de altitude, com temperaturas amenas, tendo verão chuvoso (outubro a março) e inverno seco (abril a setembro). Segundo a classificação de Köppen (1948), adotada universalmente e adaptada ao Brasil, o clima de Uberlândia tem a classificação "Cwa", ou seja: C - mesotérmico (meio quente e úmido); w - chuvas de verão; a - verões quentes e invernos brandos. A altitude média do município de Uberlândia, fornecida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2006) é de 863 metros. A latitude estende-se de 5°16' Norte até 33°45' Sul. Uberlândia, com latitude de 18°55'23" Sul (Equador) está na faixa de temperatura moderada. A média anual da temperatura é de 22°C, sendo os meses de outubro a março os mais quentes, temperatura média de 24,7°C, e os meses de junho e julho os mais frios, média de 18,8°C (IBGE, 2006).

Quanto à avicultura, de acordo com o Banco de Dados Integrados, Secretaria Municipal de Planejamento Urbano e Meio Ambiente do Município de Uberlândia (2007), a região possui 33 empresas integradoras e plantel de capacidade instalada de 18.800.000 cabeças/ano, com produção de 42.000 toneladas de carne de frango por ano.

#### **3.2. Local do experimento**

O experimento foi realizado no período de março a agosto de 2008, em propriedade particular, situada na zona rural, a 11 quilômetros do município de Uberlândia, Minas Gerais. A propriedade possui 25 hectares, sendo formada por área de pastagem e reflorestamento por eucaliptos. O aviário utilizado possui construção mista, de alvenaria e madeira, com telhado em duas águas, posicionado no sentido leste oeste. As laterais são teladas com tela de arame galvanizado, malha duas polegadas e revestidas por lonas impermeabilizadas de cor azul. O aviário foi equipado com bebedouros tipo pendular e comedouros tubulares, em proporções de criação industrial. Nos primeiros três dias de idade, além do comedouro, a ração foi fornecida aos animais sobre um papel, a fim de facilitar o acesso dos animais à ração. A instalação

possui sistema de aquecimento para os pintinhos através do aquecimento do ar por forno a lenha e sistema de ventilação e nebulizadores para a climatização do aviário.

O local do experimento permaneceu isolado da presença de outros animais. Ao redor do galpão, existia uma área de biossegurança cercada a 20 metros de distância. As aves foram alojadas em densidade de dez aves/metro quadrado (m<sup>2</sup>). Antes do alojamento, o galpão foi totalmente lavado com água e sabão neutro comercial e desinfetado, primeiramente o piso foi desinfetado com solução de soda cáustica a concentração de 2%, com posterior aplicação de solução de formol a 5%. Todos os equipamentos, como comedouros, bebedouros e divisórias dos boxes, também foram previamente limpos e desinfetados com solução de formol a 5% e em seguida amônia quaternária a 10%.

As medidas de limpeza e desinfecção adotadas no experimento seguiram os critérios estabelecidos pelo Manual da Organização Internacional de Epizootias (OIE) (2000).

### **3.3. Comitê de Ética**

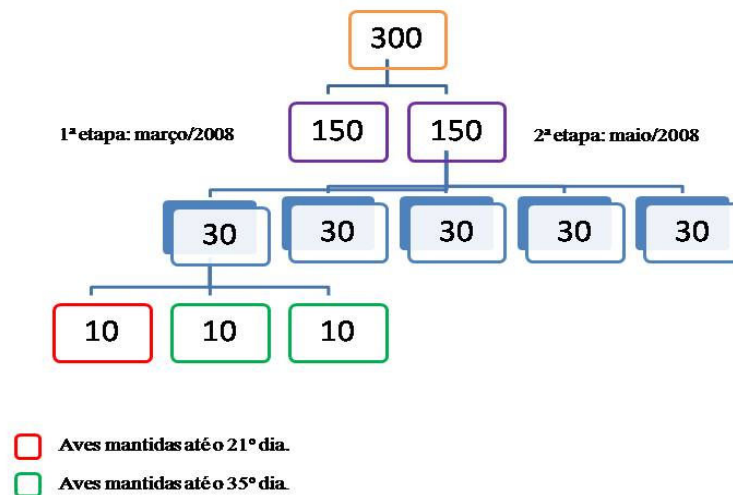
Este estudo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Utilização Animal (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo número 050/2008 (Anexo 1).

### **3.4. População de estudo**

Foram utilizados 300 frangos de corte, fêmeas, da linhagem Cobb, com peso médio inicial de 42 gramas (com coeficiente de variação de três gramas), adquiridos em dois lotes separados de 150 aves cada, para duas etapas experimentais distintas nos meses de março e maio de 2008, respectivamente. As aves foram obtidas com um dia de idade, provenientes do incubatório da empresa Cobb, com registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), localizado no município de Marília, estado de São Paulo. Os pintos eram provenientes de matrizes vacinadas contra doença de Gumboro, Bronquite infecciosa das galinhas, doença de Newcastle, encefalomielite, coriza infecciosa e varíola aviária e foram vacinados ainda no incubatório, contra a doença de Marek, Bronquite e Gumboro, mas não estavam vacinados contra a coccidiose.

As aves foram distribuídas em dois alojamentos, sendo 150 aves por alojamento. Em cada alojamento, 100 frangos permaneceram do primeiro até 35 dias de idade, com o objetivo de acompanhamento da cinética de eliminação de oocistos. As outras 50 aves de cada alojamento foram mantidas até o 21º dia de vida, quando foram necropsiadas para avaliações

histológicas. Nos dois alojamentos, as aves foram divididas em boxes de 30 aves cada, totalizando cinco tratamentos por alojamento, subdivididos em três repetições de dez aves, sendo que as necropsiadas aos 21 dias estavam subdivididas em cada boxe ou grupo de tratamento (Figura 1).



**Figura 1.** Representação esquemática da distribuição da população de estudo.

### 3.5. Manejo das aves

O manejo das aves obedeceu aos padrões da avicultura industrial, com limpeza diária de comedouros e bebedouros. Foi utilizada água clorada, a três ppm, para consumo das aves e limpeza dos equipamentos. A água dos bebedouros era trocada três vezes ao dia. O manejo foi padronizado durante todo o experimento.

A temperatura do ambiente foi mantida na zona de conforto das aves (Anexo 2) durante todo o período experimental, sendo utilizado aquecimento até os 14 dias de idade. Os ventiladores e nebulizadores foram utilizados para controle da temperatura e umidade relativa do ar. A dieta basal referiu-se a ração comercial sem aditivos, formulada de acordo com as exigências nutricionais de frangos de corte da linhagem Cobb e contou com acréscimo de anticoccidiano Monensina (110 ppm). A composição básica da ração era 21,58% de proteína, 4,75% de extrato etéreo, 4,00% de fibra, 5,65% de minerais, 0,87% de cálcio e

0,79% de fósforo, conforme especificado pelo fabricante Agrocere S/A, Unidade de Nutrição Animal (Rio Claro, SP, Brasil).

### **3.6. Obtenção do inóculo**

O inóculo de oocistos de *E. acervulina* cepa Ea3LP8a foi cedido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Aves e Suínos, situada em Concórdia, SC, em convênio com o Laboratório BIOVET, localizado em São Paulo, SP, responsável pela purificação, manutenção e ajuste do isolado para este experimento. O ajuste teve como objetivo a obtenção de dose infectante aproximada de  $3 \times 10^3$  oocistos por cada 0,5 mililitro (mL) de solução diluente da vacina de Marek (Anexo 3), considerando-se a patogenicidade, variantes da espécie e dose infectante média, para produzir infecção de caráter subclínico, simulando uma infecção natural a campo. Até o momento do uso, o inóculo foi mantido à temperatura de cinco graus Celsius, em caixa própria do fabricante, sendo transportado ao local do experimento em caixa de isopor resfriada e imediatamente utilizado.

### **3.7. Delineamento experimental**

O delineamento experimental realizado foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo que este estudo foi dividido em duas etapas experimentais ou dois alojamentos, com 150 aves cada. As duas etapas se realizaram no mesmo ambiente criatório, porém, entre elas, houve intervalo sanitário de 15 dias. Neste intervalo sanitário, foram aplicados os diferentes tratamentos experimentais de métodos de controle da coccidiose na cama de frango reutilizada.

### **3.8. Separação dos grupos de tratamentos**

Nas duas etapas experimentais, as aves foram separadas em cinco grupos de tratamento, utilizando-se boxes confeccionados com telas metálicas, na densidade de 10 aves por metro quadrado, sendo o total de 30 aves por boxe ou grupo de tratamento. Estes boxes foram instalados dentro de um aviário convencional de criação, com o objetivo de se aproximar ao máximo dos desafios que, normalmente, ocorrem durante o crescimento das aves, para garantir a possível reprodução da metodologia na avicultura industrial. Todos os boxes de tratamento tinham divisórias internas de tela, de forma a distribuir igualmente as 30



aves em três subgrupos de 10 com o objetivo de garantir distribuição uniforme dos frangos, eliminação de fezes de forma equilibrada na cama e repetição estatística. O substrato utilizado como cama de frango foi palha de arroz, sendo estabelecida a cobertura do piso com 10 centímetros de espessura desse substrato.

### **3.8.1. 1ª etapa experimental (1º alojamento)**

Na primeira etapa, utilizou-se 150 frangos de corte, os quais foram inoculados, experimentalmente, com oocistos de *Eimeria acervulina*. Aos 21 dias de idade, foram retirados 10 frangos de cada grupo experimental com o objetivo de avaliação do escore de lesão intestinal macroscópica e coleta de amostras intestinais para a análise histológica. Os 20 frangos restantes em cada grupo foram mantidos até 35 dias de idade com o objetivo de avaliação da curva de eliminação de oocistos por um período de tempo próximo a idade de abate em avicultura comercial (ANUÁRIO DA AVICULTURA INDUSTRIAL, 2007).

#### **3.8.1.1. Inoculação das aves da primeira etapa**

Na primeira etapa experimental, as 150 aves foram inoculadas, individualmente, aos 12 dias de idade, com  $3 \times 10^3$  oocistos da cepa Ea3LP8a de *Eimeria acervulina*, por via endoesofágica. O desafio foi realizado utilizando seringa de insulina descartável e estéril de um mL, com dosagem de 0,5 mL de inóculo por frango.

#### **3.8.1.2. Coletas de fezes e cama e Exames parasitológicos**

Amostras de fezes e cama de cada grupo de tratamento foram coletadas, diariamente, durante todo o período experimental. Na primeira etapa experimental, a primeira coleta foi realizada no primeiro dia de alojamento das aves (um dia de idade). Amostras controle foram realizadas até o dia da inoculação (12 dias de idade) e também neste dia, antes da inoculação. Estas foram realizadas com o objetivo de verificação da negatividade dos frangos e foram consideradas controle. As coletas subsequentes, após a inoculação, foram realizadas até 35 dias de idade dos frangos.

Em cada grupo experimental, seis amostras de *pool* de cama e fezes foram coletadas superficialmente, sendo quatro nos compartimentos laterais e duas centrais, totalizando seis repetições diárias de amostras por grupo de tratamento. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos identificados e transportadas em caixa de isopor refrigerada até o Laboratório de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU) para processamento.

Para análise de positividade das amostras, dois gramas de fezes foram processados utilizando-se a técnica de centrifugação por flutuação em solução saturada de sacarose a concentração de 35% e densidade de 1,2 g/mL (SHEATER, 1923) (Anexo 4). As amostras positivas foram posteriormente quantificadas pelo método de contagem de oocistos por grama de fezes (OOPG) de Gordon e Whitlock (1939) modificado utilizando câmara de MacMaster. Para contagem de oocistos foi considerado fator de multiplicação por 100. As análises foram realizadas em duplicata nas seis repetições por tratamento.

### 3.8.1.3. Desempenho zootécnico

As aves tiveram seu ganho de peso acompanhado por pesagens periódicas, aos um, sete, 14, 21, 28 e 35 dias de idade e foram observados aspectos clínicos durante todo o período experimental. As pesagens foram realizadas, semanalmente, seguindo-se o mesmo horário e a sequência de pesagem (Grupo 1 ao 5, conforme detalhado no item 3.9), durante todo o experimento. Para a pesagem, as aves foram acondicionadas dentro de caixa plástica, considerando peso líquido. Foram avaliados ganho de peso (GP) e consumo de ração, a fim de se determinar a conversão alimentar. A ração foi pesada diariamente antes de ser fornecida para as aves em balança comercial comum com peso máximo de 25 quilos. O consumo de ração de cada tratamento foi determinado pela diferença de peso entre o alimento fornecido e o consumido diariamente (McCARTER, 1999). Este valor foi calculado descontando-se as sobras de ração do total de ração fornecida, durante a limpeza diária dos comedouros. A conversão alimentar (CA) foi estimada através da relação consumo de alimento (kg/ave/dia) dividido pelo ganho de peso (kg/ave/dia).

#### Equação 1 - Equação para correção da conversão alimentar para 2,00kg

$$CA_{\text{Cor } 2,00} = ((2,00 - PV) / 3) + CA, \text{ onde:}$$

**CA Cor 2,00 = Conversão alimentar corrigida para 2,00 kg de peso vivo**

PV = peso vivo dos frangos

CA = conversão alimentar real obtida pelos frangos

### 3.8.1.4. Procedimentos de necropsia

A eutanásia dos frangos foi realizada aos 21 dias de idade, por deslocamento cervical, método aceito sob restrição, previsto na Resolução número 714, de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2002). À necropsia, foi retirado o terço inicial do intestino delgado, sendo este dividido em dez fragmentos de aproximadamente dois

centímetros. Estes fragmentos foram utilizados para observar as lesões macroscópicas presentes e, posteriormente, o material foi acondicionado em formalina tamponada a 10% para análise histopatológica.

#### **3.8.1.5. Avaliação de lesões macroscópicas**

A classificação das lesões em escore foi baseada no método descrito por Johnson e Reid (1970) (Anexo 5), segundo o qual o escore zero equivale à ausência de lesões; escore um significa a visualização de pontos ou estrias brancas vistas da serosa ou mucosa, esparsas (até cinco por cm<sup>2</sup>) e confinadas ao duodeno; o escore dois é equivalente à presença de pontos ou estrias brancas mais numerosas, mas não coalescentes, se estendendo entre duodeno e divertículo com conteúdo intestinal normal; no escore três observam-se pontos ou estrias brancas já coalescendo com redução de tamanho, se estendendo até o divertículo, parede intestinal engrossada e conteúdo intestinal aquoso; no escore quatro, os pontos ou estrias brancas estão completamente coalescentes, dando à mucosa do intestino uma coloração acinzentada, presença de lesões típicas no intestino médio com parede intestinal engrossada e conteúdo cremoso. O escore de lesões fornece a classificação numérica de lesões macroscópicas causadas por coccídios e é usado para determinar o efeito de diferentes tratamentos nas infecções coccidianas.

#### **3.8.1.6. Avaliação das lesões microscópicas**

A obtenção do material para estudo à microscopia óptica de luz seguiu as etapas da técnica histológica convencional. Para avaliação das lesões microscópicas, os fragmentos intestinais foram coletados e fixados em solução de formalina tamponada a 10% e posteriormente desidratados em série de concentrações crescentes de álcool etílico, iniciando com álcool a 70 graus Gay Lussac (°GL) e finalizando com álcool absoluto, realizada em seis horas. Seguiram-se a diafanização com xilol por duas horas e a impregnação pela parafina fundida em estufa a 60°C, em três banhos de meia hora, perfazendo uma hora e meia. Para obtenção de um bloco regular de parafina, o material foi imerso em um molde retangular que continha parafina líquida, em seguida solidificada em temperatura ambiente (inclusão). Os blocos com tecidos incluídos foram seccionados em micrótomo, obtendo-se cortes histológicos longitudinais e semi-seriados de cinco micrômetros de espessura. Para visualização dos componentes teciduais realizou-se coloração pela hematoxilina-eosina (HE).

Para a análise morfométrica, as lâminas foram posicionadas na objetiva de quatro vezes de aumento e ocular de 10 (aumento de 40x), em busca de melhor campo para realizar

as medidas de altura e larguras basal, central e apical das vilosidades, além da distância média entre duas vilosidades adjacentes e bem orientadas.

Todos os cortes histológicos foram analisados por imagens digitalizadas obtidas em microscópio Olympus Triocular BX40 acoplado a uma camera digital Oly-200 da marca Olympus®, ligada a um computador PC por placa digitalizadora Data Translation 3153. As medidas foram realizadas pelo programa HL Image 97 (MASTRANTONIO et al., 2002), no Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). No total, foram coletadas porções intestinais de 50 aves por alojamento (dez por grupo), sendo que, de cada tratamento, foram produzidas 15 lâminas, chegando-se ao número de 150 lâminas analisadas.

