



“Avaliação da imunidade protetora de uma cepa atenuada de *Eimeria acervulina*, em galinhas (*Gallus gallus*), após desafios com as cepas parentais homóloga e duas heterólogas”

200336887

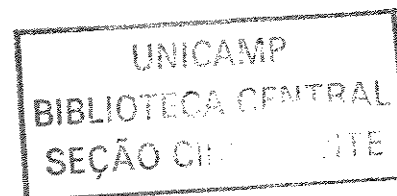
LUCIO ANDRÉ VIANA DIAS

ORIENTADORA: PROFA. DRA. URARA KAWAZOE

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Lucio André Viana Dias
Urara Kawazoe
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

2003



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TUNICAMP
	D 543 a
V	EX
TOMBO BC	56658
PROC.	16-124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	2411,00
DATA	03/12/03
Nº CPD	

CM00192859-5

Bib id 307088

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

D543a

Dias, Lucio Andre Viana

Avaliação da imunidade protetora de uma cepa atenuada de *Eimeria acervulina*, em galinhas (*Gallus gallus*) após desafios com as cepas parentais homóloga e duas heterólogas / Lucio André Viana Dias. -- Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientadora: Urara Kawazoe

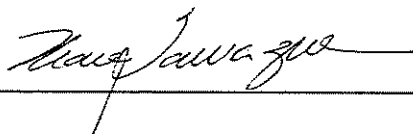
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Coccidiose. 2. Vacina. 3. Eimeriidae. 4. Imunidade. I. Kawazoe, Urara.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da defesa: 22 de Setembro de 2003

Banca examinadora:

Prof.^a. Dra. Urara Kawazoe (Orientadora):




Prof.^a. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo:



Prof.^a. Dra. Silmara Marques Allegretti:

Prof.^a. Dra. Marlene Tiduko Ueta:



Prof.^a. Dra. Liana Verinaud:

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade a qual seu futuro trabalho pertence”

Albert Einstein

A minha querida mãe, que sempre acreditou em mim e me apoiou em todos os momentos, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Fundação Marinete Viana pelo financiamento do meu primeiro ano em Campinas.

A minha família, pelo amor, carinho e paciência que sempre tiveram comigo.

A Prof^a Dra. Urara Kawazoe, pela compreensão e confiança dedicados durante a orientação.

A FAEP e CNPq pelo auxílio financeiro concedido.

Aos meus companheiros de Pós-graduação do Departamento de Parasitologia.

Aos amigos das Repúblicas de Barão Geraldo.

Aos super amigos: Wagner, Paula, Jacy, Vânia, Érico, Adelina, por todos os ótimos momentos convividos.

Às Prof^{as}.Doutoras Silmara Allegretti, Ana Guaraldo e Marlene Ueta pelas valiosas sugestões oferecidas.

A todos, minha profunda gratidão.

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO.....	1
2.JUSTIFICATIVA.....	9
3.OBJETIVO.....	10
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	11
5.RESULTADOS.....	18
6.DISSCUSSÃO.....	23
7.CONCLUSÕES.....	31
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação da imunidade protetora produzida pela imunização de galinhas (*Gallus gallus*) com a cepa atenuada Cu de *Eimeria acervulina*, desafiadas com sua cepa homóloga e duas heterólogas parentais. Foram utilizadas aves SPF (Specific Pathogen Free) da linhagem *White Leghorn*, com idade de sete dias. Cada ave recebeu uma dose de 1×10^3 oocistos da cepa atenuada “Cu” de *Eimeria acervulina*, no 7º dia e outra dose reforço no 14º dia de vida. As aves foram desafiadas com 2×10^5 oocistos das cepas parentais “Cu”, “PeFa” e “I” de *E. acervulina*, com 21 dias de idade. Os parâmetros adotados para a avaliação foram ganho de peso médio por ave, escore de lesão da mucosa intestinal e produção de oocistos por ave. A imunização proporcionou uma elevada proteção (acima de 85%) às aves desafiadas com as cepas parentais “Cu” e “PeFa”, com relação ao ganho de peso médio por ave e produção de oocistos. Contudo, a imunidade mostrou-se menos elevada (75%) após o desafio com a cepa parental “I”. Foi obtida total proteção contra o desenvolvimento de lesões intestinais em todos os experimentos de imunização. Os resultados apresentados sugerem a presença de variação antigênica em *E. acervulina* “I”, em relação às duas outras cepas utilizadas. A cepa atenuada “Cu” de *Eimeria acervulina* apresenta um elevado potencial para utilização como vacina, no Brasil.

ABSTRACT

Evaluation of protective immunity produced by immunization of chickens (*Gallus gallus*) with the attenuated line "Cu" of *Eimeria acervulina* after challenge with its homologous and two heterologous strains "PeFa" e "I" was performed. Seven day old *White Leghorn* SPF (Specific Pathogen Free) chickens were used for experiments. Each bird received a dose of 1×10^3 attenuated "Cu" line oocysts of *Eimeria acervulina* on the 7th day and another dose in the 14th day of age. The birds were challenged with 2×10^5 oocysts of "Cu", "PeFa " and " I " parent strains of *E. acervulina* on the 21st day - old. The criteria used to evaluate protective immunity were: weight gain, lesion score of duodenum and upper small intestine and oocysts production per bird. The immunization with precocious line of *E. acervulina* showed a high protection of chickens after challenge with parent strains "Cu" (96%) and "PeFa" (over 86%) for weight gain and oocysts production. The immunity was lower (75%) when birds were challenged with the "I" parent strain. Total protection against intestinal lesions was obtained in all the immunization experiments. The present results suggest the presence of antigenic variation in *E. acervulina* between the strains used in the experiments. The attenuated "Cu" line of *Eimeria acervulina* seems suitable for its use as live vaccine in Brazil.

INTRODUÇÃO

A coccidiose aviária é considerada um dos maiores problemas sanitários da indústria avícola mundial, sendo responsável por perdas anuais de pelo menos 800 milhões de dólares (Williams, 1998). Estes gastos estão relacionados com manejo profilático pela adição de medicamentos preventivos à alimentação; manejo no controle de epidemias, a redução no ganho de peso e na postura de ovos pelas aves infectadas (Ruff, 1999).

A doença é causada por sete espécies de protozoários do gênero *Eimeria* (Filo Apicomplexa: Família Eimeridae): *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella* (Reid et al., 1984).

No Brasil poucos levantamentos sobre a prevalência da coccidiose foram realizados, mas de uma maneira geral as espécies mais encontradas são: *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. praecox* e com menor frequência *E. tenella* (Kawazoe, 2000). Estes dados refletem a realidade encontrada em estudos de outros países (Williams et al., 1996). Em criações comerciais, tanto de frango de corte como de aves poedeiras, a coccidiose está presente em níveis variados de acordo com o histórico de utilização de medicamentos anticoccidianos ou de vacinas vivas virulentas ou atenuadas (Kawazoe, 2000).

A transmissão ocorre pela via fecal-oral, isto é, pela ingestão de oocistos esporulados presentes na ração, água ou no meio ambiente. O ciclo biológico dos parasitos ocorre em um único hospedeiro, onde os oocistos imaturos são eliminados junto as fezes do hospedeiro, vindo a esporular e amadurecer no meio ambiente em dois ou três dias, na presença de O₂, temperatura de 25-30°C e umidade de 70-80%. Os oocistos esporulados são infectantes e podem

permanecer viáveis por mais de três meses no meio ambiente. Uma vez ingeridos pelas aves, a membrana externa do oocisto sofre rompimento na moela e os esporocistos são liberados. Posteriormente, pela ação da tripsina e de sais biliares os esporozoítos são liberados dos esporocistos no duodeno. Esses esporozoítos, ao penetrarem nas células da mucosa intestinal transformam-se em trofozoítos uninucleados. A seguir, inicia-se a fase assexuada do ciclo (merogonia) onde ocorrem divisões mitóticas sucessivas do núcleo, com a formação final dos merozoítos dentro do meronte. De acordo com a espécie, cada meronte produz em seu interior um número variável de merozoítos. Após o rompimento da célula hospedeira, os merozoítos atingem a luz intestinal e invadem novas células epiteliais refazendo esse ciclo. Alguns merozoítos penetram em novas células dando início a fase sexuada do ciclo ao passo que outros realizam uma terceira e/ou quarta geração do ciclo assexuado, dependendo da espécie. Na fase sexuada do ciclo ocorre a formação dos gametas femininos e masculinos, fecundação, e a formação dos zigotos. A formação de uma membrana dupla em volta dos zigotos origina os oocistos não esporulados, que ao cair na luz intestinal, são eliminados para o meio externo juntamente com as fezes (Fig.1).

