

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Letícia da Silva Giacomini

**DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE APÓS VACINAÇÃO COM UMA
VACINA VIVA ATUADA CONTRA COCCIDIOSE AVIÁRIA**

Santa Maria, RS
2020

Letícia da Silva Giacomini

**DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE APÓS VACINAÇÃO COM UMA
VACINA VIVA ATUADA CONTRA COCCIDIOSE AVIÁRIA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) com o requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Silveira Flores Vogel

Santa Maria, RS
2020

Giacomini, Leticia
DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE APÓS VACINAÇÃO COM UMA
VACINA VIVA ATUADA CONTRA COCCIDIOSE AVIÁRIA / Leticia
Giacomini.- 2020.
48 p.; 30 cm

Orientadora: Fernanda Silveira Flores Vogel
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2020

1. Frango de corte 2. Vacina 3. Imunidade 4.
Coccidiose aviária 5. Desafio I. Silveira Flores Vogel,
Fernanda II. Título.

Letícia da Silva Giacomini

**DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE APÓS VACINAÇÃO COM UMA
VACINA VIVA ATUADA CONTRA COCCIDIOSE AVIÁRIA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) com o requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Aprovado em:

Fernanda Silveira Flores Vogel, Dra. (UFSM)
(Presidente/ Orientadora)

Patrícia Braunnig, Dr. (UFSM)

Felipe Libardoni, Dr. (UNIJUÍ)

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Leandro e Carla e aos meus irmãos Tales e Lorenzo por todo apoio dado que foi essencial para a conclusão deste trabalho.

- à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Fernanda Vogel, por toda orientação, paciência e carinho que teve comigo ao longo destes 2 anos.

- ao Instituto SAMITEC, por toda ajuda e apoio fornecidos na elaboração deste trabalho, coleta e execução dos testes.

- às minhas amigas Luisa Berlato, Isadora Taschetto, Natália Rossi, Allássia Garcia, Manuela Manta e Carolina Freitas, por toda ajuda apoio, carinho e paciência que tiveram comigo durante este período.

- ao Laboratório de Doenças Parasitárias por toda ajuda fornecida na elaboração deste trabalho e execução dos testes.

- à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e seus professores, pela oportunidade de fazer parte do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária.

RESUMO

DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE APÓS VACINAÇÃO COM UMA VACINA VIVA ATUADA CONTRA COCCIDIOSE AVIÁRIA

AUTOR: Letícia da Silva Giacomini
ORIENTADOR: Fernanda Silveira Flores Vogel

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da vacinação contra coccidiose aviária (vacina comercial viva atenuada LIVACOX® T) frente a um desafio, e sua correlação com o desempenho produtivo, econômico, observação clínica e excreção de oocistos em frangos de corte. Para tanto, 420 pintainhos de 1 dia da linhagem Cobb, foram divididos em cinco grupos de 84 aves divididas em 6 gaiolas por grupo: G1. Grupo controle não vacinado e não desafiado; G2. Grupo controle vacinado com 10 ul da vacina no dia (zero); G3. Grupo desafiado com 200 ul da vacina no dia 1; G4. Grupo vacinado no dia (zero) e desafiado no dia 14; G5. Grupo não vacinado, porém desafiado no dia 14. A vacinação via oral foi realizada na dose de 300 a 500 oocistos. Após a vacinação, os grupos 3, 4 e 5 foram desafiados via oral com 6.000 à 10.000 oocistos (equivalente a 20 vezes a dose da vacina). Durante todo o período do experimento (28 dias) foram avaliados os sinais clínicos, avaliou-se o peso e a conversão alimentar das aves e foram coletadas fezes para avaliação de excreção de oocistos. Além disso, também foi realizada análise macroscópica de lesões intestinais das aves. Pode-se observar que tanto após a vacinação dos grupos 2, 3 e 4 quanto após o desafio nos grupos 4 e 5 houve aumento na excreção de oocistos. Em relação aos sinais clínicos, no 14º e 21º dia no grupo 3 foram observados em sinais clínicos mais intensos como debilidade e ausência de apetite, as fezes apresentaram-se com consistência aquosa e fétida. Nas avaliações macroscópicas realizadas no 7º e 14º dia nos animais do grupo 3 foram visualizadas vilosidades hemorrágicas, presença de muco e descamação. Já na análise do ganho de peso, se compararmos nossos resultados dos pesos finais entre os grupos 3 e 4, temos uma diferença de -105,74g por ave. Logo, se multiplicarmos este valor pelo número de aves abatidas por dia em um frigorífico de médio/grande porte (250.000), temos um montante de 26.435 kg a menos de carne de frango por dia de abate, representando 581.570kg de perdas mensais (22 dias de abate), ou cerca de R\$ 3.489.420,00 ou U\$ 872.355,00, considerando o valor comercial da carne de frango a R\$ 6,00/kg ou U\$ 1,5/kg. Desta forma, fica evidente o impacto produtivo e econômico da coccidiose em aves, e destaca-se a importância da vacinação para prevenir a ocorrência da doença e desta forma reduzir as perdas.

Palavras-chave: Coccidiose aviária, Frangos de corte, Vacinação, Desafio.

ABSTRACT

PERFORMANCE OF CHICKEN AFTER VACCINATION WITH A LIVE VACCINE ACTIVE AGAINST AVIAN COCCIDIOSIS

AUTHOR: Letícia da Silva Giacomini
ADVISOR: Fernanda Silveira Flores Vogel

. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of vaccination against avian coccidiosis (live attenuated commercial vaccine LIVACOX® T) in the face of a challenge, and its correlation with the productive, economic performance, clinical observation and oocyst excretion in broilers. For this purpose, 420 1-day-old Cobb chicks were divided into five groups of 84 birds divided into 6 cages per group: G1. Unvaccinated and unchallenged control group; G2. Control group vaccinated with 10 ul of the vaccine on the day (zero); G3. Group challenged with 200 ul of the vaccine on day 1; G4. Group vaccinated on day (zero) and challenged on day 14; G5. Non-vaccinated group, but challenged on day 14. Vaccination by mouth was performed at a dose of 300 to 500 oocysts. After vaccination, groups 3, 4 and 5 were challenged orally with 6,000 to 10,000 oocysts (equivalent to 20 times the dose of the vaccine). During the entire period of the experiment (28 days), clinical signs were evaluated, the weight and feed conversion of the birds were evaluated, and feces were collected to evaluate the excretion of oocysts. In addition, macroscopic analysis of intestinal injuries of birds was also performed. It can be observed that both after the vaccination of groups 2, 3 and 4 and after the challenge in groups 4 and 5 there was an increase in the excretion of oocysts. In relation to clinical signs, on the 14th and 21st days in group 3, they were observed in more intense clinical signs such as weakness and lack of appetite, the feces presented with a watery and fetid consistency. In macroscopic evaluations performed on the 7th and 14th day in animals in group 3, hemorrhagic villi, presence of mucus and flaking were seen. In the analysis of weight gain, if we compare our results of final weights between groups 3 and 4, we have a difference of -105.74g per bird. Therefore, if we multiply this value by the number of birds slaughtered per day in a medium / large size refrigerator (250,000), we have an amount of 26,435 kg less chicken meat per day of slaughter, representing 581,570 kg of monthly losses (22 slaughter days), or about R \$ 3,489,420.00 or U \$\$ 872,355.00, considering the commercial value of chicken meat at R \$ 6.00 / kg or U \$\$ 1.5 / kg. Thus, the productive and economic impact of coccidiosis on birds is evident, and the importance of vaccination to prevent the occurrence of the disease and thus reduce losses is highlighted.

Keywords: Avian coccidiosis, broilers, vaccination, challenge.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fórmula da <i>LivaCox</i> [®] <i>T</i> contendo 1.000 doses	34
Tabela 2 – Média do consumo de ração (C.R.) dos frangos de corte, saudáveis, vacinados e desafiados experimentalmente com vacina viva atenuada (<i>LivaCox</i> [®] <i>T</i>) contendo oocistos esporulados de <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> e <i>E. tenella</i>	41
Tabela 3 – Média de peso vivo (P.V.) dos frangos de corte, saudáveis, vacinados e desafiados experimentalmente com vacina viva atenuada (<i>LivaCox</i> [®] <i>T</i>) contendo oocistos esporulados de <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> e <i>E. tenella</i>	42

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Excreção de oocistos durante o período experimental.....	41
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 AGENTE ETIOLÓGICO	12
2.2 EPIDEMIOLOGIA	12
2.3 CICLO DAS ESPÉCIES	13
2.3.1 Merogonia	14
2.3.2 Gametogonia	14
2.3.3 Esporogonia	14
2.4 PATOGENIA DAS ESPÉCIES	15
2.4.1 <i>Eimeria acervulina</i>	15
2.4.2 <i>Eimeria</i> máxima	15
2.4.3 <i>Eimeria tenella</i>	16
2.4.4 <i>Eimeria praecox</i>	16
2.4.5 <i>Eimeria mitis</i>	16
2.4.6 <i>Eimeria necatrix</i>	17
2.4.7 <i>Eimeria brunetti</i>	17
2.5 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	18
2.6 IMUNOLOGIA DAS AVES	18
2.6.1 Sistema imunológico das aves frente à vacinas	18
2.6.1.1 <i>Proteínas intracelulares secretórias e estruturais</i>	20
2.6.1.2 <i>Proteínas superficiais estruturais</i>	21
2.6.1.3 <i>DNA recombinante</i>	22
2.7 CONTROLE E PREVENÇÃO	22
2.7.1 Anticoccidianos	22
2.7.1.1 <i>Resistência aos anticoccidianos</i>	23
2.7.2 Vacinas utilizadas	25
2.7.3 Intervalo entre lotes	26
2.8 DIAGNÓSTICO	28
2.8.1 Pesquisa de oocistos na cama	28
2.8.2 Observação da mucosa intestinal macroscópica	28
2.8.3 Observação da mucosa intestinal microscópica	29
3 CAPÍTULO - ARTIGO CIENTÍFICO	29
4 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

A coccidiose aviária é causada por protozoários do gênero *Eimeria*, as principais espécies de *Eimeria* são: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. Tenella* está associada à mortalidade, má absorção, má utilização da ração e crescimento prejudicando em frangos de corte (LILLEHOJ et al., 2004; SHIRLEY et al., 2007). Os sinais clínicos variam de acordo com a espécie, taxa de infecção e a patogenicidade varia de leve a grave (WILLIAMS, 1999). Normalmente é encontrada mais de uma espécie de coccídeo presente no trato alimentar das aves submetidas ao diagnóstico (WILLIAMS et al., 1996). Atualmente, a coccidiose clínica grave é relativamente incomum e a condição mais freqüente que afeta as aves é a coccidiose subclínica, que dá origem à maior perdas econômicas totais (WILLIAMS, 1999). Como medida preventiva, tem-se adotado a prática da vacinação. Existem diferentes vacinas no mercado, que compreendem mais de uma espécie de *eimeria* devido à baixa reatividade sorológica cruzada entre as espécies (SMITH et al., 2008). Vacinas por via oral com oocistos esporulados resultam em infecções de baixo grau, induzindo uma resposta imune protetora que é potencializada pela reinfecção tanto do antígeno vacinal como por cepas de campo (SMITH et al., 2008). O propósito da vacina é induzir uma resposta humoral e celular de maior magnitude com o mínimo de lesão tecidual (SMITH et al., 2008).