Em cada corte histológico, a partir de uma linha traçada na base das criptas, foram medidas dez vilosidades íntegras, desde a base até a extremidade livre. Em seguida, realizou-se a média por grupo. As alterações histopatológicas em relação às vilosidades e criptas foram comparadas entre os tratamentos. Estas mensurações foram correlacionadas ao perfil de eliminação de oocistos e foram também analisadas possíveis correlações entre as lesões macro e microscópicas observadas no intestino dos frangos de corte.

O modelo matemático para mensuração da área de absorção da mucosa intestinal, proposto por Kisielinski et al. (2002) foi utilizado neste estudo para análise de possíveis modificações funcionais e morfológicas ocorridas no intestino delgado devido à infecção pelo coccídio. Este modelo matemático permite estimar, em cortes histológicos, a área da mucosa intestinal pela avaliação de três parâmetros, sendo estes: comprimento e largura da vilosidade e largura da cripta (distância entre duas vilosidades).

## **Equação 2. Equação para cálculo da área de absorção da mucosa intestinal**

$$M = (\text{larg. vilo} \times \text{comp. vilo}) + (\text{larg. vilo}/2 + \text{larg. cripta}/2)^2 - (\text{larg. Vilo}/2)^2 / (\text{larg. vilo}/2 + \text{larg. cripta}/2)^2$$

**M = área (superfície) de absorção da mucosa intestinal**

Larg. vilo = largura média da vilosidade

Comp. vilo = comprimento da vilosidade

Larg. cripta = largura média da cripta

### 3.9. Intervalo sanitário e tratamento da cama

Após a retirada dos 150 frangos de corte da 1ª etapa experimental, foi realizado intervalo sanitário de 15 dias, no qual não foi removida a cama colocada no início do estudo nos cinco grupos (boxes) de tratamento. Durante esse intervalo sanitário, três grupos foram submetidos a tratamento da cama, um grupo não recebeu tratamento da cama, mas os frangos da segunda etapa receberam tratamento anticoccidiano (vide item 3.10) e um grupo foi considerado controle, não sendo utilizado nenhum método de tratamento neste boxe (Grupo 1). Os tratamentos da cama reutilizada durante o intervalo sanitário são descritos abaixo.

- **Grupo 1:** Controle. Neste grupo experimental, a cama de frango não foi fermentada ou desinfetada no intervalo sanitário e os frangos que foram colocados sobre essa cama (2ª etapa experimental) não receberam tratamento para coccidiose. O manejo de cama realizado foi apenas revolvimento, com máquina revolvedora de cama, um dia após a retirada das aves da 1ª etapa e dois dias antes da entrada das aves da 2ª etapa.
- **Grupo 2:** Cama de frango tratada por método de desinfecção mecânica ou física, denominado fermentação. O procedimento de fermentação foi realizado após a retirada de todas as aves da primeira etapa, durante o intervalo sanitário. A cama foi revolvida um dia após a saída das aves da 1ª etapa. No segundo dia do intervalo sanitário, a fermentação foi iniciada enleirando toda a cama do grupo no eixo central desse boxe, cobrindo com lona plástica preta e, em seguida, deixando em repouso por dez dias. Após esse período, a cama foi redistribuída no boxe e revolvida com máquina revolvedora de cama, nos dois dias anteriores à entrada das aves da 2ª etapa.
- **Grupo 3:** Cama de frango tratada por método de desinfecção química com amônia quaternária em solução de concentração de 10% do princípio ativo e diluição de 1 litro dessa solução de amônia quaternária para 20 litros de água (1:20). A desinfecção foi realizada por pulverização do boxe de alojamento com bomba de fumigação agrícola, por 15 minutos, durante o segundo e o 12º dia do intervalo sanitário, utilizando um litro de solução para cada metro quadrado de área. A cama foi revolvida nos dois dias anteriores à entrada das aves da 2ª etapa.
- **Grupo 4:** Cama de frango fermentada e, após este procedimento, desinfetada com amônia quaternária. No segundo dia do intervalo, a cama foi enleirada no centro do aviário e coberta com lona plástica preta, iniciando-se o processo de fermentação, que foi mantido por 10 dias. Após esse período, a cama foi redistribuída no boxe,

ficando em repouso por um dia, sendo que, no 12º dia do intervalo, esta cama foi pulverizada com solução de amônia quaternária 10% em diluição de 1:20 por 15 minutos e revolvida nos dois dias anteriores à entrada das aves da 2ª etapa.

A cama do quinto boxe experimental (Grupo 5) não foi tratada. Entretanto, as aves alojadas nesse grupo, na 2ª etapa, receberam anticoccidiano Diclazuril, por via oral.

### **3.10. 2ª etapa experimental (2º alojamento)**

Após o intervalo sanitário e estabelecidos os tratamentos foram alojadas nos cinco boxes outras 150 aves, em distribuição e manejo iguais aos da 1ª etapa, na cama reutilizada. No segundo alojamento, não ocorreu inoculação experimental, sendo esperada a possibilidade de infecção natural pela cama de aviário.

- **Grupo 5:** não houve tratamento da cama no intervalo sanitário. As 30 aves alojadas nesse boxe durante a segunda etapa foram tratadas com o anticoccidiano avícola Diclazuril, na dose de 0,5 miligrama (mg) por quilo de peso corporal médio dos frangos, via oral em água de bebida, aos 17 dias de idade.

#### **3.10.1. Análises experimentais da 2ª etapa**

Os exames parasitológicos, desempenho zootécnico e exames histológicos desta etapa foram os mesmos realizados na primeira etapa, anteriormente descritos.

### **3.11. Análise estatística**

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em relação à distribuição das aves nos diferentes tratamentos (SPIEGAL, 1994).

A análise estatística seguiu o esquema da análise de variância (ANOVA) para as variáveis quantitativas. O teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) foi utilizado para comparar as médias das variáveis quantitativas, bem como o teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) para as qualitativas (SPIEGAL, 1994).

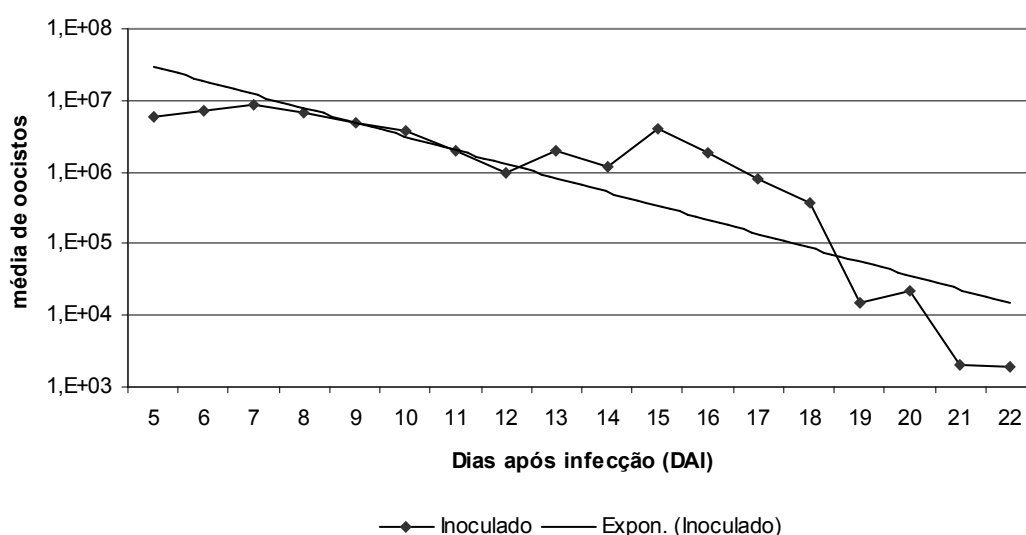
O número médio de oocistos recuperados em cada grupo, os escores de lesões e o ganho de peso foram avaliados por análise de variância, pelo teste de Tukey, em nível de significância de 95% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). O escore de lesão macroscópica foi avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). As análises de correlação foram realizadas pelo teste de correlação de Pearson ( $p < 0,01$ ). A análise estatística foi realizada através do pacote estatístico SISVAR. A análise gráfica foi obtida estatisticamente pelo Software GraphPad Prism versão 5.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Curva de eliminação de oocistos

Na primeira etapa experimental, foram encontrados oocistos nas fezes 120 horas (cinco dias) após a inoculação. Na segunda etapa, as aves foram infectadas naturalmente, por contato com a cama reutilizada, o período pré-patente também foi de 120 horas, independente do tratamento colocado na cama ou dado aos frangos. Este achado está de acordo com o período pré-patente de 97 a 120 horas, citado por vários pesquisadores como Long e Reid (1982) apud Conway e Mackenzie (1991), Jeurissen et al. (1996), Youn e Noh (2001), Gabriel et al. (2006) e Zulpo et al. (2007). Teixeira et al. (2006) observaram que, em frangos de corte inoculados com a mesma cepa experimental, mas com dose infectante maior do que a deste estudo, a eliminação de oocistos iniciou-se, no 5º dia após a infecção (DAI), corroborando com os achados deste trabalho. Entretanto, Kawazoe et al. (2005) comentaram que podem ocorrer variações no período pré-patente da *E. acervulina* e que estas estão associadas às características da cepa do parasito estudado.

Na 1ª etapa experimental, observaram-se valores crescentes de oocistos nas fezes do 5º ao 7º DAI, em seguida, houve uma fase de gradativa redução da eliminação até o 12º DAI. Foi observado pico primário de eliminação no 7º DAI e picos secundários de eliminação no 13º e 15º DAIs, como observado na Figura 2.



**Figura 2.** Curva de eliminação diária de oocistos recuperados das fezes de frangos de corte inoculados experimentalmente com *Eimeria acervulina*, na primeira etapa experimental.

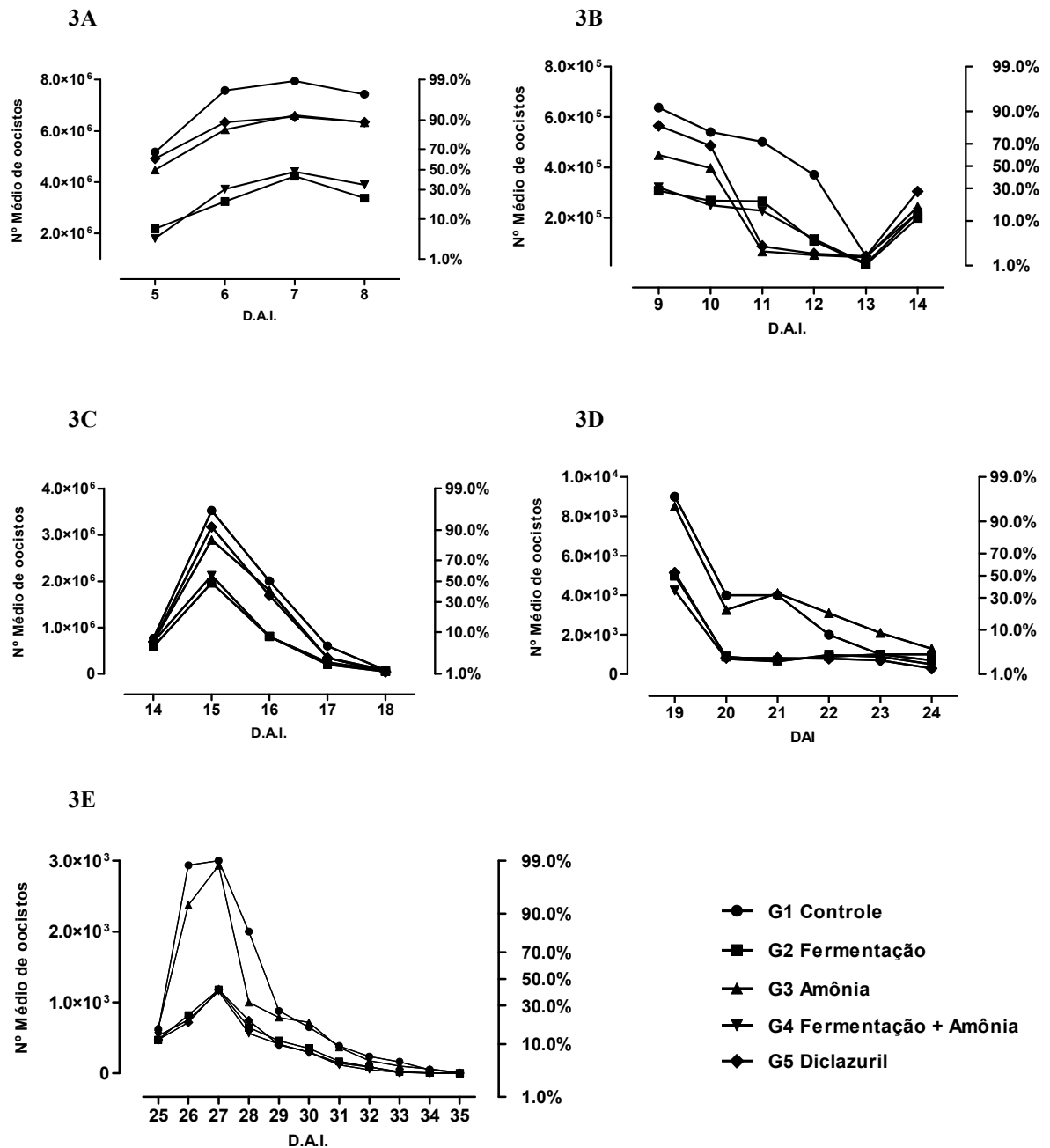
Os picos de eliminação secundários, ou picos de repicagem, podem indicar novas reinfecções de algumas aves por ingestão de oocistos esporulados presentes na cama de frango reutilizada. Michael (2005) considerou os picos de repicagem na coccidiose como achado normal, já que frangos de corte são convencionalmente alojados em cama e podem reinfecar-se, naturalmente, com oocistos presentes nesta. Kawazoe et al. (2005), em inoculação experimental, observaram picos primários de eliminação entre cinco e seis dias pós-inoculação, seguido de decréscimo do número de oocistos nas fezes, entretanto não observaram picos secundários posteriores, tendo em vista o alojamento das aves desse estudo em gaiolas, inexistindo o contato com a cama de frango e a possibilidade de reinfecção.

Neste estudo, é possível observar que os picos secundários apresentaram-se reduzidos em relação ao pico do 7º DAI, possivelmente, devido à atuação da imunidade celular que, na coccidiose, aparece de forma progressiva, na qual o sistema imune do hospedeiro pode controlar, significativamente, a eliminação de oocistos até níveis subclínicos (WILLIS; BAKER, 1981). Os frangos expostos a coccidiose, de acordo com as respostas do hospedeiro, podem desenvolver imunidade ou doença clínica com repercussão econômica (FERNANDO, 1990). A imunidade pela contínua reinfecção dos oocistos na infecção por *E. acervulina* aparece cerca de três semanas após a infecção inicial (MICHAEL, 2005). Neste estudo, pôde observar-se redução da excreção de oocistos nas fezes neste período. Resultados semelhantes foram relatados por Franco et al. (1993), em inoculação experimental de aves de postura, aos 15 dias de idade, que identificaram que o número de oocistos no sedimento fecal foi maior no período inicial, diminuindo posteriormente, corroborando com os achados deste experimento, apesar da utilização de outra linhagem de aves.

Fatores predisponentes para a ocorrência de esporulação de oocistos estão presentes em toda a avicultura mundial. Como as aves alojadas na 2ª etapa eram inicialmente livres de coccidiose e iniciaram a eliminação de oocistos, comprovou-se a reinfecção natural destas pelos oocistos presentes na cama reutilizada em todos os grupos desta etapa. A condição mais importante para que se inicie o ciclo de vida dos coccídios é a esporulação do oocisto na presença de ar, calor e umidade (DAUGSCHIES et al., 2002), condições comprovadamente presentes na cama de frango reutilizada durante este estudo.

A Figura 3 mostra as curvas de eliminação de oocistos nos diferentes grupos experimentais, durante todo o período da 2ª etapa.





**Figura 3.** Curvas de eliminação diária de oocistos de *E. acervulina* recuperados das fezes de frangos, após tratamentos de controle da coccidiose (DAI: dias após a inoculação). Grupo 1 (G1): Controle positivo (cama não tratada no intervalo sanitário), Grupo 2 (G2): Fermentação. Grupo 3 (G3): Fermentação e amônia quaternária. Grupo 4 (G4): Amônia quaternária. Grupo 5 (G5): Diclazuril via oral.