As espécies de *Eimeria* apresentam especificidade quanto à sua localização na região intestinal, e com relação a profundidade na mucosa intestinal onde parasitam, de acordo com a espécie, o que determina o grau de patogenicidade no hospedeiro: *E. mitis* e *E. praecox* são espécies consideradas pouco patogênicas e de desenvolvimento intracelular epitelial; *E. necatrix* e *E. tenella* são altamente patogênicas, localizando-se na camada subepitelial da mucosa, associadas à forma aguda da doença; *E. acervulina* e *E. maxima*,

possuem desenvolvimento epitelial e são consideradas de patogenicidade mediana, contudo apresentam alta morbidade devido aos sintomas subclínicos que causam (Joyner, 1982). De um modo geral, os parasitas agem modificando as estruturas das vilosidades quando do seu desenvolvimento nos enterócitos, causando diminuição na absorção de diversos nutrientes, aumento da taxa de conversão alimentar e ocasionando perda de peso, fator esse de extrema importância econômica para os produtores avícolas (Fernando & McCraw, 1977; Joyner, 1982; Bordin, 1994). As principais características das espécies de *Eimeria* de galinha estão descritas no **Quadro 1**.

Segundo Jeurissen et al. (1996), após a infecção primária ocorre o desencadeamento de respostas imunes humoral e celular espécie-específica. O sistema imune poderia controlar o desenvolvimento parasitário principalmente durante a interação do parasita com as células do epitélio intestinal; uma vez no interior do epitélio próximo aos linfócitos; e durante sua passagem pela lâmina própria em direção ao epitélio das criptas.

Embora a infecção por espécies de *Eimeria* seja capaz de desencadear a produção imunoglobulinas específicas para estes parasitas nas aves (Girard et al., 1997), a função dos anticorpos contra infecções primárias aparentemente possui pouca importância. Lillehoj (1987) observando a quantidade de oocistos eliminados após infecção por *Eimeria tenella* em aves bursectomizadas, não verificou alteração na quantidade de oocistos eliminados em relação à aves normais. Contudo, estudos *in vitro* têm demonstrado que as imunoglobulinas podem agir reduzindo a infectividade dos parasitas por meio de: (1) aglutinação; (2) redução da motilidade; (3) induzindo mudanças na

conformação de moléculas de superfície, possivelmente envolvidas no processo de invasão celular (Lillehoj & Lillehoj, 2000).

Quadro 1. Características das sete espécies de *Eimeria* spp. que ocorrem em galinhas domésticas (*Gallus gallus*)

ESPÉCIES	LOCALIZAÇÃO	LESÕES MACROSCÓPICAS	ESTÁGIOS ASSOCIADOS À INFECÇÃO	PATOGENICIDADE*	IMUNOGENICIDADE*
<i>E. acervulina</i>	Intestino delgado: porção superior	Infecção leve: estrias transversais esbranquiçadas; espessamento da parede intestinal	Gametócitos e oocistos	++	++
<i>E. brunetti</i>	Int. delgado: porção inferior e cecos	Coagulação, necrose, enterite sanguinolenta	Gametócitos e oocistos	+++	++++
<i>E. maxima</i>	Int. delgado médio	Paredes espessadas, exsudato mucosanguinolento	Gametócitos e oocistos	+++	++++
<i>E. mitis</i>	Int. delgado: porção inferior e cecos	Sem lesões, exsudato mucóide	Gametócitos e oocistos	++	++
<i>E. necatrix</i>	Int. médio (ciclo assexual) cecos (ciclo sexual)	Lesões globosas, pontos brancos (esquizontes), exsudato com muco e filetes de sangue	Esquizontes	++++	++++
<i>E. praecox</i>	Int. delgado: porção superior	Sem lesões, exsudato mucóide	Gametócitos e oocistos	+	++
<i>E. tenella</i>	Cecos	Início: hemorragia na luz dos cecos; Posterior: mucosa espessada, tecido necrótico	Esquizontes	++++	++++

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

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

A imunidade mediada por células é considerada como o principal componente da resistência contra *Eimeria* spp. em camundongos e galinhas, como demonstrado em diversos estudos de supressão celular (Lillehoj & Trout, 1994). Um dia após a infecção primária, pode ser observada uma maciça infiltração da lâmina própria por macrófagos, granulócitos e linfócitos

(Lillehoj & Lillehoj, 2000). Juntamente com a presença das células têm-se detectado a produção de cinco citocinas principais em resposta a infecção: IFN- γ , IL-2, IL-15, TNF e o Fator de Crescimento Celular (TGF) (Yun, et al, 2000; Lillehoj & Lillehoj, 2000).

Desde a década de 50 a adição de medicamentos na ração das aves tem sido a principal forma de controle da coccidiose aviária, mas o contínuo surgimento de isolados resistentes a praticamente todos os medicamentos de uso comercial e o desinteresse da indústria farmacêutica em produzir novas drogas tem limitado esta estratégia (Kawazoe *et al.*, 1991; Chapman, 1997, 1993).

Com as dificuldades surgidas com as drogas, as vacinas vivas foram gradativamente ganhando mais espaço, sendo atualmente consideradas a maneira mais segura no controle da coccidiose aviária, além de não deixar resíduos de fármacos nos tecidos das aves (Danforth, 1998).

As vacinas vivas hoje comercializadas apresentam-se em duas variantes: as virulentas, constituídas de isolados de espécies de *Eimeria* mantidos em laboratório, que não possuem nenhuma alteração com relação a sua virulência (ex.: *Coccivac B[®]/D[®]* e *Immucox[®]*), e vacinas atenuadas, com parasitos selecionados artificialmente para redução da virulência (ex.: *Livacox[®]* e *Paracox[®]*) (Williams, 1998). Contudo, pelo fato da possibilidade do desenvolvimento de lesões intestinais e diminuição do ganho de peso em aves suscetíveis, as vacinas virulentas tem dado lugar à utilização de vacinas vivas atenuadas, consideradas mais seguras, caso estejam realmente atenuadas (Chapman, 2000).

A metodologia para a obtenção de cepas atenuadas foi desenvolvida por Jeffers (1975), por meio da seleção de oocistos precoces em cepas de *E. tenella*. O método consiste em passagens sucessivas dos primeiros oocistos eliminados após as infecções nas aves, de modo que após várias passagens nas aves pode ocorrer o encurtamento do ciclo parasitário, e conseqüentemente diminuição do período pré-patente (precocidade), e ocasionalmente levando à atenuação da virulência da cepa, permitindo o uso da mesma para a imunização das aves. Esta metodologia tem permitido a obtenção da precocidade e atenuação de várias espécies de *Eimeria* de galinhas, tais como: *E. acervulina* (McDonald et al., 1982; Kawazoe & Manarini, 2001); *E. mitis* (McDonald & Ballingall, 1983); *E. praecox* (Shirley et al., 1984); *E. necatrix* (Shirley & Bellatti, 1984; Montes et al., 1998); *E. maxima* (McDonald et al., 1986) e *E. brunetti* (Shirley et al., 1986).

De um modo geral, as cepas atenuadas apresentam as seguintes características: (i) encurtamento do ciclo reprodutivo (período de patência); (ii) diminuição do potencial reprodutivo; (iii) atenuação da virulência; (iv) retenção da imunidade; (v) estabilidade da atenuação (Shirley & Bedrník, 1997). A dificuldade para a obtenção dessas cepas baseia-se no fato de que algumas cepas precoces não conferem imunidade protetora total contra cepas heterólogas e/ou não estarem atenuadas apesar de serem precoces. A segurança na utilização dessas cepas está associada à diminuição do desenvolvimento de estágios assexuados nas células do epitélio intestinal, com conseqüente redução na produção de oocistos, além de causar menor dano às células intestinais das aves e menor disseminação de oocistos nos galpões.

