

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



INSTITUTO DE BIOLOGIA

TALINE BUENO PÍNOLA

**“OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO
PRECOCE DE *EIMERIA MAXIMA* (APICOMPLEXA:
EIMERIIDAE)”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Taline Bueno Pínola
é aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Mestre
em Parasitologia.


Orientadora: Profa. Dra. URARA KAWAZOE

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

P656o

Pínola, Taline Bueno

Obtenção e caracterização de uma cepa precoce de *Eimeria Maxima* (Apicomplexa: Eimeriidae) / Taline Bueno Pínola. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadora: Urara Kawazoe.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Eimeriidae. 2. Coccidiose. 3. Cepa precoce. 4. Patogenicidade. I. Kawazoe, Urara, 1946-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Development and characterization of a precocious line of *Eimeria Maxima* (Apicomplexa: Eimeriidae).

Palavras-chave em inglês: Eimeriidae; Coccidiose; Precocious line; Pathogenicity.

Área de concentração: Parasitologia.

Titulação: Mestre em Parasitologia.

Banca examinadora: Urara Kawazoe, Selma Giorgio, Rosângela Zacarias Machado, Silmara Marques Allegretti.

Data da defesa: 11/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

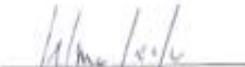
Campinas, 11 de FEVEREIRO de 2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra URARA KAWAZOE (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. SELMA GIORGIO


Assinatura

Profa. Dra. ROSÂNGELA ZACARIAS MACHADO


Assinatura

Profa. Dra. SILMARA MARQUES ALEGRETTI

Assinatura

Profa. Dra . ANA MARIA APARECIDA GUARALDO

Assinatura

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada "OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA CEPA PRECOCE DE *EIMERIA MAXIMA* (APICOMPLEXA: EIMERIIDAE)":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio/IB/UNICAMP (Protocolo nº _____), intitulado _____;

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP (Protocolo nº 1084-1); *PPM 4/9/2006*

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP (Protocolo nº _____);

() tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.
Especificar: _____

Taline Bueno Pinola

Aluno: Taline Bueno Pinola

Urara Kawazoe

Orientadora: Urara Kawazoe

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Profa. Dra. Anamaria A. Guarnido

Nome:

Função:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARNIDO
Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEAIIB - UNICAMP

Dedicatória

*Aos meus pais e irmãos pela
confiança e paciência.*

Agradecimentos

A DEUS por ter me dado a chance de alcançar mais um objetivo em minha vida e ter me dado forças para concluí-lo com satisfação e êxito.

À Profa Dra Urara Kawazoe pela imensa dedicação, compreensão, atenção e ética acima de tudo.

Aos meus pais Hélio Pínola Filho e Silvia Helena Bueno Pínola pela paciência, orientação e carinho cedidos durante a realização deste sonho.

Aos meus irmãos Rafaela Bueno Pínola e Gabriel Bueno Pínola por me agüentarem falar de frangos e vacinas e por não os deixar usar o computador.

Ao meu namorado Rodrigo Alberto Viaro pela paciência e companhia nos finais de semana e feriados passados no biotério e laboratório da UNICAMP. Pelas inúmeras viagens e passeios adiados. Por fazer sua moto saber ir de olhos fechados de Amparo à Campinas. Obrigada pela compreensão e carinho.

À técnica de laboratório Cirene Alves Lima pela colaboração durante os experimentos.

A todos os docentes do Departamento de Parasitologia que sempre estavam à disposição para esclarecimentos de dúvidas e pela ajuda na minha formação como Parasitologista.

A todos os funcionários do Departamento de Parasitologia da UNICAMP, especialmente ao técnico de laboratório João, por ajudar a descarregar os pesados sacos de ração.

Aos meus amigos e colegas do Departamento de Parasitologia, especialmente a Claudineide e Kelsen, pelas excelentes conversas, discussões e almoços.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida parcialmente durante o curso.

À Nutron Alimentos por fornecer ração às aves para a realização dos experimentos.

À Merial Saúde Animal e a Globo Aves pelo fornecimento das aves durante a realização dos experimentos.

Ao senhor Félix, motorista, que durante anos me cedeu carona no trajeto Amparo – Campinas.

E a todas as pessoas que dê alguma forma contribuíram para a realização e término deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

Resumo

Este estudo teve como objetivos obter o isolado precoce de *Eimeria maxima* "Ca" e posterior estudo comparativo da patogenicidade entre as aves (*Gallus gallus*) inoculadas com isolados: parental e precoce, com os seguintes critérios de avaliação: ganho de peso corporal, escore de lesão da mucosa intestinal e contagem de oocistos produzidos pelas aves infectadas. Para a obtenção do isolado precoce foram inoculados sucessivamente em aves saudáveis, os primeiros oocistos eliminados, a partir da geração parental. Os oocistos contidos nas fezes foram isolados e cultivados em solução de dicromato de potássio 2% para a esporulação. Através deste processo foram realizadas 25 passagens dos primeiros oocistos nas aves até a estabilização do período pré-patente. Foi obtida uma redução de 36 horas na eliminação dos primeiros oocistos, de 124h30min para 88h30min. Os isolados parental e precoce foram comparados quanto a patogenicidade, através da inoculação de doses específicas em aves saudáveis. Nesse estudo foram utilizadas 75 aves distribuídas em cinco grupos: I e II para a produção de oocistos, III e IV para ganho de peso e escore de lesão e grupo V como controle negativo (aves saudáveis). Houve uma diminuição significativa da patogenicidade em aves infectadas com o isolado precoce quando comparadas a aves inoculadas com a geração parental. As aves infectadas com o isolado precoce obtiveram uma média de escore de lesão da mucosa do intestino estatisticamente inferior à parental. O valor médio do escore de lesão obtido pelo isolado precoce foi de 0,77 enquanto que a geração parental 1,67. As aves infectadas com o isolado precoce apresentaram uma redução significativa na produção de oocistos, quando comparadas à respectiva geração parental. Apresentaram, também, ganho de peso estatisticamente superior em relação à geração parental. Este isolado precoce é um excelente candidato à produção e comercialização de uma vacina viva atenuada. No entanto, testes em bateria e no campo sobre imunidade protetora desse isolado precoce devem ser realizados no futuro que poderá caracterizá-lo confiável para o uso comercial como vacina viva atenuada no controle da coccidiose aviária.

Abstract

The aim of this study was to obtain a precocious line of *Eimeria maxima*, “Ca” strain and the comparative pathogenicity study between precocious line and parental strain. The criteria used for this evaluation was: body weight gain, lesion score of intestinal mucosa and oocyst counting dropped by infected chickens. The precocious line was obtained by successive oral inoculation of parental *E. maxima* oocysts in chickens. First oocysts eliminated after inoculation were collected, isolated and cultivated in 2% dichromate potassium solution for their sporulation. The pre-patent period of first oocysts elimination diminished and stabilized after 25 passages in chickens. It was obtained a time reduction of 36 hours between precocious line and parental strain: 124h30' for parental strain and 88h30' for precocious line. The comparative evaluation of pathogenicity between precocious line and parental strain were performed using body weight gain, lesion score and oocyst production compared to non - infected chickens in groups of five chickens per cage with three replications. Parental strain infected in chickens showed loss of body weight while in chickens inoculated with precocious line showed weight gain of 75% when compared to non-infected control birds. The lesion score of intestine mucosa was 0.8 for chickens with precocious line and 1.7 for parental strain showing statistically significant difference. The precocious line showed also significant less oocyst production than parental strain in infected chickens. The precocious line of *E. maxima* obtained in the present study seems a good candidate for live attenuated vaccine against avian coccidiosis although there is a need for complementary study about protective immunity in battery and field tests.

Keywords: Eimeria maxima; Attenuation; Precocious line; Pathogenicity, chickens.

Índice

1 – Introdução	1
1.1 – Biologia	2
1.2 – Medicamentos anticoccidianos e vacinas vivas	10
2 – Justificativa	16
3 – Objetivos	17
4 – Material e Métodos	18
4.1 – Obtenção do isolado precoce	20
4.2 – Produção de oocistos	21
4.3 – Patogenicidade	22
4.4 – Análise Estatística	24
5 – Resultados	26
5.1 – Obtenção de oocistos precoces de <i>E. maxima</i> “Ca”	26
5.2 – Estudo Comparativo da Patogenicidade entre as amostras parental e precoce de <i>E. maxima</i> “Ca”	29
5.2.1 – Ganho de peso corporal	29
5.2.2 – Escore de lesão da mucosa intestinal	32
5.2.3 – Produção de oocistos por ave	36
6 – Discussão	39
6.1 – Obtenção de oocistos precoces	39
6.2 – Patogenicidade	41
7 – Conclusões	49
8 – Referências Bibliográficas	50

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1: Ciclo de vida de <i>Eimeria</i> spp	5
Figura 2: Distribuição dos grupos de aves	26
Figura 3: Período pré-patente (horas) das gerações de <i>E. maxima</i> “Ca”	27
Figura 4: Comparação da porcentagem do ganho de peso entre as aves inoculadas com a geração parental e o isolado precoce de <i>E. maxima</i> “Ca” e as aves saudas (controle negativo)	31
Figura 5: Comparação dos valores médios do escore de lesão da mucosa intestinal entre as aves infectadas com a geração parental e o isolado precoce de <i>E. maxima</i> “Ca”	33
Figura 6: Aspecto macroscópico do duodeno e dos intestinos delgado anterior e médio de uma ave sadia (A) e de aves infectadas com a geração parental (B) e precoce (C) de <i>E. maxima</i> “Ca”, após sete dias de infecção	34
Figura 7 Comparação entre os intestinos das aves necropsiadas: controle negativo - não infectado (A), infectadas com o isolado precoce (B) e parental (C)	35
Figura 8: Eliminação de oocistos de <i>E. maxima</i> “Ca” parental e precoce entre o quinto e o décimo sexto dia após inoculação em aves saudas	37
Figura 9: Fezes eliminadas pelas aves infectadas com a geração parental (A) e precoce (B)	38
Quadro 1: Características diferenciais das espécies de <i>Eimeria</i>	9
Quadro 2: Características das vacinas vivas contra coccidiose aviária	13
Quadro 3: Características do escore de lesão para <i>Eimeria maxima</i>	24
Tabela 1: Obtenção de oocistos precoces de <i>E. maxima</i> “Ca” através de passagens sucessivas em aves experimentalmente inoculadas	28
Tabela 2: Comparação da patogenicidade entre a geração parental, isolado precoce de <i>E. maxima</i> “Ca” e o controle negativo	30

1 - Introdução

A avicultura brasileira está situada entre as maiores do mundo, possuindo cerca de 32 milhões de matrizes de corte em alojamento no mês de agosto de 2008 e estimativa de 11 milhões de toneladas de carne de frango e 5,2 bilhões de cabeças de pintos de corte até o final do ano, segundo a União Brasileira de Avicultura (UBA, 2008) e a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF, 2008). A produção nacional de carne de frango *per capita* estimada para o ano de 2008 é de 38,5 quilogramas, correspondendo a um aumento de 1,8% ao ano anterior segundo a UBA. Com esses dados, o Brasil é considerado o maior exportador do mundo no ano de 2008 com um total estimado até ao final do ano em 3,8 milhões de toneladas de carne de frango exportados para diversos países correspondendo a um aumento de 16,3% em relação ao ano anterior e, o terceiro maior produtor, ficando atrás somente de Estados Unidos e China. O desempenho do Brasil e dos outros países produtores no setor da avicultura, poderia ser melhor se não fossem as doenças que afetam a produção gerando perdas econômicas.

Os parasitos em geral são as principais causas de prejuízos econômicos para a indústria avícola mundial. Dentre os parasitos aviários, os protozoários coccídeos são os mais importantes. No Brasil, não existem dados recentes visando determinar as perdas anuais do setor avícola por coccidiose, mas Castro (1994) considerou que os prejuízos anuais associados a essa parasitose podem chegar a US\$ 30 milhões e, segundo Bellaver *et al.* (2005), a doença atingiu 65% das empresas do setor no ano de 2005. Calcula-se que os gastos mundiais com

esta doença, incluindo os prejuízos zootécnicos e a utilização de medicamentos com fim preventivo e curativo cheguem a 800 milhões de dólares anualmente (Allen & Fetterer, 2002).

A coccidiose aviária é uma das doenças parasitárias mais importantes em aves domésticas, sendo uma das mais antigas e severas formas de enteropatia (Ruff, 1999; Kawazoe, 2000). É uma doença conhecida de longa data, pois, em 1873, Rivolta & Silvestrini haviam descrito a presença de um parasito tetraporicístico que denominaram genericamente de *Eimeria avium*.

1.1 – Biologia

A coccidiose ou eimeriose das aves domésticas (*Gallus gallus*) que atinge tanto frangos de corte como matrizes e aves de postura é causada por protozoários pertencentes ao gênero *Eimeria*, família Eimeriidae (Levine, 1982), subordem Eimeriorina, ordem Eucoccidiorida, subclasse Coccidia, classe Sporozoea e ao filo Apicomplexa (Levine, 1970). As espécies são: *Eimeria acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella* (Borges, 2000; Kawazoe, 2000). Essas sete espécies de *Eimeria* infectam aproximadamente 30 bilhões de aves domésticas anualmente em todo o mundo (Shirley *et al.*, 2005).

Os protozoários do filo Apicomplexa são parasitos intracelulares obrigatórios, transmitidos para novas células hospedeiras por estágios invasivos extracelulares, os quais são equipados com elementos especializados do

citoesqueleto e organelas secretórias na porção anterior, pertencente ao complexo apical, que deu nome ao filo (Kawazoe, 2000).

O complexo apical é formado por: dois anéis polares elétron - densos, um conóide formado por diversos microtúbulos em espiral dentro do anel polar, roptrias (formação de vacúolos parasitóforos) saculares ou tubulares, micronemas (responsáveis pela adesão e reconhecimento da célula hospedeira), grânulos densos (remodelação metabólica para o desenvolvimento do parasita) e microtúbulos subpeliculares que se estendem ao longo do anel polar (Current *et al.*, 1990). Existe também uma organela descoberta recentemente chamada de apicoplasto, em seres pertencentes ao filo Apicomplexa (Köhler *et al.*, 1997).

As três principais espécies de *Eimeria* que ocorrem no Brasil são: *E. acervulina* (Tyzzer, 1929), *E. tenella* (Raillet *et al.*, 1981) e *E. maxima* (Tyzzer, 1929). *E. mitis* (Tyzzer, 1929) também é comum em frangos de corte, embora não seja monitorada pois não produz lesões macroscópicas que facilitem esse monitoramento e, também, por não ser considerada importante para a cadeia produtiva (Costa, 2002).

Klein (1996), entre 1993 e 1995 isolou e caracterizou cinco espécies de eimérias em 74 criações de frango da Europa, Américas Central, do Sul, África do Sul, EUA e Tailândia, encontrando infecções monoespecíficas e mistas que incluem as espécies *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. mitis*, *E. maxima* e *E. tenella*. Segundo uma pesquisa de Terra *et al.* (2001) em um município do interior do Estado de São Paulo, a espécie mais encontrada nos lotes foi *E. maxima* e a menos freqüente foi *E. necatrix*. Shirley (1994) e Smith *et al.* (2002) comentam que

a elevada frequência de *E. maxima* é atribuída a variação antigênica encontrada entre as diferentes populações.

Segundo Levine (1988), o ciclo de vida do protozoário do gênero *Eimeria* realiza-se em um único hospedeiro (monoxeno) e possui três fases distintas: uma fase no ambiente externo (esporogonia) e duas dentro das células do tubo digestório das aves (merogonia e gametogonia), sendo necessário o desenvolvimento completo das três fases para haver a formação final dos oocistos, o estágio de resistência (Figura 1).