Em relação à resposta imune, como o ciclo de vida de *eimeria* é complexo e compreende os estágios intracelular, extracelular, assexual e sexual, não é surpresa que a imunidade do hospedeiro também seja complexa e envolva muitas facetas inespecíficas (barreiras físicas, fagócitos e leucócitos e o sistema complemento) e específicas à imunidade, a última abrangendo mecanismos imunes celulares e humorais (LILLEHOJ, 1999). Como para outras infecções por protozoários intracelulares, a imunidade humoral de mucosas é importante para evitar a internalização nos enterócitos e a resposta celular por linfócitos T citotóxicos para determinar a lise de células infectadas (MCDUGALD, 1997).

No entanto, a vacinação contra a coccidiose tem suas desvantagens. Entre eles a possibilidade de não imunizar para todas as cepas/isolados de campo e de interferir no desempenho dos animais (TIZARD, 2002). Efeitos conflitantes sobre o desempenho do crescimento de frangos de corte (ganho de peso corporal e taxa de conversão alimentar) foram relatados em estudos de eficácia comparando programas de vacinação e ionóforos antibióticos (SHIRLEY et al., 2007).

Por outro lado, se a vacinação contribui para uma menor ocorrência da coccidiose, existem outros fatores que podem estar presentes em uma criação comercial de frangos de corte e que, potencialmente, possam interferir com a imunidade, favorecendo a coccidiose. Entre eles destacam-se o estresse, as deficiências de nutrientes, os agentes virais e as micotoxinas, os quais podem determinar estado imunossupressivo nas aves (KAWAZOE et al., 2000).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho produtivo em frangos de corte, criados experimentalmente, quando submetidos a um protocolo de vacinação para coccidiose e posteriormente desafiados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo encontra-se uma análise sobre os principais aspectos da coccidiose aviária, agente etiológico, epidemiologia, ciclo das espécies, patogenia, importância econômica, controle, prevenção e diagnóstico. Esses assuntos são relevantes para o entendimento do comportamento desta doença e suas formas de controle e prevenção com a finalidade de diminuir seus impactos econômicos na produção.

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

Os protozoários do gênero *Eimeria* causadores da coccidiose pertencem ao filo Apicomplexa, classe *Sporozoa*, subclasse *Coccidia*, ordem *Eucoccidiorida*, subordem *Eimeriorina*, família Eimeriidae, com sete espécies estabelecidas: *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*, sendo as três últimas de maior importância para aves, especialmente frangos de produção. No fim do século XIX, estas todas eram agrupadas em uma única espécie, *Eimeria avium*. Estudos subsequentes puderam isolar espécies distintas, com *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix* e *E. praecox* se estabelecendo no início do século XX (KAWAZOE et al., 2000).

Os oocistos são caracterizados por terem dois esporocistos com quatro esporozoítos cada um, somando oito esporozoítos. As coccídeas são protozoários altamente resistentes no meio ambiente. Apresentam especificidade pelo hospedeiro, ou seja, as coccídeas de aves não acometem outros grupos, e vice-versa (AHID, 2009).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A coccidiose aviária apresenta distribuição global, com focos em todos os continentes e acompanha o desenvolvimento da avicultura em todo o mundo (FORTES, 2004; BOWMAN et al., 2010). Infecções mistas, onde se encontra mais de uma espécie de *Eimeria*, são comuns (TERRA, et al., 2001).

Klein (1996), entre 1993 e 1995 isolou e caracterizou cinco espécies de *Eimeria* em 74 criações de frango da Europa, Américas Central, do Sul, África do Sul, EUA e Tailândia, encontrando infecções específicas e mistas que incluem as espécies *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. mitis*, *E. maxima* e *E. tenella*. Todas as sete espécies de *Eimeria* têm sido isoladas nos EUA e Europa, como resultado de aplicações das características taxonômicas tradicionais, embora seja aceito que as espécies mais comuns em todo o mundo sejam *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*.

2.3 CICLO DAS ESPÉCIES

Espécies do gênero *Eimeria* completam seu ciclo de vida em um único hospedeiro, chamado (monoxeno ou homoxeno), apresentam reprodução assexuada (merogonia) como também sexuada (gamogonia) dentro das células do hospedeiro (estágios endógenos) e esporogonia no meio externo. Na maioria das espécies, o hospedeiro desenvolve uma resposta imune protetora espécie específico. As aves tornam-se infectadas, através da ingestão do oocisto esporulado (oocisto contendo esporozítos) juntamente com a ração e água. O primeiro processo que ocorre dentro do hospedeiro é chamado de excitação, neste processo os oocistos sofrem ruptura de sua membrana pela ação mecânica da moela, ocorrendo então liberação dos esporocistos. Estes, pela ação enzimática, térmica e de sais biliares, têm os esporozítos liberados no duodeno. Os esporozoítos saem através da abertura do esporocisto – o corpo de Stieda (CALNEK, 1991).

Acredita-se que a tripsina degrade o corpo de Stieda enquanto os sais biliares estimulam a motilidade dos esporozoítos. Uma vez livre na luz intestinal, esporozoítos invadem ativamente as células hospedeiras (enterócito, células da lâmina própria ou criptas epiteliais), formando um vacúolo parasitóforo. A esporulação ocorre após a excreção dos oocistos através das fezes de aves contaminadas. No meio ambiente sobre condições de temperatura, umidade e oxigenação o oocisto esporula, formando os esporocistos com os esporozoítos dentro (KAWAZOE et al., 2000).

2.3.1 Merogonia

Fase de merogonia ou também conhecida por esquizogonia, é marcada pela fase de reprodução assexuada que ocorre na forma endógena, pois nesse período os esporozítos que infectam estão dentro das células do hospedeiro, e assumem forma arredondada e transformam-se em merontes uninucleados ou trofozoítos. Esse núcleo se individualiza em uma célula alongada (merozoíto dentro da célula hospedeira) O conjunto destes merozoítos recebe o nome de meronte ou esquizonto. Estes merozoítos deixam a célula hospedeira e invadem novas células, formando uma ou mais gerações de merontes contendo merozoítos (CALNEK, 1991).

2.3.2 Gametogonia

Após os merozoítos formarem diversas gerações de merogonia, dependendo da espécie penetram em novas células hospedeiras e iniciam a fase sexuada do ciclo endógeno, onde diferenciam-se em gamontes masculinos (microgamontes) e gamontes femininos (macrogamontes). Alguns merozoítos transformam-se em microgamontes que sofrem repetidas divisões nucleares e citoplasmáticas dando origem a muitos microgametas, que apresentam dois ou três flagelos. Outros merozoítos transformam-se em macrogametas os quais não sofrem divisão nuclear, mas aumenta de tamanho. Esse aumento inclui a proliferação de várias organelas, incluindo os corpos formadores de parede (*wall forming bodies*) que estão envolvidos na formação da parede do oocisto. O macrogameta é fertilizado pelo microgameta, ocorre a formação do zigoto e mais tarde a parede do oocisto. O oocisto formado é liberado para a luz intestinal e excretado para o meio exterior juntamente com as fezes, ainda imaturo (CALNEK, 1991).

2.3.3 Esporogonia

Os oocistos imaturos são liberados na luz intestinal e excretados para o meio exterior juntamente com as fezes, irão sofrer um processo de esporogonia, isto é, divisão meiótica seguida de divisão mitótica, dando origem a oito esporozoítos, em número de dois dentro de cada esporocisto, sob condições ideais de temperatura (28° - 30° C), oxigenação e umidade do ambiente. Lembrando que apenas oocistos esporulados possuem capacidade infectante ao

hospedeiro. Condições não adequadas podem afetar a viabilidade e a virulência dos oocistos (LONG; REID, 1982).

2.4 PATOGENIA DAS ESPÉCIES

2.4.1 *Eimeria acervulina*

Desenvolve-se na porção anterior do intestino delgado ao longo da alça duodenal, sendo que em infecções severas pode ser encontrada avançando para o jejuno e íleo. Essa espécie causa alterações visíveis da mucosa e serosa do intestino que vão desde pontos brancos a listras brancas transversais que podem estar coalescentes. As lesões são 22 compostas de esquizontes, gametócitos e oocistos (MCDOUGALD, 2003).

Segundo Conway e McKenzie (2007), em esfregaços do local das lesões são visualizados gametócitos e oocistos não esporulados. Bordin (1999) citou que essa espécie localiza-se superficialmente no epitélio da mucosa intestinal, sobre as vilosidades.

Kawazoe et al., (2000) citou que essa espécie geralmente não causa mortalidade, porém, causa uma profunda depressão no ganho de peso e aumento na taxa de conversão alimentar das aves acometidas. Os oocistos dessa espécie são ovóides. Segundo Long e Reid (1982) o período pré-patente, o tempo mínimo de esporulação, a forma e as medidas dos oocistos variam entre as espécies de *Eimeria*.

2.4.2 *Eimeria máxima*

Localiza-se na região média do intestino delgado (jejuno e íleo), próximo ao divertículo do saco da gema, mas em infecções severas pode ser ascendente, alcançando o duodeno e/ou descendente até a junção ileocecal, causa lesões hemorrágicas associadas a um espessamento da mucosa intestinal, petéquias podem ser vistas na serosa e o intestino pode apresentar uma dilatação na região afetada, chamada de “balonamento”, estando repleto de conteúdo mucoso de coloração amarela ou laranja, podendo conter sangue. É responsável pela perda de peso, aumento na taxa de conversão alimentar e despigmentação das aves acometidas (CONWAY; MCDOUGALD, 2003).

Nessa espécie o maior dano tecidual ocorre na fase de reprodução sexual, pois, possui grandes macrogametócitos de localização subepitelial (MCDOUGALD, 2003). Pode causar mortalidade de até 20% (SCHNITZLER; SHIRLEY, 1999). Os oocistos de *E. maxima* são

ovóides de coloração característica, marrom dourada e, com superfície irregular, são os maiores oocistos dentre as espécies de *Eimeria* que parasitam aves da espécie *G. gallus domesticus* (LONG; REID, 1982).

2.4.3 *Eimeria tenella*

Espécie do gênero *Eimeria* altamente patogênica, responsável por surtos com alta morbidade e mortalidade, causando também queda no ganho de peso e aumento na taxa de conversão alimentar. Todo o ciclo (assexuado e sexuado) ocorre nos cecos causando uma tífite. Os esquizontes desenvolvem-se na lâmina própria do intestino e os maiores danos são causados durante a reprodução assexuada, pela segunda geração de grandes esquizontes contendo centenas de merozoítos (BORDIN, 1999; MCDOUGALD, 2003).

O mecanismo que causa a morte das aves não está completamente elucidado. Segundo Kawazoe et al., (2000), acredita-se que o parasito interfere no mecanismo de coagulação sanguínea devido a falhas no metabolismo da vitamina K, agravando o quadro hemorrágico. Porém, a hemorragia por si só não é responsável pela morte, provavelmente ocorre interação de fatores tóxicos e bacterianos durante a infecção (MCDOUGALD, 2003). Os oocistos de *E. tenella* são ovóides (LONG; REID, 1982).

2.4.4 *Eimeria praecox*

Desenvolve-se no terço superior do intestino delgado, principalmente na alça duodenal, possui localização epitelial. O conteúdo intestinal pode apresentar-se aquoso, com presença de muco, e algumas vezes, petéquias podem ser visualizadas na mucosa. Essa espécie pode causar uma diminuição no ganho de peso e aumento na taxa de conversão alimentar nas aves (MCDOUGALD, 2003). Os oocistos são ovóides (LONG; REID, 1982).

2.4.5 *Eimeria mitis*

Seu desenvolvimento ocorre no intestino delgado desde o divertículo do saco da gema até a junção ileocecal, não formam colônias e localizam-se superficialmente no epitélio da mucosa do intestino delgado. Desta forma causam poucas alterações visíveis como, intestino pálido e flácido (MCDOUGALD, 2003) e com espesso exsudato (LONG; REID, 1982).