A Figura 3A apresenta os resultados da primeira semana de eliminação de oocistos na 2ª etapa experimental. Observou-se tendência crescente entre cinco e oito dias de idade, com pico de eliminação primário no 7º DAI, em todos os grupos experimentais. O comportamento

da infecção na primeira semana, em relação ao seu início (cinco dias de idade) e ao pico de eliminação (sete dias) foi precoce, quando comparado ao comumente diagnosticado na avicultura industrial (pico de eliminação de oocistos de 10 a 12 dias) (SANTOS et al., 2005). Tendo em vista que, a coccidiose acomete aves jovens e em crescimento (LILLEHOJ; LILLEHOJ, 2000) e que a *Eimeria acervulina* apresenta períodos pré-patentes variando de 97 a 120 horas e de esporulação de 15 até 24 horas (LONG; REID, 1982 apud CONWAY; MCKENZIE, 1991), este achado justifica-se como possível, levando-se em conta que, em cinco dias, pode ocorrer um ciclo biológico deste parasito. Este achado indica a existência de infecção coccidiana em idade precoce nos frangos de corte. Teoricamente, em uma granja convencional, os frangos podem se infectar nos primeiros dias de vida. No entanto, a doença clínica pode não ser observada (DANFORTH; RUFF, 1999).

De nove a 14 dias de idade, houve decréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) nos valores médios de oocistos recuperados das fezes, frente aos valores encontrados na semana anterior, em todos os grupos experimentais (Figura 3B). O decréscimo na curva pode ser explicado pelo ciclo biológico do parasito. Após a multiplicação em progressão geométrica nas células epiteliais intestinais, levando a posterior eliminação de grande quantidade de oocistos (observada neste estudo no pico de eliminação) o parasito realiza esporulação assexuada no meio ambiente (JOHNSTON; FERNANDO, 1995). De acordo com estes autores, gerações de esquizontes do parasito multiplicam-se no intestino delgado, sendo possível a formação de até quatro gerações consecutivas destes esquizontes antes do início da eliminação de oocistos, o que pode retardar a fase de eliminação para o meio exterior e contribuir para um decréscimo temporário de eliminação enquanto essas fases se realizam intracelularmente.

Os principais achados da terceira semana de infecção foram os picos secundários e a expressiva redução nas médias de oocistos recuperados nas fezes das aves em todos os grupos testados. Foi observado pico de repicagem (ou secundário) mais expressivo no 15º DAI referente à possível reinfecção natural dos frangos por oocistos presentes na cama (Figura 3C). Houve expressiva redução na eliminação de oocistos de 16 a 19 dias com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação à média de oocistos da primeira e da segunda semana, em todos os tratamentos estudados. Nesta semana da 2ª etapa, foram observadas variações extremas na curva de eliminação dos diferentes tratamentos. Os frangos tratados com Diclazuril (G5) aos 17 dias de idade, apresentaram uma curva de eliminação particular. Os valores de eliminação de oocistos foram semelhantes aos do controle positivo (G1) até a idade anterior ao tratamento e, após o anticoccidiano, houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) na média de oocistos eliminados. A alteração na curva de eliminação das aves tratadas com

Diclazuril foi resultante da ação terapêutica do anticoccidiano. Este resultado condiz com Maes et al. (1988), que citaram que Diclazuril é capaz de interromper o ciclo e a eliminação de oocistos de *Eimeria* sp.

Os grupos de fermentação, associada ou não à desinfecção por amônia quaternária (G2 e G4) apresentaram os menores valores de oocistos na fase inicial da infecção dentre os tratamentos, mas, a partir da aplicação do Diclazuril o número médio de oocistos do G5 foi semelhante aos valores encontrados nestes grupos. O controle por fermentação da cama reutilizada permitiu menor exposição dos frangos aos oocistos no início de sua vida no aviário. Pode-se inferir que o Diclazuril apresentou eficiente ação terapêutica, mas a fermentação atuou preventivamente, reduzindo a carga ambiental de oocistos na cama reutilizada e, conseqüentemente, a exposição dos frangos.

A partir de 19 dias de idade, houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) na eliminação de oocistos em todos os grupos (Figura 3D). O fenômeno de redução da eliminação de oocistos a níveis subclínicos, inclusive no grupo controle (G1) pode ser considerado característico da cinética do parasito estudado (LILLEHOJ et al., 2005). A partir de 30 dias (Figura 3E) pode-se dizer que os oocistos eliminados nas fezes foram encontrados em valores subclínicos. Se avaliada isoladamente, esta expressiva redução leva ao entendimento de que a coccidiose em frangos de corte, severa ou subclínica, obrigatoriamente tende a auto-imunidade, e que, por isso, não deve ser considerada infecção preocupante. No entanto, esta avaliação exclui as observações clínicas e zootécnicas do comportamento deletério desta doença na fase inicial da vida das aves. As altas perdas econômicas na avicultura atual, por coccidiose, podem estar relacionadas a pouca importância dispendida a fase inicial. Se a gravidade e precocidade da infecção não forem levadas em conta, pode ocorrer destruição epitelial intestinal severa, quando níveis infectantes elevados de oocistos de *E. acervulina* atingirem o intestino delgado. Conseqüentemente, ocorrem perdas de produtividade por redução do ganho de peso e piora da conversão alimentar dos frangos de corte.

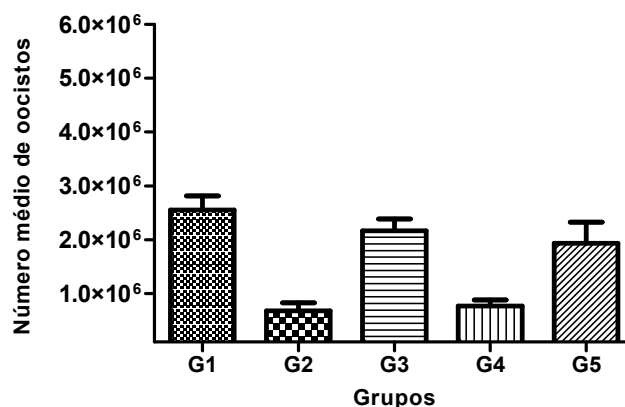
A cinética da infecção coccidiana observada neste estudo, nas duas etapas experimentais, apresentou-se como descrita na literatura por Kawazoe et al. (2005) e Ito et al. (2007). Apesar da efetiva variação no número médio de oocistos eliminados por tratamento nos grupos da 2ª etapa, o ciclo biológico de eliminação de oocistos não foi modificado pelos tratamentos, sendo regulares o período pré-patente, a presença de picos e o decréscimo da eliminação, como anteriormente descrito por Cardozo e Yamamura (2004), Kawazoe et al. (2005) e Michael (2005). Frente à forma de infecção dos frangos, por inoculação experimental ou por contato com a cama reutilizada, foi observada maior dispersão nos valores de oocistos

recuperados na 2ª etapa, possivelmente devido aos frangos terem se infectado em diversos intervalos temporais, e com dosagens diferenciadas através da ingestão de oocistos na cama e não por inoculação. Tratando-se de infecção natural, a produção de oocistos não foi sincronizada como na 1ª etapa, na qual as aves foram inoculadas à mesma idade e com dosagem conhecida. A infecção natural favoreceu a formação de picos de infecção secundários, com valores menos expressivos por atuação da imunidade e devido à resposta individual das aves dentro de cada grupo.

Em ambas as etapas, observou-se presença de oocistos na cama durante todo período estudado, ou seja, até 35 dias de idade das aves em todos os grupos experimentais.

#### 4.2. Números médios de eliminação de oocistos

Na Figura 4, observa-se que, os grupos nos quais métodos de controle da cama reutilizada foram aplicados apresentaram-se com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos valores médios de oocistos recuperados das fezes. A fermentação, associada ou não a desinfecção por amônia quaternária, (G4 e G2, respectivamente) foi o método de maior contribuição para a redução de oocistos na cama. Assim, os frangos que apresentaram menores eliminações de oocistos pelas fezes foram aqueles expostos às menores cargas infectantes na cama, reduzidas pela ação de controle do tratamento em questão.



**Figura 4.** Médias (desvio padrão) das contagens totais de oocistos recuperados da cama de frangos de corte infectados naturalmente com *E. acervulina*, após tratamentos de controle da coccidiose, na cama reutilizada ( $p < 0,05$ ). (G1: Controle positivo, G2: Fermentação, G3: Amônia quaternária, G4: Fermentação e amônia quaternária, G5: Diclazuril via oral)

A redução da exposição dos frangos aos oocistos, atingindo-se níveis subclínicos, possivelmente proporcionou desenvolvimento da imunidade contra coccidiose. Comparando os valores médios de oocistos dos grupos em que foi testado o método de desinfecção por amônia quaternária (G3, somente desinfecção por amônia quaternária e G4 fermentação associada à desinfecção por amônia quaternária), observou-se que o número médio de oocistos quando a cama passou apenas por desinfecção (G3) foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) em relação a quando a desinfecção por amônia quaternária foi associada à fermentação (G4). Assim, a desinfecção da cama reutilizada por amônia quaternária apresentou efeito limitado, não sendo eficiente sem sua associação com a fermentação. Permite-se considerar que a desinfecção por amônia quaternária não foi fator preponderante no controle da coccidiose, já que não contribuiu para efetivar a redução do número de oocistos na cama reutilizada. Apesar de alguns compostos a base de amônia, como o composto anidro de amônia ( $H_3N$ ) (EUROPEAN COMMISSION ENVIRONMENT BIOTECHNOLOGY AND PESTICIDES, 2000) e o hidróxido de amônia ( $NH_4OH$ ) (HILBRICH, 1975) terem comprovada ação sobre oocistos, a atividade da amônia quaternária pode ter sido limitada pelo baixo tempo de exposição ao desinfetante e influenciada pelo tamanho e carga iônica da molécula em questão (DAUGSCHIES et al., 2002), impossibilitando a passagem desta pela parede do oocisto. Além disso, a eficiência de desinfecção é representada *in vitro* pela proporção entre oocistos esporulados em relação aos não esporulados ou lisados (DAUGSCHIES et al., 2002). Em estudos realizados em ambientes não higienizados previamente, comprovou-se que a matéria orgânica existente no ambiente, como cama de frango, fezes e penas interage com o princípio ativo usado, causando a alteração do poder da desinfecção (AYENI et al, 1972; WILLIAMS, 1997). A amônia quaternária foi testada, neste estudo, tendo como propósito a vantagem de sua baixa toxicidade em relação aos demais compostos de amônia e a comprovada ação da amônia sobre oocistos de *Eimeria* sp. *in vitro*. No entanto, observou-se que no ambiente avícola, onde se reutiliza a cama de frango, a presença da matéria orgânica pode inviabilizar a desinfecção.

Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre o número médio de oocistos recuperados dos grupos: grupo G1 (controle), grupo G3 (cama desinfetada com amônia quaternária) e grupo G5 (aves tratadas com Diclazuril), sendo observados valores médios de  $2,54 \times 10^6$  oocistos,  $2,26 \times 10^6$  e  $1,93 \times 10^6$ , respectivamente.

Apesar do Diclazuril, via oral, comprovadamente reduzir a eliminação de oocistos (MAES et al., 1988) não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a média de oocistos

recuperados das fezes do grupo controle (G1) e deste tratamento (G5). Este fato pode ser explicado pelo tratamento somente aos 18 dias de idade das aves, quando a multiplicação dos parasitos já havia ocorrido no intestino, com liberação de grande quantidade de oocistos. Os grupos G2 e G4 apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos valores médios de oocistos recuperados por grama de fezes (OOPG) em relação ao G1, G3 e G5. Isso pode refletir o nível diferenciado de recontaminação da cama de frangos reutilizada e que o tratamento terapêutico não é efetivo na redução da eliminação tanto quanto a fermentação.

As médias dos valores das contagens totais e desvio padrão, picos de eliminação primário e secundário (o mais expressivo, aos 15° DAI) de oocistos recuperados da cama de frangos de corte infectados com *E. acervulina* da 1ª e 2ª etapas experimentais estão representadas na Tabela 1. Como pode ser observado, a média de eliminação de oocistos recuperados nas fezes dos frangos inoculados na primeira etapa foi de  $3,67 \times 10^6$ .

**Tabela 1.** Médias de oocistos recuperados das fezes com desvio padrão (DP) e picos de eliminação, observados na primeira etapa experimental (inoculação) e na segunda (infecção natural por contato com cama reutilizada), em frangos de corte, infectados com oocistos de *E. acervulina*. (DAI: dias após a infecção).

| Tratamentos            | Médias de oocistos<br>eliminados (DP)       | Picos de eliminação   |                                |
|------------------------|---|-----------------------|--------------------------------|
|                        |   | Pico inicial (7° DAI) | Pico de repicagem<br>(15° DAI) |
| Inoculação             | $3,67 \times 10^6$ ( $8,96 \times 10^3$ ) c | $8,43 \times 10^6$    | $4,03 \times 10^6$             |
| G1 Controle positivo   | $2,54 \times 10^6$ ( $4,40 \times 10^3$ ) b | $7,95 \times 10^6$    | $3,52 \times 10^6$             |
| G2 Fermentação         | $0,67 \times 10^6$ ( $2,38 \times 10^3$ ) a | $4,23 \times 10^6$    | $1,96 \times 10^6$             |
| G3 Amônia quaternária  | $2,26 \times 10^6$ ( $4,35 \times 10^3$ ) b | $6,21 \times 10^6$    | $2,89 \times 10^6$             |
| G4 Fermentação/Amônia  | $0,76 \times 10^6$ ( $2,21 \times 10^3$ ) a | $4,49 \times 10^6$    | $2,12 \times 10^6$             |
| G5 Diclazuril via oral | $1,93 \times 10^6$ ( $6,70 \times 10^3$ ) b | $6,68 \times 10^6$    | $3,17 \times 10^6$             |

(abc) Valores do mesmo parâmetro seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam valores estatisticamente diferentes pelo Teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

O número médio de oocistos por grama de fezes (OOPG) da 1ª etapa experimental apresentou-se maior e com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado à média dos valores encontrados nos grupos da 2ª etapa experimental. Entretanto, o valor do grupo controle (G1), da 2ª etapa, demonstrou que a reutilização da cama de frangos de corte sem

método de controle da coccidiose leva a uma maior carga de oocistos na cama para a reinfecção das aves, já que este grupo apresentou a maior média de oocistos nas fezes.

### 4.3. Desempenho zootécnico

Os frangos da 1ª etapa apresentaram menor peso final ( $1.392\pm 41,9$ ) e maiores valores de conversão alimentar real e ajustada, 1.917 e 2.119, respectivamente, aos 35 dias de idade.

Na 2ª etapa, observou-se que o peso médio e a conversão alimentar real e ajustada foram influenciados pelos tratamentos de controle da coccidiose. Entre os tratamentos dessa etapa, os frangos dos grupos de fermentação (G2 e G4) apresentaram um ganho de peso maior e uma conversão alimentar menor, tendo o melhor desempenho zootécnico.

Em relação ao peso, os frangos mostraram-se mais pesados nos grupos alojados sobre cama fermentada (G2), fermentada e desinfetada por amônia quaternária (G4) e quando receberam tratamento com Diclazuril (G5). O pior desempenho em peso dos grupos controle (G1) e dos frangos alojados sobre a cama apenas desinfetada com amônia quaternária (G3) ( $1.450\pm 47,3$  e  $1.535\pm 57,8$  respectivamente) coincidiu com as maiores médias de oocistos nestes tratamentos. Os valores médios de ganho de peso final aos 35 dias (GP) e da conversão alimentar real (CR) e ajustada (CAj) são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Valores médios dos parâmetros zootécnicos: peso médio final (35 dias), conversão alimentar real (CR) e conversão ajustada (CAj) em frangos de corte infectados com *E. acervulina* experimentalmente (1ª etapa) e, naturalmente, por oocistos na cama reutilizada, após tratamentos de controle da coccidiose (2ª etapa), calculados ao final do período experimental. (GP: ganho de peso)

| Tratamentos                         | Peso 35 dias | Conversão Real | Conversão      |
|-------------------------------------|--------------|----------------|----------------|
|                                     | (GP)         | (CR)           | Ajustada (CAj) |
| Inoculação experimental             | 1.392±41,9 a | 1.917 c        | 2.119 c        |
| G1 Controle positivo                | 1.450±47,3 b | 1.897 b        | 2.080 b        |
| G2 Fermentação                      | 1.587±63,4 d | 1.765 a        | 1.903 a        |
| G3 Amônia quaternária               | 1.535±57,8 c | 1.841 b        | 1.996 b        |
| G4 Fermentação e Amônia quaternária | 1.599±51,0 d | 1.692 a        | 1.826 a        |
| G5 Diclazuril via oral              | 1.613±81,0 d | 1.834 b        | 1.963 b        |

(abcd) Valores do mesmo parâmetro seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam valores estatisticamente diferentes pelo Teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Unidade de medida: gramas (g).

Em relação à conversão alimentar, os frangos alojados sobre cama fermentada (G2 e G4) apresentaram menor conversão alimentar, com diferença significativa em relação aos grupos G1, G3 e G5 (Tabela 2).