A transmissão, infecção e a contaminação ocorrem via fecal-oral, isto é, pela ingestão de oocistos esporulados, contendo no seu interior quatro esporocistos com dois esporozoítos cada (Long, 1987), que podem estar presente na ração, água ou no ambiente.

A membrana do oocisto se rompe pela ação mecânica inicial da moela e pelos estímulos de temperatura e gás carbônico liberando os esporocistos. No duodeno, a ação da tripsina digere uma estrutura chamada corpo de Stieda e os sais biliares estimulam a mobilidade dos esporozoítos, promovendo a excitação e sua liberação para a luz intestinal. Uma vez livres na luz intestinal, os esporozoítos invadem ativamente a célula hospedeira, formando um vacúolo parasitóforo, geralmente em um enterócito, células da lâmina própria ou criptas epiteliais transformando-se em trofozoítos ou merontes uninucleados com forma arredondada (Long, 1987).

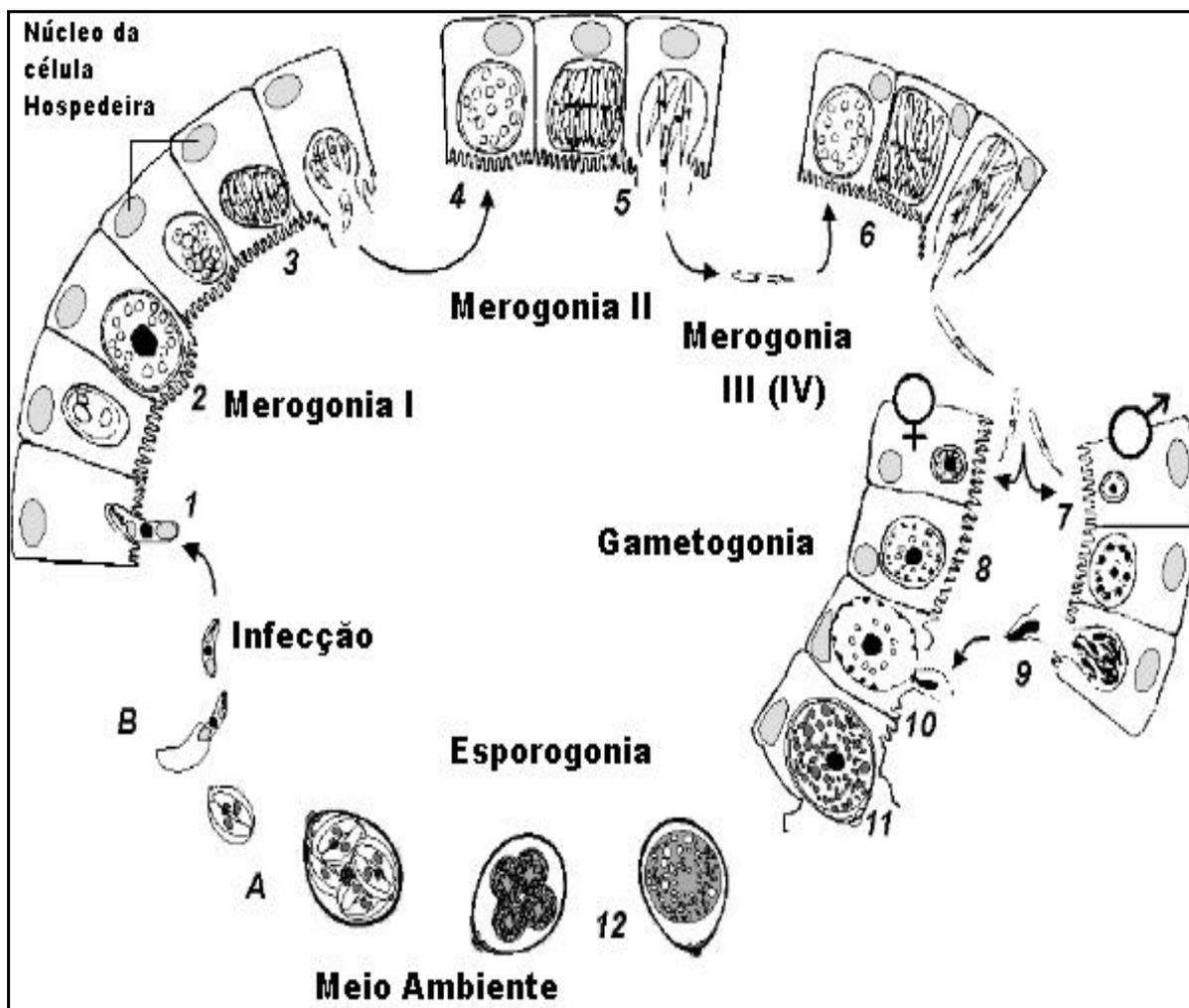


Figura 1: Ciclo de vida de *Eimeria* spp. em aves domésticas (Weck-Heimann, 2001).

Oocistos esporulados são ingeridos e liberam os esporocistos e esporozoítos (A) que invadem enterócitos (1). Na merogonia (2) ocorre a transformação em trofozoítos uninucleares, iniciando-se a divisão assexuada com formação de merozoítos (3) dentro do vacúolo parasitóforo. Os merozoítos são liberados e invadem outras células intestinais (4). Após 3 ou mais gerações assexuadas (5, 6), os merozoítos invadem células epiteliais e se desenvolvem em formas sexuais: masculina (microgametas) (7) ou feminina (macrogametas) (8) por meio da gametogonia. Após a fertilização dos gametas (9), forma-se o zigoto (10) que fabrica uma parede cística (11) originando os oocistos. Oocistos não esporulados (12) são liberados com as fezes e a esporulação ocorre no meio externo em condições adequadas do meio ambiente através da esporogonia, originando oocistos viáveis (A).

Primeiramente ocorre o ciclo assexuado com a formação de merozoítos por um processo de merogonia onde ocorre a divisão sucessiva do núcleo, com a formação final de merozoítos dentro do meronte. Cada meronte produz no seu interior um número variável de merozoítos, dependendo da espécie de *Eimeria*. Após romperem a célula hospedeira, os merozoítos atingem a luz intestinal e invadem novas células epiteliais intestinais formando uma nova geração de merozoítos. Alguns desses merozoítos, pelo mesmo processo, originam uma terceira e quarta geração de merontes, enquanto outros ao penetrarem em novas células iniciam a fase sexuada com formação de gametas masculinos (microgametas) e femininos (macrogametas). Nesta fase pode ocorrer recombinação genética e fertilização cruzada (Rollinson *et al.*, 1979; Shirley & Harvey, 2000) A fusão destas formas origina um zigoto que elabora ao seu redor uma membrana cística dando origem ao oocisto. Essa forma é eliminada junto com as fezes para o meio externo (Kawazoe, 2000).

Os oocistos que não completam a esporulação são inviáveis enquanto os oocistos esporulados são infectantes e podem sobreviver no ambiente por um período de três a seis meses. As espécies de *Eimeria* de aves domésticas não parasitam outras espécies de animais na natureza, sendo consideradas espécie – específicas (Joyner, 1969).

O diagnóstico específico tem sido feito tradicionalmente pelos itens abaixo:

- a) Período pré-patente: intervalo de tempo decorrente entre a infecção e o aparecimento das primeiras formas detectáveis do agente infeccioso, neste caso, os oocistos.
- b) Morfologia, tamanho e contagem de oocistos nas fezes das aves;

- c) Localização e morfologia dos parasitos no intestino das aves;
- d) Localização, intensidade e característica das lesões macroscópicas na mucosa intestinal associada com a morfologia dos oocistos, gametócitos ou esquizontes (Hemsley, 1964);
- e) Tempo de esporulação dos oocistos (Long *et al.*, 1976; Long & Joyner, 1984; Tsuji, 1997).

Embora, a maioria dos autores reconheça que esses métodos de diagnóstico são primitivos, demorados e, freqüentemente, fracassam na identificação das espécies de *Eimeria* responsáveis pelo problema (Sluis, 1993), muitos estudos ainda são desenvolvidos com base nessa metodologia. Prado (2005) em sua dissertação de mestrado testou um protocolo de PCR para o diagnóstico de coccidiose aviária em amostras de campo, mas segundo o autor, do modo como foi utilizado este método de diagnóstico não pareceu adequado, prático e satisfatório.

A localização dos parasitos no intestino e o seu grau de patogenicidade variam conforme a espécie: *E. mitis* e *E. praecox* são espécies de localização superficial da mucosa intestinal desenvolvendo-se nas células da cripta e, são consideradas pouco patogênicas; *E. necatrix* e *E. tenella* localizam-se nas partes mais profundas da mucosa (camada subepitelial) e são altamente patogênicas, estando associadas à forma aguda grave da doença; *E. acervulina* e *E. maxima* possuem desenvolvimento epitelial e são consideradas de patogenicidade mediana, apresentando alta morbidade, devido à forma subclínica da doença.

O Quadro 1 apresenta as características diferenciais das espécies de *Eimeria* de aves domésticas.

Os parasitos modificam as estruturas das vilosidades intestinais dos enterócitos causando, dentre outras ocorrências, aumento da taxa de conversão alimentar, prejudicando a ingestão de ração, digestão, absorção, transporte de nutrientes na corrente sanguínea, e pode diminuir em até 85% a atividade digestiva de uma série de enzimas do pâncreas e mucosa intestinal, podendo ocorrer necrose da parede intestinal em alguns casos, ocasionando perda de peso e aves apáticas sendo esses fatores muito importantes para a economia avícola (Fernando & McCraw, 1977; Joyner, 1982; Bordin, 1994; Anuário da Avicultura Industrial, 2000; Williams, 2005).

Quadro 1. Características diferenciais das espécies de *Eimeria*

ESPÉCIES	CARACTERÍSTICAS					
	Lesões macroscópicas	Medida do oocisto Média (µm)	Localização do parasito no intestino	Patogenicidade *	Imunogenicidade*	Período pré – patente (horas)
<i>E. acervulina</i>	Infecção leve: estrias transversais esbranquiçadas com oocistos; Infecção grave: parede espessada pelas placas.	18,3 x 14,6	Epitelial	++	++	96
<i>E. brunetti</i>	Coagulação, necrose, enterite mucóide sanguinolenta no intestino posterior.	24,6 x 18,8	2ª geração de esquizonte sub-epitelial	+++	++++	120
<i>E. maxima</i>	Parede espessada, exudato mucóide cor de laranja, petéquias.	30,5 x 20,7	Gametócito sub-epitelial	+++	++++	126
<i>E. mitis</i>	Sem lesão. Exudato mucóide.	16,2 x 16,0	Epitelial	++	++	138
<i>E. necatrix</i>	Formação de gases, pontos brancos (esquizontes), petéquias, exudato mucóide sanguinolento.	20,4 x 17,2	2ª geração de esquizonte sub-epitelial	++++	++	99
<i>E. praecox</i>	Sem lesões. Exudato mucóide	21,3 x 17,1	Epitelial	+	++++	84
<i>E. tenella</i>	Início: hemorragia na luz do ceco. Mais tarde: mucosa espessada, tecido necrótico do coágulo sanguíneo em forma de charuto.	22,0 x 19,0	2ª geração de esquizonte sub-epitelial	++++	++	128

* + = graus de patogenicidade e imunogenicidade segundo o autor.

Fonte: Research Report 163. 1973. College of Agriculture Experiment Stations, University of Geórgia, Athens, Long, P.L., 1987.

1.2 - Medicamentos Anticoccidianos e Vacinas Vivas

O controle da coccidiose aviária tem sido realizado mediante o uso de medicamentos anticoccidianos (Peterson & Laborde, 1961; Vertommen, 1994; Allen *et al.*, 1998; Williams, 1999; Youn & Noh, 2001) desde a década de 1940 em diferentes sistemas de produção, mas o contínuo surgimento de isolados resistentes a praticamente todas os medicamentos comerciais, tem limitado a estratégia de controle (Kawazoe *et al.*, 1991 e 1994; Chapman, 1993; Conway *et al.*, 1995; Chapman, 1997). O primeiro relato de ineficiência parcial da atuação dos medicamentos anticoccidianos às espécies de *Eimeria* aviária foi realizado por Horton Smith (1951). Anos depois, Jeffers (1974a, 1974b, 1974c) relatou o encontro de diversos isolados de *E. acervulina* e *E. maxima* nos EUA resistentes a vários medicamentos anticoccidianos. Hodgson *et al.* (1969), Bourdeau *et al.* (1994), McDougald & Seibert (1998), Laurent *et al.* (2001), Youn & Noh (2001) também relataram resistências aos anticoccidianos.

Medicamentos como os ionóforos, que geralmente atuam desestabilizando as membranas do parasito (Kawazoe *et al.*, 2000) podem ser uma alternativa para o controle da doença, mas os mesmos têm se tornado ineficientes no controle da coccidiose (LI *et al.*, 2004).

A falta de eficiência dos anticoccidianos, o desinteresse das indústrias farmacêuticas em desenvolver novos medicamentos devido ao alto custo para a pesquisa de novos fármacos, além da proibição desses medicamentos em aves consumidas nos países da Europa e Ásia devido aos possíveis riscos à cadeia

alimentar, outras alternativas têm sido utilizadas para o controle da coccidiose, entre estas, as vacinas vivas.

A utilização de vacinas vivas no controle da doença não é uma estratégia recente (Williams, 2002), porém, sua utilização permaneceu por longo tempo como medida secundária. Atualmente, esta metodologia tornou-se de uso freqüente nas granjas comerciais (Oviedo-Rondón *et al.*, 2005; Shirley *et al.*, 2007). A vacinação das aves ainda no incubatório tende a ser a técnica mais segura ao consumidor final, por não deixar resíduos na carcaça (Ruff, 1999).

Existem dois tipos de vacinas vivas: as que contêm oocistos de isolados selvagens (vacinas virulentas) e as que contêm oocistos de isolados precoces (vacinas atenuadas). As últimas são resultantes de passagens sucessivas dos primeiros oocistos eliminados após infecções nas aves sadias, o que culmina com a diminuição do ciclo do parasito e muitas vezes com atenuação da virulência do isolado, permitindo o uso das mesmas para imunização das aves. A margem de segurança das vacinas atenuadas tem sido maior do que das vacinas virulentas em relação ao aparecimento de um quadro clínico agudo da doença. Este fato se deve, em parte, pelo ciclo de vida mais curto nos isolados precoces do que nas gerações parentais correspondentes (McDonald *et al.*, 1984; McDonald *et al.*, 1986; Shirley, 1994; Danforth, 1998; Montes *et al.*, 1998; Muir *et al.*, 2000; Shirley *et al.*, 2005).

As vacinas feitas com parasitos atenuados têm como vantagens principais à produção de um número menor de oocistos eliminados durante cada ciclo de infecção e menor lesão na mucosa intestinal, além de conferir imunidade protetora nas aves (Shirley *et al.*, 1997; Shirley, 1999; Shirley *et al.*, 2005; Meeusen *et al.*,

2007). As amostras atenuadas ainda apresentam as seguintes características: diminuição do período pré-patente, decréscimo da virulência, estabilidade genética, redução do potencial reprodutivo fazendo com que o número de esporozoítos que penetram nas células do hospedeiro seja menor, levando a um desenvolvimento ótimo da imunidade com uma menor lesão do epitélio intestinal (Jeffers, 1975; Williams, 1994; Williams, 1998). No Quadro 2 estão as características das vacinas vivas contra a coccidiose para uso em galinhas.