Recentemente, foi desenvolvida no Brasil uma cepa precoce de *E. acervulina*, cuja cepa parental foi isolada a partir de uma amostra de campo, obtida de galinhas “caipiras”, com histórico negativo para uso de medicamentos anticoccidianos. A cepa precoce foi obtida por passagens sucessivas dos primeiros oocistos eliminados em aves não infectadas, até a estabilização do período pré-patente de eliminação dos oocistos. Os parâmetros utilizados para a caracterização da cepa precoce foram: período pré-patente de eliminação dos primeiros oocistos, atenuação da patogenicidade, análises histopatológicas da mucosa intestinal de aves infectadas, teste preliminar de imunização e testes de sensibilidade a diversos medicamentos anticoccidianos, atestando a sua precocidade e atenuação em relação à cepa parental (Kawazoe & Manarini, 2001).

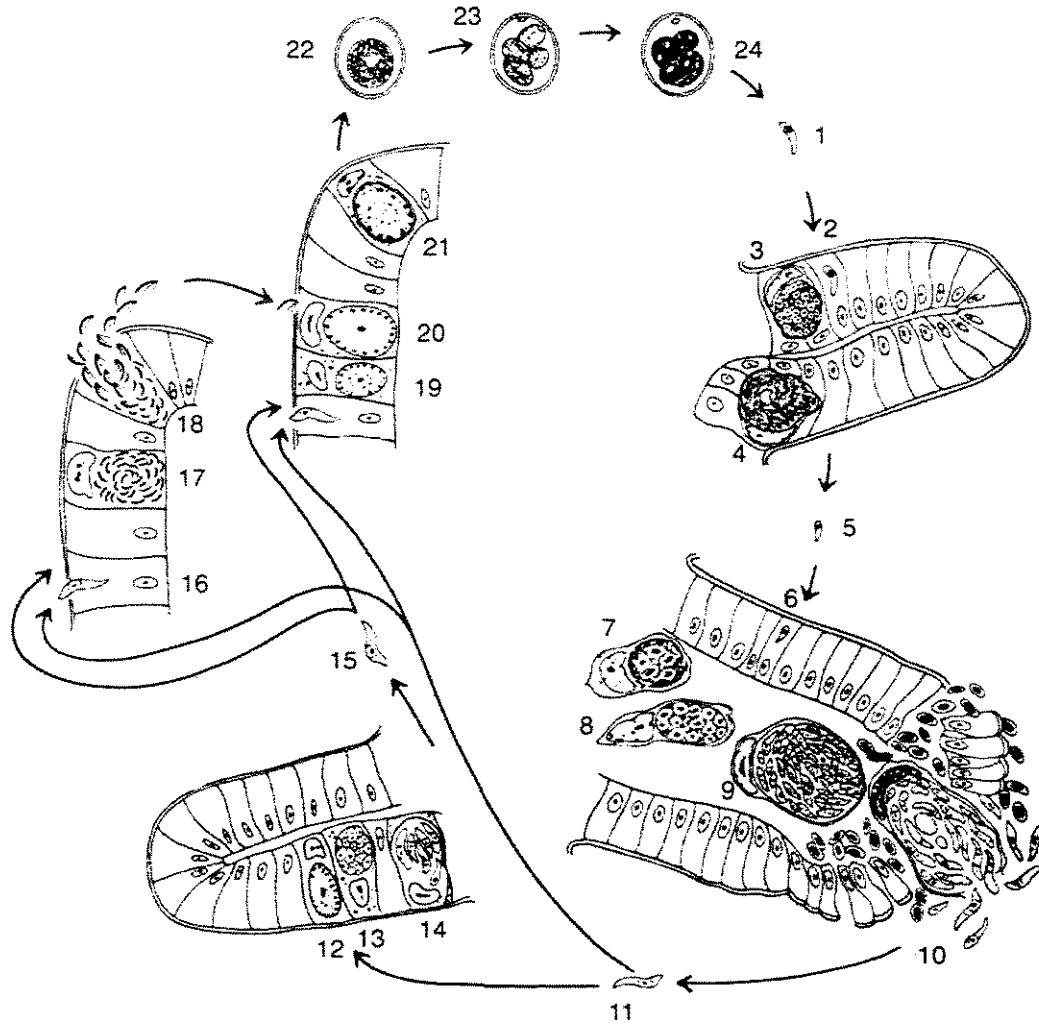


Figura 1 – Ciclo de vida de *Eimeria* spp. – Após deixarem os esporocistos os esporozoítos (1) penetram em uma célula do epitélio intestinal (2). Com divisões mitóticas sucessivas dentro de um meronte (3), forma-se a primeira geração de merozoítos (4), que rompem a células parasitada e são liberados para a luz intestinal (5), podendo assim penetrar em novas células (6), reiniciando um novo ciclo merogônico (7, 8), que culmina com a formação da segunda geração de merozoítos (9, 10). Após romper a células hospedeira os merozoítos formados (11) podem entrar em uma nova célula epitelial do intestino (12) e gerar a terceira geração de merozoítos (13, 14). Grande parte dos merozoítos de segunda (11) e todos da terceira geração (15) penetram em uma nova célula epitelial. Alguns tornam-se microgametócitos (16, 17), os quais produzem uma grande quantidade de microgametas (18), e outros tornam-se macrogametetas (19, 20). Os macrogametetas são fertilizados pelos microgametas e tornam-se zigotos (21), que posteriormente formam a parede cística para formar os oocistos. Após seu desenvolvimento, os oocistos caem na luz intestinal contendo um esporonte e são eliminados para o meio ambiente com as fezes (22) onde sofre divisão nuclear meiótica formando os esporoblastos (23) e divisão mitótica para a formação de quatro esporocistos, cada um contendo dois esporozoítos. Tem-se agora o oocisto maduro infectante (24) que pode ser ingerido por uma galinha. (Roberts & Janovy-Jr., 1996)

JUSTIFICATIVA

Segundo dados da Associação Paulista de Avicultura (APA, 2001), o Brasil é considerado um dos maiores produtores e exportadores de frango de corte no mundo. Assim como em outros países, criações comerciais de galinhas livres de coccidiose tem se tornado extremamente raras (Bigs, 1982; Williams, 1999).

No Brasil, dados estatísticos mostram que a coccidiose é responsável por perdas anuais de aproximadamente 30 milhões de dólares (Castro, 1994). Segundo o mesmo autor a indústria aviária apresentou uma considerável evolução na quantidade de animais produzidos nas últimas décadas. Em contrapartida, a produção de novas drogas pela indústria farmacêutica não teve proporcionalmente o mesmo crescimento. Conseqüentemente, a facilidade com que as espécies de *Eimeria* spp. desenvolvem resistência aos medicamentos utilizados comercialmente e os elevados gastos associados ao desenvolvimento de novos fármacos, podem ser considerados os principais responsáveis pela re-emergência observada da coccidiose a partir da década de 80 no Brasil (Castro, 1994).

Como alternativa aos medicamentos anticoccidianos, diversas granjas brasileiras iniciaram a utilização de vacinas com cepas virulentas (Coccivac B®/D® e Immunox®) e atenuadas (Livacox®) como medida imunoprolática. Contudo, o elevado custo de importação destes produtos e a ocorrência de variação antigênica em algumas espécies, tal como observado em populações de *E. maxima*, e em menor grau em *E. acervulina*, podem atuar como importantes obstáculos para a eficiência de sua utilização.

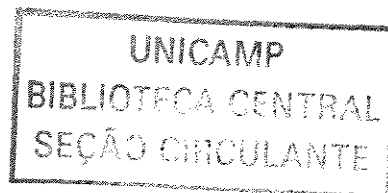
Dentre as sete espécies causadoras da coccidiose aviária, as espécies consideradas mais importantes são *E. acervulina*, devido ao elevado potencial reprodutivo, e *E. maxima*, ambas com alta prevalência nas granjas e relativa facilidade para o desenvolvimento de resistência às drogas comercialmente utilizadas para o controle da coccidiose no mundo (Chapman, 1982; Kawazoe et al., 1991; Kawazoe & Di Fabio, 1994; Williams et al., 1996).

OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade da cepa atenuada “Cu” de *E. acervulina* em induzir imunidade protetora em galinhas, após desafios com sua cepa homóloga “Cu” e duas cepas heterólogas “PeFa” e “T”.