Pode causar queda de peso, palidez das aves e piora na conversão alimentar (LONG; REID, 1982; MCDOUGALD, 2003). Essa espécie apresenta oocistos subesféricos que são

menores entre as *Eimerias* spp. que parasitam frangos (LONG; REID, 1982). Tem-se demonstrado que, mesmo espécies como *E. praecox* e *E. mitis*, consideradas muitas vezes inócuas, podem causar uma significativa queda no ganho de peso (JORGENSEN et al., 1997; MCDOUGALD et al., 1997).

2.4.6 *Eimeria necatrix*

Essa espécie desenvolve-se inicialmente no intestino delgado (jejuno e íleo, próximo ao divertículo do saco da gema), onde ocorrem as merogonias (reprodução assexuada), e em seguida, a terceira geração de esquizontes migra para o ceco onde acontece a reprodução sexuada e a formação dos oocistos. As lesões que ocorrem no intestino delgado são causadas principalmente pela segunda geração de esquizontes, de localização subepitelial, que alcançam a camada muscular e os vasos sanguíneos, causando um dano extenso no tecido. Podem ser visualizadas alterações como uma acentuada dilatação ou “balonamento”, com um aumento de até duas vezes o tamanho normal do intestino na região afetada (MCDOUGALD, 2003).

Na serosa se observam placas brancas formadas pela aglomeração de esquizontes e petéquias, o interior do intestino pode estar repleto de sangue, fluídos e muco. É altamente patogênica e causa alta morbidade e mortalidade, queda no ganho de peso e aumento na taxa de conversão alimentar. Porém, é pouco prolífera e, devido à competição com outras espécies, é responsável por surtos tardios, acometendo principalmente, aves de vida longa ao redor de 9 a 14 semanas de idade, como por exemplo, reprodutoras, sendo rara a ocorrência de quadros clínicos em frangos devido ao curto ciclo dessas aves (MCDOUGALD, 2003). Os oocistos de *E. necatrix* são ovóides oblongos (LONG; REID, 1982).

2.4.7 *Eimeria brunetti*

Essa espécie geralmente desenvolve-se na porção inferior do intestino delgado, entre o divertículo do saco da gema e a junção ileocecal, podendo se estender por todo o intestino delgado e grosso em infecções massivas, a localização da segunda geração de esquizontes é subepitelial. É considerada uma espécie altamente patogênica, causa lesões que variam desde um engrossamento da mucosa com a presença de petéquias, em infecções leves, até uma necrose e descamação do epitélio com a formação de uma membrana diftérica cobrindo a superfície intestinal (BORDIN, 1999; MCDOUGALD, 2003). Pode causar mortalidade,

diminuição no ganho de peso e aumento na taxa de conversão alimentar (MCDOUGALD, 2003). *E. brunetti* possui oocistos ovoides (LONG; REID, 1982).

2.5 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Infecções subclínicas e baixos níveis parasitários exercem impacto significativo na produção animal, causam redução na eficiência metabólica e imunológica dos animais acometidos e não são percebidas pelo produtor (ALLEN; FETTERER, 2002). A distribuição dessa patologia em diversas áreas do mundo, inclusive Brasil, Europa, Estados Unidos e Ásia, além de dificuldades no controle, profilaxia vacinal e terapêutica são fatores que elevam a importância dessa doença (LILLEHOJ, 2000, ALLEN; FETTERER, 2002).

O Brasil, um dos maiores produtores de aves do mundo, o impacto desta patologia é imenso. Em levantamento realizado em 1993 junto a empresas avícolas brasileiras, concluiu-se que a percentagem de lotes afetados por coccidiose clínica ou subclínica variou, entre diferentes empresas, de 1% a 15%. Mostrou-se que aproximadamente 65% das empresas no Brasil tiveram problemas com coccidiose clínica e subclínica no ano de 1993. Estima-se que as perdas decorrentes da coccidiose subclínica chegam a US\$ 19,1 milhões anuais, sendo US\$ 11,85 milhões em perdas de carne e US\$ 7,25 milhões em consumo de ração (CASTRO, 1994).

As lesões provocadas no epitélio intestinal, resultantes das fases de desenvolvimento das eimérias, prejudicam os índices zootécnicos da avicultura de corte e conseqüentemente o resultado econômico da empresa avícola. Portanto, pesquisas referentes à etiologia da eimeriose no território nacional são extremamente importantes. Deste modo, a coccidiose aviária é uma patologia parasitária de grande importância zootécnica e epidemiológica, tanto pelos elevados prejuízos na produção de frangos, como elevados custos no tratamento, distribuição mundial e dificuldade no controle desta doença (SANTOS et al., 2003).

2.6 IMUNOLOGIA DAS AVES

2.6.1 Sistema imunológico das aves frente às vacinas

A infecção por *Eimeria* induz uma resposta imune complexa e multifatorial no hospedeiro, embora esteja claro que muitas destas respostas não são essenciais na proteção contra desafio subsequente (SHIRLEY, 2007). Devido a infecção ser confinada ao trato intestinal, o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) exerce a primeira linha de defesa

contra o agente tendo três funções principais, como o processamento e apresentação de antígenos, a produção de anticorpos intestinais (IgA), e a ativação da imunidade mediada por células (LILLEHOJ et al., 2000).

Segundo Shirley, (2007), a caracterização dos mecanismos imunes responsáveis pela proteção, tanto na infecção primária quanto na secundária, pela maioria das espécies de *Eimeria*, mostram o papel crítico das células T (CD4+), principalmente aquelas que expressam receptores $\alpha \beta$, e interferon gama (IFN- γ). Este último foi identificado em altas concentrações nas infecções por *E. acervulina*, *E. maxima*, e *E. tenella*.

Ainda segundo estes autores, as células B e natural killer parecem exercer um papel menos importante na promoção de imunidade efetiva. Constantinoiu et al. (2011), reforçam a importância das células T na promoção de imunidade protetora na infecção de aves pelo gênero *Eimeria*.

Trout e Lillehoj (1996), descreveram que a resposta humoral não exerce um papel fundamental na proteção contra infecção, porém aponta para a importância da imunização materna e transferência de imunidade passiva. A natureza exata dos mecanismos de defesa do hospedeiro frente a estes parasitos ainda permanece desconhecida, porém sabe-se que diversas proteínas, de diferentes organelas são importantes no processo de invasão celular e desenvolvimento da infecção, que poderiam estimular a resposta imune celular e prover proteção frente a infecção (KLOTZ, 2007).

Devido a este fato, a utilização de vacinas atenuadas proporciona uma imunidade mais eficiente em comparação às vacinas de subunidades (mortas/ inativadas). Porém este tipo de vacina tem o inconveniente da possibilidade de manifestação clínica da doença (LILLEHOJ et al., 2000).

Assim, com o advento da biologia molecular, diversos estudos têm sido desenvolvidos nesta área, visando a estimulação específica de células promotoras de imunidade consistente (LAMPHEAR, et al., 2002). A imunidade conferida pelas vacinas vivas de baixa dose e atenuada é protetora, pois permite o desenvolvimento completo do ciclo do parasito e, conseqüentemente, estimula todas as vias da resposta imune, principalmente a resposta imune celular, a qual promove efetivamente a proteção contra infecções subsequentes. Já a imunidade pelas vacinas recombinantes irá depender da proteína utilizada, sendo esta, de preferência, participante de etapas fundamentais no ciclo do parasito (LILLEHOJ et al., 2000).

Os últimos 10 anos de pesquisa no desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra diversos parasitos apicomplexos (*Eimeria*, *Plasmodium*, e *Toxoplasma*) revelaram a

complexidade da relação parasito-hospedeiro, e indicam como caminho mais promissor o uso de antígenos recombinantes de proteínas de organelas específicas (presentes no complexo apical, como roptrias, micronemas e granulos densos) envolvidas no processo de invasão celular (JENKINS, 1988).

Existem diversos tipos de vacinas, porém somente vacinas vivas e atenuadas são comercializadas (exceção a vacina recombinante CoxAbic®). Apesar disso, o seu uso ainda é discreto frente ao uso de anticoccidianos, possivelmente devido a sua menor eficácia e maior custo (DALTON; MULCAHY, 2001).

2.6.1.1 Proteínas intracelulares secretórias e estruturais

Os antígenos intracelulares de *Eimeria* desempenham importantes papéis na relação parasito-hospedeiro e no ciclo de vida do parasito, sendo assim, são considerados melhores candidatos à confecção de vacinas, por bloquearem as atividades relacionadas ao processo de invasão celular. Entre estes, estão os componentes dos corpos refratários e organelas do complexo apical (LILLEHOJ et al., 2000).

Aparentemente, diversas proteínas associadas ao complexo apical estão envolvidas no processo de invasão celular e formação do vacúolo parasitóforo. A clonagem de genes que codificam as proteínas associadas às roptrias, micronemas e grânulos densos forneceu informações de eventos que ocorrem durante e após a invasão celular (JENKINS, 1988).

Proteínas de micronema têm sido utilizadas na confecção de vacinas recombinantes, como a EtMIC2 (DALLOUL et al., 2005) e EtMIC1 (SUBRAMANIAN et al., 2008). Alguns autores utilizaram partes de regiões consideradas imunogênicas de algumas proteínas, como o antígeno 5401 da região C-terminal da proteína de micronema EtMIC4 (DANFORTH et al., 1989; DU et al., 2005).

Outra organela presente no complexo apical são as roptrias. Esta organela, localizada na região anterior do complexo apical, possui um compartimento com um repertório distinto de proteínas envolvidas diretamente na invasão da célula hospedeira (PROELLOCKS et al., 2010).

No entanto, apesar da sua importância neste evento, não existem muitos estudos utilizando proteínas desta organela na imunização de aves, com exceção da proteína EAMZp30-47, obtida de merozoítos de *Eimeria acervulina*, a qual evidenciou o estímulo das células T de aves (JENKINS et al., 1990).

Os corpos refratários são estruturas específicas dos parasitos da família Eimeriidae, desprovidos de membrana. Apesar de terem sido estudados anteriormente e detectados nos estágios sexuais precoces (de esporozoíto à esquizonte de primeira geração), suas funções permanecem desconhecidas (VENEVELLES et al., 2006).

Uma proteína de corpo refratário de *E. tenella* (Etp28) foi clonada e expressa em grande quantidade em sistema de expressão por *Bacullovirus* (YANG et al., 1998), sendo, esta descrita pelos autores como imunoprotetora e candidata a vacina para combater a coccidiose aviária. Outro antígeno de corpo refratário, SO7, derivado de gene homônimo, também tem sido estudado na confecção de vacinas (POGONKA, et al., 2003; YANG et al., 2010).

Além disso, outras proteínas, a princípio estruturais e com outras funções, têm sido reconhecidas no processo de invasão celular, como as proteínas de choque térmico HSP70 (CACHO et al., 2008) e HSP90 (DASZAK, 1999; PÉROVAL et al., 2006), mostrando-se possíveis candidatas a estudos futuros.

2.6.1.2 Proteínas superficiais estruturais

Os antígenos de superfície são importantes na confecção de vacinas por desempenharem um papel direto na interação parasito-hospedeiro, e resultados promissores foram observados utilizando antígenos superfície (membrana celular) nativos e recombinantes (LILLEHOJ et al., 2000). Estas proteínas de membrana são obtidas, preferencialmente, de esporozoítos ou merozoítos, por serem as formas infectantes do parasito. São amplificadas de genes, como cSZ-1 (esporozoíto) e cMZ-8 (merozoíto), e tem a propriedade de estimularem a imunidade humoral e celular *in vitro* (JENKINS et al., 1988).