Coccivac é o nome comercial da primeira vacina viva comercialmente disponível em 1952, nos Estados Unidos. Entretanto, durante os últimos quarenta anos, o uso de vacinas vivas para o controle da coccidiose tem ocorrido em uma escala relativamente pequena quando comparada ao uso dos anticoccidianos profiláticos.

Apesar do custo mais elevado das vacinas vivas em relação aos anticoccidianos, essas vacinas tem sido empregadas em aves reprodutoras e em frangos de corte. Essas vacinas não protegem das infecções coccidianas, mas sim da patogenicidade, sendo possível encontrar oocistos em locais de infecção controlada.

No Brasil, são comercializadas tanto vacinas virulentas (*Coccivac B*[®] e *D*[®], *Immunox*[®]); como atenuada (*Livacox*[®]). Contudo, prováveis variações antigênicas existentes em diversos isolados de *Eimeria* spp. de campo podem levar a menor eficiência dessas vacinas comerciais na proteção imunológica (Danforth, 1998, Kawazoe & Manarini, 2001; Smith *et al.*, 2002).

Quadro 2: Características das vacinas vivas contra a coccidiose aviária

PRODUTO e FABRICANTE	TIPO DE OOCISTO	TIPO DE AVE	ESPÉCIES INCLUÍDAS	ADMINISTRAÇÃO/ OBSERVAÇÕES
“Coccivac B” Schering Plough Animal Health, EUA.	Virulentos	Frangos de corte	<i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. tenella</i> , <i>E. mivati</i>	Via oral * ou Pulverização spray
“Coccivac D” Schering Plough Animal Health, EUA.	Virulentos	Matrizes e poedeiras comerciais	<i>Todas as espécies</i>	Via oral * ou Pulverização spray
“Immucox” Vetech Laboratories, Canadá.	Virulentos	Frangos de corte	<i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. tenella</i> e <i>E. necatrix</i>	Via oral ou spray no incubatório
“Immucox” Vetech Laboratories, Canadá.	Virulentos	Matrizes e poedeiras comerciais	<i>E. tenella</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. brunetti</i> , <i>E. acervulina</i> , <i>E. necatrix</i>	Via oral ou spray no incubatório
“Paracox” Schering Plough Animal Health, Reino Unido.	Atenuados	Matrizes e poedeiras comerciais	<i>Todas as espécies</i>	Via oral
“Paracox” 5 Schering Plough Animal Health, Reino Unido.	Atenuados	Frangos de corte	<i>E. acervulina</i> , <i>E. mitis</i> , <i>E. tenella</i> , <i>E. maxima</i> (2)	Via oral * ou spray no incubatório
“Livacox” Q Biopharm, República Tcheca.	Atenuados	Matrizes e poedeiras comerciais	<i>E. acervulina</i> , <i>E. tenella</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. necatrix</i>	Via água, ocular ou spray no incubatório
“Livacox” T Biopharm, República Tcheca.	Atenuados	Frangos de corte	<i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. tenella</i>	Via oral *, ocular ou spray no incubatório
ADVENT Novus International, EUA	Virulentos	Frangos de corte	<i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. tenella</i>	Via oral ou spray

Nobilis COX ATM Intervet International, Holanda.	Virulentos	Frangos de corte	<i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> (2), <i>E. tenella</i> <i>ionóforo-resistentes</i>	Spray
Eimeriavax 4m Bioproperties Pty, Austrália.	Atenuados	Todos os tipos	<i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. necatrix</i> , <i>E. tenella</i>	Via oral
Eimerivac Plus Guangdong Academy of Agricultural Sciences, China.	Atenuados	Todos os tipos	<i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. necatrix</i> , <i>E. tenella</i>	Via oral
Inmuner Gel-Coc Vacunas Inmuner, Argentina.	Virulentos e Atenuados	Todos os tipos	<i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. tenella</i>	Via oral
CoxAbic Abic, Israel.	Antígeno morto	Poedeiras	<i>E. maxima</i>	Injeção intramuscular
Inovocox Embrex, EUA.	Virulentos	Frangos de corte	<i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. tenella</i>	Aplicação <i>in ovo</i>

* Via oral: ração, água de beber

Fonte: Shirley, *et al.*, 2005; Shirley *et al.*, 2007.

Essas vacinas têm mostrado eficiência na proteção imunológica contra a coccidiose nas aves em granjas comerciais. Estudos comparativos de eficiência entre vacinas vivas e anticoccidianos tem demonstrado melhor ganho de peso em aves vacinadas do que em aves com proteção anticoccidiana, especialmente no final do ciclo de criação (Chapman *et al.*, 2002). Por outro lado, aves vacinadas com Paracox[®], Livacox[®] e Immucox[®] têm apresentado lesões ao longo do seu ciclo de criação (Williams & Andrews, 2001, Chapman *et al.*, 2002), sugerindo apenas proteção parcial nas aves.

Existem outros estudos referentes a diferentes tipos de vacinas. Esses estudos têm sido realizados caracterizando antígenos de diversas etapas do ciclo de desenvolvimento do parasita: antígenos de oocistos esporulados e não esporulados e esporozoítos de *E. tenella* (Gurnett *et al.*, 1990); perfis antigênicos de organelas de esporozoítos (Kawazoe *et al.* 1992); antígenos comuns entre esporozoítos e merozoítos (Danforth & McAndrew, 1987; Castle *et al.*, 1991); antígenos de gametócitos de *E. maxima* (Mencher *et al.*, 1989; Wallach *et al.*, 1992).

A produção de isolados precoces e a conseqüente atenuação desses isolados realizados a partir de gerações parentais de *Eimeria*, é um bom caminho a ser seguido para se obter uma vacina viva comprovadamente atenuada. Estudos adequados sobre atenuação de isolados precoces utilizando como parâmetros redução do período pré-patente, diminuição da patogenicidade e do número de oocistos produzidos, têm sido realizados por diversos pesquisadores com as principais espécies de *Eimeria* aviária. Recentemente, estudo sobre a atenuação de *E. acervulina* foi realizado por Kawazoe *et al.* (2005) com excelentes resultados.

2 - Justificativa

A avicultura brasileira ocupa excelente posição no cenário internacional. Segundo dados da Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF) e da União Brasileira de Avicultura (UBA), o Brasil poderá encerrar o ano de 2008 em segundo lugar no ranking mundial. Contudo, a exemplo de outros países, a coccidiose constitui – se em um dos principais problemas sanitários para a produção avícola. Calcula-se que os gastos mundiais com esta doença, incluindo os prejuízos zootécnicos e a utilização de medicamentos com a finalidade de prevenção e cura cheguem a 800 milhões de dólares por ano segundo Allen & Fetterer, (2002).

Até recentemente, o controle da coccidiose aviária no Brasil era realizado exclusivamente pela utilização de medicamentos anticoccidianos existentes no mercado. Entretanto, esses medicamentos têm se tornado ineficientes no combate aos isolados de *Eimeria*. Há uma tendência de reduzir e extinguir até 2010 o uso desses medicamentos da criação de frangos de corte na indústria avícola brasileira, com a eliminação gradual desta estratégia (McDougald *et al.*, 1987; Chapman, 1993; Kawazoe & Di Fabio, 1994). Desta forma, criações comerciais de frangos, livres de *Eimeria*, são extremamente difíceis de serem encontradas (Bigs, 1982; Williams, 1999).

As vacinas vivas virulentas importadas do Canadá e dos Estados Unidos têm sido amplamente utilizadas no Brasil. Contudo, variações antigênicas existentes em isolados de *E. maxima* e em menor grau em *E. acervulina*, nas

linhagens de campo, podem atuar como obstáculos importantes para a eficiência de sua utilização. Os isolados das vacinas podem ter menor eficácia na proteção imunológica das aves, em granjas cuja presença de isolados de *Eimeria* sejam diferentes dessas vacinas (Danforth, 1998; Kawazoe & Manarini, 2001).

Dessa maneira, torna-se cada vez mais necessário e desejável a contribuição científica na busca de outras alternativas como a obtenção de vacinas vivas comprovadamente atenuadas, que atuem na proteção das aves contra as eimérias, sem prejudicar o desempenho do animal.

3 - Objetivos

Os objetivos do estudo foram:

1. Obtenção do isolado precoce da *Eimeria maxima* a partir da geração parental;
2. Comparação da patogenicidade entre o isolado parental e precoce em aves experimentalmente inoculadas.

4 - Material e Métodos

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Coccidiose Aviária e no biotério de aves do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Este experimento está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) – IB – UNICAMP, protocolo número 1084-1.

AVES: para o desenvolvimento dos experimentos na obtenção e produção de oocistos precoces, foram utilizadas galinhas (*Gallus gallus*) SPF (*Specific Pathogen Free*) da linhagem “White Leghorn”, fornecida pela Merial Saúde Animal (Paulínia, SP), de ambos sexos. Com quatro a cinco semanas de idade, três a quatro aves foram alocadas aleatoriamente em gaiolas de metal.

No experimento de patogenicidade foram utilizadas setenta e cinco aves (*Gallus gallus*) SPF (*Specific Pathogen Free*) da linhagem “Cobb”, fornecida pela empresa Globo Aves. Aos treze dias de idade as aves foram pesadas e alocadas em gaiolas (cinco aves por gaiola), por um processo de randomização, o qual aproximou as médias dos pesos iniciais das aves em cada gaiola.

As aves foram, desde o nascimento, criadas e mantidas em gaiolas de metal (51 x 40cm) previamente esterilizadas, alimentadas irrestritamente com ração inicial destituída de qualquer medicamento e promotor de crescimento e

água filtrada, nas dependências do biotério de aves do Departamento de Parasitologia, livre de patógenos, com ventilação e temperatura ambiente controladas. O tempo de iluminação foi de 11 horas diárias de luz artificial (controle automático) ligada às 7 horas e desligada às 18 horas.

A ração para todo o experimento foi doada pela empresa Nutron Alimentos localizada na cidade de Campinas (SP).

PARASITOS: para os experimentos foi utilizada a geração parental “Ca” de *Eimeria maxima* isolada em uma granja “caipira” no Estado de São Paulo, em 2006, sem histórico do uso de medicamentos anticoccidianos e promotores de crescimento. Este isolado é mantido no Laboratório de Coccidiose Aviária do Departamento de Parasitologia, IB, UNICAMP.

O isolamento dos oocistos de *E. maxima* “Ca” foi realizado a partir de uma amostra mista, contendo as espécies *E. acervulina*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. tenella* e *E. maxima*. Desta amostra, foi realizado o isolamento de oocistos de *E. maxima* por meio de diluições sucessivas com água destilada, em tubos de ensaio. Em seguida, a solução aquosa contendo os oocistos foi pipetada e colocada gota a gota em lâminas de vidro esterilizadas, até que fosse observado ao microscópio óptico comum (aumento de 400x), apenas um (1) oocisto de *E. maxima* por gota. Estas gotas, contendo os oocistos de *E. maxima*, foram pipetadas com uma pipeta Pasteur modificada apresentando extremidade curva e fina, com abertura aproximada de 500µm de diâmetro. Esses oocistos foram transferidos para um pequeno frasco de vidro esterilizado de 10ml contendo água destilada.

Terminado este procedimento, os oocistos foram inoculados, via oral, em duas aves sadias, cada dose contendo 10 oocistos.

Nos experimentos foram utilizados oocistos com no máximo oito semanas de armazenamento, período em que é conservada a viabilidade dos mesmos (Long *et al.*, 1976).

4.1 - Obtenção do isolado precoce

A passagem dos oocistos nas aves sadias foi realizada de acordo com o método descrito por Long *et al.*, 1976, abaixo:

As aves sadias, de quatro a cinco semanas de idade, foram inoculadas com cerca de 2 a 30×10^3 oocistos esporulados, contados na câmara de Fuchs-Rosenthal. As fezes foram depositadas em bandeja de metal, forrada com jornal esterilizado (90°C por 20min) e coletadas a partir de 120 horas após inoculação, de duas em duas horas, até o aparecimento dos primeiros oocistos. Este procedimento prosseguiu com a diminuição progressiva do horário de coleta das fezes e de inoculação conforme a obtenção das gerações mais precoces de oocistos. As inoculações sucessivas dos primeiros oocistos eliminados foram realizadas em aves sadias, para a redução do período pré-patente até a sua estabilização.

Os oocistos foram isolados das fezes utilizando-se o método de flutuação em solução saturada de cloreto de sódio, sendo em seguida esporulados na solução de dicromato de potássio a 2% ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), oxigênio (O_2) e temperatura em torno de 28°C por, pelo menos, 72 horas (Long *et al.*, 1976).

Após esse período, a cultura foi lavada sucessivamente com água destilada e centrifugada a 1.200g por 6 minutos e os oocistos obtidos foram acondicionados em frascos esterilizados, rotulados e mantidos na geladeira a 4^o C.

4.2 - Produção de oocistos

Após a obtenção da estabilidade do período pré-patente da eliminação dos oocistos, foram realizadas três produções de oocistos precoces devido ao pequeno número de oocistos eliminados. Nesta parte do experimento foram utilizadas vinte e oito aves, sendo seis inoculadas com a geração parental e vinte e duas aves inoculadas com o isolado precoce "Ca" de *E. maxima* obtida.

O número de oocistos inoculados por ave sadia foi de 5×10^3 para a geração parental e 2 a 4×10^4 para o isolado precoce.

No quarto dia após a inoculação do isolado precoce, foi realizado o exame de fezes das aves infectadas e posterior coleta das fezes para a realização da cultura dos oocistos (esporulação) segundo método de Long *et al.*, 1976. Para a geração parental foi coletada amostra de fezes do quinto ao sétimo dias após a inoculação nas aves e a obtenção dos oocistos foi realizada da mesma forma que o isolado precoce. A limpeza da cultura foi realizada através de lavagens sucessivas em água destilada e com centrifugação a 1.200g durante 6 minutos. Posteriormente, os oocistos foram armazenados em frascos esterilizados, rotulados adequadamente e acondicionados na geladeira a uma temperatura de 4°C.

4.3 – Patogenicidade

O estudo de patogenicidade teve como critérios de avaliação: ganho de peso corporal das aves, escores de lesão provocados pelo parasito na mucosa intestinal e contagem do número de oocistos produzidos a partir da data da eliminação. Foram comparados dois isolados de *E. maxima* “Ca”: parental e precoce.

Nos experimentos de patogenicidade foram utilizados frangos de corte da linhagem Cobb, de sexo masculino. Cada ave recebeu um mililitro de solução aquosa com a dose correspondente de oocistos para cada estudo. A infecção nas aves foi feita oralmente com o auxílio de uma seringa de plástico descartável de um mililitro. Cada ave recebeu uma identificação numérica na perna direita.

Os experimentos foram realizados em triplicata, divididos em cinco grupos de quinze aves, sendo cinco aves alocadas em cada gaiola de metal esterilizada (Figura 2):

Grupo I: aves infectadas com 1×10^3 oocistos da geração parental de *E. maxima* “Ca” para a contagem dos oocistos;

Grupo II: aves infectadas com 1×10^3 oocistos do isolado precoce de *E. maxima* “Ca” para a contagem dos oocistos;

Grupo III: aves infectadas com 1×10^5 oocistos da geração parental de *E. maxima* “Ca” para observação dos escores de lesão e ganho de peso;

Grupo IV: aves infectadas com 1×10^5 oocistos do isolado precoce de *E. maxima* “Ca” para observação dos escores de lesão e ganho de peso;

Grupo V: aves sadias (controle negativo).

A pesagem das aves foi realizada antes da alocação em gaiolas (décimo terceiro dia de vida), três e sete dias após a inoculação. As aves foram pesadas individualmente, obtendo-se o valor do ganho de peso individual das aves pela diferença nas pesagens do sétimo e terceiro dias e foi realizada a média dos pesos corporais das aves por gaiola e posterior análise estatística.