Para essa avaliação foram utilizados os seguintes critérios:

1. Ganho de Peso
2. Escore de lesão da mucosa intestinal
3. Produção de oocistos.



MATERIAL E MÉTODOS

1 – AVES. Foram utilizadas galinhas (*Gallus gallus*) da linhagem *White Leghorn*. São aves SPF (*Specific Pathogen Free*) amplamente utilizadas para experimentação científica. As mesmas foram mantidas nas dependências do biotério de aves, livre de patógenos, do Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, UNICAMP.

A partir do 1º dia de idade, as aves foram alocadas em gaiolas de metal (51x40cm), com acesso irrestrito a água filtrada e ração inicial para aves destituída de qualquer medicamento. A periodicidade de iluminação foi de 9 horas de luz e 15 horas de escuro, sendo que as luzes foram acessas às 8 horas da manhã e apagadas às 17 horas da tarde. As aves permaneceram em temperatura ambiente.

Embora a sexagem de aves ao 1º dia de idade seja conseguida por especialistas, a empresa fornecedora das aves (Merial Saúde Animal) não dispõe de tal funcionário, de modo que a sexagem ao início do experimento não pode ser realizada. Conseqüentemente, os grupos de aves por gaiolas foram aleatoriamente compostos por aves de ambos os sexos.

O sacrifício das aves para verificação do escore de lesão foi realizado por deslocamento cervical. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/Unicamp - Protocolo no. 316-1).

2 – PARASITOS. Foram utilizadas: cepa precoce “Cu” de *E. acervulina* obtida pela Profa. Dra. Urara Kawazoe para a imunização das aves; cepa homóloga parental “Cu” e cepas heterólogas “PeFa” e “I” de *E. acervulina*

para desafio das aves imunizadas. As cepas são mantidas no Laboratório de Coccidiose Aviária do Departamento de Parasitologia, IB, UNICAMP. As cepas “Cu” e “I”, utilizadas no presente trabalho foram isoladas de galinhas “caipiras”, dentro do Estado de São Paulo, sem histórico de uso de medicamentos anticoccidianos. A cepa “PeFa” foi isolada em uma granja comercial no Estado de São Paulo, com histórico de uso de medicamentos anticoccidianos de uso comercial.

Previamente à realização de cada experimento, os oocistos de cada cepa foram produzidos em aves. Os oocistos encontrados nas fezes foram purificados utilizando o método de flutuação em solução saturada de NaCl (Long et al., 1976), e a esporulação foi realizada em solução de dicromato de potássio a 2% na presença de O₂, a temperatura ambiente (28°C). Oocistos esporulados foram mantidos em água destilada, a temperatura de aproximadamente 4°C. Foram utilizados oocistos com no máximo oito semanas de armazenamento, período em que os oocistos conservam a sua viabilidade (Long et al., 1976).

3 – EXPERIMENTO. Para a avaliação da imunidade protetora, as aves foram imunizadas com a cepa precoce “Cu” de *E. acervulina* e desafiadas com a cepa homóloga parental “Cu” e duas cepas parentais heterólogas “PeFa” e “I”. Cada experimento foi realizado em triplicata, onde cada grupo foi composto de cinco aves por gaiola.

3.1. – Dose de oocistos para a imunização das aves: as aves foram imunizadas com 1×10^3 oocistos em 0,5 mL de água destilada por ave, inoculadas por via oral, mediante o uso de uma seringa de 1,0 mL. As aves

receberam a primeira dose de imunização da cepa precoce “Cu” com sete dias de idade, e uma dose reforço com 14 dias de idade.

3.2. – Dose de oocistos para o desafio das aves imunizadas: as aves foram desafiadas com 21 dias de idade, mediante inoculação, via oral, de 2×10^5 oocistos em 0,5 mL de água filtrada por ave. Foram utilizadas as cepas parentais “Cu”, “PeFa” e “I” de *E. acervulina* para os desafios.

Os controles positivos foram constituídos por grupos de aves não imunizadas e infectadas pelas cepas parentais (PA) “Cu”, “PeFa” e “I” de *E. acervulina* no 21º dia de idade com 2×10^5 oocistos por ave. Ao início dos experimentos os controles negativos, formados por aves não imunizadas e não infectadas, tiveram suas fezes examinadas para a verificação da presença de oocistos.

Para avaliação do período de eliminação de oocistos (período de patência), um grupo de aves imunizado e desafiado permaneceu até o fim da eliminação de oocistos.

a) EXPERIMENTO I

Grupo I: aves imunizadas e desafiadas com a cepa “Cu” parental (PA) para a observação do escore de lesão da mucosa intestinal e ganho de peso das aves;

Grupo II: aves infectadas com a cepa “Cu” PA para a observação do escore de lesão da mucosa intestinal e ganho de peso das aves (controle positivo);

Grupo III: aves não imunizadas e não infectadas (controle negativo);

Grupo IV: aves imunizadas e desafiadas com cepa “Cu” PA para a observação do período patente de eliminação de oocistos;

Grupo V: aves não imunizadas e infectadas com a cepa “Cu” PA no 21º dia de vida, para a observação do período patente de eliminação de oocistos (controle positivo).

b) EXPERIMENTO II

Grupo I: aves imunizadas e desafiadas com cepa “PeFa” PA para a observação do escore de lesão da mucosa intestinal e ganho de peso das aves;

Grupo II: aves infectadas com a cepa “PeFa” PA (controle positivo) para a observação do escore de lesão da mucosa intestinal e ganho de peso das aves;

Grupo III: aves não imunizadas e não infectadas (controle negativo);

Grupo IV: aves imunizadas e desafiadas com a cepa “PeFa” PA para observação do período patente de eliminação de oocistos;

Grupo V: aves não imunizadas e infectadas com a cepa “PeFa” PA, no 21º dia de vida, para a observação do período patente de eliminação de oocistos (controle positivo).

c) EXPERIMENTO III

Grupo I: aves imunizadas e desafiadas com cepa “I” PA para a observação do escore de lesão da mucosa intestinal e ganho de peso das aves;

Grupo II: aves infectadas com a cepa “I” PA (controle positivo) para a observação do escore de lesão da mucosa intestinal e ganho de peso das aves;

Grupo III: aves não imunizadas e não infectadas (controle negativo);

Grupo IV: aves imunizadas e desafiadas com cepa “I” PA para observação do período patente de eliminação de oocistos;

Grupo V: aves não imunizadas e infectadas com cepa “I” PA, no 21^o dia de vida, para a observação do período patente de eliminação de oocistos (controle positivo).

O teste de imunidade foi avaliado mediante três parâmetros:

- (1) **Ganho de peso:** As pesagens das aves foram realizadas antes (aves com 21 dias de idade) e após o desafio (28 dias de idade). As diferenças de peso para cada ave foram registradas, obtendo-se então o peso médio por grupo de aves (n=15);
- (2) **Contagem de oocistos:** As fezes totais depositadas sobre uma bandeja forrada com papel, no fundo das gaiolas, foram coletadas diariamente às 9 horas da manhã durante o período de eliminação dos oocistos. As fezes foram então homogeneizadas com água filtrada, em um homogeneizador elétrico. Foi retirado 1 mL da amostra e adicionado a 9 mL de solução saturada de NaCl e após homogeneização dessa solução, o líquido foi colocado na câmara de MacMaster para a contagem dos oocistos (Long et al., 1976). A contagem foi realizada a partir do quarto dia pós-infecção até o término da sua eliminação.
- (3) **Escore de lesão da mucosa intestinal:** o escore de lesão foi realizado segundo método de Johnson & Reid (1970) que consiste na atribuição de graus (1 a 4) às lesões observadas na mucosa intestinal entre a região superior (duodenal) e a região mediana do intestino delgado. As características para cada nível do escore de lesão são apresentadas no **Quadro 2**.

Quadro 2. Características do escore de lesão para *Eimeria acervulina*

Escore	Características
0	Nenhuma lesão macroscópica.
1	Lesões com estrias brancas transversais confinadas no duodeno. Máximo de 5 lesões por cm ² .
2	Lesões com estrias brancas transversais ainda não coalescentes. Lesões podem se estender abaixo do duodeno. Conteúdo e paredes intestinais normais.
3	Lesões coalescentes, lesões com uma cobertura esbranquiçada. Parede intestinal engrossada e o conteúdo intestinal aquoso. Lesões podem se estender até o resquício do saco vitelino.
4	Lesões coalescentes, coloração branca acinzentada. Parede intestinal engrossada com exudato cremoso. Mucosa pode estar inflamada, avermelhada ou apresentar petéquias hemorrágicas. Lesões como estrias transversais brancas típicas, na parte média do intestino.