No caso da coccidiose, a piora da conversão alimentar justifica-se pela passagem da ração no duodeno sem ser totalmente digerida e absorvida porque as células epiteliais estão danificadas pela infecção. O tratamento com Diclazuril contribuiu para a melhoria no peso desse grupo, porém, a conversão alimentar não apresentou melhoria. Esse resultado corrobora com o de McCarter (1999), cujas aves tratadas com anticoccidiano apresentaram maior valor de conversão alimentar apesar de melhoria no ganho de peso. Os valores de peso final e conversão alimentar dos frangos da 1ª etapa apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos dos grupos da 2ª etapa. Hammond e Long (1973) e Ruff (1999) comentaram que aves infectadas com coccidiose apresentam retardo no crescimento e conseqüente redução no ganho de peso, proporcional a gravidade da infecção. Os achados desses autores corroboram com os piores índices de desempenho zootécnico (peso e conversão alimentar) encontrados nas aves alojadas sem tratamento de controle da coccidiose, na 1ª etapa e na 2ª etapa experimental (G1). Nestes, a cama foi reutilizada sem tratamento de controle, e por isso, as aves foram expostas a maior gravidade de infecção, devido ao nível infectante de oocistos na cama, que permaneceu elevado.

Os diferentes tratamentos influenciaram no ganho de peso semanal. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados os dois primeiros pesos semanais (sete e 14 dias) dos tratamentos preventivos da cama (G2 e G4) com os grupos controle, cama desinfetada apenas com amônia quaternária e tratado com Diclazuril (G5). A partir de 21 dias o peso semanal do grupo tratado com Diclazuril apresentou melhora significativa ( $p < 0,05$ ). A utilização do Diclazuril melhorou o peso final das aves porque levou ao ganho de peso compensatório após o tratamento. Vanparijs et al. (1990), relataram que o tratamento com Diclazuril pode suprimir ou reduzir lesões intestinais permitindo ganhos de peso normais por melhoria na absorção intestinal de nutrientes. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre o peso médio final aos 35 dias nos tratamentos G2, G4 e G5 ( $G2=1.587 \pm 63,4$ ;  $G4=1.599 \pm 51,0$ ;  $G5=1.613 \pm 81,0$ ;  $p > 0,05$ ). Houve diferença significativa no peso final das aves entre G3 e G1 ( $p < 0,05$ ), e estes grupos apresentaram, respectivamente, os menores pesos finais desta etapa.

A Tabela 3 apresenta os valores médios dos pesos semanais, que foram realizados aos sete, 14, 21, 28 e 35 dias de vida dos frangos.



**Tabela 3.** Valores médios dos pesos semanais (7, 14, 21, 28 e 35 dias) em frangos de corte infectados com *E. acervulina* experimentalmente (1ª etapa) e, naturalmente, por oocistos na cama reutilizada, após tratamentos de controle da coccidiose (2ª etapa).

| Peso médio semanal por grupo de tratamento |           |            |            |              |              |
|--|-----------|------------|------------|--------------|--------------|
| Datas das pesagens (dias)                  | 7         | 14         | 21         | 28           | 35           |
| Inoculação experimental                    | 142±8,7 a | 380±12,3 a | 647±27,6 a | 1.090±51,4 a | 1.392±41,9 a |
| G1 Controle positivo                       | 153±6,5 b | 387±15,7 a | 673±24,3 b | 1.180±44,9 b | 1.450±47,3 b |
| G2 Fermentação                             | 176±3,9 c | 445±10,4 b | 725±18,7 c | 1.274±43,7 c | 1.587±63,4 d |
| G3 Amônia quaternária                      | 165±9,6 b | 393±8,21 a | 670±29,1 b | 1.163±49,7 b | 1.535±57,8 c |
| G4 Fermentação e Amônia                    | 182±7,6 c | 452±14,3 b | 710±22,8 c | 1.250±41,3 c | 1.599±51,0 d |
| G5 Diclazuril via oral                     | 150±9,2 b | 384±11,8 a | 699±26,5 c | 1.290±40,8 c | 1.613±81,0 d |

(abcd) Valores do mesmo parâmetro seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam valores estatisticamente diferentes pelo Teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Unidade de medida: gramas (g).

#### 4.3.1. Sinais clínicos

Sinais clínicos como diarreia, apatia e queda do consumo de ração foram observados na 1ª etapa experimental, com maior intensidade de cinco a oito dias após a inoculação, correspondendo à idade de 17 a 20 dias dos frangos. O sinal clínico mais evidente foi queda de peso, também a partir de 17 dias de idade. A diarreia foi a primeira manifestação clínica observada, corroborando com os achados de Koynarski et al. (2007) e de Freitas et al. (2008), em estudos similares de coccidiose experimental por *Eimeria acervulina*. Quadros de diarreia sanguinolenta não foram observados porque a *E. acervulina* infecta as células epiteliais intestinais sem penetração profunda na mucosa intestinal.

Na 2ª etapa, os sinais foram mais brandos e precocemente observados, a partir de 14 dias de idade, sendo o mais evidente a diarreia. A queda de peso não foi tão acentuada como na 1ª etapa, principalmente nos grupos de frangos alojados sobre cama fermentada e nos que foram tratados com Diclazuril.

Na 1ª e 2ª etapas experimentais, após a terceira semana de idade (21 dias) todos os grupos apresentaram melhoria no quadro clínico, com controle da diarreia e gradativa recuperação do peso corporal, devido ao fenômeno de ganho de peso compensatório.

#### 4.4. Escore de lesões intestinais macroscópicas

À necropsia, as alterações patológicas observadas macroscopicamente no intestino dos frangos foram enterite, hiperemia, congestão e alta concentração de exsudato mucoso no lúmen, em todos os tratamentos. Estas lesões descritas são indicativas de fase inicial da infecção coccidiana e referem-se à parasitemia por trofozoítos (SMITH, 2000), as lesões ocorrem devido à perda de células epiteliais intestinais. Isso pode explicar o efeito negativo no ganho de peso e na conversão alimentar. Alterações semelhantes às observadas neste estudo foram descritas por Freitas et al. (2008) em frangos de corte da linhagem Cobb também infectados com *Eimeria acervulina*.

Na 1ª etapa experimental, as lesões intestinais macroscópicas foram visualizadas pela necropsia seis dias após a inoculação. Alguns frangos pertencentes a esta etapa apresentaram escore de lesão igual a quatro (JOHNSON; REID, 1970), indicativo de maior severidade de infecção, com lesões pontuais e estriadas brancas e completamente coalescentes na mucosa do intestino, características da espécie de *Eimeria* estudada, e parede intestinal engrossada.

A média de escore de lesão macroscópica nesta etapa foi de  $3,5 \pm 0,53$ , sendo este resultado similar ao descrito por Conway et al. (2001), que trabalharam com dosagem de  $10^4$  oocistos de *E. acervulina*.

Na 2ª etapa, os grupos G4, G2 e G5 apresentaram os menores escores de lesões intestinais macroscópicas, respectivamente, sendo os valores absolutos individuais e o escore médio de cada grupo de dez frangos observados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Valores absolutos individuais e média do grupo com desvio padrão (DP) dos escores de lesões macroscópicas (conforme Johnson e Reid, 1970) em frangos necropsiados aos 21 dias de idade, infectados experimental e naturalmente por *E. acervulina*. (n = 10, número de aves avaliadas).

| Tratamentos | Média do escore $\pm$ DP | Escore de lesão macroscópica (n=10 frangos) |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
|-------------|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
|             |                          | 1   | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Inoculação  | $3,5 \pm 0,53$ d         | 4   | 3 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3  |
| G1          | $3,1 \pm 0,57$ c         | 3   | 3 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3  |
| G2          | $1,3 \pm 0,48$ a         | 1   | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2  |
| G3          | $2,3 \pm 0,95$ b         | 3   | 3 | 1 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 1 | 1  |
| G4          | $1,1 \pm 0,32$ a         | 1   | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1  |
| G5          | $1,6 \pm 0,69$ a         | 1   | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 2 | 1  |

(abcd) Valores do mesmo parâmetro seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam valores estatisticamente diferentes pelo Teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

A média de escore de lesão macroscópica do grupo controle (G1) foi igual a  $3,1 \pm 0,57$ , valor significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que os dos demais grupos dessa etapa. A desinfecção por amônia quaternária isoladamente (G3) apresentou escore médio de lesões ( $2,3 \pm 0,95$ ) valor estatisticamente maior aos observados na fermentação (G2 e G4) e no anticoccidiano (G5), e menor em relação ao grupo controle (G1). Entre os grupos G2 ( $1,3 \pm 0,48$ ), G4 ( $1,1 \pm 0,32$ ) e G5 ( $1,6 \pm 0,69$ ) os escores de lesões macroscópicas encontrados não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ). A aplicação do anticoccidiano quatro dias antes da necropsia foi causa provável da melhora observada na aparência macroscópica intestinal, por eliminação e/ou redução da presença do parasito no epitélio, propiciando a este grupo baixo valor de escore de lesão intestinal ( $1,6 \pm 0,69$ ). Esse achado corroborou com Cardozo; Yamamura (2004), que em infecção por *E. acervulina* observaram menor escore de lesões após tratamento dos frangos com Diclazuril por via oral.

O valor médio de escore de lesão macroscópica da 1ª etapa foi estatisticamente maior ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores dos grupos da 2ª etapa, principalmente em relação aos grupos G2, G4 e G5. Essa diferença pode ser explicada pela redução da carga infectante de oocistos após os tratamentos preventivos de fermentação da cama no intervalo sanitário e da aplicação do anticoccidiano.

O aparecimento de sintomas clínicos e de lesões macroscópicas no intestino de uma ave infectada por *Eimeria* sp. depende, primariamente, da quantidade de oocistos esporulados ingeridos, da localização do parasito nas vilosidades e da resposta imune do hospedeiro (GUZMAN et al., 2003). Em aves jovens, que nunca tiveram contato prévio com coccídios, o aparecimento de lesões macroscópicas é diretamente proporcional à dose infectante (ELLIS; BUMSTEAD, 1990). Em relação aos achados desses autores, e neste estudo, a eliminação do número de oocistos nas fezes frente aos métodos de controle da coccidiose, apresentou-se diretamente correlacionada, pelo Coeficiente de Pearson ( $p < 0,01$ ) ao valor do escore de lesões macroscópicas (Tabela 5). Este fato também foi citado por Garg et al. (1999), Greif et al. (2000), Kettunen et al. (2001), Zhao et al. (2001) e Persia et al. (2006). Os resultados demonstram que os coeficientes de correlação entre OOPG e valores dos escores de lesões foram indicativos de alta ( $> 0,70$ ) e de média correlação (coeficiente entre 0,30 a 0,70) nos diversos tratamentos testados, tanto na 1ª etapa quanto na 2ª etapa experimental. Neste estudo, a correlação positiva entre o escore de lesões macroscópicas intestinais e o número médio de oocistos apresentou os maiores coeficientes ( $+0,74$  e  $+0,71$ ) na inoculação experimental e no

G1 (controle) da 2ª etapa, respectivamente, quando os escores e o número de oocistos foram também maiores.

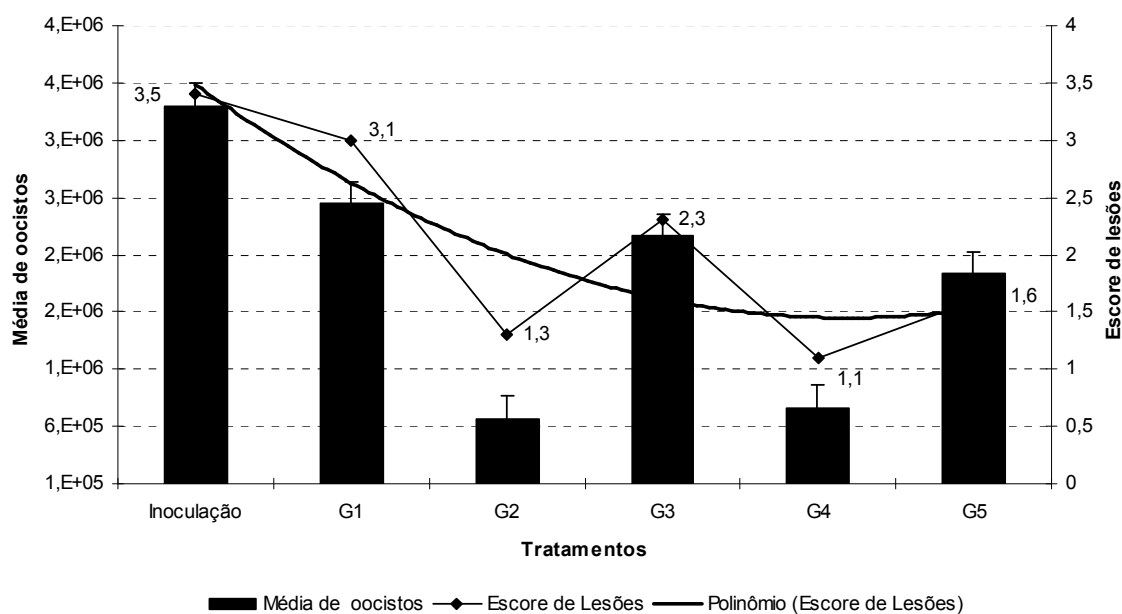
**Tabela 5.** Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre os resultados médios obtidos para as contagens de oocistos de *Eimeria acervulina* e os escores de lesões macroscópicas dos frangos necropsiados aos 21 dias de idade.

| Tratamentos             | Correlação entre OOPG e Escore de lesões macroscópicas |                                 |                                |
|-------------------------|--|---------------------------------|--------------------------------|
|                         | Média de oocistos<br>OOPG                              | Escore de Lesão<br>macroscópica | Coefficiente de correlação (r) |
| Inoculação experimental | 3,67x10 <sup>6</sup> (8,96x10 <sup>3</sup> ) c         | 3,5±0.53 d                      | +0,74                          |
| G1                      | 2,54x10 <sup>6</sup> (4,40x10 <sup>3</sup> ) b         | 3,1±0.57 c                      | +0,71                          |
| G2                      | 0,67x10 <sup>6</sup> (2,38x10 <sup>3</sup> ) a         | 1,3±0.48 a                      | +0,59                          |
| G3                      | 2,26x10 <sup>6</sup> (4,35x10 <sup>3</sup> ) b         | 2,3±0.95 b                      | +0,61                          |
| G4                      | 0,76x10 <sup>6</sup> (2,21x10 <sup>3</sup> ) a         | 1,1±0.32 a                      | +0,55                          |
| G5                      | 1,93x10 <sup>6</sup> (6,70x10 <sup>3</sup> ) b         | 1,6±0.69 a                      | +0,65                          |

(abcd) Valores do mesmo parâmetro seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam valores estatisticamente diferentes pelos Testes de Tukey e de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). Valores de Coeficientes de correlação: Teste de Correlação de Pearson ( $p < 0,01$ ).

A imunidade gerada pela infecção das espécies de *Eimerias* não previne que o esporozoítio invada a célula do hospedeiro, mas sim o seu desenvolvimento dentro da célula. A *Eimeria acervulina* possui sua patogenicidade intestinal diretamente relacionada com quantidade de gametócitos que invadem as células e posteriormente originam oocistos (ALLEN; FETTERER, 2002). Este fato pode explicar a presença das lesões macroscópicas intestinais, tanto nas aves inoculadas experimentalmente quanto nas infectadas através da cama reutilizada, e a existência da correlação positiva entre estes fatores, porém com variações entre a extensão da lesão epitelial, devido à carga de oocistos infectantes ingeridos.

A Figura 5 demonstra graficamente que os escores de lesões macroscópicas de *E. acervulina* tiveram correlação direta e positiva com a quantidade de oocistos encontrados no intestino e, posteriormente, liberados nas fezes (número médio de oocistos).



**Figura 5.** Correlação entre os valores médios do número de oocistos e dos escores de lesões macroscópicas intestinais, por grupo de tratamento, em frangos de corte experimental (Inoculado) e naturalmente infectados com *E. acervulina*, após metodologia de controle (G1: Controle positivo, G2: Fermentação, G3: Amônia quaternária, G4: Fermentação e amônia quaternária, G5: Diclazuril).

Segundo Lillehoj (1998), para que ocorra processo de imunidade contra coccidiose, faz-se necessário que os protozoários completem alguns ciclos de vida. Esse efeito é mantido e ampliado por reinfecções sucessivas, tanto de oocistos vacinais, que foram excretados pelas fezes, bem como por oocistos virulentos presentes no ambiente.