Para a contagem total de oocistos, foram coletadas as fezes depositadas sobre uma bandeja forrada com papel esterilizado instalada na base das gaiolas, a partir do quarto dia após a inoculação, diariamente, até o final da eliminação dos oocistos, em cada gaiola. As fezes foram homogeneizadas com água filtrada em um homogeneizador elétrico. Retirou-se um mililitro da amostra que foi colocada em tubo de ensaio. A amostra foi diluída dez vezes com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) e após homogeneização dessa solução, uma alíquota do líquido foi colocada na câmara de Mc Master para a contagem dos oocistos, segundo o método descrito por Long *et al.*, 1976. A contagem final foi calculada a partir do fator que determina o número de oocistos por mililitro de conteúdo fecal.

As aves foram sacrificadas por meio do deslocamento cervical e necropsiadas em seguida.

O escore de lesão foi realizado no sétimo dia após inoculação das aves, segundo o método de Johnson & Reid (1970) que consiste na atribuição de graus (1 a 4) às lesões observadas na mucosa intestinal da região mediana do intestino delgado e do duodeno. No presente experimento os escores foram adaptados com graus intermediários, isto é, meio grau (0,5) e um grau e meio (1,5) devido a lesões intermediárias verificadas na mucosa intestinal das aves. As características para cada nível do escore de lesão são apresentadas no Quadro 3.

Quadro 3 . Características do escore de lesão para *Eimeria maxima*

Escore	Características
0	Nenhuma lesão macroscópica.
0,5	Petéquias quase imperceptíveis na mucosa do intestino médio. Ausência de muco alaranjado e sem engrossamento da parede intestinal.
1	Pequenas petéquias na serosa do intestino médio. Pode haver pequena quantidade de muco alaranjado, sem engrossamento do intestino.
1,5	Discreto engrossamento da parede intestinal. Muco alaranjado discreto.
2	Superfície serosa com numerosas petéquias vermelhas. Intestino pode conter muco alaranjado. Engrossamento da parede intestinal. Congestão localizada no intestino médio.
3	Engrossamento da parede intestinal. Conteúdo intestinal com manchas de sangue e muco. Congestão generalizada no intestino médio. Superfície mucosa áspera.
4	Numerosos tampões de sangue e sangue digerido. Odor pútrido. Parede intestinal bastante engrossada.

Fonte: Johnson & Reid, 1970 (adaptado).

4.4 – Análise Estatística

Foram realizadas análises de variância (ANOVA) para a verificação da patogenicidade dos isolado precoce e parental, utilizando o teste múltiplo de Duncan, através do Sistema SAS, versão software 2008. O grau de significância foi de 5%, ou seja, os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

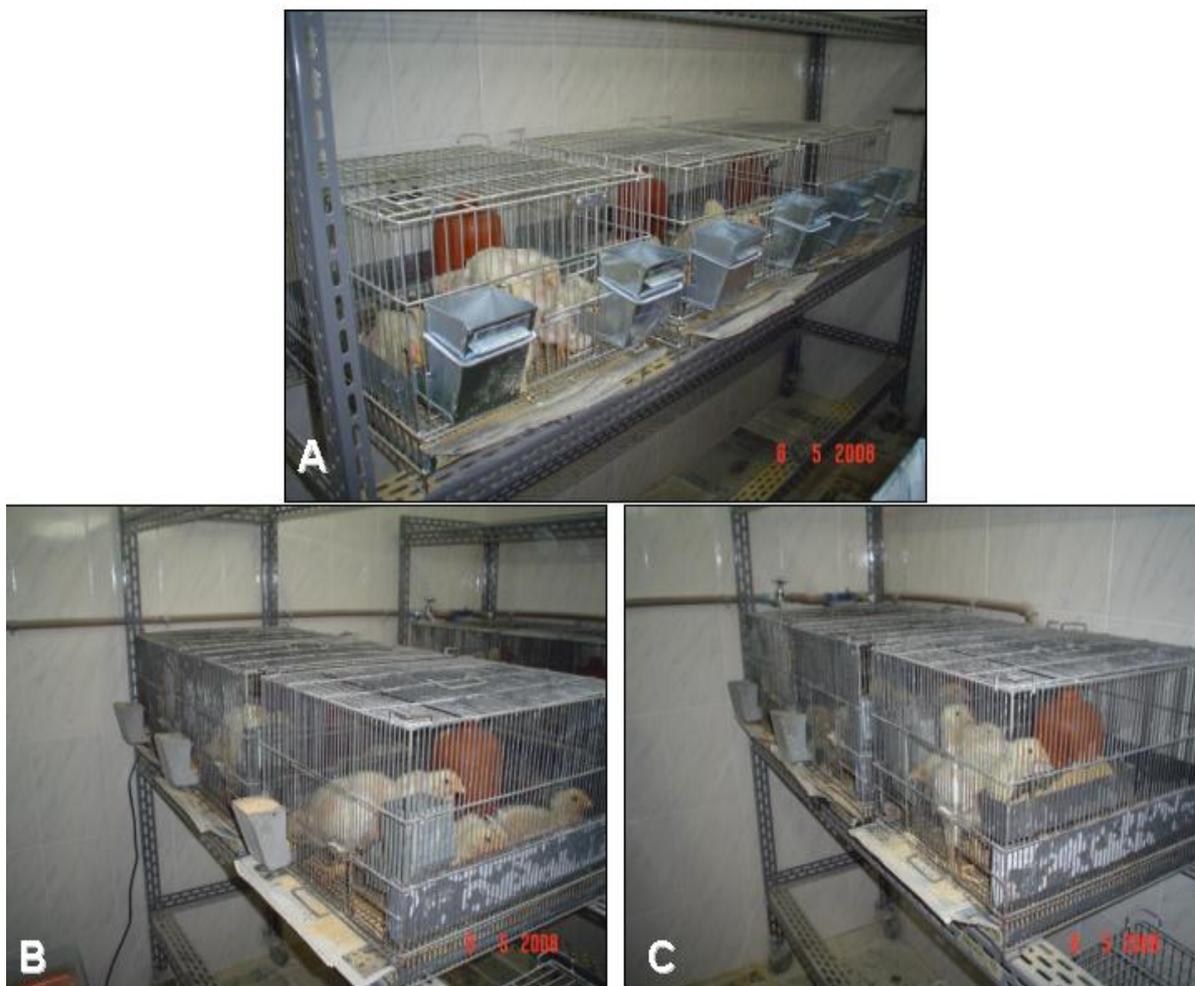


Figura 2: Distribuição dos grupos de aves. A: Controle Negativo. B: Aves infectadas com o isolado precoce. C: Aves infectadas com a geração parental.

5 - Resultados

5.1 - Obtenção de oocistos precoces de *E. maxima* “Ca”

A obtenção de oocistos precoces atingiu a geração F23 da amostra *E. maxima* “Ca” com um período pré-patente final de 88h30min. Esses resultados encontram-se na Figura 3 e na Tabela 1.

O período pré-patente inicial foi de 124h30min (geração parental) e após 23 passagens sucessivas dos primeiros oocistos em aves, este foi diminuído lenta e gradualmente para 88h30min na geração F23, estabilizando nas gerações F24 e F25, com uma diminuição total de 36 horas no ciclo de vida de *E. maxima* “Ca”.

Nas gerações F2, F5 e F7 ocorreu um aumento do período pré-patente em relação ao período anterior. Nas gerações F2 e F3, F8 e F9 o período estabilizou-se em 124 e 121 horas, respectivamente.

Observando-se os dados da Tabela 1, verificou-se um período pré-patente máximo na geração F7 (125h). O decréscimo no período pré-patente de cada passagem dos oocistos precoces foi irregular, sendo que nas gerações F7 para a F8 e F18 para a F19 ocorreram os maiores decréscimos, ou seja, de 4 horas.

Na geração F17 não foi possível a identificação do período pré-patente na primeira passagem, portanto repetiu-se mais uma vez a amostra para a obtenção do período, no qual observou-se 105 horas.

A Figura 3 apresenta o gráfico em que se pode notar a queda progressiva no número de horas do período pré-patente, após passagens sucessivas dos primeiros oocistos nas aves.

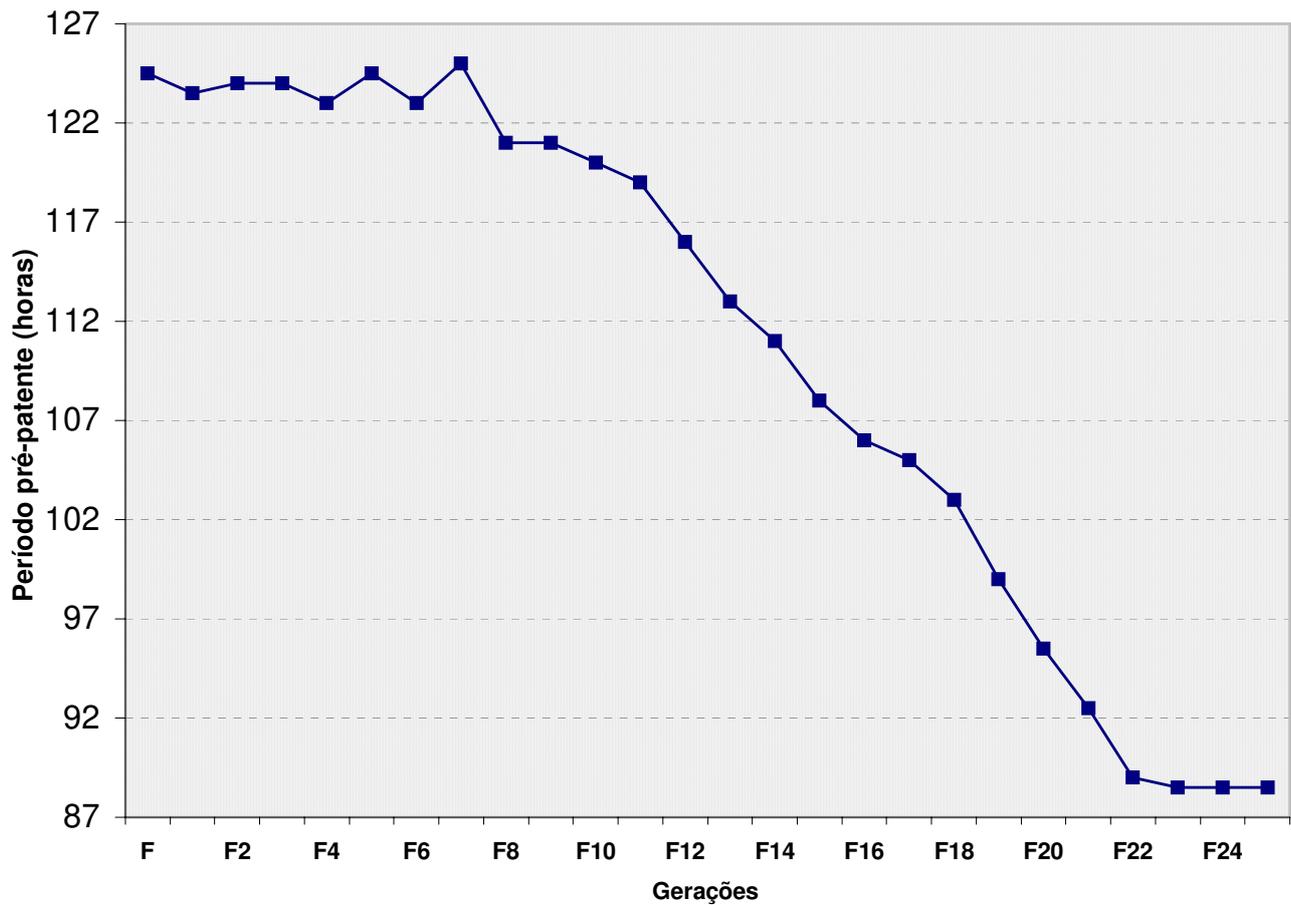


Figura 3: Período pré-patente (horas) das gerações precoces de *E. maxima* "Ca".

Tabela 1. Obtenção de oocistos precoces de *E. maxima* "Ca" através de passagens sucessivas em aves experimentalmente inoculadas.

GERAÇÃO	Nº de oocistos inoculados x 10 ³	Data da inoculação	Período Pré-Patente
Parental – F	5	09/03/06	124h30min
F1	5	19/04/06	123h30min
F2	5	18/05/06	124h
F3	5	23/06/06	124h
F4	5	21/07/06	123h
F5	8	10/08/06	124h30min
F6	8	24/08/06	123h
F7	8	28/09/06	125h
F8	8	19/10/06	121h
F9	8	09/11/06	121h
F10	8	07/12/06	120h
F11	10	07/02/07	119h
F12	15	09/03/07	116h
F13	15	09/05/07	113h30min
F14	20	23/05/07	111h
F15	20	13/06/07	108h
F16	20	05/07/07	106h
F17	20	19/07/07	-
F17	25	26/07/07	105h
F18	24	23/08/07	103h
F19	30	06/09/07	99h
F20	16	04/10/07	95h30min
F21	15	18/10/07	92h30min
F22	23,750	01/11/07	89h
F23	30	09/11/07	88h30min
F24	16,250	22/11/07	88h30min
F25	18	30/11/07	88h30min

F: amostra parental de *E. maxima* "Ca"; F1: oocistos de 1ª geração; F2: oocistos de 2ª geração; F3: oocistos de 3ª geração; F4: oocistos de 4ª geração; F5: oocistos de 5ª geração; F6: oocistos de 6ª geração; F7: oocistos de 7ª geração; F8: oocistos de 8ª geração; F9: oocistos de 9ª geração; F10: oocistos de 10ª geração; F11: oocistos de 11ª geração; F12: oocistos de 12ª geração; F13: oocistos de 13ª geração; F14: oocistos de 14ª geração; F15: oocistos de 15ª geração; F16: oocistos de 16ª geração; F17: oocistos de 17ª geração; F18: oocistos de 18ª geração; F19: oocistos de 19ª geração; F20: oocistos de 20ª geração; F21: oocistos de 21ª geração; F22: oocistos de 22ª geração; F23: oocistos de 23ª geração; F24: oocistos de 24ª geração; F25: oocistos de 25ª geração.

5.2 - Estudo Comparativo da Patogenicidade entre as Amostras Parental e Precoce de *E. maxima* "Ca"

Observou-se que as aves infectadas com o isolado precoce não mostraram sinais clínicos da doença, enquanto as aves infectadas com a geração parental demonstraram apatia e redução na ingestão de alimento. Além disso, no sexto dia após a infecção, três aves vieram a óbito não sendo possível realizar o escore de lesão.

Na Tabela 2 encontram-se os valores do resultado comparativo da patogenicidade entre a geração parental e o isolado precoce de *E. maxima* "Ca", inoculadas em aves saudáveis.

5.2.1 - Ganho de Peso Corporal

Nos grupos de aves infectadas com a geração parental houve perda de peso ao passo que nos grupos infectados com o isolado precoce e no controle negativo (aves saudáveis) ocorreu ganho de peso, porém, no isolado precoce do parasito foi em menor porcentagem do que nas aves saudáveis.

De acordo com a análise estatística, no teste múltiplo de Duncan, houve diferença significativa entre o controle negativo, o isolado precoce e a geração parental quanto ao ganho de peso corporal das aves. As diferenças entre os valores médios de ganho de peso por ave infectadas com o isolado precoce e com a geração parental foram estatisticamente significativas. Considerando o ganho de peso das aves saudáveis como 100%, as aves inoculadas com o isolado precoce

obtiveram ganho de 64,8%, enquanto que as aves infectadas com a geração parental perderam 3,1% de peso.