Fonte: Johson & Reid, 1970

4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Para as análises estatísticas de ganho de peso e escore de lesão foi utilizada a Análise de Variância de uma Via (ANOVA), seguida pelo Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni. Para análise da eliminação de oocistos utilizou-se o teste *t*. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $P < 0,05$. Todos os testes estatísticos foram realizados no software *GraphPad InStat*, versão 3.00 (1998).

RESULTADOS

1 - Ganho de peso

O ganho de peso médio por ave, nos animais imunizados e desafiados com as cepas “Cu”, “PeFa” e “I” de *E. acervulina*, pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Ganho de peso médio das aves imunizadas com *Eimeria acervulina* “Cu” precoce e desafiadas com as cepas parentais “Cu”, “PeFa” e “I”

Grupo de Aves	Ganho de Peso Médio		
	“Cu” % (g)	“PeFa” % (g)	“I” % (g)
Imunizado e desafiado	90,6 (74,0±16)	87,6 (60,2±23)	75,3 (60,4±25,7)
Controle positivo	57,4 (46,8±20,1)	52,5 (36,1±19,3)	56,3 (45,2±14,6)
Controle negativo	100 (81,6±26,7)	100 (68,7±17)	100 (80,2±18,1)

O grupo de aves imunizado com a cepa precoce “Cu” e desafiado com sua cepa homóloga parental, apresentou diferença estatisticamente significativa ($P < 0,01$) no ganho de peso quando comparado ao grupo controle positivo. Resultados semelhantes foram verificados no segundo experimento, onde as aves foram desafiadas com a cepa heteróloga “PeFa” ($P < 0,01$). Nas aves imunizadas e desafiadas com a cepa “I”, embora tenha sido observado ganho de peso, não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle positivo ($P > 0,05$) (Fig.2).

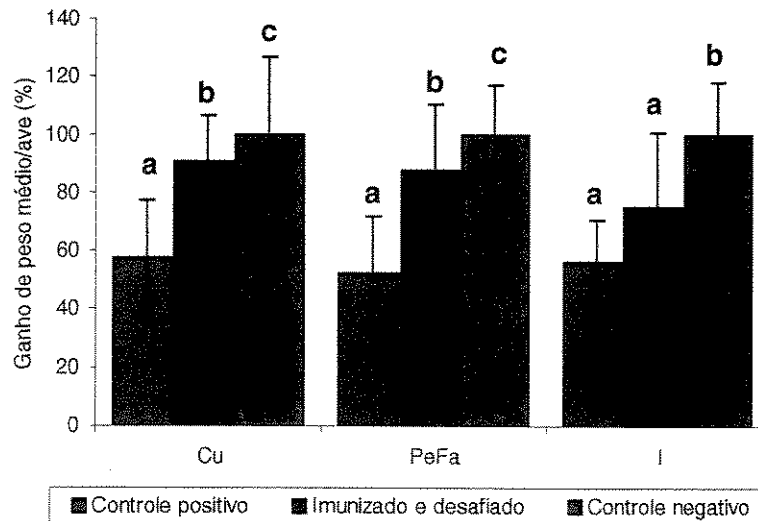


Fig. 2 – Percentagem do ganho peso médio das aves imunizadas com *E. acervulina* cepa precoce “Cu” e desafiadas com as cepas parentais homóloga “Cu” e heterólogas “PeFa” e “I”. As letras diferentes representam diferenças significantes. * $P < 0,05$.

2 – Produção de oocistos

A produção de oocistos no período entre 1 a 14 dias pós - imunização com a cepa precoce “Cu” é referente aos oocistos eliminados pelas aves imunizadas, antes do desafio com as cepas parentais. Verificou-se que a produção total de oocistos foi relativamente pequena (“Cu” = $17,1 \times 10^3$; “PeFa” = $1,8 \times 10^3$; “I” = $3,7 \times 10^3$), com picos de eliminação dos parasitos decrescendo gradualmente com o passar dos dias. No grupo de animais do Experimento I houve maior produção de oocistos, sendo observados 3 picos de eliminação. A quantidade e o padrão de oocistos produzidos nos Experimentos II e III foram semelhantes. A partir do 15º dia pós-imunização os oocistos eliminados são referentes ao desafio com as cepas parentais “Cu”, “PeFa” e “I” (Tabela 2).

No Experimento I, após o desafio com a cepa parental “Cu”, o controle positivo apresentou um número elevado de oocistos. O período de patência se estendeu por 7 dias, gerando 2 picos de eliminação. Contudo, não foram observados oocistos no grupo imunizado e desafiado (Figura 3).

Tabela 2. Produção total média de oocistos em aves imunizadas e desafiadas com as cepas parentais “Cu”, “PeFa” e “I” de *E. acervulina*.

Eliminação de oocistos por grupo	Produção total média de oocistos/ave (x 10 ⁶)		
	“Cu”	“PeFa”	“I”
Imunizado	0*	3,5*	14,5
Controle positivo	70,8	138,4	45,6

(*) *significante (P<0,05)*

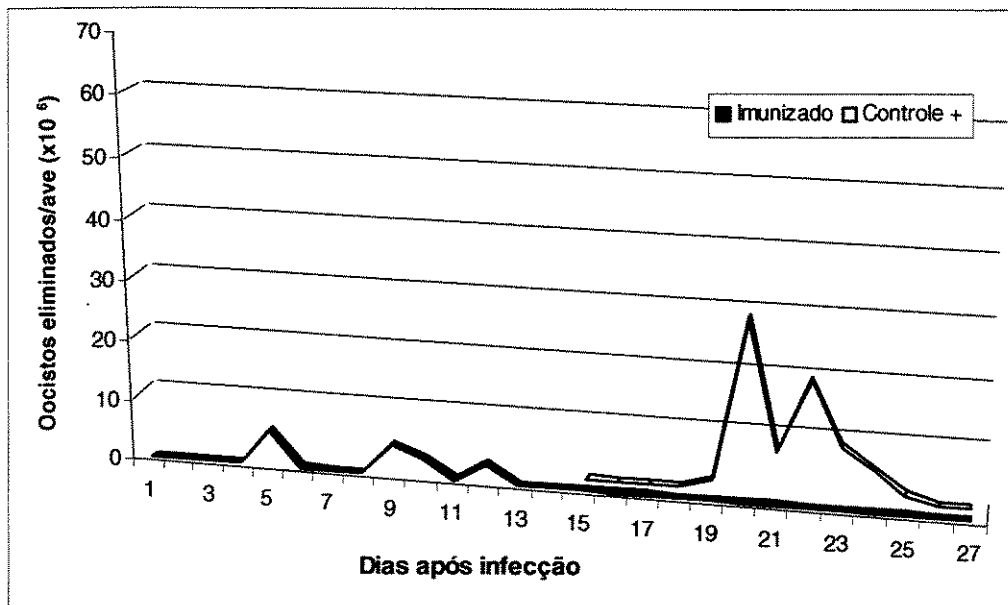


Fig. 3 - Produção de oocistos em aves imunizadas com *E. acervulina* “Cu” precoce, desafiadas com 2×10^5 oocistos de *E. acervulina* “Cu” parental.

No Experimento II, onde as aves foram desafiadas com a cepa parental “PeFa”, o grupo imunizado e desafiado apresentou uma baixa produção de oocistos com relação ao controle positivo. O controle positivo também apresentou dois picos de eliminação de oocistos (Figura 4).