É possível ocorrer atenuação do quadro clínico e das lesões macroscópicas intestinais por diminuição do número de oocistos infectantes aos quais os frangos são expostos. A reinfecção por oocistos, na coccidiose, pode atuar como estímulo à imunidade quando a pressão de infecção do parasito for reduzida pelo tratamento adequado da cama. Os frangos alojados sobre cama fermentada apresentaram menor escore de lesões intestinais, possivelmente porque tiveram a pressão de reinfecção da coccidiose atenuada pelo tratamento da cama reutilizada, capaz de diminuir o número de oocistos encontrados na mesma. Como consequência, reduz-se o número de oocistos aos quais os frangos foram expostos.

#### 4.5. Lesões microscópicas e morfometria intestinal

Freitasi et al. (2008), relataram atrofia das vilosidades e denso infiltrado inflamatório no epitélio intestinal de aves infectadas com *E. acervulina*, sendo semelhante aos achados deste estudo. Na 1ª etapa, observaram-se os menores valores em comprimento e largura de vilosidades analisadas, sendo o comprimento médio de 926,38(±274,58) microns. Macari e Maiorka (2000) citam que duas fases do ciclo de vida das *Eimerias* sp. ocorrem no interior das células epiteliais, levando à destruição dessas, com redução de seu comprimento e largura. Este dado pode explicar o padrão das vilosidades dos frangos desta etapa.

Na 2ª etapa experimental, quando a cama de frango não foi submetida a métodos eficientes de controle da coccidiose (G1 e G3), e por isso, as aves foram expostas a uma maior carga infectante de oocistos, houve maior multiplicação do parasito no epitélio intestinal (maior destruição celular). Assim, o comprimento médio das vilosidades intestinais nestes tratamentos foram menores, em relação aos grupos G2, G4 e G5, e este fato pode ser explicado pelo desequilíbrio causado pela maior taxa de multiplicação da *E. acervulina* (já que foi maior o número de oocistos ingeridos), levando a destruição e atrofia das vilosidades.

A utilização do Diclazuril (G5) foi capaz de afetar as vilosidades intestinais, sendo que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre este tratamento e os grupos de cama fermentada ou fermentada e desinfetada com amônia quaternária (G2 e G4). Este resultado deve-se à ação anticoccidiana do Diclazuril na recuperação da integridade intestinal, com conseqüente melhoria da capacidade de absorção intestinal. A avaliação morfométrica das vilosidades intestinais mostra que as aves alojadas sobre cama fermentada apresentaram maior profundidade de criptas, comprimento e larguras médias de vilosidades comparadas as que foram alojadas sobre cama sem método de fermentação. Pode-se inferir que, o tratamento por fermentação da cama de frango, associada ou não a desinfecção por amônia quaternária, mostrou interação positiva com a saúde intestinal, por permitir menor atrofia das vilosidades intestinais e permanência de maior área de absorção. O fato de a fermentação da cama reduzir significativamente a carga infectante de oocistos pode ser a causa da maior integridade do epitélio duodenal, o que, conseqüentemente, resulta em maior comprimento das vilosidades.

Na Tabela 6, observam-se os valores médios obtidos na avaliação morfométrica das vilosidades intestinais, com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

**Tabela 6.** Valores médios (desvio padrão) da morfometria intestinal (em microns) de frangos de corte infectados experimental (1ª etapa) e naturalmente (2ª etapa) com *E. acervulina* e necropsiados aos 21 dias de idade (n=10, número de aves avaliadas).

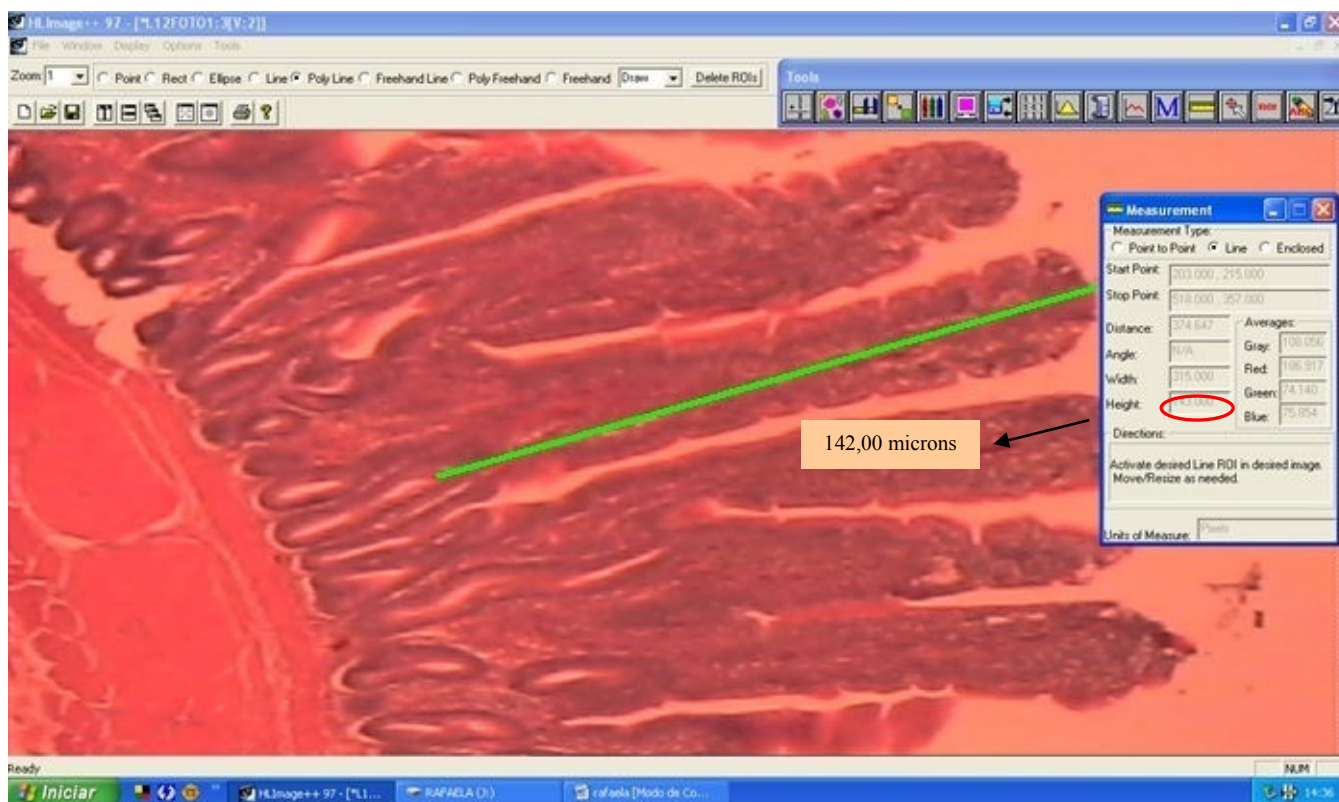
| Tratamentos             | Avaliações morfométricas das vilosidades intestinais $\pm$ DP |                     |                       |                      |                       |
|-------------------------|---|---------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
|                         | Comprimento médio   | Largura média basal | Largura média central | Largura média apical | Distância entre vilos |
| Inoculação experimental | 926,38(274,58) a  | 197,52(79,25) a     | 158,23(49,12) a       | 108,13(51,42) a      | 39,80(2,03) d         |
| G1                      | 1129,26(167,43) b   | 215,39(64,53) b     | 179,35(58,02) b       | 117,05(51,30) a      | 29,95(2,34) c         |
| G2                      | 1805,29(137,09) c   | 312,28(82,15) d     | 299,05(58,11) c       | 219,13(64,05) c      | 20,81(3,14) a         |
| G3                      | 1170,12(222,24) b   | 249,86(59,86) c     | 201,61(54,83) b       | 137,45(64,59) b      | 27,10(2,96) b         |
| G4                      | 2056,11(158,75) c   | 344,21(47,26) d     | 305,04(41,32) c       | 204,31(48,22) c      | 20,34(2,79) a         |
| G5                      | 1946,36(267,23) c   | 327,18(70,15) d     | 278,26(57,74) c       | 167,39(59,23) b      | 26,93(3,67) b         |

abcd. Valores do mesmo parâmetro seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam valores estatisticamente diferentes pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Segundo Maiorka et al. (2002), as alterações dos enterócitos nas vilosidades têm impacto imediato na digestão e absorção dos nutrientes. O número e tamanho das vilosidades dependem do número de células que a compõem. Assim, quanto maior o número de células, maior o tamanho da vilosidade, e pôr consequência, maior a área de absorção de nutrientes. Dessa forma, a absorção somente se efetivará quando houver quantidade ideal e integridade funcional das células das vilosidades (FURLAN, et al. 2004).

As aves inoculadas (1ª etapa) apresentaram atrofia das vilosidades intestinais quando comparadas as da 2ª etapa.

Na Figura 6, está demonstrada a tela do programa HL Image 97, utilizado neste estudo para a análise da morfometria das vilosidades e criptas intestinais. Esta figura exemplifica a análise morfométrica da altura de uma vilosidade, em corte histológico referente ao Grupo 2, da 2ª etapa experimental. Como demonstrado, o programa calcula, no caso, em microns, o valor do comprimento de qualquer linha traçada (em verde) sobre a imagem histológica. Na tabela do programa (interior da Figura 6) está circulado em vermelho o valor referente à linha verde (142,00 microns). A seta preta apenas indica a representação em letras maiores, externa à tabela, do valor encontrado. Nota-se na imagem, que as vilosidades encontram-se próximas entre si, achado indicativo de integridade da superfície de absorção intestinal.



**Figura 6.** Fotomicrografia de corte longitudinal da região duodenal de frangos infectados com *E. acervulina* (corada com HE em medição de vilosidade intestinal pelo programa HL Image 97, aumento 40x).

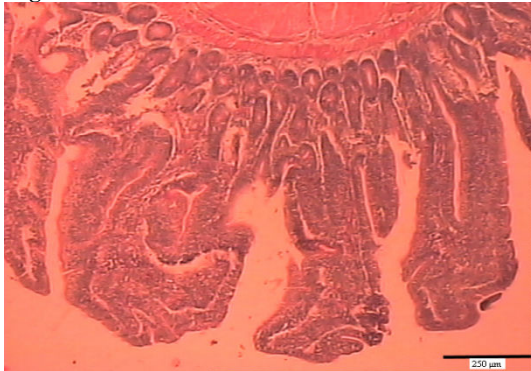
A renovação epitelial intestinal é resultante das divisões mitóticas sofridas por células totipotentes localizadas nas criptas e ao longo das vilosidades. Sabe-se que o equilíbrio entre os processos de renovação e perda celular (extrusão) ocorre normalmente no ápice das vilosidades e determina *turnover* celular (mitose-migração-extrusão) constante. Ou seja, a manutenção do comprimento das vilosidades está relacionada à manutenção da capacidade digestiva e de absorção intestinal (UNI et al., 1998; UNI, 2000). De acordo com Pluske et al. (1997), o maior valor de profundidade de cripta (ou de comprimento de vilosidade) indica maior atividade proliferativa celular, com adequada taxa de renovação epitelial intestinal, compensando perdas celulares nas extremidades das vilosidades. Quando o intestino responde a algum agente (microrganismos, por exemplo) ocorre um desequilíbrio no *turnover* com uma consequente redução na altura.

Na Figura 7, estão representadas imagens histológicas de cada grupo estudado, para exemplificação de alguns dos achados encontrados nas avaliações histomorfométricas. Observam-se menores distâncias entre as vilosidades, maior largura e uniformidade da área, fatores responsáveis pela adequada absorção intestinal, principalmente nos grupos G2 e G4 (Figuras 7C e 7E, respectivamente), nos quais a cama passou por tratamento de fermentação e

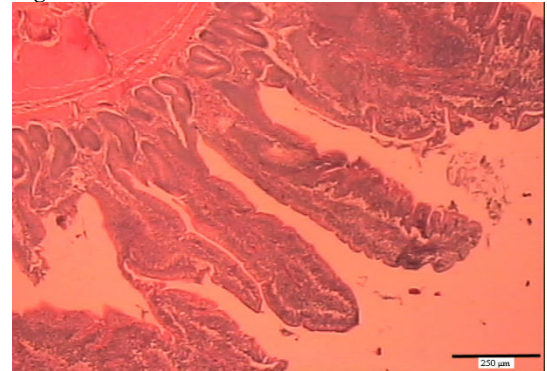


fermentação associada à desinfecção por amônia. Neste estudo, o parasito pode ter levado a um aumento na taxa de extrusão, havendo diminuição na taxa de proliferação celular das vilosidades. Dessa forma, na 1ª etapa (Figura 7A) e no grupo controle (G1) da 2ª etapa (Figura 7B), o intestino pode ter respondido com aumento da distância entre as vilosidades e desuniformidade da área de absorção intestinal, conseqüentemente, isso pode ter levado a redução da capacidade de digestão e absorção, devido à ação da *Eimeria acervulina*.

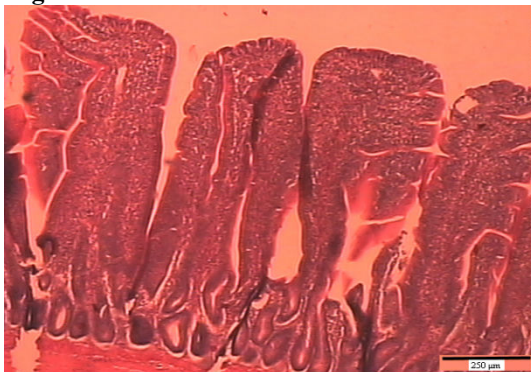
**Figura 7A**



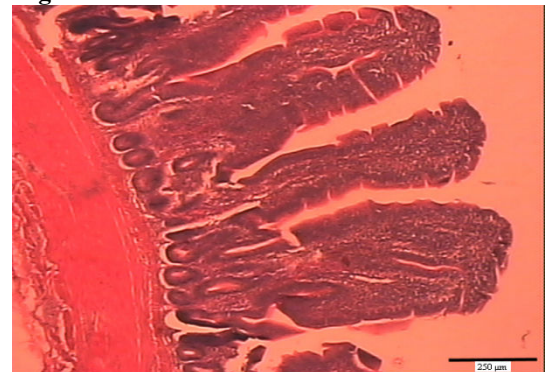
**Figura 7B**



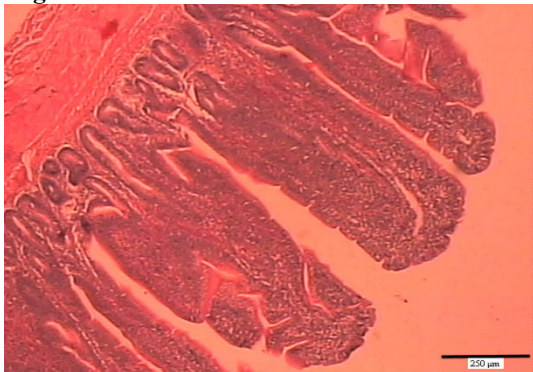
**Figura 7C**



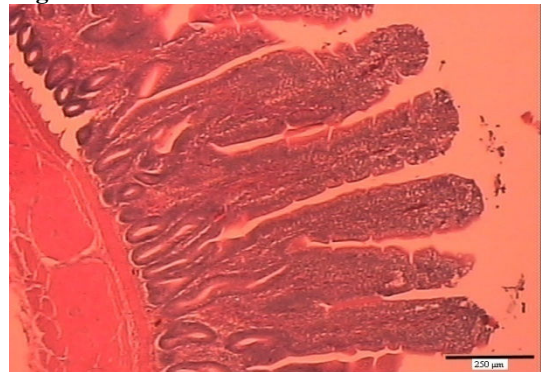
**Figura 7D**



**Figura 7E**



**Figura 7F**



**Figura 7.** Observações histopatológicas dos padrões de vilosidades intestinais (aumento de 40x) em frangos de corte infectados com *Eimeria acervulina*. Figuras 7A: 1ª etapa: Inoculação; 2ª etapa: 7B: Grupo controle (G1); 7C: Fermentação (G2); 7D: Amônia quaternária (G3); 7E: Fermentação + Amônia (G4); 7F: Diclazuril (G5). Escala: barra de 250 micrômetros (µm).

Na Figura 7D, observa-se o padrão de vilosidades das aves alojadas sobre cama desinfetada com amônia quaternária, e, na Figura 7F, dos frangos tratados com Diclazuril, que possivelmente tiveram o padrão intestinal influenciado pela ação do anticoccidiano.

Os valores absolutos referentes às áreas de absorção intestinal, conforme modelo matemático proposto por Kisielinski et al. (2002), são apresentados na Tabela 7. Observa-se que o menor valor de área de absorção intestinal encontrado refere-se aos frangos que sofreram inoculação experimental ( $p < 0,05$ ). Na 2ª etapa experimental, apresentaram maiores valores de área de absorção intestinal os grupos G4 e G5, sendo estes o grupo de cama fermentada e desinfetada com amônia e o de tratamento com Diclazuril, seguidos do grupo de cama fermentada (G2), que apresentou valor maior do que os grupos onde não foram realizados controles efetivos de coccidiose (G1 e G3) ( $p < 0,05$ ).