A Tabela 2 e a Figura 4 mostram a porcentagem do ganho de peso entre a geração parental e o isolado precoce sobre o controle negativo (aves sadias).

Tabela 2: Comparação da patogenicidade entre geração parental, isolado precoce de *E. maxima* "Ca" e o controle negativo

Crítérios de Avaliação	<i>E. maxima</i> "Ca" Parental	<i>E. maxima</i> "Ca" Precoce	Controle Negativo (Aves Sadias)
Produção média de oocistos/ ave ($\times 10^6$)	14,5	0,7	----
Ganho de Peso: = % média sobre o controle negativo	- 3,1a *	64,8b *	100c*
= média de peso (em gramas)	-6,9a*	144,3b*	222,8c*
Escore de Lesão (média)	1,7a *	0,8b *	----

*Variáveis seguidas de letras diferentes, diferem significativamente no teste múltiplo de Duncan ($\alpha = 0,05$)

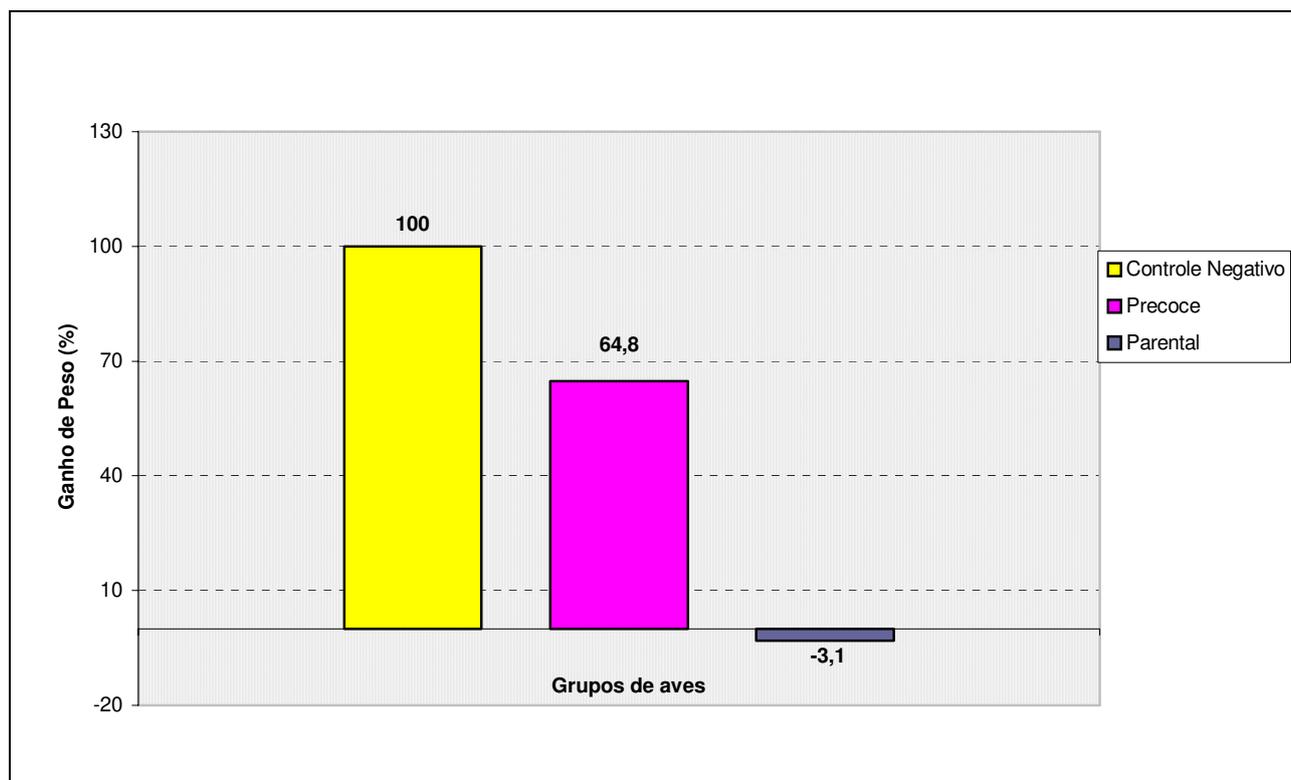


Figura 4: Comparação da porcentagem do ganho de peso entre as aves inoculadas com a geração parental e o isolado precoce de *E. maxima* "Ca" e as aves saudáveis (controle negativo). Desvio padrão: Controle Negativo: 27,1; Parental: 72,8; Precoce: 30,8.

5.2.2 - Escore de Lesão da Mucosa Intestinal

O resultado para o escore de lesão provocado no duodeno e na região mediana da mucosa do intestino delgado das aves infectadas com a geração parental e o isolado precoce pode ser verificado na Tabela 2 e Figura 5.

Houve diferença estatisticamente significativa entre os valores médios dos escores de lesão produzidas nas amostras parental e precoce. A Figura 6 mostra a comparação entre os intestinos das aves sadias, infectadas com o isolado precoce e a geração parental.

Os graus mais altos de escores de lesão foram apresentados nas aves infectadas com a geração parental (Figura 7-C), cujo maior grau foi 2 e o menor 1, enquanto que as aves infectadas com o isolado precoce (Figura 7-B) apresentaram os graus mais baixos de escores de lesão na mucosa intestinal, sendo o menor 0 (zero) e o maior 1,5, de acordo com o Quadro das características do escore de lesão para *E. maxima* segundo o método de Johnson & Reid (1970) adaptado. A Figura 7-A apresenta o intestino de uma ave sadia comparada com as mucosas dos intestinos das aves infectadas.

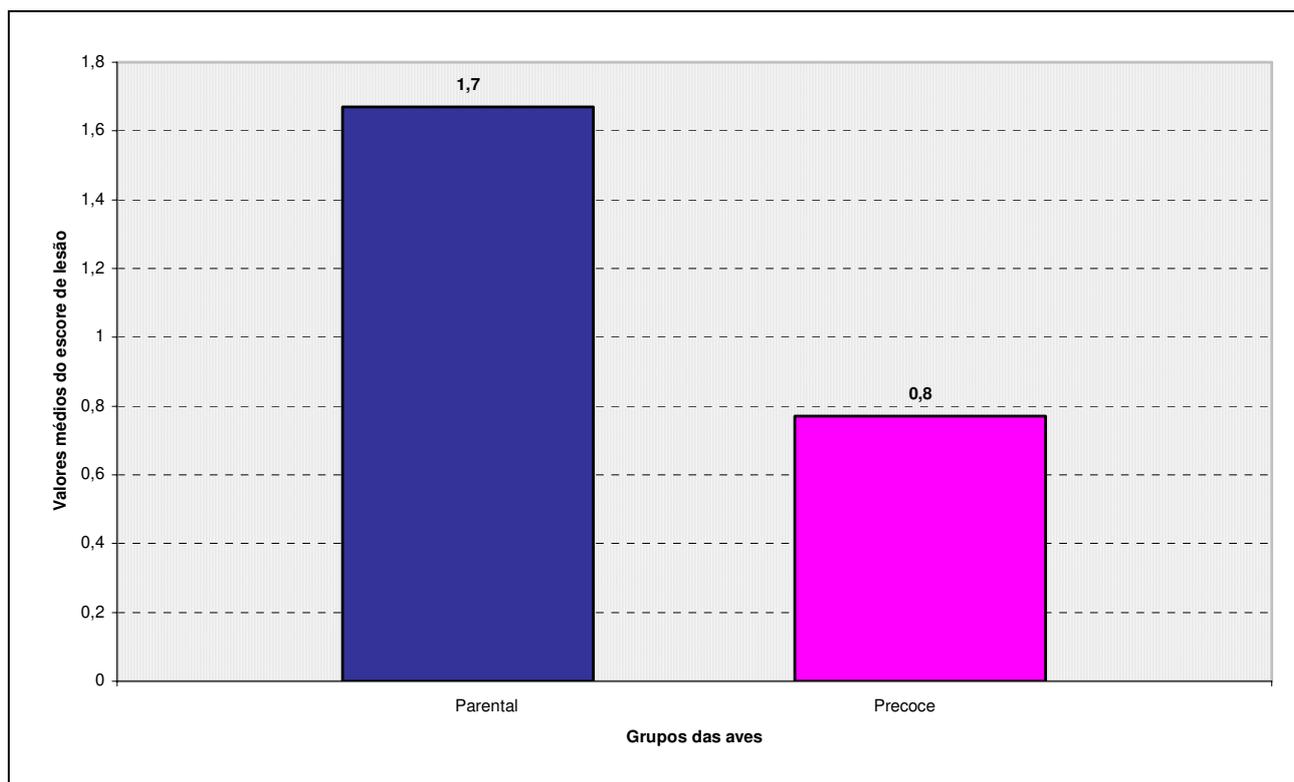


Figura 5: Comparação dos valores médios do escore de lesão da mucosa intestinal entre as aves infectadas com a geração parental e o isolado precoce de *E. maxima* "Ca". Desvio padrão: Parental: 0,38; Precoce: 0,37.

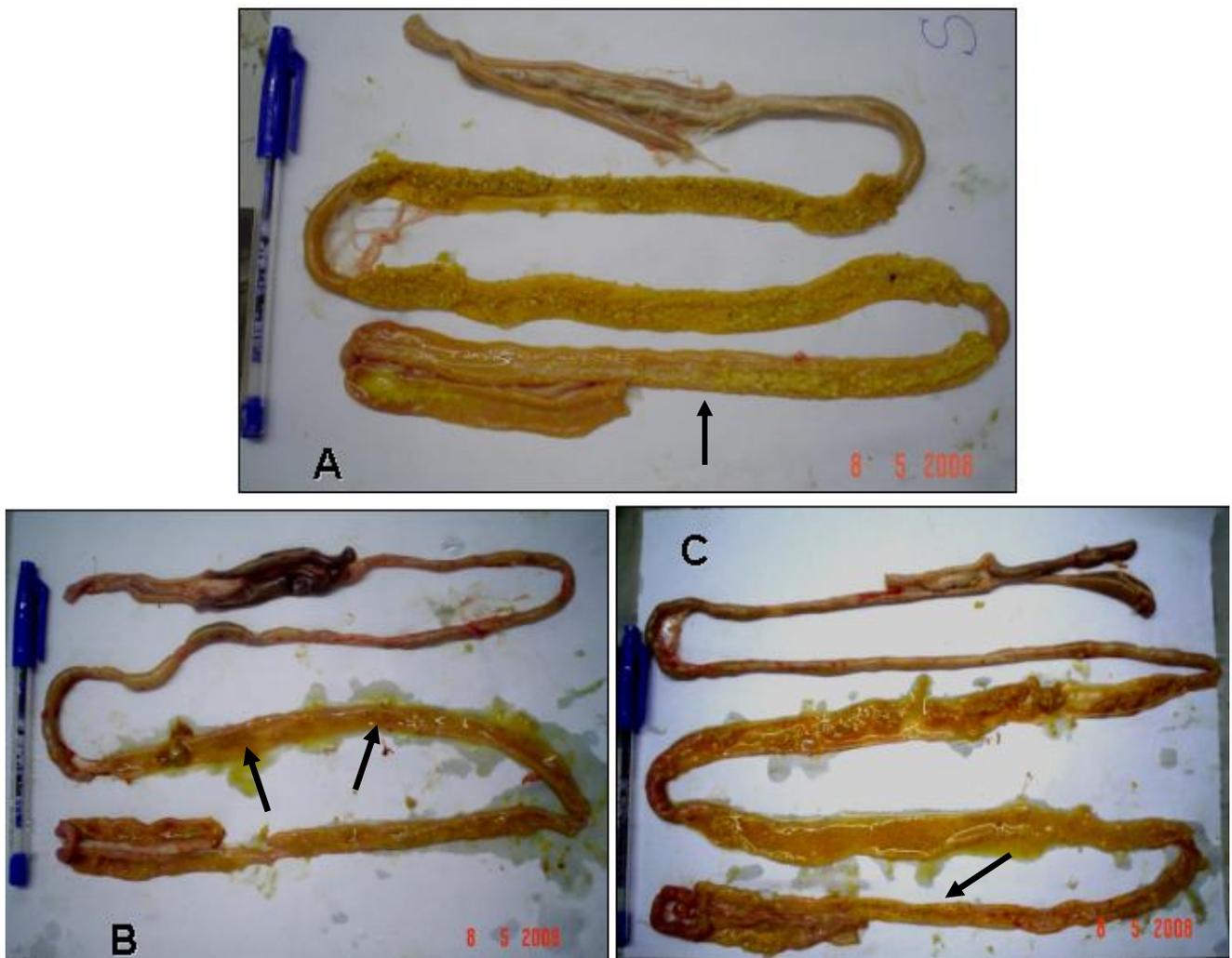


Figura 6: Aspecto macroscópico do duodeno e dos intestinos delgado anterior e médio de uma ave sadia (A) e de aves infectadas com a geração parental (B) e precoce (C) de *E. maxima* "Ca", após sete dias de infecção. Observar mucosa anêmica e com muco na geração parental (seta) e mucosa com aspecto normal no isolado precoce e na ave sadia (seta). OBS: caneta com 14 cm de comprimento.

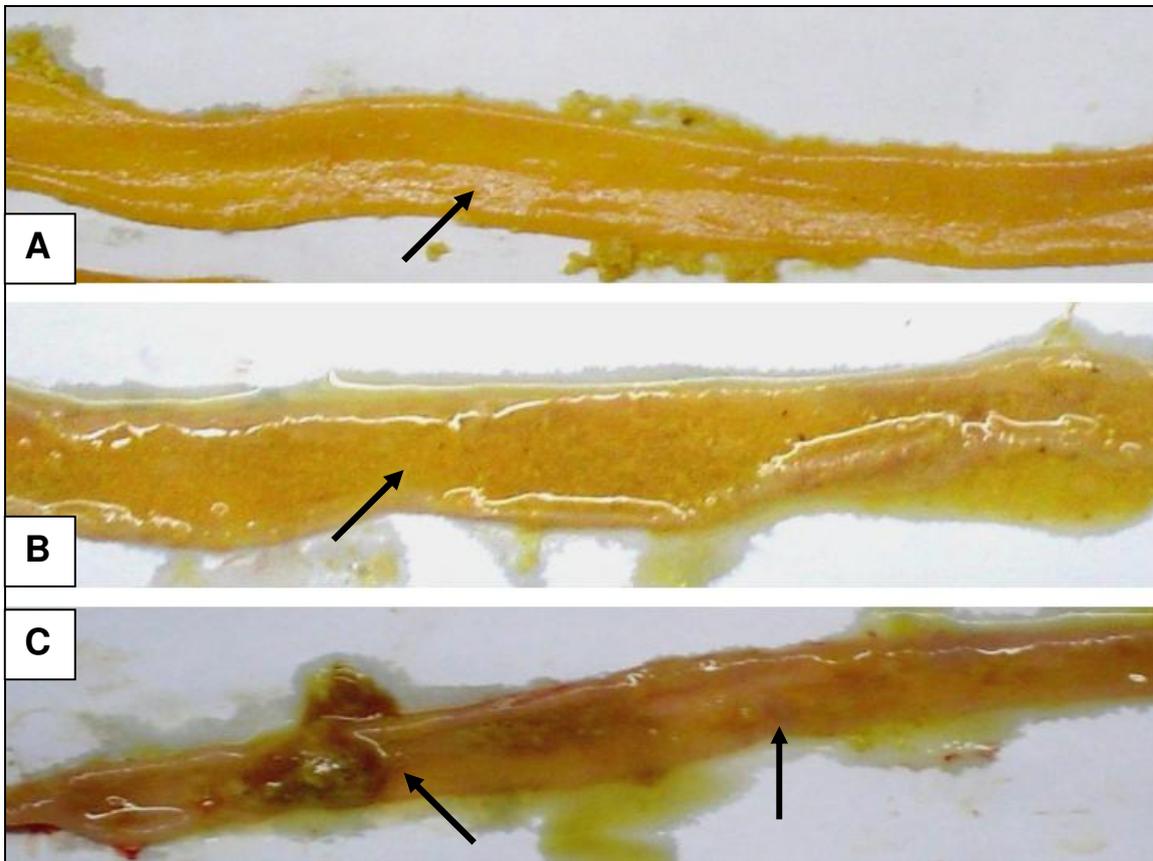


Figura 7: Comparação entre os intestinos das aves necropsiadas: controle negativo não infectado (A); infectadas com isolado precoce (B) e parental (C). Observar muco alaranjado e petéquias na parede intestinal da geração parental (setas) e mucosa normal (seta) no isolado precoce de *E. maxima* "Ca".