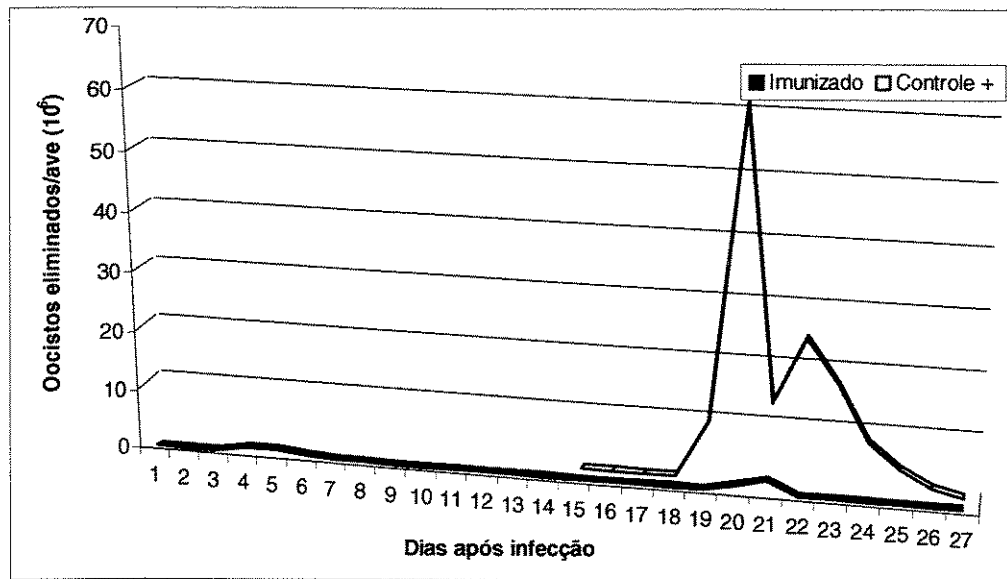


Fig. 4 - Produção de oocistos em aves imunizadas com oocistos de *E. acervulina* “Cu” precoce e desafiadas com 2×10^5 oocistos de *E. acervulina* “PeFa” parental.

No Experimento III foi observado um número elevado de oocistos produzidos pelas aves imunizadas em relação aos experimentos anteriores. Não houve diferença estatística significante ($P > 0.05$) entre o grupo desafiado com a cepa parental “I” e o grupo controle positivo. Além disso, em comparação aos outros experimentos, o controle positivo apresentou uma redução no período patente (somente 5 dias) e no número de oocistos eliminados (Figura 5).

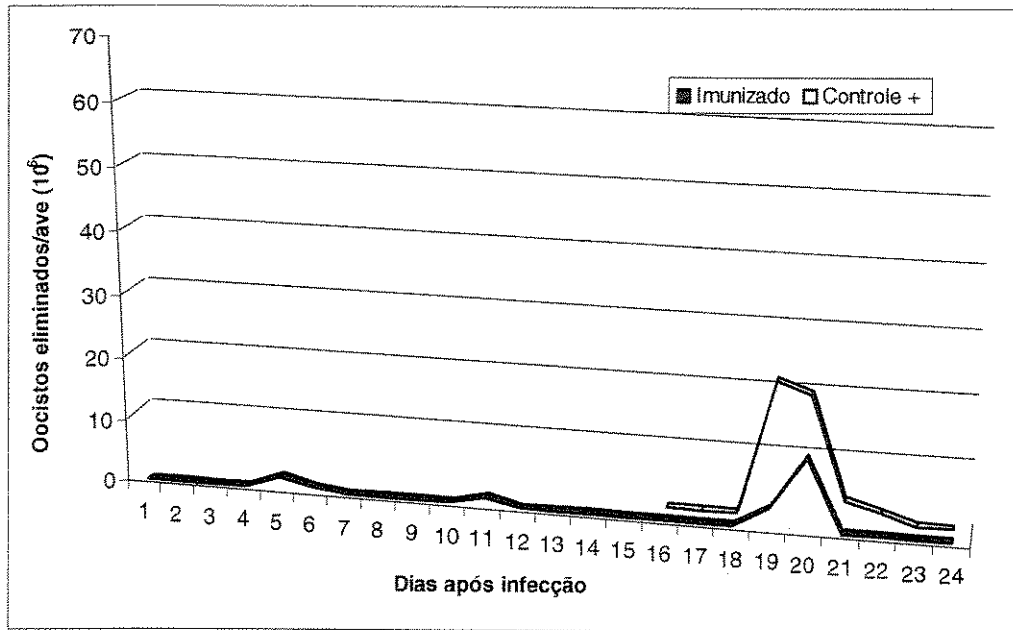


Fig. 5 – Produção de oocistos em aves imunizadas com oocistos de *E. acervulina* “Cu” precoce, desafiadas com 2×10^5 oocistos de *E. acervulina* “I” parental.

3 – Escore de lesão:

O resultado do escore de lesão para cada experimento pode ser verificado na Tabela 3. Os grupos de aves imunizadas e desafiadas nos três experimentos não apresentaram lesões aparentes na mucosa intestinal. No entanto, nas aves controle foram constatadas lesões de média intensidade.

Tabela 3. Escore de lesão na mucosa intestinal, em aves imunizadas pela cepa precoce “Cu” de *E. acervulina* e desafiadas com as cepas parentais homóloga “Cu” e heterólogas “PeFa” e “I” (n=15 por grupo)

Grupo de aves	<i>E. acervulina</i> - cepas parentais		
	“Cu”	“PeFa”	“I”
Imunizado	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,4
Controle positivo	2,4 ± 0,7	1,0 ± 0,2	2,2 ± 0,6

DISCUSSÃO

Entre os diversos fatores que atuam na complexa interação parasito-hospedeiro, a idade do hospedeiro parece ser um dos fatores determinantes no estabelecimento da imunidade em aves infectadas com espécies de *Eimeria* (Danforth, 1998; Chapman, 2000), sendo de extrema importância a determinação dessa idade para conferir imunidade protetora contra a coccidiose aviária em granjas comerciais, como melhor maneira de controlar essa doença. Outro fator importante diz respeito ao número de parasitos que deve ser utilizado para conferir essa imunidade ideal.

Deste modo, no presente trabalho, as imunizações foram realizadas no 7º dia de vida das aves, com reforço no 14º dia, sendo desafiadas com a cepa homóloga “Cu” e heterólogas “PeFa” e “I” de *E. acervulina*. Com relação ao

ganho de peso, as aves desafiadas com a cepa parental homóloga apresentaram imunidade protetora quase total (96%). As aves desafiadas com a segunda cepa parental obtiveram proteção de 87.6% e a última, mostrou imunidade protetora menor de 75%. Os resultados podem ser considerados satisfatórios, pelo fato de todos estarem conferindo imunidade acima de 75%.

McDonald & Ballingall (1983) realizando imunizações com a cepa atenuada HP de *E. acervulina* em aves de um, quatro e sete dias de idade obtiveram resultados mais satisfatórios em aves imunizadas com sete dias de idade. Outros estudos têm mostrado que os descendentes de aves poedeiras infectadas com espécies de *Eimeria* mostraram-se protegidos contra o desafio com a cepa homóloga. Anticorpos maternos parecem ser os responsáveis pela proteção imune dos descendentes durante a primeira semana de vida (Smith et al., 1994; Wallach, et al., 1995; Wallach, 1997), o que vai de encontro com a escolha de iniciar as imunizações do presente trabalho no sétimo dia de vida das aves.

A determinação da dose de imunização em nossos experimentos foi adotada com base em estudos anteriores realizados no Laboratório de Coccidiose Aviária do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Unicamp e nos resultados encontrados na literatura científica. A dose de 10^3 oocistos foi capaz de conferir resultados satisfatórios com relação ao ganho de peso e ausência de lesões nas aves imunizadas no presente trabalho. Long & Johnson (1988), trabalhando com a cepa atenuada HP de *E. acervulina*, também observaram melhores resultados com a utilização de doses com 10^3 oocistos. Contrariamente, Joyner & Norton (1973, 1976) comparando a utilização de doses diárias de cinco oocistos de *E. tenella* durante 28 dias e a

aplicação da mesma quantidade de oocistos, em uma única dose, observaram que o número de oocistos eliminados foi semelhante nos dois procedimentos. Contudo, as aves que receberam doses contínuas apresentaram imunidade quase total quanto ao ganho de peso e eliminação de oocistos após desafio com a cepa homóloga. Em termos de praticidade para uso em granjas comerciais, este último procedimento torna-se inviável de ser aplicado.

Um aspecto não observado em nosso experimento diz respeito ao fato de que após a administração das doses de oocistos, muitos destes podem passar intactos pelo trato intestinal sem que haja o excistamento dos parasitos, e conseqüentemente sem que ocorra a infecção das aves (Williams, 1995). Contudo, muitos destes oocistos liberados no solo continuam viáveis. Seria interessante ter estimado a quantidade de oocistos excretados sem o desenvolvimento dos parasitas no intestinos das aves, pois este fato poderia dar uma idéia da amplitude da infecção para a imunização obtida.