Wang et al. (2007), em avaliação intestinal de camundongos com este modelo matemático de Kisielinski et al. (2002), observaram que a proliferação ou redução das células das vilosidades ocorre em resposta adaptativa a algum estímulo ou patógeno, acompanhada por acréscimo da apoptose celular. Este achado demonstra que a área de absorção intestinal é diretamente afetada quando ocorrem alterações ou presença de patógenos intestinais. Dekaney et al. (2007) avaliaram a superfície de absorção da mucosa intestinal de camundongos pelo cálculo descrito por Kisielinski et al. (2002) e observaram alterações na profundidade das criptas intestinais após lesão provocada cirurgicamente. Estes autores concluíram que a superfície de absorção intestinal reage frente à ação de agravos externos e de patógenos, o que corrobora com este estudo.

**Tabela 7.** Valores da área de absorção da mucosa intestinal de frangos de corte infectados com *E. acervulina*, calculados por parâmetros de morfometria intestinal (larguras de cripta e vilosidade e comprimento de vilosidade) conforme cálculo de Kisielinski et al. (2002).

| Área de absorção da mucosa duodenal (Cálculo de Kisielinski) |         |         |         |         |         |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|
| Inoculação experimental                                      | G1      | G2      | G3      | G4      | G5      |
| 15,31 a  | 18,76 b | 21,23 c | 18,26 b | 23,82 d | 23,43 d |

abcd. Valores do mesmo parâmetro seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam valores estatisticamente diferentes pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O sistema digestivo sofre influência de fatores para o desempenho da função de absorção de nutrientes e a manutenção das condições de homeostase. O tempo de trânsito dos alimentos pelo canal alimentar, a extensão da superfície absorptiva e a integridade desta superfície são objetos de estudo em modelos animais e humanos (MORRIS et al., 2004).

Morris et al. (2004) conduziram experimentos avaliando a resposta em ganho de peso, escore de lesão e morfologia intestinal de aves desafiadas com cepas de *Eimeria acervulina* e concluíram que a interferência da coccidiose no desempenho e nos parâmetros intestinais de frangos de corte depende da cepa e da carga infectante das *Eimerias*. Este resultado corroborou com os achados deste estudo.

A avaliação de correlação pelo coeficiente de Pearson ( $p < 0,01$ ), entre desempenho zootécnico e morfometria intestinal foi realizada neste estudo. O desempenho zootécnico foi representado matematicamente, nesta análise estatística, pelos valores da conversão alimentar ajustada, tendo em vista que, esta é calculada por uma razão matemática que inclui o peso médio final e a conversão real (vide item 3.8.1C). O coeficiente de Pearson ( $p < 0,01$ ) referente aos valores da 1ª etapa indicou correlação positiva e média (+0,62) entre o desempenho zootécnico e o tamanho das vilosidades intestinais. Isso indica que, o pior desempenho zootécnico dessas aves está diretamente correlacionado à maior distância entre vilosidades intestinais observada nesse grupo, possivelmente, devido à maior extensão de lesão, devido à maior quantidade de oocistos de *Eimeria acervulina* a que estes frangos foram expostos.

Na 2ª etapa experimental, o coeficiente de correlação obtido no grupo G1 (controle) foi de +0,58. Os frangos que apresentaram maior área de absorção intestinal, ou seja, menor distância entre as vilosidades foram os dos grupos G2 e G4, e estes também obtiveram os melhores valores de peso médio e de conversão alimentar ajustada, com coeficientes de correlação positivos de +0,63 e +0,68, respectivamente. Os valores dos coeficientes de correlação dos grupos G3 e G5 foram de +0,59 e +0,55, respectivamente. Todos os coeficientes de correlação encontrados nesta análise apresentaram-se com valores positivos e entre +0,30 e +0,70, indicativos da existência de correlação diretamente proporcional e média (valores entre +0,30 e +0,70), entre desempenho zootécnico e a preservação da área de absorção intestinal.

Na Tabela 8, os dados demonstram os coeficientes de correlação de Pearson ( $p < 0,01$ ) calculados entre desempenho zootécnico e morfometria intestinal.

**Tabela 8.** Correlação entre desempenho zootécnico (ganho de peso e conversão alimentar) e padrões morfológicos intestinais nas aves infectadas experimental e naturalmente com *Eimeria acervulina*.

| Tratamentos | Correlação entre Desempenho zootécnico e Padrões microscópicos |                              |                       |                                |
|-------------|--|------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
|             | Peso médio   | Conversão Alimentar ajustada | Distância entre vilos | Coefficiente de correlação (r) |
| Inoculação  | 1.392±41,9 a   | 2.119 c                      | 39,80(2,03) d         | +0,62                          |
| G1          | 1.450±47,3 b   | 2.080 b                      | 29,95(2,34) c         | +0,58                          |
| G2          | 1.587±63,4 d   | 1.903 a                      | 20,81(3,14) a         | +0,63                          |
| G3          | 1.535±57,8 c   | 1.996 b                      | 27,10(2,96) b         | +0,59                          |
| G4          | 1.599±51,0 d   | 1.826 a                      | 20,34(2,79) a         | +0,68                          |
| G5          | 1.613±81,0 d   | 1.963 b                      | 26,93(3,67) b         | +0,55                          |

abcd. Valores do mesmo parâmetro seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam valores estatisticamente diferentes pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Coeficientes de correlação: Teste de Correlação de Pearson ( $p < 0,01$ ).

A manutenção da sanidade das aves, em relação às doenças ou agentes que atuam sobre o trato gastrointestinal, é de grande importância para a produção de frangos, pois essa é a principal via de entrada dos nutrientes para o desenvolvimento da ave (WALLACH, 2000). Os processos de absorção são totalmente dependentes dos mecanismos que ocorrem na mucosa intestinal. Considerando, então, que a ração representa de 70 a 80% dos custos de produção, a integridade dos mecanismos digestivos e absorptivos dos nutrientes no trato digestório, ou seja, a integridade das células epiteliais da mucosa gastrintestinal é de vital relevância para o bom desempenho das aves (HOERR, 1998). Como a manutenção do funcionamento do epitélio intestinal tem um elevado custo energético para os animais (McBRIDE; KELLY, 1990), a redução de reinfecção por coccidiose, pelo tratamento da cama de frango, leva a menor invasão de oocistos em tal epitélio. A manutenção de boa condição desse tecido pode explicar a melhoria na conversão alimentar e do ganho de peso dos frangos sob menor desafio coccidiano, que foram alojados após a cama reutilizada ser fermentada.

Não existe medida de biossegurança, higiene e desinfecção que possa evitar ou eliminar o risco de perpetuação ou introdução de coccídios em uma granja convencional. Mas essa infecção pode ser controlada, ou prevenida, por métodos de controle que permitam a implantação de resposta imune por redução de carga infectante de oocistos exposta aos frangos de corte. A utilização de metodologia específica, no caso, a fermentação da cama é capaz de preservar a resistência natural do hospedeiro, proporcionar sustentabilidade

ambiental e reduzir a utilização de anticoccidianos e drogas químicas, além de ser método de baixo custo e alta eficiência contra a coccidiose.

## 5. CONCLUSÕES

- A fermentação obteve o maior potencial para metodologia de controle da coccidiose, por redução da carga de oocistos na reinfecção. O método de fermentação da cama reutilizada, associado ou não a desinfecção por amônia quaternária, apresentou maior eficiência dentre os diferentes métodos de controle da coccidiose testados, em relação ao desempenho zootécnico. Este pode ser o método de escolha para controle da coccidiose em frangos de corte, sobre cama reutilizada.
- O método de desinfecção da cama reutilizada por amônia quaternária não apresenta efetividade no controle da reinfecção de frangos de corte por oocistos de *Eimeria acervulina*. Novos testes que envolvam desinfecção química em ambientes criatórios de aves devem ser realizados com a amônia quaternária.
- O tratamento químico, via oral, com anticoccidiano Diclazuril é eficiente em reduzir a eliminação de oocistos a partir de sua utilização. Este pode ser método de escolha para a abordagem terapêutica da coccidiose.
- O Diclazuril permite recuperação do ganho de peso das aves, por ganho compensatório após o tratamento, apresentando comprovada ação terapêutica, porém há piora da conversão alimentar, e não contribui para redução da reinfecção e da contaminação ambiental.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, P. C.; FETTERER, R. H. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. **Clinical Microbiologic Revist**, v. 15, p. 58-65, 2002.
- AL-NATOUR, M. Q.; SULEIMAN, M. M.; ABO-SHEHADA, M. N. Flock-level prevalence of *Eimeria* species among broiler chicks in northern Jordan. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 53, n. 4, p. 305-310, 2002.
- AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNIL, Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. **Poultry Sciences**, v.83, p.1093-1098, 2004.
- ANDRIGUETTO, J. M. **Normas e padrões de nutrição e alimentação animal**: revisão 2000. Curitiba: DTPA. SDR-MAARA, 2000. 145 p.
- ANISUZZAMAN, M.; CHOWDHURY, S. D. Use of four types of litter for rearing broilers. **British Poultry Science**, v.37, n.3, p.541-545, 1996.
- ANUÁRIO DA AVICULTURA INDUSTRIAL. **O avanço da utilização de vacinas e o uso de prébióticos e probióticos em substituição aos aditivos e promotores de crescimento devem ser as estratégias usadas no combate à coccidiose nos próximos anos**. Ed. 1081/2000. Disponível em <[www.url.http://www.aviculturaindustrial.com.br](http://www.aviculturaindustrial.com.br)> Acesso em: 20 de julho de 2007.
- ANUÁRIO DA AVICULTURA INDUSTRIAL. **Pesquisa e Desenvolvimento, Desempenho da avicultura brasileira e mundial em anos recentes**. Ed. 1162/2007. Disponível em <[www.url.http://www.avicultura industrial.com.br](http://www.avicultura industrial.com.br)> Acesso em: 20 de julho de 2007.
- AVILA, V. S.; MAZZUCO, H.; FIGUEIREDO, E. A. P. **Cama de aviário: materiais, reutilização, uso como alimento e fertilizante**. Concórdia: EMBRAPA - CNPSA, 38p. (Circular Técnica, 16), 1992.

- AVILA, V. S.; OLIVEIRA, U; ELSIO, A. P.; COSTA, C. A. F.; ABREU, V. M. N.; ROSA, P. S. Avaliação de materiais alternativos em substituição à maravalha como cama de aviário. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.37, n.2, p.273-277, 2008.
- AYENI, A. O.; DINFELDEIN, E.; DÜRR, U. Studies on the inactivation of coccidian oocysts. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 22, n. 1, p. 111-122, 1972.
- BANCO DE DADOS INTEGRADOS, 2007. Divisão de Planejamento Integrado e Coordenação do Núcleo de Pesquisa e estatística da Secretaria Municipal de Planejamento Urbano e Meio Ambiente do Município de Uberlândia. Disponível em: <www3.uberlandia.mg.gov.br/>. Acesso em: 15 de dezembro de 2008.
- BARTA, J. R. Investigating Phylogenetic Relationships within the Apicomplexa using sequence data: The search for homology. **Methods**, v. 13, 2002.
- BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. FACTA. Campinas, 1ª edição, 505 p., 2000.
- BOLELI, I. C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. **Estrutura funcional do trato digestório**. In: Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. Jaboticabal: FUNEP / UNESP, 2002, cap.13, p. 167-173.
- BORDIN, E. L. **Patologia da Coccidiose**. In: Simpósio Internacional sobre Coccidiose, Santos, SP, FACTA, 1994. Anais... Santos: FACTA, 1994, cap. 2, p.7-10.
- CAPRARA, V. L.; MEDEIROS, H. Z.; DUARTE, P. N.; SILVA, L. A.; NIZOLI, L. Q.; SILVA, S.S., SCHMITT, E.; GÖTZE, M. M. **Aspectos epidemiológicos da coccidiose aviária na zona sul do Rio Grande do Sul**. 2005. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, UFPEL/Veterinária Preventiva, 2005.
- CARDOZO, S. P.; YAMAMURA, M. H. Identificação de espécie de *Eimeria* sp. e avaliação do escore de lesões intestinais entre os frangos vacinados e tratados com anticoccidianos, produzidos no sistema Colonial/Caipira. **Ciências Agrárias**, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, v. 25, n. 1, p. 63-74, 2004.



- CARRINGTON C; PLESSIS A.; NAIDOO, V. **Index of Veterinary Specialities**, Johncom publishers, Johannesburg, p. 38–40, 2007.
- CASTRO, A. G. M. de. **Situação atual da coccidiose no Brasil: importância econômica**. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE COCCIDIOSE, 1994, Santos. Anais... Santos: FACTA, 1994, p. 45 - 54.
- CHAPMAN, H. D. Drug resistance in coccidia. In: Long, P. L., Boorman, K. N., Freeman, B. M. (Eds.), Avian Coccidiosis. **British Poultry Science Limited**, Edinburgh, p. 387–412, 1978.
- COELHO, C. N.; BORGES, M. **O complexo Agroindustrial (CAI) da Avicultura**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/spa/rpa3tri99/3t99s202.htm>>. Acesso em: 12 junho de 2007.
- COMES, A. M.; HUMBERT, J. F.; CABARET, J.; ÉLARD, L. Using molecular tools for diagnosis in veterinary parasitology. **Veterinary Research**, v. 27, n. 4-5, p. 313-549, 1996.
- CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, (CFMV). Resolução Nº. 714, de 20 de Junho de 2002. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências, no uso da atribuição que lhe são conferidas pelo artigo 16, alínea "F" da Lei nº. 5.517/68, 2002.
- CONWAY, D. P.; MATHIS G. F.; JOHNSON, J.; SCHWARTZ M.; BALDWIN, C. Efficacy of Diclazuril in Comparison with Chemical and Ionophorous Anticoccidials against *Eimeria* spp. in Broiler Chickens in Floor Pens. **Poultry Science**, v. 80, p. 426–430, 2001.
- CONWAY, D. P.; MCKENZIE, E. **Poultry Coccidiosis: diagnostic and testing procedures**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Pfizer, 63 p., 1991.
- COSTA, C. A. F.; ÁVILA, V. S. **Efeito da idade das aves e da reutilização e manejo da cama de aviário sobre a coccidiose em frangos de corte**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 3p. (Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico, 327), 2003.

- COSTA, C. A. F.; GOMES, R. F.; MELO, M. N.; RIBEIRO, M. F. B. *Eimeria* parasites of domestic fowl: genetic relationships of different isolates estimated from random amplified polymorphic DNA. **Parasitol. Res.**, v. 87, p. 459-466, 2000.
- CRANE, M. S. J.; GOGGIN, B.; PELLEGRINO, R. M.; RAVINO, O. J.; LANGE, C.; KARKHANIS, Y. D.; KIRK, K. E.; CHAKRABORTY, P. R. Cross-protection against four species of chicken coccidia with a single recombinant antigen. **Infect and Immune**, v. 59, p. 1271-1277, 2001.
- DALLOUL, A. A.; LILLEHOJ, H. S. Avian Coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 5, p. 143-163, 2006.
- DANFORTH, H. D. Use of live oocyst vaccines in the control of avian coccidiosis: experimental studies and field trials. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28. n.7, p. 1099-1109, 1998.
- DANFORTH, H. D.; RUFF, M. D. **Mecanismo de indução de resistência às drogas anti-coccidianas**. In: Simpósio Internacional de Coccidiose, Foz do Iguaçu, PR, FACTA, 1999. Anais... Foz do Iguaçu: FACTA, 1999, v. 2, p. 45-51.
- DAUGSCHIES, A.; BOSE, R.; MARX, J.; TEICH, K.; FRIEDHOFF, K. T. Development and application of a standardized assay for chemical disinfection of coccidian oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 103, p. 299-308, 2002.
- DEKANEY, C. M.; FONG, J. J.; RIGBY, R. J.; LUND, P. K.; HENNING, S. J.; HELMRATH, M. A. Expansion of intestinal stem cells associated with long-term adaptation following ileocecal resection in mice. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 293, p. 1013-1022, 2007.
- DI FÁBIO, J. **Desinfecção por agentes físicos e químicos**. In: Simpósio Internacional sobre coccidiose, 1994. Anais... Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1994, p. 101-108.
- ELLIS, J., BUMSTEAD, J. *Eimeria* species: studies using rRNA and rDNA probes. **Parasitology**, v. 101, p. 1-6, 1990.

- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, EMBRAPA. Programa de Sanidade Avícola, 1991. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 20 de maio de 2007.
- EUROPEAN COMMISSION ENVIRONMENT BIOTECHNOLOGY AND PESTICIDES, IUCLID DATASET, CREATED 19<sup>TH</sup> FEBRUARY 2000, ID NUMBER 7664-41-7. Directorate B4: Protecting the natural environment, 2000. Disponível em: [http://ec.europa.eu/environment/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/index_en.htm). Acesso em: 19 de abril de 2008.
- FAYER, R. Epidemiology of protozoan infections: the Coccidia. **Veterinary Parasitology**, v. 6, n. 1-3, p. 75-103, 1980.
- FERNANDO, M. A. *Eimeria*: infections of the intestine. In: Long, P.L. (Ed.), Coccidiosis of man and Domestic Animals. **CRC Press**, Boca Raton, Flórida, p. 63-77, 1990.
- FIORENTIN, L. **Implicações da reutilização da cama de aviário para a saúde pública e animal**. Embrapa Suínos e Aves. Anais do IV Seminário Internacional de Aves e Suínos. 2005. Anais... Florianópolis: IV Seminário Internacional de Aves e Suínos, 2005.
- FRANCO, R. M. B. Survey of avian coccidiosis from two layer's poultry farms in Campinas, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 45, p. 557-571, 1993.
- FREITASI, F. L.; ALMEIDA, K. D. S.; DO NASCIMENTO, A. A.; TEBALDI, J. H.; MACHADO, R. Z.; MACHADO, C. Clinical and pathological aspects in broilers (*Gallus gallus domesticus*) infected experimentally with *Eimeria acervulina* (Tyzzer, 1929) sporulated oocysts. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 16-20, 2008.
- FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. **Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva**. 5º Simpósio Técnico de Incubação, Matrizes de Corte e Nutrição, Anais, 2004. Anais... Balneário Camboriú: 5º Simpósio Técnico de Incubação, Matrizes de Corte e Nutrição, 2004, p. 6-26.
- GABRIEL, L.; MALLET, S.; LCONTE, M.; FORT, G.; NACIRI, M. Effects of whole wheat feeding on the development of coccidial infection in broiler chickens until market-age. **Animal Feed Science and Technology**, v. 129, n. 3-4, p. 279-303, 2006.

- GASSER, R. B.; WOODS, W. G.; WOOD, J. M.; ASHDOWN, L.; RICHARDS, G.; WHITHEAR, K. G. Automated, fluorescence-based approach for the specific diagnosis of chicken coccidiosis. **Electrophoresis**, v. 22, n. 16, p. 3546 - 3550, 2004.
- GARG, R., BANERJEE, D.P., GUPTA, S.K. Immune responses in chickens against *Eimeria tenella* sporozoite antigen. **Vet. Parasitol.**, v. 81, p. 1-10, 1999.
- GONÇALVES, G. A. M.; MARTINS, T. F.; LIMA, E. T.; LOPES, R. S.; ANDREATTI, R. L. Prevalência de endoparasitos em amostras fecais de aves silvestres e exóticas examinadas no Laboratório de Enfermidades Parasitárias da FMVZ – UNESP/BOTUCATU – SP, 2006. Anais...Botucatu: Sociedade Paulista de Zoológicos, 2006.
- GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for courting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council of Science, Industry and Research in Australia**, v. 12, p. 50-52, 1939.
- GRAAT, E. A. M.; KOOIJ, E. van der.; FRANKENA, K.; HENKEN, A. M.; SMEETS, J. F. M.; HEKERMAN, M. T. J. Quantifying risk factors of coccidiosis in broilers using on-farm data based on a veterinary practice. **Prev. Vet. Med.**, v. 33, p. 297-308, 2001.
- GREIF, G.; STEPHAN, B.; HABERKORN, A. Intraspecific polymorphisms of *Eimeria* species due to resistance against anticoccidial drugs. **Parasitol. Res.**, v. 82, p. 706-714, 2000.
- GUIMARÃES, I.G.; GUIMARÃES JÚNIOR, J. da S. Ocorrência de *Eimeria* spp em galinhas reprodutoras no Norte do Paraná. **Semina**, Londrina, v. 12, n. 1, p. 44-48, 1991.
- GUZMAN, V. B.; SILVA, D. A.; KAWAZOE, U.; MINEO, J. R. A comparison between IgG antibodies against *Eimeria acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella* and oocyst shedding in broiler-breeders vaccinated with live anticoccidial vaccines. **Vaccine**, v.21, p. 4225-4233, 2003.
- HAAPAPURO, E. R.; BARNARD, N. D.; SIMON, M. Review – animal waste used as livestock feed: dangers to human health. **Preventive Medicine**, v. 26, p. 599-602, 1997.
- HAMMOND H.; LONG P. **The coccidia: *Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma* and related genera.** Park Press University (Baltimore), USA, 482 p., 1973.

- HILBRICH, P. Desinfektions versuche an *Eimeria tenella* Oozysten. **Berliner Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, v. 88, p. 144-148, 1975.
- HOERR, F. J. Pathogenesis of Enteric Diseases. **Poultry Science**, v. 77, p. 1150-1155, 1998.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Relatório de Banco de Dados Agropecuários. **Avicultura industrial**, 2006. Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em: 15 de dezembro de 2008.
- ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; OKABAYASHI, S. M. **Recentes Avanços na fisiopatologia do trato gastrointestinal nos frangos de corte**. In: Produção de frangos de corte, FACTA 2004, p.1-20, Jaboticabal, atualizado 2007.
- JEFFERS, T. K. **Anticoccidial drug resistance: a review with emphasis on the polyether ionophores**. In: International Coccidiosis Conference 5, Tours, France, INRA, 1989. Proceedings INRA, France, p. 295-308, 1989.
- JEFFREY, J. S.; KIRK, J. H.; ATWILL, E. R. Y.; CULLOR, J. S. Prevalence of selected microbial pathogens in processed poultry waste used as dairy cattle feed. **Poultry Science**, v. 77, p.801-811, 1998.
- JENKINS, M. C.; CASTLE, M. D.; DANFORTH, H. D. Protective immunization against the intestinal parasite *Eimeria acervulina* with recombinant coccidial antigen. **Poultry Science**, v. 70, p. 539–547, 2001.
- JEURISSEN, S .H. M.; JANSE, E. M.; VERMEULEN, A. N.; VELVERDE, L. *Eimeria tenella* infections in chickens: aspects of host-parasite interactions. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Amsterdam, v. 54, p. 231-238, 1996.
- JINNEMAN, K. C.; WSEETHERINGTON, J. H.; HILL, W. E.; ADAMS, A. M.; JOHNSON, J. M.; TENGE, B. J.; DANG, N. L.; MANGER, R.; WEKELL, M. Template preparation for PCR and RFLP of amplification products for the detection and identification of *Cyclospora* sp. and *Eimeria* spp. oocysts directly from raspberries. **J. Food Protec.**, v. 61, p. 1497-1503, 2003.

- JOHNSON, J.; REID, W. M. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. **Exp. Parasitol.**, v. 28, p. 30-36, 1970.
- JOHNSTON, D. A., FERNANDO, M. A. *Eimeria* spp. of the domestic fowl: analysis of genetic variability between species and strains using DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers and denaturing gradient-gel electrophoresis. **Parasitol. Res**, v. 81, p. 91-97, 1995.
- JOYNER, L.P. Immunological variation between two strains of *Eimeria acervulina*. **Parasitology**, v. 59, p. 725–732, 1969.
- KAWAZOE, U. **Biologia**. In: Simpósio Internacional sobre Coccidiose, Santos, SP, FACTA, 1994. Anais... Santos: FACTA, cap. 1, p. 1-6, 1994.
- KAWAZOE, U. **Coccidiose**. In: Berchieri Júnior, A.; Macari, M. Doenças das Aves. Campinas: FACTA, p. 391-405, 2000.
- KAWAZOE, U.; FIGUEIREDO, A. C. Survey of avian coccidiosis from three poultry farms in the region of Campinas, state of São Paulo, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 42, n. 4, p. 317-36, 1990.
- KAWAZOE, U.; BORDIN, E. L.; LIMA, C. A.; DIAS, L. A. V. Characterization and histopathological observations of a selected Brazilian precocious line of *Eimeria acervulina*. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 5-14, 2005.
- KELLEY, T. R.; PANCORBO, O. C.; MERKA, W. C.; THOMPSON, S. A.; CABRERA, M. L.; BARNHART, H. M. Bacterial pathogens and indicators in poultry litter during re-utilization. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 4, p. 366-373, 1995.
- KETTUNEN, H.; TIIHONEN, K.; PEURANEN, S.; SAARINEN, M. T.; REMUS, J. C. Dietary betaine accumulates in the liver and intestinal tissue and stabilizes the intestinal epithelial structure in healthy and coccidia-infected broiler chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology*, v. 130, p. 759–769, 2001.

- KISIELINSKI, K.; WILLIS, S.; PRESCHER, A.; KLOSTERHALFEN, B.; SCHUMPELICK, V.  
A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. **Clin. Exp. Med.**, v. 2, p. 131–135, 2002.
- KÖEPPEN, W. **Climatologia; con un Estudio de los Climas de la Tierra**. México: Fondo de Cultura Economica, 1948. 478 p.
- KOPKO, S. H.; MARTIN, D. S.; BARTA, J.R. Responses of chickens to a recombinant refractile body antigen of *Eimeria tenella* administered using various immunizing strategies. **Poultry Science**, v. 79, p. 336-342, 2000.
- KOYNARSKI, V.; STOEY S.; GROZEVA N.; MIRCHEVA, T.; DASKALOV H.; MITEV, J.; MANTLE P. Experimental coccidiosis provoked by *Eimeria acervulina* in chickens simultaneously fed on ochratoxin contaminated diet. **Research in Veterinary Science**, v. 82, n. 2, p.225-231, 2007.
- LEVINE, N. D. **Protozoan parasites of domestic animals and of man**. 2<sup>nd</sup> edition, Minneapolis, Burgess Publ. Co., 1973.
- LEVINE, N. D. **The protozoan phylum Apicomplexa**. Boca Raton, FL, USA, CRC Press, Vol. 1, 1988.
- LILLEHOJ, H. S. Role of T lymphocytes and cytokines in coccidiosis. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, p. 1071-1081, 1998.
- LILLEHOJ, H. S.; LILLEHOJ, E. P. Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. **Avian Diseases**, v. 44, p. 408 - 425, 2000.
- LILLEHOJ, H. S.; DING, X.; QUIROZ, M. A.; BEVENSEE, E.; LILLEHOJ, E. P. Resistance 426 to intestinal coccidiosis following DNA immunization with the cloned 3-1E 427 *Eimeria* gene plus IL-2, IL-15, and IFN-gamma. **Avian Diseases**, v. 49, n.1, p. 112-117, 2005.
- LOBAGO, F.; WORKU, N.; WOSSENE, A. Source: **Tropical Animal Health and Production**, v. 37, n. 3, p. 245-251, 2005.

- LONG, P. L. The pathogenic effects of *Eimeria praecox* and *E. acervulina* in the chicken. **Parasitology**, v. 58, p. 691–700, 1968.
- LONG, P. L.; JOYNER, L. P.; MILLARD, B. J.; NORTON, C. C. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. **Folia Veterinaria Latina**, v. 6, p. 201–217, 1976.
- LOWENTHAL, J. W.; YORK, J. J.; O'NEIL, T. E.; RHODES, S.; PROWSE, S. J.; STROM, A. D. G.; DIGBY, M. In Vivo effects of chicken Interferon during infection with *Eimeria*. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 17, p. 551 - 558, 2004.
- LUNDEN A.; THEBO P.; GUNNARSSON S.; HOOSHWAND-RAD P.; TAUSON R.; UGGLA A. Source: **British Poultry Science**, v. 41, n. 4, p. 440-447, 2000.
- MACARI, M.; MAIORKA, A. **Função gastrintestinal e seu impacto no rendimento avícola**. In: Conferência Apinco de ciência e tecnologia avícolas, 2000. Anais... Jaboticabal: APINCO, 2000, p. 161-174.
- MAES, L.; COUSSEMENT, W.; VANPARIJS, O.; MARSBOOM, R. In vivo action of the anticoccidial Diclazuril (Clinacox [registered]) on the developmental stages of *Eimeria tenella*: a histological study. **Journal of Parasitology**, v. 74, p. 931–938, 1988.
- MAIORKA, A.; BOLELI, I. C.; MACARI, M. **Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal**. In: Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. Jaboticabal: FUNEP /UNESP. 2002.
- MANUAL DA ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (OIE), International Animal Health Code 2000. Appendix 3.6.1. General Recommendations on disinfection and desinsectisation Art. 3.6.1.1, 2000.
- MARTIN, A. G.; DANFORTH, H. D.; BARTA, J. R.; FERNANDO, M. A. Analysis of immunological cross-protection and sensitivities to anticoccidial drugs among five geographical and temporal strains of *Eimeria maxima*. **International Journal of parasitology**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 527-533, 1997.



- MASTRANTONIO, E. C.; D. BELETTI, M. E., COELHO, C. C.; SHIMIZU, B. J.; MOTA, F. C. D.; CAMPOS, V. A. Morfometria das camadas da córnea de suínos da raça Large White. **Arq. Ciências Vet. Zool. UNIPAR**, v. 5, n. 1, p. 79-83, 2002.
- McBRIDE, B. W.; KELLY, J. M. Energy cost of absorption and metabolism in the ruminant gastrointestinal tract and liver: A review. **Journal Animal Science**, v. 68 p. 2997-3010, 1990.
- McCARTER, S. Inmunidad en el manejo de coccidiosis. **Avicultura Profesional**, v. 17, n. 7, p.26-27, 1999.
- McDOUGALD, L.R. **Coccidiosis y su control**. American Cyanamid Company. Boletim Técnico, 36 p., 1984.
- McDOUGALD, L. R.; SILVA, J. M. L.; SOLIS, J.; BRAGA, M. A survey of sensitivity to anticoccidial drugs in 60 isolates of coccidia from broiler chickens in Brazil and Argentina. **Avian Diseases**, v. 31, p. 287-292, 1987.
- McDOUGALD, L. R.; REID, W. M. **Coccidiosis**. In: Calnek, B.W. Ed. Diseases of Poultry, 10<sup>th</sup> edition, Iowa State University Press, Ames, IA., v. 34, p. 855-862, 1997.
- McDOUGALD, L. R.; SEIBERT, B. P. Residual activity of anticoccidial drugs in chickens after withdrawal of medicated feeds. **Veterinary Parasitology**, v.74, n. 2, p. 91-99, 1998.
- MCKENZIE, M. E.; COLNAGO, G. L.; LEE, S. R.; LONG, P. L. Gut stasis in chickens infected with *Eimeria*. **Poultry Science**, v. 66, p. 264–269, 1987.
- MICHAEL, A. **Introdução ao conceito Coxabic**. In: 1º seminário Novartis Coxabic, 2005. Anais... Foz do Iguaçu: Novartis, 2005, p.9-14.
- MIN, W.; LILLEHOJ, H. S.; BURNSIDE, J.; WEINING, K. C.; STAEHELI, P.; ZHU, J. J. Adjuvant effects of IL-1beta, IL-2, IL-8, IL-15, IFN-alpha, IFN-gamma, TGF-beta4 and Lymphotactin on DNA vaccination against *Eimeria acervulina*. **Vaccine**, v. 20, p. 267-274, 2001.
- MORRIS, B. C.; DANFORTH, H. D.; CALDWELL, D. J.; PIERSON, F. W.; McELROY, A. P. Intestinal mucosal mast cell immune response and pathogenesis of two *Eimeria acervulina* isolates in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 83, p. 1667-1674, 2004.

- NAIDOO, V.; MCGAW, L. J.; BISSCHOP, S. P. R. Source: **Veterinary parasitology**, v. 153, n. 3-4, p. 214-219, 2008.
- OLIVEIRA, M. R.; LONGHI, E.; ONO, L. M.; ZULPO, D. L.; PERETTI, J. **Eficácia de inibição da esporulação em oocistos de *Eimeria* de aves tratados com desinfetantes de uso comercial**. In: Encontro Anual de Iniciação Científica, 13, 2004, Londrina. Anais... Londrina: UEL, 2004.
- OLIVEIRA, S. C.; CAVALHEIRO, A. C. L.; TRINDADE, D. S. **Comparação entre tipos de cama na criação de frangos de corte**. Porto Alegre: Supervisão da Produção Animal, Instituto de Pesquisas Zootécnicas, 13 p. (Boletim Técnico, 20), 1973.
- OUARZANE, M.; LABBE, M.; PERY, P. Purification of first generation *Eimeria tenella* schizonts. **Journal of Parasitology**, v. 84, n. 5, p. 1027-1031, 1998.
- PEEK H. W.; LANDMAN, W. J. M. Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2001, **Avian Pathol.**, v. 32, p. 391-401, 2003.
- PERSIA, M. E.; YOUNG, E. L.; UTTERBACK, P. L.; PARSONS, C. M. Effects of dietary ingredients and *Eimeria acervulina* infection on chick performance apparent metabolizable energy and amino acid digestibility. **Poultry Science**, v. 85, p. 48-55, 2006.
- PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J.; WILLIAMS, I. H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**, v. 51, p. 215-236, 1997.
- POPE, M. J.; CHERRY, T. E. An evaluation of the presence of pathogens on broilers raised on Poultry Litter treatment. **Poultry Science**, v. 79, p.1351-1355, 1999.
- PRADO, O. R. **Ocorrência de *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella* e *E. mitis* em frangos de corte na região oeste de Santa Catarina**. Dissertação em Patologia Veterinária, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 67 p., 2005.
- REID, W. M.; JOHNSON, J. Pathogenicity of *Eimeria acervulina* in light and heavy coccidial infections. **Avian Diseases**, v. 14, p. 166-171, 1970.