5. 2.3 - Produção de Oocistos por Ave

Nesta parte do estudo, foi feita a contagem diária dos oocistos de seis gaiolas, sendo três gaiolas inoculadas com a geração parental e três inoculadas com o isolado precoce de *E. maxima* "Ca" cada uma com cinco aves.

Na Tabela 2 encontram-se os resultados da produção média de oocistos obtidos por ave, desde o início até o final da eliminação dos oocistos, infectadas com a geração parental e o isolado precoce.

No desenvolvimento do ciclo do protozoário, o número de oocistos eliminados nas fezes das aves mostrou um pico de eliminação e posterior diminuição, até atingir a negatificação na eliminação dos oocistos das amostras precoce e parental de *E. maxima* "Ca" (Figura 8).

O pico de oocistos eliminados nas fezes foi observado no sétimo dia pós-infecção nas aves infectadas com o isolado precoce e o nono dia após a inoculação nas infectadas com a geração parental. O número de oocistos foi nulo no décimo quarto dia após inoculação no isolado precoce e no décimo sexto dia na geração parental (Figura 8).

As aves infectadas com a geração parental eliminaram maior número de oocistos do que as infectadas com o isolado precoce. Ao final do experimento o número total de oocistos produzidos pela geração parental chegou a quase vinte vezes o número produzido pelo isolado precoce, significativamente diferentes.

Foi observada diferença entre o aspecto das fezes eliminadas pelas aves durante o experimento. As aves infectadas com a geração parental apresentaram fezes diarréicas com grande quantidade de muco (Figura 9-A). Nas gaiolas com

aves infectadas com o isolado precoce de *E. maxima* "Ca" as fezes estavam com consistência normal (Figura 9-B).

Os resultados do experimento mostraram uma significativa redução da patogenicidade no isolado precoce quando comparado à geração parental, tendo como critérios de avaliação: ganho de peso corporal, escore de lesão da mucosa intestinal e produção de oocistos pelas aves.

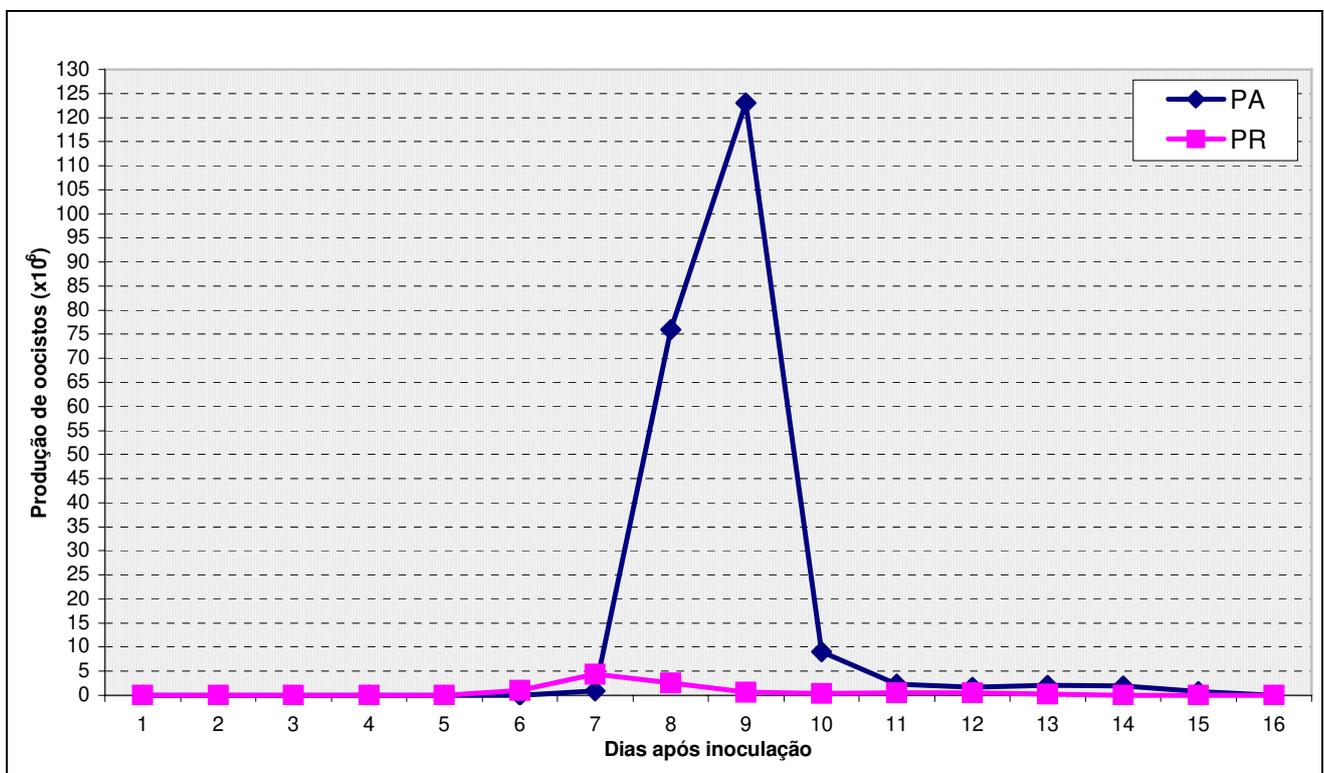


Figura 8: Eliminação de oocistos de *E. maxima* "Ca" parental (PA) e precoce (PR) entre o quinto e décimo sexto dia após inoculação em aves saudáveis.

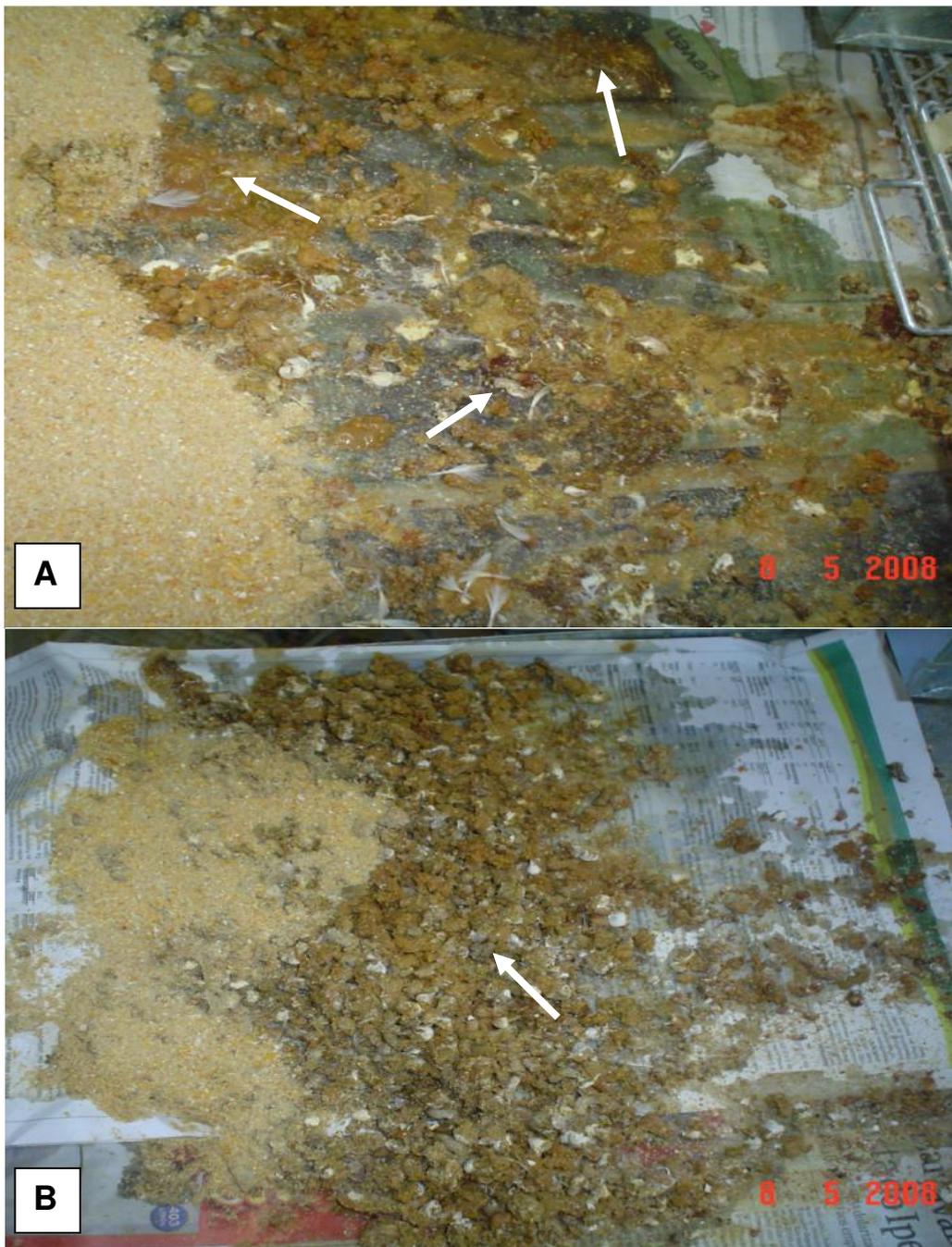


Figura 9: Fezes eliminadas pelas aves infectadas com a geração parental (A) e precoce (B). Observar (setas) aspecto diarréico das fezes com muco alaranjado eliminadas por aves infectadas com a geração parental (A) e aspecto consistente das fezes eliminadas por aves infectadas com o isolado precoce (B) de *E. maxima* "Ca".

6 – Discussão

6.1 - Obtenção de oocistos precoces

A obtenção de oocistos precoces de *Eimeria* sp. varia de acordo com as diferentes espécies e amostras encontradas no ambiente, sendo que os resultados obtidos com o isolado “Ca” de *E. maxima* no presente trabalho foram melhores do que os observados na literatura e em estudos realizados anteriormente com outros isolados de *E. maxima*, tendo alcançado e estabilizado o período pré-patente dos primeiros oocistos eliminados de 124h30min para 88h30min, após 25 passagens em aves sadias.

Shirley & Bellatti (1988) realizaram um experimento com um isolado *E. maxima*, no qual observaram a redução do período pré-patente de 127 horas na geração parental para 117 a 115 horas no isolado precoce, após 12 passagens em aves sadias. Este fato ocorreu devido à redução do ciclo de vida endógeno, isto é, a perda de uma ou mais fases assexuadas do ciclo biológico do parasito (McDonald *et al.*, 1984; McDonald *et al.*, 1986; Shirley & Bedrník, 1997; Shirley, 1989 e 2005). A atenuação em dois isolados de *E. maxima* (W e MF) levou a obtenção de amostras com redução do período pré-patente de 130 horas (F3) e 131 horas (F) para 107 horas, após 12 passagens (McDonald *et al.*, 1986).

Em estudos realizados com outras espécies, McDonald & Ballingall em 1983, realizaram a atenuação de oocistos de *E. mitis* resultando na redução do período pré-patente maior do que 20 horas após 14 passagens dos oocistos em

aves sadias. Também, Shirley & Bellatti (1984) observaram que o isolado de *E. necatrix* com período pré-patente de 138 horas, após as primeiras cinco passagens, mostrou diminuição regular a cada passagem e chegando à geração F15 com um período mínimo entre 115 a 120 horas. Ainda, Shirley *et al.* (1984) após quinze gerações, conseguiram reduzir o período pré-patente de um isolado de *E. praecox* de 88 horas na geração parental para 64 a 68 horas após 10 passagens e para 49 horas após 18 passagens dos oocistos em aves sadias.

Em outro trabalho de revisão sobre características de isolados atenuados, observou-se para *E. tenella* uma redução no período pré-patente de 121 horas para 112 horas, enquanto que em *E. acervulina* o período pré-patente diminuiu de 97 para 72 horas após 15 a 20 passagens de oocistos em aves sadias (Long & Johnson, 1988).

A atenuação de um outro isolado precoce de *E. necatrix* foi realizada por Montes *et al.* (1998) que conseguiram reduzir o período pré-patente de 148 horas na geração parental para 114 horas, após 19 passagens dos primeiros oocistos em aves sadias. Ocorreu diminuição de 34 horas no período pré-patente do isolado precoce, resultado semelhante ao obtido nesse estudo com *E. maxima* “Ca”.

No ano de 2005, foram realizados estudos com uma amostra isolada de *E. maxima* “L” em que foi observada a diminuição do período pré-patente de 124h30min para 97 horas após 28 passagens dos primeiros oocistos em aves sadias (Kawazoe *et al.*, 2006), confirmando que a obtenção dos oocistos precoces, a partir do isolado de *E. maxima* “Ca” realizada neste trabalho atingiu um ótimo resultado, conseguindo diminuir o período pré-patente ainda mais.

No trabalho mais recente sobre atenuação de um isolado de *E. acervulina*, Kawazoe *et al.* (2005) reduziram o tempo do período pré-patente, de 96 para 83 horas, após 25 passagens dos primeiros oocistos em aves saudáveis. Neste caso, apesar da diferença relativamente pequena entre as gerações parental e precoce, estudos histopatológicos e de patogenia comprovaram a atenuação deste isolado.

Nos isolados precoces caracterizados por um ciclo de vida mais abreviado do que a parental, a geração de meronte ou esquizonte que precede a gametogonia é cada vez menor em tamanho, com a produção de poucos merozoítos. Esta perda de estágios assexuados tem demonstrado ser a base para a atenuação (Jeffers, 1975; McDonald *et al.*, 1982). Outros fatores podem estar envolvidos na variação da redução do período pré-patente das amostras estudadas como: a patogenicidade causada no hospedeiro e a presença de alguns vírus dentro dos parasitos (Nuss, 1992).

6.2 - Patogenicidade

Para a comprovação na diminuição da patogenicidade entre as gerações parental e precoce da amostra isolada de *E. maxima* "Ca" foi realizado um estudo comparativo em aves experimentalmente inoculadas. O isolado precoce de *E. maxima* "Ca" quando comparado à respectiva geração parental apresentou: menor número de oocistos eliminados, ganho de peso significativo e escore de lesão com menor grau.

A determinação das doses de infecção neste experimento foi adotada com base em estudos anteriormente realizados no Laboratório de Coccidiose Aviária

do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP e nos protocolos encontrados na literatura científica. Importante salientar que a observação da patogenicidade com doses altas de oocistos na infecção de aves determina a real atenuação da virulência. Outro aspecto importante é a utilização de diferentes doses, de acordo com a espécie da *Eimeria* estudada. Não é recomendável utilizar doses altas de oocistos em aves, nos casos de estudos com espécies mais patogênicas como *E. tenella* e *E. necatrix*, pois poderiam matar as aves infectadas antes do término do experimento. Em espécies como *E. maxima*, uma dose de 1×10^5 , apesar de ser considerada uma dose alta, causa morbidade mas não mortalidade nas aves infectadas. Estudos realizados por diversos autores comprovam esta hipótese.