Li et al. (2010), em um trabalho mais recente, verificou uma significativa diminuição em lesões intestinais, perda de peso e eliminação de oocistos em infecção experimental por *E. tenella*, imunizando aves com uma proteína (cSZ-2) de *E. acervulina*. Shah et al. (2010), utilizando a mesma proteína e sob as mesmas condições, observaram resultados semelhantes. Recentemente outra proteína vem sendo utilizada em estudos para imunógenos, a proteína 3-1E, presente na superfície de esporozoítos e esquizontes de *Eimeria acervulina*, e que demonstrou ser altamente imunogênica, produzindo proteção imune parcial contra a coccidiose (MA, et al., 2011).

Assim como a proteína 3-1E, outra proteína também de superfície tem sido amplamente utilizada em testes vacinais, a proteína TA4, também conhecida como SAG1. Esta proteína obtida de *E. acervulina* ou de *E. tenella*, mostrou ser eficiente na promoção de imunidade

protetora a coccidiose, quando submetidas a desafios homólogo e heterólogo, associadas a interleucinas e outras citocinas como compostos adjuvantes (LILLEHOJ et al., 2000; SONG et al., 2009). Em outro estudo, Geriletu et al., (2011), obtiveram resultados satisfatórios imunizando aves com uma proteína de superfície de merozoíto, denominada MZ5-7, associada a uma interleucina IL-17 de frangos.

2.6.1.3 DNA recombinante

Vacinas de DNA utilizam genes que codificam proteínas imunogênicas de patógenos (gene de interesse carregado por vetor biológico, como plasmídeo bacteriano ou DNA viral) ao invés das proteínas já expressadas. Elas são utilizadas em conjunto com elementos regulatórios apropriados como os promotores e os estimuladores, permitindo que a proteína codificada seja expressa e, assim, ser reconhecida pelo sistema imune do hospedeiro de uma forma que simule a infecção natural. Este tipo de vacina requer a transferência de genes e expressão do antígeno em tecidos acessíveis ao sistema imunológico, como pele, músculo e mucosas (LILLEHOJ et al., 2000). Este tipo de vacina pode ser confeccionada utilizando somente plasmídeo clonado ou um vetor biológico portando o gene que codifica a proteína desejada ou mesmo, a proteína expressada (SHAH et al., 2010).

2.7 CONTROLE E PREVENÇÃO

2.7.1 Anticoccidianos

No passado a quimioterapia com a finalidade de controlar a coccidiose nas produções avícolas era feita apenas de forma curativa. Atualmente, quase que a totalidade dos lotes de frangos recebe uma medicação preventiva, enquanto que os tratamentos ficaram relegados a um último recurso (MCDOUGALD, 2003).

Segundo Ferreira e Revollo (2005) há relatos de que a primeira substância empregada para o tratamento da coccidiose, por volta de 1935, foi o enxofre. Na década seguinte foram introduzidas as sulfonamidas e a nicarbazina, e na década de 1970 a monensina. A nicarbazina e a monensina continuam sendo muito utilizadas. Os anticoccidianos são classificados em dois grupos: os sintéticos e os ionóforos de poliéter. Esses últimos são produzidos a partir da fermentação de micélios, principalmente do gênero *Streptomyces* (BUTAYE et al., 2003) e são considerados drogas mais eficientes no controle da eimeriose,

pois, devido ao seu intrincado modo de ação, são menos susceptíveis ao desenvolvimento da resistência pelas espécies de *Eimeria* (CHAPMAN, 1997; KAWAZOE, 2000).

Formam complexos com íons, facilitando a entrada de Na^+ e a grande quantidade desse íon no meio intracelular provoca um aumento de líquido no interior da célula do parasito, causando a parada da função mitocondrial e posteriormente a ruptura da membrana celular (CHAPMAN, 1997).

Segundo Danforth e Ruff (1999), o grupo dos ionóforos permanece sendo o esteio principal no controle da coccidiose. Os anticoccidianos sintéticos possuem um mecanismo de ação mais simples, que os tornam mais susceptíveis ao desenvolvimento de resistência pelos parasitos (KAWAZOE et al., 2000).

As sulfonamidas são análogas e competidoras do ácido p-aminobenzóico (PABA) que é essencial para o metabolismo do ácido fólico, rota importante para a síntese de RNA e DNA do parasito (CHAPMAN, 1997; FERREIRA; REVOLLEDO, 2005; MCDOUGALD, 2003). Agem impedindo a redução do diidrofolato para tetraidrofolato pela enzima diidrofolato redutase timidilato sintetase (DHFR-TS) (CHAPMAN, 1997).

O amprólio é um antagonista da tiamina, impede a absorção desse aminoácido inibindo, com isso, a síntese do ácido fólico (FERREIRA; REVOLLEDO, 2005; MCDOUGALD, 2003). Outras drogas sintéticas interferem na geração de energia ou no metabolismo mitocondrial do parasito, como por exemplo, o 27 decoquinato, clopidol, robenidina e, apesar do mecanismo de ação da nicarbazina não estar completamente elucidado acredita-se que, esta também atue na mitocôndria (DANFORTH; RUFF, 1999; CHAPMAN, 1997). Supõe-se que a robenidina impeça a fosforilação oxidativa (CHAPMAN, 1997; FERREIRA; REVOLLEDO, 2005).

O decoquinato atua bloqueando o transporte de elétrons próximo ao citocromo b na mitocôndria do parasito, e o clopidol possui o mesmo mecanismo, mas em um local diferente da mitocôndria, impossibilitando a resistência cruzada entre estas drogas (CHAPMAN, 1997). Anticoccidianos mais recentes como o diclazuril e o toltrazuril atuam na cadeia respiratória do parasito (FERREIRA; REVOLLEDO, 2005).

2.7.1.1 Resistência aos anticoccidianos

O desenvolvimento da resistência pelo parasito pode ser definido como um decréscimo da sensibilidade a uma droga ao longo do tempo e pode ser parcial ou completa (CHAPMAN, 1997). A ampla utilização dos anticoccidianos para o controle da eimeriose aviária permite a exposição frequente de populações de *Eimeria* spp. a uma determinada classe de drogas,

podendo induzir à resistência (CHAPMAN, 1997; DANFORTH; RUFF, 1999; MCDOUGALD, 2003).

McDougald (2003) citou que a resistência às drogas é um fenômeno genético, e quando estabelecido em uma população de *Eimeria* spp., pode permanecer por muitos anos. Porém, segundo Champan (1997) há relatos de reversão da resistência em populações de parasitos para uma determinada droga, após um período administrando uma droga não relacionada.

Os mecanismos que levam ao desenvolvimento de cepas resistentes aos anticoccidianos não são totalmente conhecidos, Chapman (1997) citou que, para o amprólio, acredita-se que ocorrem mudanças a nível molecular, que alteram o receptor alvo, impedindo a ligação da droga em cepas resistentes; para as sulfonamidas, sugere-se que a resistência seja devido à duplicação do cromossomo ou mutação em um gene, resultando na amplificação da diidrofolato redutase timidilato sintetase (DHFR-TS) e para os ionóforos, acredita-se que envolva mudanças bioquímicas na composição da membrana do parasito ou na expressão de genes que produzem uma proteína, chamada de Pglicoproteína, responsável por aumentar a atividade da bomba de Na^+ / K^+ , sendo que a expressão da resistência está relacionada com diferenças na acumulação de ionóforo pelos parasitos.

Zhang et al. (2013), em um trabalho para investigar a resistência aos ionóforos, 28 relatou que a resistência severa a maduramicina estava associada a uma maior dose fornecida da droga. O complexo modo de ação dos ionóforos torna o processo de resistência mais difícil e, portanto, mais demorado para acontecer, mesmo assim, essa classe de anticoccidianos tem-se demonstrado vulnerável (CHAPMAN, 1997; CHAPMAN et al., 2010; KAWAZOE et al., 2000).

O processo de disseminação da resistência em populações de *Eimeria* spp. se dá por meio de seleções, as populações que sobrevivem a utilização de um determinado anticoccidiano, sofrem uma pressão de seleção e podem desenvolver resistência a droga, que é uma característica estável, podendo ser transmitida para as próximas gerações e permanecendo por vários anos em uma população de *Eimeria* spp., mesmo que a população siga sem a pressão daquela droga (CHAPMAN, 1997; MCDOUGALD, 2003).

A maioria das drogas atua na fase de reprodução assexuada, quando o parasito é haploide (esporozoítos, esquizontes e merozoítos). Estes compostos podem eliminar facilmente da população os indivíduos sensíveis à droga, e em consequência permitir a multiplicação de indivíduos mais resistentes, durante a reprodução assexuada. A difusão dessa característica ocorre na fase de reprodução sexuada, com os cruzamentos das características de resistência a

uma ou múltiplas drogas, gerando novas populações com fenótipos de resistência para um ou vários anticoccidianos (CHAPMAN, 1997; DANFORTH; RUFF, 1999).

A resistência também pode ocorrer de forma cruzada, acontece quando uma cepa portadora de um fenótipo de resistência a uma droga pode ser totalmente ou parcialmente resistente a outro anticoccidiano que possua o mesmo ou semelhante mecanismo de ação. Acredita-se que a resistência cruzada possa ocorrer entre o grupo dos ionóforos, mas isso não foi devidamente comprovado e, entre diclazuril e toltrazuril, indicando que exibem o mesmo modo de ação (CHAPMAN, 1997). A velocidade com que ocorre o estabelecimento da resistência a um anticoccidiano está relacionada com o modo de ação da droga, quanto mais simples, mais rápida é a instauração da resistência (MCDOUGALD, 2003).

Segundo Ferreira e Revollo (2005) de acordo a velocidade de aparecimento da resistência, os anticoccidianos podem ser classificados como: muito rápido (glicosaminas); rápido (buquinolato, decoquinato e diclazuril); menos rápido (clopidol); moderado (sulfonamida e robenidina); lento (amprolium, zoalene e nitrobenzamidas) e muito lento (nicarbazina e ionóforos). Com o objetivo de evitar ou atrasar o desenvolvimento da resistência às drogas, são utilizados alguns tipos de manejo dessas 29 substâncias, como por exemplo, a rotação de drogas, que consiste em se utilizar um anticoccidiano por alguns ciclos de criação e posteriormente substituí-lo. Outra forma de uso dos anticoccidianos são os programas duais, onde se utiliza um determinado anticoccidiano na fase inicial e de crescimento do frango (01-21 dias), que é substituído por outro na fase de terminação (22-42 dias) (KAWAZOE et al., 2000).

A utilização de vacinas com oocistos vivos tem demonstrado ser uma ferramenta interessante para restabelecer a sensibilidade às drogas. Mathis e Broussard (2006) avaliaram a resistência de cepas de *Eimeria* spp. ao diclazuril, em isolados provenientes de complexos aviários antes e após a utilização desta droga.

2.7.2 Vacinas utilizadas

Antes da introdução das vacinas vivas, as espécies existentes estavam restritas as espécies autóctones locais, sendo mais frequentes a *E. acervulina* e *E. maxima* e outra apatogênicas. Por isto o uso de vacinas contendo todas as espécies ou as principais foi determinante para massificação destas por todo o território. As espécies *E. brunetti*, *E. necatrix* e *E. tenella* são altamente patogênicas, ocasionando diarreia aquosa ou hemorrágica e extremo baixo rendimento das aves, podendo levar a morte. Estas também podem reduzir a produção e qualidade dos ovos, chegando até a completa parada na postura (KAWAZOE et al., 2000).