- REID, W. M. History of avian medicine in the United States X Control of coccidiosis. **Avian Diseases**, v. 34, p. 509-525, 2000.
- REZA RAZMI, G.; KALIDERI, G. A. Prevalence of subclinical coccidiosis in broiler-chicken farms in the municipality of Mashhad, Khorasan, Iran. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 44, n. 3-4, p. 247-253, 2000.
- REZENDE, C. L. E.; MALLISON, E. T.; GUPTA, A.; JOSEPH, S. W. *Salmonella* spp. are affected by different levels of water activity in closed microcosms. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.26, p. 222-225, 2001.
- RIVOLTA, S.; SILVESTRINI, A. **Giornale di Anatomie Fisiol et Patologia Animali**, Pisa, 1873.
- RUFF, M. D. Important parasites in poultry production systems. **Veterinary Parasitology**, v. 84, n. 3-4, p. 337-347, 1999.
- SANTOS, T. M. B.; LUCAS, J.; SAKOMURA, N. K. Effects of broiler stocking density and poultry litter reuse in broiler performance and poultry litter production. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100, p. 45-52, 2005.
- SCHNITZLER, B. E.; SHIRLEY, M. W. Immunological aspects of infections with *Eimeria maxima*: a short review. **Avian Pathology**, v. 28, p. 537-543, 1999.
- SESTI, L. C. A. **Biosseguridade em granjas de frangos de corte: conceitos e princípios gerais**. In: Simpósio Brasil Sul de Avicultura, 2004, Chapecó. Anais... Chapecó: Núcleo Oeste de Médicos veterinários, 2004, p. 55-72.
- SHEATER, A. L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. **J. Comp. Ther.**, v. 36, p. 266-275, 1923.
- SHIRLEY, M. W. Enzyme variation in *Eimeria* species of the chicken. **Parasitology**, v. 71, p. 369-376, 1975.
- SHIRLEY, M. W. **Epizootiologia**. In: Simpósio Internacional sobre Coccidiose, Santos, SP, FACTA, 1994. Anais...Santos: FACTA, 1994, cap. 3, p.11-22.

SHIRLEY, M. W. **Uso de vacinas baseadas em oocistos vivos no controle da coccidiose aviária. Visão Européia.** In: Simpósio Internacional de Coccidiose, 2., Foz do Iguaçu, PR, FACTA, 1999. Anais...Foz do Iguaçu: FACTA, 1999, p. 57-70.

SMITH, A. L. **Intestinal immunology coccidial immunity and enteric vaccination.** Workshop at the national veterinary institute: Coccidial and clostridial infections in broiler chickens. Uppsala. 2000. Anais...Uppsala: AFAC, 2000.

SONG, K. D.; LILLEHOJ, H. S.; CHOI, K. D.; YUN, C. H.; PARCELLS, M. S.; HUYNH, J. T.; HAN, J. Y. A DNA vaccine encoding a conserved *Eimeria* protein induces protective immunity against live *Eimeria acervulina* challenge. **Vaccine**, v. 19, p. 243-252, 2001.

SPIEGAL, M.R. **Estatística.** 3ª edição. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 1994. 643p.

STUCKI, U.; BRAUN, R.; RODITI, I. *Eimeria tenella*: Characterization of a 5 S ribosomal RNA repeat unit and its use as a species-specific probe. **Exp. Parasitol.**, v. 76, p. 68 - 75, 2003.

TEIXEIRA, M.; NIANG, T. M. S.; GOMES, A. V.da C.; LOPES, C. W. G. Efeito do uso da betaína na biologia e morfologia dos estádios evolutivos de *Eimeria acervulina* em frangos de corte infectados experimentalmente com oocistos esporulados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, n.4, p.193-198, 2006.

TOLEDO, L. R. Alternativa acertada. **Revista Globo Rural**, São Paulo, v. 16, p. 45-51, 2001.

TSUJI, N.; KAWAZU, S.; OHTA, M.; KAMIO, T.; ISOBE, T.; SHIMURA, K.; FUJISAKI, K. Discrimination of eight chicken *Eimeria* species using the two-step polymerase chain reaction. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 966-970, 1997.

UNI, Z.; GANOT, S.; SKLAN, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**, v. 77, p. 75-82, 1998

UNI, Z. Vitamin A deficiency interferes with proliferation and maturation of cells in the chicken small intestine. **British Poultry Science**, v. 41, p. 410-415, 2000.

UNIÃO BRASILEIRA de AVICULTURA (UBA, 2007/2008). Relatório anual 2007/2008. 84p. Disponível em <<http://www.uba.org.br/>>. Acesso em: julho de 2008.

- VANPARIJS, O.; MARSBOOM, R.; HERMANS, L.; VAN DER FLAES, L. Diclazuril, a new broad-spectrum anticoccidial for chickens: 3 floorpen trials. **Poultry Science**, v. 69, p. 60–64, 1990.
- VERMEULEN, A. N.; SCHAAP, D. C.; SCHETTERS, T. H. P. M. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. **Veterinary Parasitology**, v. 100, n. 1-2, p. 13-20, 2001.
- VERTOMMEN, M. H. **Situação do coccidiose na Europa**. In: Simpósio Internacional de Coccidiose. Santos, SP, FACTA, p. 61-84, 2004. Anais... Santos: FACTA, 2004.
- WALLACH, M. **The control of coccidiosis in chickens by maternal immunization**. Workshop at the national veterinary institute: Coccidial and clostridial infections in broiler chickens. Anais...Uppsala: AFAC, 2000.
- WANG, L.; TANG, Y.; RUBIN, D.; LEVIN, M. Chronically administered retinoic acid has trophic effects in the rat small intestine and promotes adaption in a resection model of short bowel syndrome. **Am. J. Gastrointestinal Liver Physiologic**, v. 292, p. 1559-1569, 2007.
- WILLIAMS, R. B. Laboratory test of phenolic disinfectant as oocysticides against the chickens coccidium *Eimeria tenella*. **Veterinary Record**, v. 141, n. 17, p. 447 - 448, 1997.
- WILLIAMS, R. B. Analysis of the phenotypes in field populations of *Eimeria acervulina* expressing dual drug-resistance to decoquinat and clopidol. **Avian Pathology**, v. 27, p. 67-73, 1998.
- WILLIS, G. M.; BAKER, D. H. *Eimeria acervulina* infection in the chicken: a model system for estimating nutrient requirements during coccidiosis. **Poultry Science**, v. 60, p. 1884-1891, 1981.
- WOODS, W. G.; RICHARDS, G.; WHITHEAR, K. G.; ANDERSON, G. R.; JORGENSEN, W. K.; GASSER, R. B. High-resolution electrophoretic procedures for the identification of five *Eimeria* species from chickens, and detection of population variation. **Electrophoresis**, v. 21, p. 3558 - 3563, 2000a.
- WOODS, W. G.; WHITHEAR, K. G.; RICHARDS, G.; ANDERSON, G. R.; JORGENSEN, W. K.; GASSER, R. B. Single-strand restriction fragment length polymorphism analysis of the

second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) for six species of *Eimeria* from chickens in Australia. **International Journal Parasitology**, v. 30, p. 1019-1023, 2000b.

YOUN, H. J.; NOH, J. W. Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. **Veterinary Parasitology**, v. 100, p. 13-20, 2001.

ZHAO, X.; DUSZYNSKI, D. W.; LOKER, E. S. A simple method of DNA extraction for *Eimeria* species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p.131-137, 2001.

ZULPO, D. L.; PERETTI, J.; ONO, L. M.; LONGHI, E.; OLIVEIRA, M. R.; GUIMARÃES, I. G.; HEADLEY, S. A.; GUIMARÃES, J. S. Pathogenicity and Histopathological observations of commercial broiler chicks experimentally infected with isolates of *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *E. maxima*. **Ciências Agrárias**, v. 28, p. 97-104, 2007.

**Anexo 1.** Protocolo de aprovação do projeto de pesquisa emitido pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA), da Universidade Federal de Uberlândia.



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica -  
Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531/4173; e-mail:ceua@propp.ufu.br;  
[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

ANÁLISE FINAL Nº 015/09 DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS  
PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 050/08

Projeto Pesquisa: **“Eficiência de diferentes métodos de controle sobre oocistos de *Eimeria acervulina* na cama reutilizada de frangos de corte”.**

Pesquisador Responsável: Márcia Cristina Cury

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

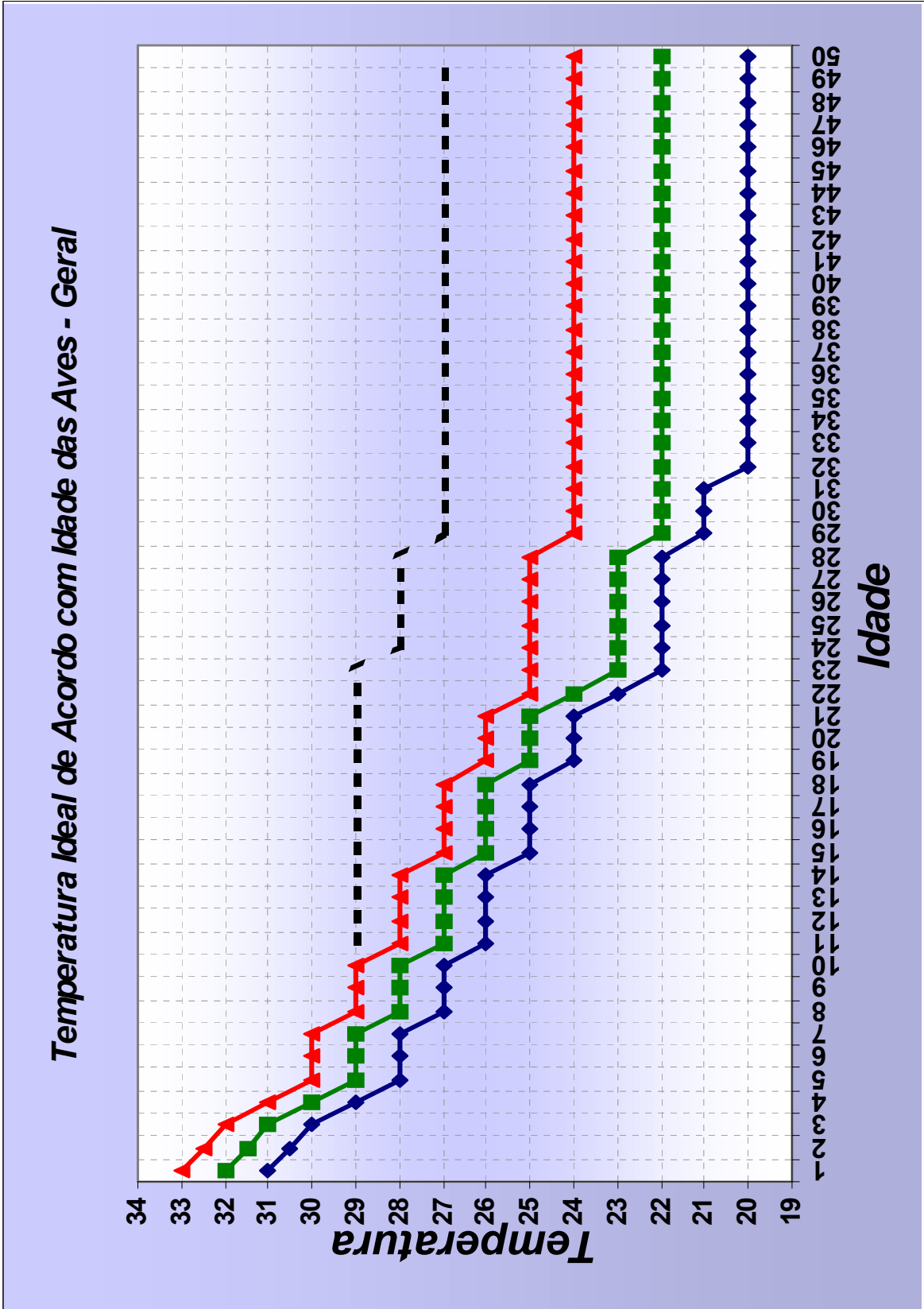
SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 06 de janeiro de 2009.

Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella  
Coordenadora do CEUA/UFU

Anexo 2. Gráfico de controle da temperatura do aviário pela idade dos frangos (em dias), na zona de conforto térmico das aves (em graus Celsius).



Legenda: linha verde: temperatura ideal (°C), vermelha: máxima e azul: mínima.



**Anexo 3.** Material de inoculação dos frangos de corte (cedido pelo Laboratório BIOVET).

Referência: Amostra de oocistos de *Eimeria acervulina*

Procedência: EMBRAPA

Preparado por: Doutora Lucimara Mendes, Laboratório BIOVET

Autorizado por: Doutor Juan Solis

Um frasco contendo 100 mL de solução com Diluente de Marek (meio de cultura estéril muito utilizado para diluição das vacinas utilizadas em avicultura), sem antibióticos, com oocistos de *Eimeria acervulina* cepa Ea3LP8a, suficiente para inocular 200 aves com 0,5 mL/ave com 3.000 oocistos por ave.

Formulação do Diluente de Marek

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| Ácido orto-fosfórico.....    | 83 ml    |
| N.Z.Amine .....              | 462 g    |
| KOH 5N .....                 | 600 ml   |
| Vermelho fenol .....         | 750 ml   |
| Água bidesmineralizada ..... | 61500 ml |

**Anexo 4.** Protocolo de Técnica Parasitológica. Centríflugo-Flutuação em solução de sacarose (SHEATER, 1923).

A técnica de Sheater (1923), é recomendada para a pesquisa de oocistos em material fecal fresco ou preservado em solução de formaldeído.

#### REAGENTES

1. Sacarose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ )
2. Fenol, cristais ( $C_6H_6O$ )

#### PREPARAÇÃO

1. Solução de sacarose de Sheather, densidade 1,2 g/ml

Sacarose 500 gramas

Fenol (fundido a 44°C) 6,5 gramas

Água destilada-deionizada 320 ml

Ferver a solução de sacarose até clarificar e adicionar, com cuidado, o fenol. Deixar esfriar a temperatura ambiente antes de esfriar.

#### TÉCNICA

1. Colocar 1 ou 2 gramas de fezes formadas, coletadas de várias partes do bolo fecal, em frasco contendo 10 ml de água corrente.
2. Filtrar a suspensão através de gaze dobrada quatro vezes e receber o filtrado em um tubo cônico de centrífuga de 15 ml.
3. Adicionar a solução de sacarose de Sheather até  $\frac{3}{4}$  do tubo (aproximadamente 10 ml).
4. Agitar vigorosamente 1 a 2 ml da suspensão fecal com 10 ml da solução de sacarose. Completar o volume do tubo com a solução de sacarose.
5. Colocar uma lamínula (22X22 mm) na borda do tubo, mantendo-a em contato com a solução de sacarose.
6. Centrifugar (500 x g por 10 min.). Remover a lamínula, invertendo a sua posição, colocando a face com a gota sobre a lâmina.
7. Examinar em microscópio de contraste de fase.

**Anexo 5.** Escores de lesões macroscópicas intestinais, por *Eimeria acervulina*, segundo JOHNSON e REID (1970), utilizados neste estudo:

| <b>ESCORE</b> | <b>LESÕES</b>   |
|---------------|---|
| <b>0</b>      | Ausência de lesões.   |
| <b>1</b>      | Pontos ou estrias brancas, vistas da serosa ou mucosa, esparsas (até cinco lesões por cm <sup>2</sup> ) e confinadas ao duodeno. Leve perda de peso no período de sete dias após a infecção.        |
| <b>2</b>      | Pontos ou estrias brancas mais numerosas, mas não coalescentes, se estendem até ao meio entre duodeno e divertículo; conteúdo intestinal normal.  |
| <b>3</b>      | Pontos ou estrias brancas já coalescendo com redução de tamanho, se estendem até o divertículo; parede intestinal espessada e conteúdo intestinal aquoso.   |
| <b>4</b>      | Pontos ou estrias brancas completamente coalescentes, dando à mucosa do intestino uma coloração acinzentada; lesões típicas só no intestino médio; parede intestinal engrossada e conteúdo cremoso. |