Estudo comparativo sobre a patogenicidade das gerações parental e precoce foi realizado por McDonald *et al.* (1986) em dois isolados precoces de *E. maxima* (WP5 e WP14), em experimentos separados, onde grupos de aves que receberam 5×10^3 oocistos do isolado W (parental) tiveram perda de peso mais significativa do que aquelas que receberam a mesma dose de oocistos de WP5 (ocistos precoces de 5ª geração). Entretanto, o ganho de peso médio do último grupo foi menor do que o do controle. Uma dose de 2×10^4 oocistos de WP5 foi menos patogênica do que uma dose de 5×10^3 de oocistos da geração parental. Onze dias após inoculação com 5×10^3 oocistos de WP14 (ocistos precoces de décima quarta geração), não houve diferença significativa entre as médias de pesos dos grupos infectados e não infectados (controle negativo). Uma dose de 2×10^4 oocistos de WP14 foi consideravelmente menos patogênica do que uma dose de 5×10^3 oocistos da geração W (parental). Os dados desses experimentos

indicaram que a seleção para a precocidade resultou em perda significativa de virulência (McDonald *et al.*, 1986), o que também ocorreu neste estudo com *E. maxima* “Ca”.

Um estudo sobre patogenicidade de seis isolados atenuados por seleção de oocistos precoces de *Eimeria* spp, mostrou que o isolado de *E. maxima* reduziu o período pré-patente de 121 horas para 106 (Long & Johnson, 1988). Com uma dose de 5×10^3 oocistos desse isolado precoce, o ganho de peso diminuiu 8,8% quando comparado com uma diminuição de 57% em aves inoculadas com geração parental. Em nosso estudo com *E. maxima* “Ca” as aves infectadas com o isolado precoce obtiveram 64,8% de ganho de peso e as inoculadas com a geração parental -3,1%, ou seja, perdendo peso.

A geração parental de *E. maxima* “Ca” apresentou, assim como no estudo de Long & Johnson (1988), lesões intestinais mais severas do que o isolado precoce. Nas outras espécies de eimérias estudadas, a redução na patogenicidade dos isolados precoces variou em relação às gerações parentais nos dois parâmetros avaliados (Long & Johnson, 1988). Perda de peso após a inoculação de oocistos parentais foi, particularmente, severa com *E. maxima* e *E. necatrix* e menos severa com *E. praecox*. Portanto, nossos resultados obtidos com o isolado precoce de *E. maxima* “Ca” são concordantes com aqueles mostrados por Long & Johnson (1988), uma vez que o isolado precoce apresentou resultados satisfatórios e contundentes para a diminuição dos danos gerados às aves.

Estudos sobre a patogenicidade de parasitos precoces e parentais de *E. mitis* foram realizados por McDonald & Ballingall (1983), os quais determinaram o ganho de peso corpóreo das aves infectadas em relação às aves sadias (controle

negativo). No primeiro experimento, foram inoculados oocistos precoces com período pré-patente de 77h (HP) e parentais (H) de *E. mitis*. A média de peso obtido pelo grupo infectado com isolado precoce HP foi intermediária entre o grupo controle e do grupo infectado com isolado H. No décimo dia após a infecção a média de peso do grupo inoculado com HP (precoce) foi significativamente mais alta do que a do grupo inoculado H, mas também significativamente mais baixa do que a do grupo controle. No segundo experimento, foram inoculados no lugar dos oocistos precoces (HP) com 77h, oocistos precoces com 72h. Neste caso a média de ganho de peso do grupo que recebeu isolado precoce (HP) não foi significativamente diferente daquela do grupo controle, enquanto o grupo que recebeu isolado H ganhou significativamente menos peso do que cada um dos outros grupos. Isto demonstra que o isolado HP 72h é menos patogênico do que o isolado HP 77h. Esses mesmos autores verificaram a patogenicidade do isolado atenuado de *E. acervulina*, com 72 e 62 horas de período pré-patente onde, para o primeiro isolado, com inoculação de 1×10^6 oocistos, houve significativa perda de peso ao passo que para o segundo isolado, com o mesmo número de oocistos inoculados, o ganho de peso foi similar ao das aves sadias.

Características patogênicas de isolados precoces (HP) de *E. brunetti* também foram avaliadas em um outro estudo. A média de pesos das aves que receberam oocistos precoces foi significativamente maior do que a obtida pelas aves que receberam geração parental (H). A atenuação da virulência das gerações precoces foi associada com o aumento de seleção para oocistos precoces e foi maior para *E. brunetti* HP26. O ganho de peso das aves inoculadas com HP26 não diferiu do ganho de peso das aves sadias (controle negativo).

Infecções com isolados precoces, especialmente HP15 e HP22, causaram poucas lesões no intestino das aves (Shirley *et al.*, 1986). Esses dados estão próximos aos apresentados do isolado precoce de *E. maxima* "Ca" que mostrou ganho de peso corpóreo significativamente maior do que as aves inoculadas com a geração parental.

Os estudos sobre a patogenicidade entre amostras precoces e parentais das espécies de *Eimeria* aviária têm demonstrado que, quanto mais precoces forem os oocistos eliminados, menor a patogenicidade dos isolados precoces em relação às respectivas gerações parentais. No entanto, o grau de atenuação tem diferido de acordo com o isolado e a espécie estudada, conforme demonstrado pelos autores acima citados e em experimentos realizados no Laboratório de Coccidiose Aviária da UNICAMP.

Alguns autores têm verificado que a redução na produção de oocistos de eimeria seja devido à diminuição da geração assexuada do ciclo biológico, fato que tem sido comprovado através de estudos histológicos do ciclo de desenvolvimento das gerações precoces. McDonald & Jeffers (1976) mostraram que ocorreu a eliminação da segunda geração de esquizogonia para a atenuação de um isolado precoce de *E. tenella*. Segundo Shirley & Bedrník (1997) os isolados atenuados possuem caracteristicamente seus ciclos assexuados diminuídos em dois ciclos.

McDonald *et al.* (1982) conferiram a depleção da quarta geração de esquizogonia em *E. acervulina* enquanto Shirley *et al.* (1984) verificaram a depleção da quarta geração de esquizogonia em *E. praecox* ao passo que para *E.*

brunetti foi verificada a perda de alguns estágios assexuados (Shirley *et al.*, 1986, 2005, 2007).

Em 2005 foi realizado um estudo comparativo sobre a patogenicidade entre a geração parental e precoce (geração F30) de *E. maxima* "L" no Laboratório de Coccidiose Aviária do Departamento de Parasitologia da UNICAMP. As aves infectadas com o isolado precoce apresentaram maior ganho de peso e menor produção de oocistos do que as aves inoculadas com a geração parental. No entanto, para o critério escore de lesão não houve diferença significativa entre os isolados estudados (Kawazoe *et al.*, 2006). A perda de peso verificada nas aves infectadas com a geração parental (controle positivo) quando comparada com o ganho de peso das aves não infectadas era previsível, porém o pouco ganho de peso nas aves infectadas com o isolado precoce (11%) quando comparado com as aves controle negativo (100%) indicou que esse isolado apresentou um grau alto de patogenicidade que não permitiu o desenvolvimento normal das aves. Estes dados mostraram que esse isolado precoce "L" de *E. maxima* não apresentou atenuação da virulência, mesmo tendo o ciclo de desenvolvimento diminuído com o período pré-patente de 97 horas. Por outro lado, a semelhança no escore de lesão observado nas aves infectadas com as gerações parental e precoce reforça a falta de atenuação do isolado precoce, apesar da diferença significativa observada no número total de oocistos eliminados pelas aves infectadas pelas duas amostras estudadas (Kawazoe *et al.*, 2006). Para que se comprovasse a atenuação do isolado precoce seria desejável que o ganho de peso das aves tivesse um resultado acima de 75%, como foram verificados por Kawazoe *et al.* (2005) estudando a atenuação de dois isolados de *E. acervulina*.

Esses autores verificaram que além da diminuição do ciclo assexuado, do ponto de vista histopatológico observou-se o desenvolvimento desse ciclo nas células superficiais da vilosidade intestinal em uma dos isolados, o que caracteriza uma amostra com baixa patogenicidade. No entanto, no segundo isolado estudado com o mesmo período pré-patente para a eliminação dos primeiros oocistos precoces, não houve diminuição considerável da patogenicidade, comprovando a variação na atenuação, mesmo em isolados precoces de *Eimeria*.

Chapman (2000) afirma que vacinas atenuadas não deveriam ser patogênicas e, desta forma não deveriam causar lesões no epitélio intestinal. Sendo que um dos fatores da patogenia das lesões intestinais está associado à grande capacidade de reprodução das espécies de *Eimeria*, principalmente ao desenvolvimento dos seus ciclos assexuados e a formação de grande número de estágios sexuais e de resistência (oocisto). Contudo, em estudos realizados com quatro vacinas atenuadas comerciais, duas amostras inoculadas em aves apresentaram lesões intestinais com escore variando entre graus 1 e 3 nos intestinos, sem demonstrar correlação com a redução no ganho de peso dos animais imunizados.

Danforth (1998) sugere que devido às variações antigênicas observadas em espécies de *Eimeria maxima*, os isolados atenuados deveriam ser desenvolvidos a partir de amostras regionais, implementando a utilização desta metodologia no controle da coccidiose aviária.

No presente estudo com *E. maxima* isolado "Ca", a redução do período pré-patente no isolado precoce comparado à geração parental mostrou diminuição significativa da patogenicidade observando-se lesões mínimas na mucosa

intestinal, demonstrando que na natureza existem isolados com diferentes graus de virulência e que isolados precoces não são sinônimos de isolado atenuado (Kawazoe *et al.*, 2005). Além disso, estes dados mostram que há diferença de comportamento em relação à diminuição do período pré-patente, de acordo com diferentes populações de uma mesma espécie, ou seja, podem ocorrer variações intraespecífica dos parasitos utilizados.

A realização de estudos comprovando a diminuição da virulência num isolado precoce é de fundamental importância para a comprovação da atenuação, para que possa ser utilizada com total segurança e confiabilidade como vacina viva no controle da coccidiose aviária.

7 - Conclusões

O isolado precoce obtido no presente estudo a partir da amostra de *Eimeria maxima* "Ca" parental apresentou as seguintes características em aves inoculadas com os oocistos obtidos:

1. Diminuição do período pré-patente em 36 horas;
2. Ganho de peso pelas aves infectadas em relação às aves sadias (controle negativo) de 64,8%;
3. Média do escore de lesão produzido na região mediana do intestino das aves infectadas, estatística e significativamente inferior em relação à geração parental;
4. Oocistos produzidos pelas aves inoculadas: cerca de vinte vezes menor e, significativamente inferior às aves infectadas com a geração parental;
5. Sinais clínicos ausentes de coccidiose nas aves.

Essas características demonstraram a diminuição da patogenicidade no isolado precoce e sugere a atenuação da virulência. Para a comprovação definitiva do uso deste isolado como vacina, serão necessários estudos complementares sobre teste de imunidade protetora em bateria e no campo.

8 - Referências Bibliográficas

ABEF – Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango.
Disponível em: <http://www.abef.com.br>. Arquivo capturado em 01 de setembro de 2008.

ALLEN, P.C.; DANFORTH, H.D.; AUGUSTINE, P.C. LONG, P.L.; ROWEL, J.G.
Counting oocysts of chicken modulation of avian coccidiosis. *International Journal for Parasitology*, Sidney n.28, p.1131-1140, 1998.

ALLEN, P.C., FETTERER R.H. Recent advances in biology of *Eimeria* species and diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clinical Microbiology*, v.15, p. 58-65, 2002.

ANUÁRIO DA AVICULTURA INDUSTRIAL. Situação atual e tendências para a avicultura de corte nos próximos anos. n. 1129/2004. Disponível na internet via: <http://www.aviculturaindustrial.com.br> Arquivo capturado em 27 de agosto de 2008.

ANUÁRIO DA AVICULTURA INDUSTRIAL. O avanço da utilização de vacinas e o uso de prébióticos e probióticos em substituição aos aditivos e promotores de crescimento devem ser as estratégias usadas no combate a coccidiose nos próximos anos. n. 1081/2000. Disponível na internet via: <http://www.aviculturaindustrial.com.br> Arquivo capturado em 27 de agosto de 2008.

BELLAVER, C.; FÁVERO, J.A.; FIGUEIREDO, É.A.P. Tecnologias e Inovações nas Cadeias de Carnes Suína e de Aves. *EMBRAPA Suínos e Aves-Inova 2005* –Brasil, 2005.

BIGGS, P.M. The world of poultry disease. *Avian Pathology*. v. 11, p.281-300, 1982.

- BORDIN, E.L. Patologia da Coccidiose. In: *Simpósio Internacional sobre Coccidiose*, Santos, SP, FACTA, *Anais*,. cap. 2. p.7-10, 1994.
- BORGES, A. Vacinas – Método Natural de proteção – para Coccidiose. In: *Simpósio de Sanidade Avícola da UFSM*, Santa Maria, RS, 2000. *Anais*,. p.55-63, 2000.
- BOURDEAU, P. Chimiorésistense chez les protozoaires – première et deuxième parties. *Le Point Vétérinaire*. Maisons-Lafort, v.26, n.160, p. 65-73, 1994.
- CASTLE, M.D.; JENKINS, M.C.; DANFORTH, H.D., LILLIHOJ, H.S. Characterization of a recombinant *Eimeria acervulina* antigen expressed in sporozoite an merozoite developmental stages. *Journal of Parasitology*. v. 77, p.384-390, 1991.
- CASTRO, A.G.M. Situação atual da coccidiose. In: *Simpósio Internacional sobre Coccidiose*. Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícola, Santos, SP, Brasil, 1994.
- CHAPMAN, H.D. Resistance to anticoccidial drugs in fowl. *Parasitology Today*, v.9, p. 159-162, 1993.
- CHAPMAN, H.D. Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian Pathology*, v.26, p.221-244, 1997.
- CHAPMAN, H.D. Pratical use of vaccines for the control of coccidiosis in the chickens. *World's Poultry Science Journal*, v.56, p.8-20, 2000.

CHAPMAN, H.D., CHERRY, T.E.; DANFORTH, H.D., RICHARDS, G.; SHIRLEY, M.W. & WILLIAMS, R.B. Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. *International Journal for Parasitology*, v.32, p. 617-629, 2002.

CONWAY, D.P.; GUYONNET, V.; MICHENER, S.; McDOULGALD, L.R.; MATHIS, G.F. Efficacy of semduramicin and salinomycin against *Eimeria maxima* in laboratory test using two levels of oocyst inocula. *Poultry Science*, v.74, p.1942-1947, 1995.

COSTA, C.A.F. Controle da coccidiose: possíveis avanços. In: *Simpósio de Sanidade Avícola da UFSM*, Santa Maria, RS, 2002. *Anais*, p.36-47, 2002.

CURRENT, W.L.; UPTON, S.J.; LONG, P.L. Taxonomy and life cycle. In: *Coccidiosis of man and domestic animals*. P. L. Long Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida, p.1–16, 1990.

DANFORTH, H.D. Use of live oocyst vaccines in the control of avian coccidiosis: experimental studies and field trials. *International Journal for Parasitology*, v.28, p.1099–1109, 1998.