Quanto à imunidade os linfócitos B e T estão associados às respostas específicas dos antígenos disponíveis nos hospedeiros através da liberação nos estágios invasivos e em desenvolvimento. Isto ocorre pela incorporação e expressão nas membranas das células hospedeiras e após a fagocitose e rompimento dos estágios extracelulares (KAWAZOE et al., 2000).

Os mecanismos imunes mediados por células são responsáveis pela resistência natural após a primeira infecção, eliminando os parasitas nesta e pela imunidade Adquirida que é a resposta imune ao antígeno específico após infecções secundárias (KAWAZOE et al., 2000).

Nos primórdios existiam vacinas como Coccivac® e Immucox®, onde ocorria a presença de cepas do campo ou laboratório sem nenhuma modificação, utilizadas nas matrizes com sucesso. Dada a necessidade de se obter vacina viva mais segura e eficiente, sem decréscimos significativos na imunogenicidade, produziram-se vacinas vivas atenuadas que conferem proteção aos desafios sem induzir quadros clínicos nas aves. Primeiramente surgiu a Paracox®, contendo todas as espécies de *Eimeria* de galinhas e posteriormente a Livacox® que contém as três principais espécies *E. acervulina*, *E. máxima*, *E. tenella* (KAWAZOE et al., 2000).

Já existe no mercado vacina capaz de transferir imunidade materna através da transferência de anticorpos para os pintos, a CoxAbic®. Esta possui gametócitos mortos de *E. maxima*, levando a uma redução de 60 a 70% no pico de produção de oocistos se comparado ao grupo controle (KAWAZOE et al., 2000).

Uma excelente alternativa a ser somada aos programas anticoccidianos é utilizar vacinas vivas não atenuadas, clonadas e com tolerância ionofórica (BERNARDINO, 2004). Estas são produzidas a partir de cepas de campo com características de resistência aos medicamentos anticoccidianos.

2.7.3 Intervalo entre lotes

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 um área específica. Segundo Kelley et al. (1995), a reutilização de cama, além de reduzir os

custos com a aquisição de cama nova, reduz a degradação ambiental. Estes fatores justificam a reutilização da cama por vários lotes. (AVILA, 1992).

Por apresentar clima quente que permite a produção de 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 a redução de riscos microbiológicos (AVILA, 1992).

Os parasitos presentes na cama reutilizada podem resultar em contaminação para o ambiente e ser fonte de infecção para os próprios frangos, contribuindo para a maior contaminação do trato digestivo (AMIT – ROMACH et al., 2004). Há, portanto, necessidade de esforços de parte da avicultura de corte, 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 eficácia 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 início de reinfecção das aves, sendo, ainda, metodologias de baixo custo (AVILA, 1992).

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 ocorrências 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 o patógeno, 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 é medida necessária para redução da pressão de infecção dos parasitos e para o controle da coccidiose, embora alguns oocistos sobrevivam ao procedimento (VERMEULEN et al., 2001).

A maioria dos métodos de redução da concentração de patógenos de cama de frango, entre lotes, ou antes, de sua deposição no aviário, baseia-se na alteração de pH da umidade ou da temperatura (POPE, 1999). A temperatura é agente físico de grande eficiência na

inativação de microrganismos. A forma factível de se obter altas temperaturas (60-70° C) na cama do aviário é pela fermentação, sendo possível sua realização apenas quando da ausência de frangos, ou seja, intervalo sanitário (JEFREY et al., 1998). A desinfecção física, por aumento de temperatura em amontoamento e cobertura da cama, devido a ação de microrganismos, conhecida como fermentação da cama de frango, é preconizada como método mecânico de destruição de oocistos, 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 destruição química, a estrutura da parede dos oocistos os torna altamente resistentes ao desinfetante 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. (POPE, 1999).

2.8 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da eimeriose nas granjas pode ser feito por pesquisa de oocistos na cama e necropsia das aves para observação macroscópica e microscópica de lesões na mucosa intestinal. O tipo e o escore de lesão podem ser avaliados visualmente na necropsia de forma subjetiva e classificados de um a quatro (KAWAZOE et al., 2000).

2.8.1 Pesquisa de oocistos na cama

Para verificar a simples presença de coccidiose nos galpões coletam-se amostras para a pesquisa de oocistos de *Eimeria* spp., em dicromato de potássio a 2%, mantidas a temperatura entre 28 a 30° C, por aproximadamente 48 a 72 horas. O material deve ser filtrado em tela de metal de 50 malhas por cm², centrifugado a 2.000 rpm, durante 5 minutos, para retirada da solução de dicromato de potássio e lavado sucessivamente em água destilada até a remoção da solução. Uma alíquota do sedimento e misturada a solução saturada de cloreto de sódio. Uma gota dessa solução e colocada em uma câmara de MacMaster e após alguns minutos, observada em microscópio. Os oocistos irão flutuar nessa solução. O mesmo procedimento pode ser aplicado em amostras de fezes (McDOUGALD et al., 1997).

2.8.2 Observação da mucosa intestinal macroscópica

As classificações das lesões em escore são baseadas no método descrito por Johnson e Reid (1970), 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 cm²) 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.

2.8.3 Observação da mucosa intestinal microscópica

Para avaliação das lesões microscópicas será utilizada a técnica histológica convencional, os fragmentos intestinais são coletados e fixados em solução formalina tamponada a 10% e posteriormente desidratados em série de concentração crescentes de álcool etílico, iniciando com álcool a 70 graus Gay Lussac (°GL) e finalizado com álcool absoluto, realizada em seis horas. Segue-se com 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 será imerso em um molde retangular que continha parafina líquida, em seguida solidificada em temperatura ambiente. Os blocos com tecidos incluídos são seccionados em micrótomo, obtendo-se cortes histológicos longitudinais e semi seriados de cinco micrômetros de espessura. Para a visualização dos componentes teciduais deve ser realizada feita a coloração pela hematoxilina-eosina (HE).

3. CAPÍTULO 1 – ARTIGO CIENTÍFICO

Este capítulo originou um artigo científico que será submetido para publicação na revista Semina: Ciências Agrárias.

DESEMPENHO PRODUTIVO E ANÁLISE ECONÔMICA DE FRANGOS DE CORTE APÓS VACINAÇÃO COM UMA VACINA VIVA ATENUADA CONTRA COCCIDIÓSE AVIÁRIA

Letícia da Silva Giacomini¹; Fernanda Silveira Flores Vogel^{2*}; Luis Antônio Sangione³; Fagner D'ambroso Fernandes⁴; Diego Franco Sturza⁵; Bruno Ruberto Schavetock⁶; Diogo Liberalesso⁷.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da vacinação contra coccidiose aviária (vacina comercial viva atenuada LIVACOX® T) frente a um desafio, e sua correlação com o desempenho produtivo, econômico, observação clínica e excreção de oocistos em frangos de corte. Para tanto, 420 pintainhos de 1 dia da linhagem Cobb, foram divididos em cinco grupos de 84 aves divididas em 6 gaiolas por grupo: G1. Grupo controle não vacinado e não desafiado; G2. Grupo controle vacinado com 10 ul da vacina no dia (zero); G3. Grupo desafiado com 200 ul da vacina no dia 1; G4. Grupo vacinado no dia (zero) e desafiado no dia 14; G5. Grupo não vacinado, porém desafiado no dia 14. A vacinação via oral foi realizada na dose de 300 a 500 oocistos. Após a vacinação, os grupos 3, 4 e 5 foram desafiados via oral com 6.000 à 10.000 oocistos (equivalente a 20 vezes a dose da vacina). Durante todo o período do experimento (28 dias) foram avaliados os sinais clínicos, avaliou-se o peso e a conversão alimentar das aves e foram coletadas fezes para avaliação de excreção de oocistos. Além disso, também foi realizada análise macroscópica de lesões intestinais das aves. Pode-se observar que tanto após a vacinação dos grupos 2, 3 e 4 quanto após o desafio nos grupos 4 e 5 houve aumento na excreção de oocistos. Em relação aos sinais clínicos, no 14º e 21º dia no grupo 3 foram observados em sinais clínicos mais intensos como debilidade e ausência de apetite, as fezes apresentaram-se com consistência aquosa e fétida. Nas avaliações macroscópicas realizadas no 7º e 14º dia nos animais do grupo 3 foram visualizadas vilosidades hemorrágicas, presença de muco e descamação. Já na análise do ganho de peso, se compararmos nossos resultados dos pesos finais entre os grupos 3 e 4, temos uma diferença de -105,74g por ave. Logo, se multiplicarmos este valor pelo número de aves abatidas por dia em um frigorífico de médio/grande porte (250.000), temos um montante de 26.435 kg a menos de carne de frango por dia de abate, representando 581.570kg de perdas mensais (22 dias de abate), ou cerca de R\$ 3.489.420,00 ou U\$\$ 872.355,00, considerando o valor comercial da carne de frango a R\$ 6,00/kg ou U\$\$ 1,5/kg. Desta forma, fica evidente o impacto produtivo e econômico da coccidiose em aves, e destaca-se a importância da vacinação para prevenir a ocorrência da doença e desta forma reduzir as perdas.

Palavras-chave: Coccidiose aviária, Frangos de corte, Vacinação, Desafio.

INTRODUÇÃO

A coccidiose aviária é causada por protozoários do gênero *Eimeria*, em que as principais espécies diagnosticadas são: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. Tenella* (Lillehoj et al., 2004) e (Shirley et al., 2007). Também cabe

ressaltar que normalmente pode ser encontrada mais de uma espécie do coccídio no trato alimentar das aves submetidas ao diagnóstico (Williams et al., 1996).

Esta enfermidade está associada à mortalidade, má absorção, má utilização da ração e crescimento prejudicado em frangos de corte. Os sinais clínicos variam de acordo com a espécie, taxa de infecção e a patogenicidade varia de leve a grave (Williams, 1999). Atualmente, a coccidiose clínica grave é relativamente incomum, e a condição mais freqüente que afeta as aves é a forma subclínica, que dá origem à maiores perdas econômicas, uma vez que não são diagnosticadas devido a não apresentação de sinais clínicos (Williams, 1999).

No Brasil, um dos maiores produtores de aves do mundo, há poucos estudos que descrevem o impacto econômico desta patologia nos sistemas de integração avícola, e ainda não são descritos clínica e monetariamente os benefícios ocasionados pela vacinação. Em levantamento realizado em 1993 junto a empresas avícolas brasileiras, concluiu-se que a percentagem de lotes afetados por coccidiose clínica ou subclínica variou, entre diferentes empresas, de 1% a 15%. Além disso, estima-se que as perdas decorrentes da coccidiose subclínica chegam a US\$ 19,1 milhões anuais, sendo US\$ 11,85 milhões em perdas de carne e US\$ 7,25 milhões em consumo de ração (CASTRO, 1994). Ressaltamos aqui que são necessários estudos atuais em relação aos impactos supracitados.

Em relação à resposta imune das aves frente a infecção, como o ciclo de vida de eimeria é complexo e compreende os estágios intracelular, extracelular, assexual e sexual, não é surpresa que a imunidade do hospedeiro também seja complexa e envolva muitas facetas inespecíficas (barreiras físicas, fagócitos e leucócitos e o sistema complemento) e específicas à imunidade, a última abrangendo mecanismos imunes celulares e humorais (Lillehoj, 1999). Como para outras infecções por protozoários intracelulares, a imunidade humoral de mucosas é importante para evitar a internalização nos enterócitos, e a resposta celular por linfócitos T citotóxicos para determinar a lise de células infectadas (Mcdougald, 1997).