Nos Experimentos I e II houve uma redução significativa na eliminação dos oocistos nas aves imunizadas após o desafio, comparadas aos seus respectivos controles positivos. Essas aves não apresentaram sinais clínicos aparentes. Por outro lado, no Experimento III, aves desafiadas com a cepa "I", a proteção foi um pouco menor que nos dois outros experimentos, porém podendo ser considerado satisfatório. Neste experimento, o número de oocistos eliminados pelo grupo controle positivo em relação aos grupos positivos das outras cepas parentais foi bem menor, provavelmente uma característica intrínseca dessa cepa.

Devido à impossibilidade de sexagem das aves com um dia de vida, os experimentos foram conduzidos com aves de ambos os sexos. Segundo

Williams & Catchpole (2000), não ocorrem diferenças significativas quanto à suscetibilidade entre os sexos de aves infectadas com espécies de *Eimeria*. Contudo, este procedimento pode causar um aumento do desvio-padrão na análise estatística, como foi verificado em nossos resultados.

A aplicação de duas doses para a imunização das aves em nossos experimentos teve o propósito de simular a realidade observada em aves criadas nas granjas comerciais. Aves infectadas com espécies de *Eimeria* e mantidas em gaiolas não sofrem re-infecções pelo fato de não terem contato direto com os oocistos eliminados nas fezes, ao contrário das aves de granjas mantidas no chão dos galpões, favorecendo as infecções cíclicas com pequeno número de oocistos, o que contribui para o desenvolvimento da imunidade protetora (Joyner & Norton, 1976; Williams, 2002).

A imunização das aves com a cepa atenuada “Cu” conferiu imunidade menor (75%) do que nos dois outros experimentos, quando desafiadas com a cepa parental “I”, provavelmente devido à presença de variação antigênica desta cepa em relação à cepa “Cu” precoce. Contrariamente, os resultados observados após o desafio com a cepa “PeFa” sugerem uma maior identidade antigênica com a cepa precoce “Cu”. O caráter de proteção imune intra-específica pelas espécies de *Eimeria* aviárias tem sido bem revisado em vários trabalhos (Yun et al., 2000; Lillehoj & Lillehoj, 2000). Contudo, vários estudos mostram diferentes conclusões acerca da importância da variação antigênica. Norton & Joyner (1980), obtiveram proteção total em desafios entre cepas heterólogas de *E. acervulina*, a partir da imunização com 10^5 oocistos. Joyner (1969), relatou o encontro de proteção parcial na produção de oocistos em aves imunizadas e desafiadas com cepas heterólogas de *E.*

acervulina. Karim & Trees (1989) obtiveram resultados similares em infecções com isolados de *E. acervulina*, mas não observaram correlação entre o ganho de peso e a produção de oocistos. Smith et al. (2002) trabalhando com as cepas “H” e “W” de *E. maxima* observaram níveis diferentes de resposta imune de acordo com a utilização destas cepas do parasito e da linhagem das aves nos ensaios, demonstrando o complexo caráter da interação entre a diversidade antigênica destes parasitas e os caracteres genéticos dos hospedeiros.

Nos três experimentos realizados no presente trabalho, não foram observadas lesões na mucosa intestinal das aves imunizadas, diferentemente dos controles positivos onde a mesma dose utilizada foi responsável por lesões de média intensidade nos Experimentos I e III, e de baixa intensidade no Experimento II, significando proteção dessas aves imunizadas contra presença de infecção maciça na mucosa intestinal e conseqüentemente a ausência das lesões no local. Essa proteção obtida nos experimentos também é importante por dificultar possíveis infecções secundárias por microrganismos oportunistas. Estudos sobre a interação das espécies de *Eimeria* com outros microrganismos presentes na flora intestinal de galinhas têm recebido pouca atenção até o momento. Contudo, o conhecimento destas interações pode ser de grande importância para a melhor compreensão do processo patogênico observado nas infecções coccidianas. Alguns estudos têm relatado a ocorrência de um efeito sinérgico na interação entre espécies de *Eimeria* e a bactérias *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*, agentes causadores de necrose hemorrágica da mucosa intestinal em galinhas (Bradley & RadhaKrishnan, 1973; Kimura et al., 1976; Baba et al., 1997; Hegazy et al., 1999). O desenvolvimento das eimérias nas células intestinais, muitas vezes, pode

provocar lesões na mucosa que propiciam várias ações bacterianas, tais como: adesão, replicação e produção de suas toxinas sobre as mucosas danificadas (Williams et al., 2003).

Acredita-se que a interrupção do uso de algumas drogas anticoccidianas que exercem comprovado efeito deletério sobre certas bactérias de interesse médico-veterinário, poderiam aumentar o risco de infecções secundárias associadas com lesões intestinais produzidas pelas vacinas vivas comercializadas (Watkins et al., 1997).

Segundo Chapman (2000), vacinas atenuadas não deveriam ser patogênicas, e conseqüentemente não deveriam causar lesões no epitélio intestinal. Contudo, em estudos realizados com quatro vacinas atenuadas comerciais, duas apresentaram lesões intestinais com escore variando entre 1 e 3, sem apresentar correlação com a diminuição no ganho de peso dos animais imunizados.

Um dos fatores da patogenia das lesões intestinais está associado à alta capacidade reprodutiva das espécies de *Eimeria*, em particular, ao desenvolvimento dos seus quatro ciclos assexuados e a formação de grande número de formas sexuadas e de resistência na *E. acervulina*. Contudo, as cepas atenuadas têm caracteristicamente seus ciclos assexuados diminuídos em dois ciclos (Shirley & Bedrník, 1997). Portanto, o encontro de lesões intestinais causadas por vacinas atenuadas é contraditório e sugere a presença de uma atenuação parcial em algumas das espécies que compõem essas vacinas.

Estudos têm mostrado que a introdução de cepas atenuadas em granjas com histórico de resistência às drogas anticoccidianas leva a diminuição da

resistência, patogenicidade e diversidade das espécies de campo. As causas destes fenômenos aparentemente se devem a ocorrência de recombinação gênica e da própria competição inter e intra-específica entre as cepas (Chapman et al., 2002; Williams, 2002).

Dentre os vários fatores que podem influenciar no estabelecimento da imunidade protetora, a variação antigênica observada em diversas cepas de *Eimeria* spp. pode ser considerada uma barreira potencial quanto ao sucesso da utilização de vacinas vivas atenuadas no controle da coccidiose aviária. A solução poderia ser o desenvolvimento e a adição de cepas atenuadas na composição destas vacinas, objetivo nem sempre fácil de se obter devido ao fato de muitas cepas precoces não perderem a sua virulência (Danforth, 1998; Chapman, 2000). Este foi, por exemplo, o caso da vacina comercial Paracox, que foi reformulada pela adição de duas cepas atenuadas de *E. maxima* (Williams, 2002). Como foi sugerido por Danforth (1998), o desenvolvimento de cepas atenuadas a partir de isolados regionais poderia implementar a utilização desta metodologia no controle da coccidiose aviária.

Outro fator importante é a variação de susceptibilidade entre linhagens de galinhas para as sete espécies de *Eimeria*. A linhagem das aves utilizada em nossos experimentos não é a mesma linhagem utilizada para criação em granjas comerciais. Desta forma, seria interessante a realização de estudos para verificar a suscetibilidade das linhagens de granjas comerciais brasileiras em relação a infecções coccidianas e à imunidade protetora após imunização com cepas atenuadas desenvolvidas no Brasil. Bumstead & Millard (1992), trabalhando com as sete espécies de *Eimeria* e com oito linhagens de galinhas, observaram diferentes padrões de susceptibilidade na produção de oocistos.

Lillehoj (1988, 1994) também observou variações trabalhando com as linhagens “SC” e “TK”. A diferença parece estar associada à capacidade de proliferação dos linfócitos CD8 e CD4. O aumento de linfócitos CD8 na linhagem “SC” foi correlacionado com a menor quantidade de oocistos eliminados em comparação a eliminação da linhagem “TK”.