DANFORTH, H.D.; McANDREW, S.J. Hybridoma antibody characterization on stage-specific and stage-cross-reactive antigens of *Eimeria tenella*. *Journal for Parasitology*. v. 73, p.985-992, 1987.

FERNANDO, M.A.; McCRAW, B.M. Changes in the generation cycle of duodenal crypt cells in chickens infected with *Eimeria acervulina*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*. v. 52, p.213-218, 1977.

- GURNETT, A.; DULSKI, P.; HSU, J.; TURNER, M.J. A family of glycolipid linked proteins in *Eimeria tenella*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. v. 41, p. 177-186, 1990.
- HEMSLEY, L. A. Experiences of coccidiosis in young chickens fed a coccidiostat with particular reference to the incidence of coccidiosis in broiler chickens in the south of England, 1961-1964. *The Veterinary Record*, London n.76, p.1432-1436, 1964.
- HODGSON, J.N; BALL, S.J; RYAN, K.C; WARREN, E.W. The incidence of drug resistant strains of *Eimeria* in chickens in Great Britain, 1966. *The British Veterinary Journal*. v.125, p.31–5, 1969.
- HORTON-SMITH, C. Sect. III, 9th *Worlds Poultry. Congress*, Paris, p.3-8, 1951.
- JEFFERS, T.K. Genetic transfer of anticoccidial drug resistance in *Eimeria tenella*. *Journal Parasitology* v.60, p.900-904, 1974a.
- JEFFERS, T.K. *Eimeria tenella*: incidence, distribution, and anticoccidial drug resistance of isolants in major broiler – producing areas. *Avian Diseases*, v.18, p.74-84, 1974b.
- JEFFERS, T.K. *Eimeria acervulina*: incidence, distribution, and anticoccidial drug resistance of isolants in major broiler – producing areas. *Avian Diseases*, v.18, p.331-342, 1974c.
- JEFFERS, T.K. Attenuation of *Eimeria tenella* through selection for precociouness. *Journal of Parasitology*. v.61, p.1083-1090, 1975.

- JOHNSON, J. & REID, W. M. Anticoccidial drugs: lesion-scoring techniques in battery and floor pen experiments with chickens. *Experimental Parasitology*, v.28, p.30–36, 1970.
- JOYNER, L.P. Immunological variation between two strains of *Eimeria acervulina*. *Parasitology*. v.59, p.725-732, 1969.
- JOYNER, L.P. Host na site specificity. In *The Biology of the Coccidia*. Edward Arnold Limited, Londres, Inglaterra. P.35-62, 1982.
- KAWAZOE, U. Biologia. In: *Simpósio Internacional sobre Coccidiose*, Santos, SP, FACTA, 1994. *Anais*, cap. 1. p.1-6, 1994.
- KAWAZOE U. Coccidiose. In: *Júnior A.B., Macari M. Doenças das aves*, FACTA, p.391-406, 2000.
- KAWAZOE, U.; CHAPMAN, D.; SHAW, M. Sensitivity of field isolates of *Eimeria acervulina* to salinomycin, maduramicin, and a mixture of clopidol and methyl benzoate in the chicken. *Avian Pathology*, v.20, p.439-446, 1991.
- KAWAZOE, U.; BORDIN, E. L.; MANARINI, C. A.L.; DIAS, L. A. V. Histopathological observations and characterisation of a selected Brazilian precocious line of *Eimeria acervulina*. *Veterinary Parasitology*, v.131, p.5-14, 2005.
- KAWAZOE, U. & Di FABIO, J. Resistance to diclazuril in field isolates of *Eimeria* species obtained from commercial broiler flocks in Brazil. *Avian Pathology*, v.23, p.305–311, 1994.

- KAWAZOE, U.; MANARINI, C. A.L. Development and characterization of *Eimeria acervulina* Brazilian precocious strain. In: *VIIIth Internacional Coccidiosis Conference and Annual Scientific Meeting of the Australian Society for Parasitology*, (Ed.) Ellis, J. T.; Jonson, A. M.; Morrison, D. A.; Smith, N. C., Australia, 2001.
- KAWAZOE, U.; PÍNOLA, T.B., MORETTI, M.E.; LIMA, C.A. Obtenção e caracterização de uma cepa precoce de *Eimeria maxima* (Apicomplexa, Eimeriidae). In: 14º Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Simpósio sobre Riquetsioses, Ribeirão Preto, nº 03.069, 2006.
- KAWAZOE, U.; TOMLEY, F.M.; FRASIER, J.A. Fractionation and antigenic characterization of organelles of *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitology*. v. 104, p. 1-9, 1992.
- KLEIN, U. Sensitivity of Field Isolates of Avian *Eimeria* to Different Salinomycin Products. *Supplement World Poultry Misset*, Boetinchem, p.26-29, 1996.
- KÖHLER, S.; DELWICHE, C.F.; DENNY, P.W.; TILNEY, L.G.; WEBSTER, P.; WILSON, R.J.M.; PALMER, J.D.; ROOS, D.S. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexam parasites. *Science*. v.275, p.1485-1498, 1997.
- LAURENT, F.; MANCASSOLA, R.; LACROIX, S.; MENEZES, R.; NACIRI, M. Analysis of chicken mucosal immune response to *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infection by quantitative reverse transcription – PCR. *Infection and immunity*, v.4, n.69, p.2527-2534, 2001.
- LEVINE, N. D. Taxonomy of the coccidian. *Journal of Parasitology*, v.56, p.208-209, 1970.

- LEVINE, N.D. Taxonomy and life cycles of coccidian. *In: The Biology of the Coccidia* (P.L. Long, ed.), Baltimore, USA: University Park Press, p.1-33, 1982.
- LEVINE, N. D. The protozoan phylum Apicomplexa. *Boca Raton, FL, USA, CRC Press*,. Vol. 1, 1988.
- LI, G.Q.; KANU, S.; XIANG, F.Y.; XIAO, S.M.; ZHANG, L.; CHEN, H.W.; YE, H.J. Isolation and selection of ionophore-tolerant *Eimeria* precocious lines: *E. tenella*, *E. maxima*, *E. acervulina*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.119, n.4, p.261-276, 2004.
- LONG, P.L. Coccidiosis in poultry. *CRC Critical Review* v.1, p. 25-50, 1987.
- LONG, P.L.; MILLARD, B. J.; JOYNER, L. P.; NORTON, C. C. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Veterinaria Latina*, v.6, p.201–217, 1976.
- LONG, P.L.; JOHNSON, J.K. *Eimeria* of American chickens: characteristics of six attenuated strains produced by selection for precocious development. *Avian Pathology*. v.17, p.305-314, 1988.
- LONG, P.L., JOYNER, L.P. Problems in the identification of species of *Eimeria*. *Journal Protozoology*, v.31, p.535-541, 1984.
- McDONALD, V.; BALLINGALL, S.; SHIRLEY, M.W. A preliminary study of the nature of infection and immunity in chickens given an attenuated line of *Eimeria acervulina*. *Parasitology*. v. 84, p.21 – 30, 1982.
- McDONALD, V. & BALLINGALL, S. Further investigation of pathogenicity, immunogenicity and stability of precocious *Eimeria acervulina*. *Parasitology*. v.86, p.361 – 369, 1983.

McDONALD, V.; SHIRLEY, M.W. *Eimeria mitis*: a comparison of the endogenous development stages of a line selected for early maturation and parent strain. *Parasitology*. v.88, p.37-44, 1984.

McDONALD, V.; SHIRLEY, M.W.; MILLARD, B.J. A comparative study of two lines of *Eimeria tenella* attenuated either by selection for precocious development in the chicken or by growth in chicken embryos. *Avian Pathology*. v.15, p.323-335, 1986.

McDOUGALD, L.R.; JEFFERS, T.K. *Eimeria tenella* (Sporozoa, Coccidia): gametogony following a single asexual generation. *Science*. v.192, p.258-259, 1976.

McDOUGALD, L.R.; DA SILVA, J.M.L.; SOLIS, J.; BRAGA, M. A survey of sensitivity to anticoccidial drugs in 60 isolates of coccidia from broiler chickens in Brazil and Argentina. *Avian Diseases*. v.31, p.287–292, 1987.

McDOUGALD, L.R.; SEIBERT, B.P. Residual activity of anticoccidial drugs in chickens after withdrawal of medicated feeds. *Veterinary Parasitology*, n.74 p.91-99, 1998.

MEEUSEN, E.N.; WALKER, J.; PETERS, A.; PASTORET, P.P.; JUNGENSEN, G. Current Status of Veterinary Vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*, v.20, p. 489–510, 2007.

MENCHER, D.; PUGATSCH, T.; WALLACH, M. Antigenic proteins of *Eimeria maxima* gametocytes: cell-free translation and detection with recovered chicken serum. *Experimental Parasitology*. v. 68, p.40-48, 1989.

- MONTES, C.; ROJO, F.; HIDALGO, R.; FERRE, I.; BADIOLA, C. Selection and development of a Spanish precocious strain of *Eimeria necatrix*. *Veterinary Parasitology*. v. 78, p. 169-183, 1998.
- MUIR, W.I.; BRYDEN, W.L.; HUSBAND, A.J. Immunity, vaccination and the avian intestinal tract. *Developmental and Comparative Immunology*. n.24, p.325–342, 2000.
- NUSS, D.L. Biological control of chestnut blight: an example of virus mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiology Review*. v.56, p. 561-576, 1992.
- OVIEDO-RONDÓN, E.O; CLEMENTE-HERNANDEZ, S.; WILLIAMS, P.; LOSA, R. Responses of Coccidia-Vaccinated Broilers to Essential Oil Blends Supplementation up to Forty-Nine Days of Age. *The Journal Applied. Poultry. Research*. v.14, p.657–664, 2005.
- PETERSON, E.H.; LA BORDE, J. A laboratory and field evaluation of Amprolium – A new anticoccidial. *Avian Pathology*, Tucson, p.207-213, 1961.
- PRADO, O. R.; HAMANN, W. Ocorrência de *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, e *E. mitis* em Frangos de Corte na Região Oeste de Santa Catarina - Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. *Dissertação de Mestrado*, 2005.
- RAILLIET, A.; LUCENT, A. Note sur quelques espèces de coccidies encore peu étudiées. *Bul. Soc. Zoology*, v.16, p.246, 1891.
- ROLLINSON D, JOYNER L, NORTON C. *Eimeria maxima*: the use of enzyme markers to detect the genetic transfer of drug resistance between lines. *Parasitology*. v.78, p.361–7, 1979.

- RUFF, M.D. Important parasites in poultry production systems. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.84, p.337-347, 1999.
- SAS Institute Inc. *SAS/ SATAT user's guide*, 2008.
- SHIRLEY, M.W. Enzyme characterization of the Eimeriidae. In: *Coccidia and intestinal coccidomorphs. Vth International Conference*, INRA Publications, Ed. Yvoré, p.111-124, 1989.
- SHIRLEY, M.W. Vacinas vivas: atenuadas e virulentas. *Simpósio Internacional sobre Coccidiose*, Santos-SP, Brasil, p.109-124, 1994.
- SHIRLEY, M.W. Uso de vacinas baseadas em oocistos vivos no controle da coccidiose aviária, Visão Européia. *II Simpósio Internacional sobre Coccidiose Aviária*, Foz do Iguacu-PR, Brasil, p.57-70, 1999.
- SHIRLEY, M.W. & BELLATI, M.A. *Eimeria necatrix*: selection and characteristics of a precocious (and attenuated) line. *Avian Pathology*. v.13, p.657-668, 1984.
- SHIRLEY, M.W. & BELLATI, M.A. Live attenuated Coccidiosis vaccine: selection of a second precocious line of *Eimeria maxima*. *Research. Veterinary Science*. v.44: p.25 - 28. 1988.
- SHIRLEY, M.W.; BEDRNÍK, P. Live attenuated vaccines against avian coccidiosis: success with precocious and egg-adapted lines of *Eimeria*. *Parasitology Today*. v.13, p.481-484, 1997.
- SHIRLEY, M.W.; HARVEY, D.A. A genetic linkage map of the apicomplexan protozoan parasite *Eimeria tenella*. *Genome Research*. v.10, p.1587-1593, 2000.

- SHIRLEY, M.W.; McDONALD, V; BELLATI, M.A. *Eimeria brunetii*: selection and characteristics of a precocious (and attenuated) line. *Avian Pathology*. v.15, p.705-717, 1986.
- SHIRLEY, M.W. SMITH, L.A.; TOMLEY, M.F. The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. *Advances in Parasitology*, v.60, p.285-330, 2005.
- SHIRLEY, M.W., SMITH, A.L., BLAKE, D.P. Challenges in the successful control of the avian coccidia. *Vaccine*. v.25,n.30, p.5540-5547, 2007.
- SMITH, A.L., HESKETH, P; ARCHER, A.; SHIRLEY, M.W. Antigenic diversity in *Eimeria maxima* and the influence of host genetics and immunization schedule on cross-protective immunity. *Infection and Immunity*.v.70, p.2472–2479, 2002.
- SLUIS, W.V. *Eimeria*, Quo vadimus? *Misset. World Poultry*, v.7, p.4-8, 1993.
- TERRA, A.T.; COSTA, P.S. DA; FIGUEIREDO, P.C. DE; CARVALHO, E.C.Q. Frequência de espécies do gênero *Eimeria* em frangos de corte abatidos industrialmente no município de Monte Alegre do Sul, Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.10, n.2, p.87-90, 2001.
- TSUJI, N.; KAWAZU, S.; OHTA, M.; KAMIO, T.; ISOBE, T.; SHIMURA, K.; FUJISAKI, K. Discrimination of eight chicken *Eimeria* species using two-step Polymerase Chain Reaction. *The Journal of Parasitology*, v.83, n.5, p.966-970, 1997.
- TYZZER, M.D. Coccidiosis in gallinaceous Birds. *American Journal Hygiene*, v.10, p.269-312, 1929.

UBA - União Brasileira de Avicultura. Boletim Informativo. Disponível na internet via <http://www.aviculturaindustrial.com.br>. Arquivo capturado em 02 de setembro de 2008.

VERTOMMEN, M.H. Situação do coccidiose na Europa. In: *Simpósio Internacional de Coccidiose*. Santos, SP, FACTA, 1994a. *Anais* .FACTA, p.61–84, 1994.

YOUN, H. J.; NOH, J. W. Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. *Veterinary Parasitology*. n.96, p.257-263, 2001.

WALLACH, M; MENCHER, D.; HALABI, A.; PILLEMER, G.; SARSHALOM, O.; GILAD, M.; BENDHEIM, U.; DANFORTH, H.D.; AUGUSTINE, P.C. Maternal immunization with gametocyte antigens as a means of providing protective immunity against *Eimeria maxima* in chickens. *Infection Immunity*. v.60, p.2036-2039, 1992.

WECK-HEIMANN, A. Disponível em: <http://www.saxonet.de/coccidia>. Arquivo capturado em 08 de junho de 2008.

WILLIAMS, R.B. Safety of the attenuated anticoccidial vaccine “Paracox” in broiler chickens isolated from extraneous coccidial infection. *Veterinary Research Communications*. v.18, p.189–198, 1994.

WILLIAMS, R. B. Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccine for chickens. *International Journal for Parasitology*, v.28, p.1089–1098, 1998.

WILLIAMS, R.B. 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, 1999.

WILLIAMS, R.B. Fifty years of anticoccidial vaccines for poultry (1952-2002). *Avian Diseases*. v. 46, p.775-802, 2002.

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

WILLIAMS, R. B.; ANDREWS, S. J. The origins and biological significance of the coccidial lesions that occur in the chickens vaccinated with a live attenuated anticoccidial vaccine. *Avian Pathology*, v.30, p.215–220, 2001.