Logo, como medida preventiva, tem-se adotado a prática da vacinação. Neste contexto, existem diferentes vacinas no mercado, que compreendem mais de uma espécie de *Eimeria*, devido à baixa reatividade sorológica cruzada entre as espécies (Smith et al., 2008). Vacinas por via oral com oocistos esporulados resultam em infecções de baixo grau, induzindo uma resposta imune protetora que é potencializada pela reinfecção tanto do antígeno vacinal como por cepas de campo (Smith et al., 2008). O propósito da vacina é induzir uma resposta humoral e celular de maior magnitude com o mínimo de lesão tecidual (Smith et al., 2008).

No entanto, a vacinação contra a coccidiose tem suas desvantagens. Entre eles a possibilidade de não imunizar para todas as cepas/isolados de campo e de interferir no desempenho dos animais (Tizard, 2002). Efeitos conflitantes sobre o desempenho do crescimento de frangos de corte (ganho de peso corporal e taxa de conversão alimentar), foram relatados em estudos de eficácia comparando programas de vacinação e o uso ionóforos na dieta das aves (Shirley et al., 2007).

Por outro lado, se a vacinação contribui para uma menor ocorrência da coccidiose, existem outros fatores que podem estar presentes em uma criação comercial de frangos de corte e que, potencialmente, possam interferir com a imunidade, favorecendo a coccidiose. Entre eles destacam-se o estresse, as deficiências de nutrientes, os agentes virais e as micotoxinas, os quais podem determinar estado imunossupressivo nas aves (Kawazoe, 2000).

Tendo em vista que o Brasil é um dos maiores produtores de aves do mundo, e que há poucos estudos que descrevem o impacto econômico desta patologia nos sistemas de integração avícola, e ainda não são descritos os benefícios clínicos e econômicos ocasionados pela vacinação, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da vacinação e sua correlação com o desempenho produtivo e econômico em frangos de corte criados experimentalmente, quando submetidos a um protocolo de vacinação para coccidiose e posteriormente desafiados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Formação dos grupos

Após o recebimento de 420 pintainhos de 1 dia, da linhagem Cobb, com peso médio inicial de 45 gramas (com coeficiente de variação de três gramas), realizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco grupos de 84 aves e seis repetições de 14 aves cada. Os grupos foram divididos da seguinte forma G1. Grupo controle não vacinado e não desafiado; G2. Grupo controle vacinado no dia (zero); G3. Grupo desafiado com 200 µl da vacina no dia 1; G4. Grupo vacinado no dia (zero) e desafiado no dia 14 e G5. Grupo não vacinado, porém desafiado no dia 14. O experimento teve duração de 28 dias.

Instalações e equipamentos

O experimento foi realizado no Instituto SAMITEC (Instituto de Soluções Analíticas, Microbiológicas e Tecnológicas Ltda.) localizado na cidade de Santa Maria no estado do Rio Grande do Sul. As aves foram alojadas em sala com sistema de controle de temperatura ambiental inicial (30 ± 1 °C) e exaustão para eliminação de gases. Os animais foram distribuídos em gaiolas (0,25 m² e 33cm de altura) equipadas com comedouros semiautomáticos e bebedouros automáticos.

Dieta Experimental

As aves receberam água *ad libitum* e ração a um volume de 120 g/ave/dia. As dietas isonutritivas foram formuladas de acordo com as exigências do NRC (1998), após avaliação pela tecnologia NIRS, composta de milho, farelo de soja, calcário calcítico e premix vitamínico/mineral. As matérias-primas e as dietas experimentais foram analisadas para presença de micotoxinas (aflatoxinas, zearalenona, deoxinivalenol, fumonisinas,

diacetoxiscirpenol, toxina T-2 e ocratoxina A). Nenhuma micotoxina foi detectada nas matérias-primas utilizadas.

Vacina

A vacinação via oral foi realizada de acordo com a descrição dos grupos acima, com uma vacina comercial viva atenuada (**LIVACOX[®] T**) que contém em sua formulação oocistos viáveis de três espécies de *Eimeria*: *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, na dose de 300 a 500 oocistos por ave. Foram vacinadas no primeiro dia de vida das aves dos grupos 2 e 4. A vacinação foi realizada com auxílio de uma pipeta, via oral, sendo 10ul por ave, como recomenda o fabricante.

Tabela 1 – Fórmula da **LIVACOX[®] T** contendo 1.000 doses.

<i>Eimeria acervulina</i>	3.0 a 5.0 x 10 ^{5.0} oocistos/ml
<i>Eimeria maxima</i>	3.0 a 5.0 x 10 ^{5.0} oocistos/ml
<i>Eimeria tenella</i>	3.0 a 5.0 x 10 ^{5.0} oocistos/ml

Desafio Vacinal

O desafio vacinal foi realizado utilizando 200 ul (6.000 à 10.000 oocistos) da vacina **LIVACOX[®] T**. Os grupos 3, 4 e 5 foram submetidos ao desafio. As aves do grupo 3 foram submetidas ao desafio no primeiro dia de vida e as aves dos grupos 4 e 5 no 14º dia. Assim como a vacinação o desafio foi realizado com o auxílio de uma pipeta.

Desempenho zootécnico

Para avaliação do desempenho zootécnico durante os 28 dias as aves foram pesadas, assim como o consumo de ração. As pesagens foram realizadas semanalmente (dias 0, 7, 14, 21, 28), seguindo o mesmo horário e sequência, durante todo experimento. A ração foi pesada

semanalmente, junto com a pesagem das aves. A conversão alimentar foi estimada através da relação consumo (kg/ave/dia) dividida pelo ganho de peso (kg/ave/dia).

Coleta de fezes

Para avaliação de excreção de oocistos, período mínimo pré-patente e tempo de esporulação com posterior quantificação dos oocistos encontrados, foram colhidas amostras de *pool* de cama e fezes, coletadas superficialmente, na parte central das bandejas de todas as gaiolas do teste, nos dias (0, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 21).

As amostras foram acondicionadas em recipiente estéril, transportadas em caixa de isopor refrigerada e enviadas ao Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) para processamento. Para análise de positividade das amostras, as fezes foram processadas utilizando a técnica de centrifugação por flutuação em solução saturada de sacarose a concentração de 35% e densidade de 1,2 g/mL (Sheater, 1923).

Avaliação macroscópica

As necropsias foram realizadas semanalmente, sendo 2 aves necropsiadas por repetição nos dias (0, 7, 14, 21, 28) para avaliar os escores de lesões intestinais de acordo com o método descrito por (Johnson & Reid, 1970).

Análise Estatística

Todos os dados obtidos neste experimento foram submetidos à análise de variância (One-way ANOVA). Quaisquer diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Bonferroni ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora sejam escassos no Brasil estudos relacionados à importância, a eficácia de vacinas e principalmente ao impacto econômico da coccidiose em aves, no restante do mundo esses aspectos já são relatados (Mcdougald, 1997). Shirley et al. (2007) sugerem que a perda econômica devido a coccidiose seja de aproximadamente 750 milhões de dólares por ano na Inglaterra. Essa perda está associada tanto a diminuição da produtividade, mortalidade e gastos com drogas anticoccidianas. Para controlar a coccidiose, uma das alternativas mais comumente utilizadas é a vacinação (FDA, 2011). Nesse sentido, é descrito que a vacinação seja uma importante estratégia (Lee et al., 2007; Wang et al., 2015; Muir et al., 2000).

A partir dos nossos resultados de peso vivo (TABELA 3), podemos fazer uma correlação econômica da influência da vacinação com o peso vivo final das aves. Embora as diferenças sejam aparentemente pequenas em números exatos, quando extrapolamos isso para a realidade da avicultura brasileira (criação em grande escala, em que são alojadas em torno de 20.000 aves por aviário, e alguns frigoríficos possuem capacidade de abate de cerca de 250.000 aves ou mais por dia), essas diferenças podem representar um montante muito grande de perdas produtivas e econômicas, pois é de conhecimento que, na avicultura, essas pequenas quantidades individuais de perda, quando analisadas numa produção em grande escala, são muito impactantes (Oliveira & Gai, 2016).

Neste sentido, se compararmos nossos resultados dos pesos finais dos diferentes grupos deste estudo (TABELA 3), como por exemplo, do grupo não vacinado e desafiado (G3) com o grupo vacinado e desafiado (G4), temos uma diferença de -105,74g por ave. Logo, como estimativa, se multiplicarmos este valor pelo número de aves abatidas por dia (250.000), como descrito no parágrafo anterior, temos um montante de 26.435 kg a menos de carne de frango por dia de abate, algo extremamente significativo. Porém, os dados se tornam ainda mais impactantes quando multiplicamos isso pelos dias de abate em um mês (em torno

de 22 dias/mês). Com este cálculo, chegamos a perdas produtivas de 581.570kg de perdas mensais.

Mas podemos ir além e representar isso monetariamente: multiplicando o montante de perdas mensais (581.570kg) pelo valor comercial da carne de frango (R\$ 6,00/kg ou U\$\$ 1,5/kg), chegamos a valores de R\$ 3.489.420,00 ou U\$\$ 872.355,00. Desta forma, fica evidente o impacto produtivo e econômico da coccidiose em aves, e destaca-se a importância da vacinação para prevenir a ocorrência da doença, e desta forma reduzir as perdas econômicas.

Ainda, nota-se que os animais dos grupos 3 e 5 (TABELA 3), mantiveram um ganho de peso abaixo da média geral o que pode ser diretamente relacionado ao desafio, simulando uma infecção. Segundo Freitas et al. (2008) animais infectados com *Eimeria spp.*, mesmo após o término do período patente, apresentam um desempenho zootécnico comprometido, onde as aves infectadas apresentaram baixo ganho de peso quando comparadas aos animais saudáveis. No presente estudo, os animais desafiados apresentaram perda de peso durante a infecção, sendo que após o pico de excreção de oocistos (FIGURA 1), as aves ganharam peso (TABELA 3). Possivelmente, isso ocorreu devido a uma absorção compensatória dos nutrientes por regiões saudáveis ou pouco danificadas pelo parasita, conferindo um determinado ganho de peso mesmo durante a infecção. Estes resultados confirmam que a dose desafio utilizada neste experimento foi eficiente, pois as aves apresentaram redução no ganho de peso (TABELA 3).

Estes dados, associados à excreção de oocistos nas fezes (FIGURA 1), indicam a eficiência da dose desafio, sem observação de mortalidade. Contudo, outros trabalhos evidenciaram além de um baixo desempenho, mortalidade (Muir et al., 2000). Esses dados são corroborados pelo fato de que não houve diferença estatística quando se analisa a conversão alimentar entre os grupos, mas sim diferença no peso final (TABELA 3).

Outra importante observação, é que pesquisas anteriores indicaram que a vacinação contra eimeirose deprime o crescimento de frango de corte em idade jovem (Lee et al., 2007). Porém, no presente estudo, a vacinação não resultou em perda de desempenho, e somente pode-se observar diminuição de desempenho nas aves desafiadas, conforme demonstramos nos cálculos supracitados (TABELA 3). No grupo 3 e 5 nos dias (1 e 14) respectivamente, uma coccidiose clínica foi induzida. O intestino apresentou hemorragia o que corroborou com a diminuição de consumo de ração. Uma possível explicação é que os animais, naquele momento, não haviam desenvolvido uma imunidade suficientemente protetiva. Com isso, baseado nos resultados deste trabalho, pode-se inferir que provavelmente os animais imunizados não estariam totalmente protegidos frente a um alto desafio com isolados de campo de eimeria.

Em paralelo ao crescimento das aves, o consumo de ração foi estatisticamente menor apenas nos animais desafiados e não vacinados (grupos 3 e 5 - TABELA 2), e isso está diretamente associado à perda de apetite observada nesses animais, e por consequência, menor ganho de peso. Nos animais vacinados não houve diferença no consumo de ração, o que reafirma a atenuação do antígeno vacinal.. Este resultado corrobora com Lee et al. (2007), que ao trabalhar com *Rattus norvegicus* desafiados experimentalmente com *Eimeria spp*, relatou que o consumo de ração dos animais pertencentes ao grupo dos animais infectados foi inferior em relação ao grupo dos animais saudáveis.

Também cabe ressaltar que em infecções causadas por *Eimeria spp*. é comum o aparecimento de distúrbios gastrointestinais devido ação do parasito na parede intestinal do animal. Estes parasitas intracelulares multiplicam-se no intestino, causando destruição tecidual e prejudicando a digestão e a absorção dos alimentos, o que resulta em diarreia aquosa e até hemorrágica. Ao mesmo tempo, ocorre o comprometimento da absorção de água, fato que determina desidratação (Mcdougald, 1997). Alteração na consistência das fezes foi

observada apenas nos grupos desafiados. Este resultado já foi observado por Biggs (2007) e indica que o desafio foi suficiente para determinar o aparecimento de sinais clínicos leves. Além da consistência aquosa das fezes foi observado passagem de ração nos animais dos grupos 4 e 5 aos sete e quatorze dias após desafio.

As aves dos grupos vacinados apresentaram excreção de oocistos após vacinação, mas não foram detectados sinais clínicos evidentes o que demonstra ao mesmo tempo a eficiência da replicação e a atenuação. Sinais clínicos observados nos animais dos grupos 3, 4 e 5 (desafiados), como prostração e perda de apetite após desafio demonstram a eficiência do desafio bem como reforça a importância da coccidiose no desempenho de frangos de corte. Dados similares foram relatados por Freitas et al. (2008), os quais utilizaram uma dose de 10^6 oocistos esporulados de *E. acervulina* para infectar frangos de corte, sendo que os animais apresentaram sinais como anorexia, seguida de um quadro de apatia e diarreia fétida com pequenas estrias esbranquiçadas, oriundas de lesões da parede intestinal resultante da alta carga parasitária. Com isso, espera-se que vacinas vivas atenuadas, por sua vez, baseiam-se em cepas de oocistos de baixa virulência atenuados, sejam capazes de se reproduzir, mas que não determinem alterações patológicas e sinais clínicos. No entanto, a replicação vacinal deve ser suficiente para desencadear a resposta imune nas aves vacinadas (Allen & Fetterer, 2002).

As alterações macroscópicas evidenciadas nesse trabalho, no grupo 3 (dia 14, 21 e 28) e grupo 5 (dia 28) como bursa de Fabricius aumentadas de tamanho e tonsilas cecais hiperêmicas podem estar associadas à adaptação da imunidade a nível intestinal uma vez que nenhum animal do grupo 1 apresentou essas alterações. Segundo Befus et. al (1980), a resposta imune contra a coccidiose nas aves ocorre nos tecidos linfóides associados ao intestino (GALT). Nas aves, os tecidos linfóides associados ao intestino são extensos e incluem a bursa de Fabricius, as tonsilas cecais, as placas de Peyer e linfócitos agregados ao epitélio e a lâmina própria da parede do trato gastrointestinal (Befus et al., 1980).

Todas essas lesões, além de desacelerar a taxa de crescimento dos frangos de corte, também podem deprimir o crescimento do intestino dos mesmos. Champan (2014) resumiu que infecções com *Eimeria spp.* podem resultar em má absorção de nutrientes (*E. acervulina* e *E. mitis*), em inflamação epitelial (*E. maxima*) e destruição das vilosidades (*E. tenella*). Com isso, ocorre absorção inadequada de nutrientes, incluindo L-arginina, treonina (Wils-Plotz et al., 2013) e vitamina E (Allan & Fetterer, 2002) por células epiteliais, o que pode levar a morte do animal. Neste estudo a morfologia da mucosa não foi significativamente afetada pela vacinação, no entanto as aves desafiadas apresentaram maior lesão tecidual. Isto indica que as aves desafiadas apresentaram um desenvolvimento intestinal deficiente, e por isso ganharam menos peso.

Os resultados aqui descritos também permitem determinar que a vacinação com oocistos viáveis e atenuados permitiu a replicação do protozoário com o mínimo de lesão tecidual e que foi capaz de controlar parcialmente a replicação do protozoário após desafio. Neste sentido, a excreção de oocistos após a vacinação e após o desafio indica que houve infecção pelo protozoário (FIGURA 1). A excreção de oocistos após a vacinação é um resultado já relatado por outros autores (De Gussen, 2007; Biggs et al., 2007; Champman, 2014). Ainda, após o desafio, pode-se observar uma redução da excreção de oocistos nos animais vacinados e desafiados quando comparados aos animais apenas desafiados o que sugere uma interferência (eficácia) da vacina e redução da taxa de excreção de oocistos. Resultado similar foi relatado por Teixeira (2007), em que frangos de corte apenas desafiados com *E. acervulina* pertencentes apresentaram uma maior eliminação de oocistos quando comparado aos grupos vacinados.

Além disso, nossos dados também mostram que a vacinação das aves nesse experimento foi capaz de conferir imunidade nas aves, mas não foi suficiente para evitar totalmente a replicação do protozoário após desafio. Ainda, também pode-se considerar que

houve uma proteção, uma vez que a excreção de oocistos foi muito inferior quando comparada a dos animais apenas desafiados (FIGURA 1). Somado a isso, a não detecção de oocistos nas fezes dos animais do grupo 1 demonstra a eficiência das medidas profiláticas que foram adotadas para se evitar a infecção entre os grupos experimentais.

FIGURA 1 – Excreção de oocistos durante o período experimental. G1; Controle negativo, G2; Vacinado dia zero(10ul da vacina LivaCox T), G3; Desafiado dia zero (200uL da vacina LivaCox T), G4; Vacinado dia zero(10uL da vacina LivaCox T) e desafiado vinte vezes (200uL da vacina LivaCox T administrada no 14º dia), G5; Não vacinado dia zero e desafiado (200uL da vacina LivaCox T no 14º dia).

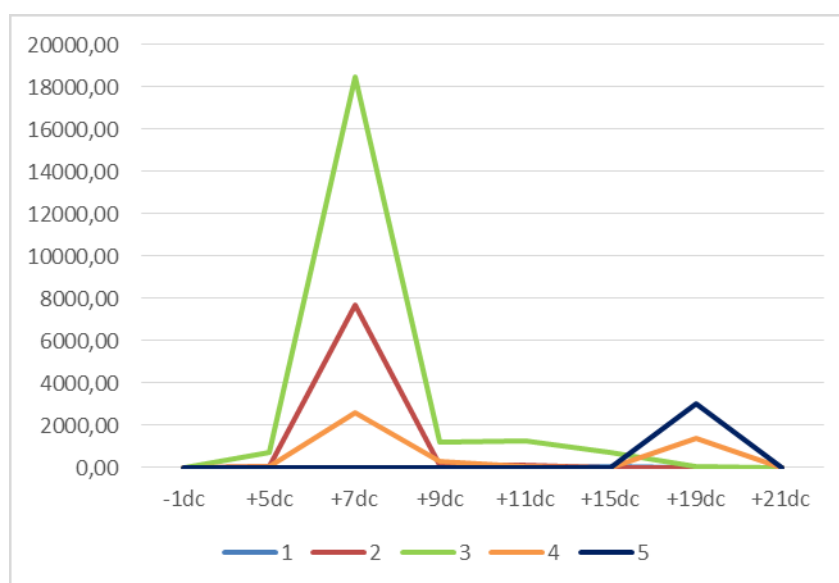


TABELA 2- Média do consumo de ração (C.R.) dos frangos de corte, saudáveis, vacinados e desafiados experimentalmente com vacina viva atenuada (LivaCox T @), contendo oocistos esporulados de E. acervulina, E. máxima e E. tenella, sendo composta pelos tratamentos; G1; Controle negativo, G2; Vacinado dia zero(10ul da vacina LivaCox T), G3; Desafiado dia zero (200uL da vacina LivaCox T), G4; Vacinado dia zero(10uL da vacina LivaCox T) e desafiado vinte vezes (200uL da vacina LivaCox T administrada no 14º dia), G5; Não vacinado dia zero e desafiado (200uL da vacina LivaCox T no 14º dia).

Grupo	C.R. 0 - 7 d	C.R. 1-14d	C.R. 1-21d	C.R.1-28d
1	162,20	551,63	1160,33	1830,08

2	153,22	540,22	1154,59	1838,59
3	133,468*	527,173	1116,86	1744,08
4	151,92	535,106	1127,80	1849,06
5	154,93	541,438	1107,18*	1745,9

(*) Valores do mesmo parâmetro seguidos de * indicam valores estatisticamente diferentes pelo o teste de Bonferroni ($P \leq 0,05$) Unidade de medida (g).

TABELA 3- Média de peso vivo (P.V.) em frangos de corte, saudáveis, vacinados e desafiados experimentalmente com vacina viva atenuada (LivaCox T @), contendo oocistos esporulados de *E. acervulina*, *E. máxima* e *E. tenella*, sendo composta pelos tratamentos; G1; Controle negativo, G2; Vacinado dia zero(10ul da vacina LivaCox T), G3; Desafiado dia zero (200uL da vacina LivaCox T), G4; Vacinado dia zero(10uL da vacina LivaCox T) e desafiado vinte vezes (200uL da vacina LivaCox T administrada no 14º dia), G5; Não vacinado dia zero e desafiado (200uL da vacina LivaCox T no 14º dia).

Grupo	P.V. 1d	P.V.7d	P.V. 14d	P.V. 21d	P.V. 28d
1	45,49	181,18	474,89	859,72	1187,74
2	45,09	175,01	455,06	827,10	1165
3	45,41	148,611*	411,515*	804,98	1112,93
4	45,10	171,26	445,71	844,26	1218,67
5	45,56	173,65	445,70	833,23	1133,24

(*) Valores do mesmo parâmetro seguidos de * indicam valores estatisticamente diferentes pelo o teste de Bonferroni ($P \leq 0,05$) Unidade de medida (g).

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que, com a vacinação com oocistos viáveis atenuados de *Eimeria spp.* fica evidente o impacto produtivo e econômico da coccidiose em aves, e destaca-se também a importância da vacinação para prevenir a ocorrência da doença e desta forma reduzir as perdas.

Reconhecimentos. - Os autores reconhecem que a pesquisa foi financiada em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil – código financeiro 001.

Declaração de conflito de interesse. - Os autores declaram que não houve conflito de interesse com relação à pesquisa, autoria e/ou publicação deste artigo.

Agradecimentos.- Ao Setor de Doenças Parasitárias, UFSM, a professora Fernanda S. Flores. Ao local do experimento Instituto SAMITEC (Instituto de Soluções Analíticas, Microbiológicas e Tecnológicas Ltda.

REFERÊNCIAS

- Allen, P. C., Fetterer, R. H. 2002. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, n. 1, p. 58-65.
- Befus, A.D., Johnston, N., Leslie G.A., Bienenstock J. 1980. Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny and some functional characteristics of Peyer's patches, *Journal of immunology*, Baltimore, v.125, n. 6, p. 2626-2632.
- Biggs P., C. M. Parsons G. C., Bozkurt M., Aysul N., Kucukyilmaz K. 2007. The effects of several oligosaccharides on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. *Poultry Science* 86:2327–2336.
- Chapman, H. D. 2014. Milestones in avian coccidiosis research: a review. *Poultry Science*. 93:501–511.
- De Gussem, M. 2007. Coccidiosis in poultry: Review on diagnosis, control, prevention and interaction with overall gut health. *Poult. Nutr. World's Poultry Science Association*, Pages 253–261.
- FDA. 2011. Summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals. Center for Veterinary Medicine.
- FDA. 2012. Drug use review. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Office of Surveillance and Epidemiology.

- Freitas F. L., Da C., Almeida K. DE S., Nascimento A. A. DO, Tebaldi J. H., Machado R. Z., & Machado C. R. 2008. Aspectos clínicos e patológicos em frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*) infectados experimentalmente com oocistos esporulados de *Eimeria acervulina* Tyzzer, 1929. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 17(1), 16–20.
- Oliveira. P. L. & Gai. F. V. 2016. Desempenho de frango de corte em aviários convencional e aviários dark house. ISSN 2175-2214 Volume 9 - n°, p. 93 – 101.
- Johnson J., Reid W.M. 1970. Anticoccidial Drugs: Lesion scoring techniques in Battery and Floor-Pen Experiments with chickens. Experimental Parasitology, v. 28: p. 30-36.
- Kawazoe U., Berchieri júnior A., Macari M. 2000. Coccidiose. Doenças das aves, Editora FACTA, Campinas, p.391-405.
- Lee S.H., Lillehoj H.S., Dalloul R.S., Park D.W., Hong Y.H., Lin J.J. 2007. Influence of *Pediococcus*: based probiotic on coccidiosis in broiler chickens. Poultry Science, Champaing, v.86, n.1, p.63-66.
- Lillehoj H.S. 1999. Imunologia em coccidiose aviária. In: Anais do Simpósio Internacional sobre Coccidiose Aviária; Foz do Iguaçu. p.23-33.
- Lillehoj E.P., Yunc H., Lillehoj H. S. 2004. Vaccines against the avian enteropathogens *Eimeria*, *Cryptosporidium* and *Salmonella*. Animal Health Research Reviews, v. 1, n. 1, p. 47-65.
- McDougald L. R. 1997. Protozoa. In: CALNEK, B. W. 10. ed. Diseases of Poultry. Iowa: Iowa State University Press, p. 865-883.
- Muir W.I., Bryden W.L.; Husband A.J. 2000. Immunity, vaccination and the avian intestinal tract. Developmental and Comparative Immunology. n.24, p.325 – 342.
- Morehouse N.F., Mcguire W.C.1958. The pathogenicity of *Eimeria acervulina*. Poultry Science. v.37, n. 1, p.665-672.
- Shirley, M. W. et al. 2007. Challenges in the successful control of the avian coccidian. Vaccine, v. 25, p. 5540–5547.
- Smith A.L., Beal R. 2008. The avian enteric immune system in health and disease. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT K.A. Avian Immunology. Academic Press, London, cap. 13, p. 243–271.
- Sheater, A. L. 1923. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. J.Comp. Ther., v. 36, p. 266-275.
- Tizard, I. R.2002. The avian antibody response. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, v. 11, n. 1, p. 2-14.
- Teixeira M. 2007. Anátomo-Clínica e Biologia em Frangos de Corte Experimentalmente Infectados com *Eimeria acervulina* e Suplementados com Betaína. Tese (Doutor em Ciências Veterinárias, Área de concentração em Sanidade Animal. UNIVERSIDADE

FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO DE VETERINÁRIA,
Seropédica, RJ.

Wang X., E. D. Peebles T. W., Morgan R. L., Harkess A., W. Zhai. 2015. Protein source and nutrient density in the diets of male broilers from 8 to 21 d of age: Effects on small intestine morphology. *Poult. Sci.* 94:61–67.

Williams R.B., Burshell A.C., Réperant T.G., Doy T.G.; Frémont J.H.Y. 1996. A survey of *Eimeria* species in commercially reared chickens in France during 1994. *Avian Pathology*, Sidney, n.25, p.113-130, may.

Williams R.B.1999. A compartmentalized model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chickens production industry. *International Journal for Parasitology*, Sidney, n.29, p.1209 – 1229.

Wils-Plotz E. L., M. C. Jenkins and R. N. DILGER.2013. Modulation of the intestinal environment, innate immune response, and barrier function by dietary threonine and purified fiber during a coccidiosis challenge in broiler chicks. *Poult. Sci.* 92:735–745.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que a vacinação com oocistos viáveis de *Eimeria spp.* não afetou o desempenho produtivo das aves e que as aves vacinadas excretaram uma menor taxa de oocistos após desafio quando comparadas as aves não vacinadas e desafiadas, demonstrando uma proteção parcial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, P. C.; FETTERER, R. H., 2002. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, n. 1, p. 58-65.
- AHID, S. M. M., 2009. Apostila Didática em Protozoologia Veterinária. Universidade Federal Rural do Semi-árido.
- AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNIL, Z., 2004. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poultry Sciences*, v. 83, p. 1093-1098.
- AVILA, V.S. et al., 1992. Cama de aviário: materiais, reutilização, uso como alimento e fertilizante. Circular técnica, 16. Concórdia: EMBRAPA, p. 38.
- BERNARDINO, A; MENDES, A. A.; NÄÄS, I. A.; MACARI, M., 2004 Programas de vacinação. Produção de Frangos de Corte. 1ª edição. Editora FACTA. Campinas, p 179-202.
- BORDIN, E. L., 1999. Patologia e patogenia da coccidiose das aves, Simpósio internacional sobre coccidiose aviária, Editora FACTA, Campinas, p. 5-7.
- BOWMAN, D. D., 2010. *Parasitologia Veterinária de Georgis*. 9º ed. Elsevier.
- BUTAYE, P. et al., 2003. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n. 2, p. 175-188.
- CASTRO, A. G. M., 1994. Situação atual da coccidiose no Brasil: importância econômica. In: Simpósio Internacional de Coccidiose. Editora FACTA, Campinas, p. 45-54.
- CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARO, C.W.; et al., 1991. *Diseases of Poultry*. 9 ed., Wolfe Publishing Ltd, Iowa, USA.
- CHAPMAN, H. D., 1997. Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian Pathology*, v. 26, p. 221-244.
- CONWAY, D. P.; MCKENZIE, E. M., 2007. *Poultry coccidiosis: diagnostic and testing procedures*. Blackwell Publishing Professional 3 rd ed. Iowa, EUA, p. 168.
- DANFORTH, H. D.; RUFF, M. D., 1999. Mecanismo de indução de resistência às drogas anti-coccidianas. SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COCCIDIOSE AVIÁRIA, Editora FACTA, Campinas, p. 45-51.
- FERREIRA, A. J. P.; REVOLLEDO, L., 2005. Anticoccidianos. *Farmacologia aplicada à avicultura*. São Paulo, p. 189.
- FORTES, E., 2004. *Parasitologia Veterinária*, 4º ed.

GONÇALVEZ, G. A. M.; MARTINS, T. F.; LIMA, E. T.; et al., 2006. Prevalência de endoparasitas em amostras fecais de aves silvestres e exóticas examinadas no Laboratório de Enfermidades Parasitárias da FMVZ – UNOESP/BOTUCATU – SP, Sociedade Paulista de Zoológicos.

JEFFREY, J.S.; KIRK, J.H., ATWILL, E.R.; CULLOR, J.S., 1998. Prevalence of selected microbial pathogens in processed poultry waste used as dairy cattle feed. *Poultry Science*, v. 77, p. 808-811.

JORGENSEN, W. K. et al., 1997. Isolation and pathogenicity of Australian strains of *Eimeria praecox* and *Eimeria mitis* Australian veterinary Journal, v. 75, n. 8, p. 592-595.

KAWAZOE, U; BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M., 2000. Coccidiose. Doenças das aves, Editora FACTA, Campinas, p.391-405.

KELLEY, T.R.; PANCORBO, O.C.; MERKA, W.C. et. al., 1995. Bacterial pathogens and indicators in poultry litter during re-utilization. *Journal of Applied Poultry Research*, v. 4, 366-373.

KLEIN, U., 1996. Sensitivity of Field Isolates of Avian *Eimeria* to Different Salinomycin Products. Supplement World Poultry Misset, Boetinchem, p.26-29.

LILLEHOJ, E. P.; YUN, C. H.; LILLEHOJ, H. S., 2000. Vaccines against the avian enteropathogens *Eimeria*, *Cryptosporidium* and *Salmonella*. *Animal Health Research Reviews*, v. 1, n. 1, p. 47-65.

LONG, P. L.; REID, W. M., 1982. A guide for the diagnosis of coccidiosis in chickens. 2. ed. rev. aum. The University of Georgia / College of Agriculture, p. 17.

MATHIS, G. F.; BROUSSARD, C., 2006. Increased Level of *Eimeria* Sensitivity to Diclazuril After Using a Live Coccidial Vaccine. *Avian Diseases*, v. 50, p. 321–324.

McDOUGALD, L.R. et al. 1997. A survey of coccidia on 43 poultry farms in Argentina. *Avian Diseases*, v. 41, p. 923–932.

McDOUGALD, L.R., 2003. Coccidiosis. Disease of Poultry. 11. ed. Ames, Iowa State: University Press; p. 974 -991.

OUARZANE, M.; LABBÉ, M.; PÉRY P., 1998. Purification of first generation *Eimeria tenella* schizonts. *Journal of Parasitology*, v. 84, n. 5, p. 1027-1031.

POPE, M.J.; CHERRY, T. E., 1999. An evaluation of the presence of pathogens on broilers raised on Poultry Litter treatment. *Poultry Science*, v. 79, p.1351 – 1355.

SANTOS, R. F. S.; KAVAVATA, G. M.; ALMEIDA, S. M., 2003. Ocorrência de *Eimeria* sp em frangos de corte no estado de São Paulo. *ARS Veterinária, Jaboticabal*, v. 19, n. 3, p. 230-234.

SCHNITZLER, B. E.; SHIRLEY, M. W., 1999. Immunological aspects of infections with *Eimeria maxima*: a short review. *Avian Pathology*, v. 28, p. 537-543.

SHIRLEY, M. W. et al., 2007. Challenges in the successful control of the avian coccidian. *Vaccine*, v. 25, p. 5540–5547.

SMITH A.L., Beal R., 2008. The avian enteric immune system in health and disease. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT K.A. *Avian Immunology*. Academic Press, London, cap. 13, p. 243–271.

TERRA A.T. et al., 2001. Frequência de espécies do gênero *eimeria* em frangos de corte abatidos industrialmente no município de monte alegre do sul, estado de São Paulo. *Parasitologia Veterinária*, v. 10, n. 2, p. 87-90.

TIZARD, I. R., 2002. The avian antibody response. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, v. 11, n. 1, p. 2-14.

VERMEULEN, A. N.; SCHAAP, D.C.; SCHETTERS, T. H. P. M., 2001. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. *Veterinary Parasitology*, v.100, n. 1-2, p13-20.

WILLIAMS R.B., BURSHELL A.C., RÉPÉRANT T.G., DOY T.G.; FRÉMONT J.H.Y., 1996. A survey of *Eimeria* species in commercially reared chickens in France during 1994. *Avian Pathology*, Sidney, n.25, p.113-130, may.

WILLIAMS R.B,1999. A compartmentalized model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chickens production industry. *International Journal for Parasitology*, Sidney, n.29, p.1209 – 1229