A partir dos dados obtidos no presente trabalho, pode-se sugerir que sejam realizados estudos adicionais para a avaliação da capacidade imunoprotetora da cepa atenuada “Cu” de *E. acervulina* em linhagens de aves utilizadas em granjas comerciais brasileiras, para melhor conhecer os efeitos de proteção imune dessa cepa atenuada nessas aves, e verificar a viabilidade de sua utilização como futura vacina atenuada.

CONCLUSÕES

No presente trabalho, a cepa atenuada “Cu” de *E. acervulina* mostrou ser capaz de conferir imunidade protetora intra-específica em aves desafiadas com sua cepa homóloga e duas cepas heterólogas, sugerindo seu potencial uso na composição de uma vacina atenuada contra *E. acervulina* encontradas no Brasil.

A imunidade parcial observada nas aves imunizadas com a cepa atenuada “Cu”, desafiadas com as cepas heterólogas “PeFa” e “I”, pode estar associada à presença de variação antigênica entre essas cepas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.P.A., 2001. <http://www.apa.com.br/framestat.htm>
- Baba, E.; Ikemoto, T.; Fukata, T.; Sasai, K; Arakawa, A.; MacDougald, L.R. 1997. Clostridial population and the intestinal lesions in chickens infected with *Clostridium perfringens* and *Eimeria necatrix*. *Veterinary Microbiology* **54**: 301-308.
- Biggs, P.M. 1982. The world of poultry disease. *Avian Pathology* **11**: 281-300.
- Bordin, E.L. 1994. Patologia da coccidiose. **In Simpósio Internacional sobre Coccidiose. Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. Santos, SP, Brasil. pp. 7-10.**
- Bradley, R.E. & RadhaKrishnan, C.V. 1973. Coccidiosis in chickens: Obligate relationship between *Eimeria tenella* and certain species of cecal microflora in the pathogenesis of the disease. *Avian Disease* **17**: 461-476.
- Bumstead, N. & Millard, B.J. 1992. Variation in susceptibility of inbred lines of chickens to seven species of *Eimeria*. *Parasitology* **104**: 407-413.
- Castro, A.G.M. 1994. Situação atual da coccidiose no Brasil importância econômica. **In Simpósio Internacional sobre Coccidiose. Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. Santos, SP, Brasil. pp. 45-54.**
- Chapman, H.D. 1982. Anticoccidial drug resistance. **In The Biology of the Coccidia.** Long, P.T. (ed.), University Park Press, Baltimore. **pp. 429-452.**
- Chapman, H.D. 1993. Resistance to anticoccidial drugs in fowl. *Parasitology Today* **9**: 159-162.

- Chapman, H.D. 1997. Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian Pathology* **26**: 221-244.
- Chapman, H.D. 2000. Practical use of vaccines for the control of coccidiosis in the chicken. *World's Poultry Science Journal* **56**: 8-20
- Chapman, H.D.; Cherry, T.E.; Danforth, H.D.; Richards, G.; Shirley, M.W.; Williams, R.B. 2002. Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. *International Journal for Parasitology* **32**: 617-629.
- Danforth, H.D. 1998. Use of live oocyst vaccines in the control of avian coccidiosis: experimental studies and field trials. *International Journal for Parasitology* **28**: 1099-1109.
- Fernando, M.A & McCraw, B.M. 1977. Changes in the generation cycle of duodenal crypt cells in chickens infected with *Eimeria acervulina*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* **52**: 213-218.
- Girard, F.; Fort, G.; Yvone, P.; Quere, P. 1997. Kinetics of specific immunoglobulin A, M and G production in the duodenal and cecal mucosa of chickens infected with *Eimeria acervulina* or *Eimeria tenella*. *International Journal for Parasitology* **27**: 803-809.
- GraphPad Software. 1998. InStat guide to choosing and interpreting statistical tests, GraphPad Software, Inc., San Diego California USA. www.graphpad.com.
- Hegazy, S.H.; Hassanein, Z.A.; El-Sheshtawy, E.A.; Awadalla, S.F. 1999. Effect of dual infections of *Escherichia coli* and pure caecal *Eimeria* sp. in broilerchickens. *Journal of Egyptian Society of Parasitology* **29**: 859-872.

- Jeffers, T.K. 1975. Attenuation of *Eimeria tenella* through selection for precociousness. *Journal of Parasitology* **61**: 1083-1090.
- Jeurissen, S.H.; Janse, E.M.; Vermeulen, A.N.; Vervelde, L. 1996. *Eimeria tenella* infections in chickens: aspect of host-parasite interaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **54**: 231-238.
- Johnson, J. & Reid, W.M. 1970. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor pen experiments with chickens. *Experimental Parasitology* **28**: 30-36.
- Joyner, L.P. & Norton, C.C. 1973. The immunity arising from continuous low-level infection with *Eimeria tenella*. *Parasitology* **67**: 333-340.
- Joyner, L.P. & Norton, C.C., 1976. The immunity arising from continuous low-level infection with *Eimeria maxima* and *E. acervulina*. *Parasitology* **72**: 115-125.
- Joyner, L.P. 1969. Immunological variation between two strains of *Eimeria acervulina*. *Parasitology* **59**: 725-732.
- Joyner, L.P. 1982. Host and site specificity. In **The Biology of the Coccidia**. Long, P.L. (ed.), Edward Arnold Limited, Londres, Inglaterra. pp. 35-62.
- Karim, M.J. & Trees, A.J. 1989. Immunogenicity of a hybrid line of *Eimeria acervulina*. In **Coccidia and Intestinal Coccidiomorphs**. Yvoré, P. (ed.). INRA, Paris. pp. 639-643.
- Kawazoe, U. & Di Fabio, J. 1994. Resistance to diclazuril in field isolates of *Eimeria* species obtained from commercial broiler flocks in Brazil. *Avian Pathology* **23**: 305-311.

- Kawazoe, U. & Manarini, C.A.L. 2001. Development and characterization of *Eimeria acervulina* brazilian precocious strain. In **VIIIth International Coccidiosis Conference and Annual Scientific Meeting of the Australian Society for Parasitology**. Ellis, J.T.; Johnson, A.M.; Morrison, D.A.; Smith, N.C. (eds.), Australia. **pp.** 172.
- Kawazoe, U.; Chapman, D.; Shaw, M. 1991. Sensitivity of field isolates of *Eimeria acervulina* to salinomycin, maduramicin, and a mixture of clopidol and methyl benzoquate in the chicken. *Avian Pathology* **20**: 439-446.
- Kawazoe, U. 2000. Coccidiose. In: **Doença das aves**. Berchieri Jr., A & Macari, M. (eds.). Ed. FACTA, Campinas. **pp.** 1-15.
- Kimura, N.; Mimura, F.; Nishida, S.; Kobayashi, A.; Mitsuoka, T. 1976. Studies on the relationship between intestinal flora and cecal coccidiosis in chickens. *Poultry Science* **55**: 1375-1383.
- Lillehoj, H.S. & Lillehoj, E.P. 2000. Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Disease* **44**: 408-425.
- Lillehoj, H.S. & Trout, J.M. 1994. CD8+ T cell-coccidia interactions. *Parasitology Today* **10**: 10-14.
- Lillehoj, H.S. 1987. Effects of immunosuppression on avian coccidiosis: cyclosporin A but not hormonal bursectomy abrogates host protective immunity. *Infection and Immunity* **55**: 1616-1621.
- Lillehoj, H.S. 1988. Influence of inoculation dose, inoculation schedule, chicken age, and host genetics on disease susceptibility in development of resistance to *Eimeria tenella* infection. *Avian Diseases* **32**: 437-444.

- Lillehoj, H.S. 1994. Analisis of *Eimeria acervulina*-induced changes in the intestinal T lymphocytes subpopulations in two chicken strains showing different levels of susceptibility to coccidiosis. *Research in Veterinary Science* **56**: 1-7.
- Long, P.L. & Johnson, J.K. 1988. *Eimeria* of american chickens: characteristics of six attenuated strains produced by selection for precocious development. *Avian Pathology* **17**: 305-314.
- Long, P.L.; Millard, B.J.; Joyner, L.P.; Norton, C.C. 1976. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Veterinaria Latina* **6**: 201-217.
- McDonald, V. & Ballingall, S. 1983. Attenuation of *Eimeria mivati* by selection for precocious development. *Parasitology* **86**:371-379.
- McDonald, V.; Ballingall, S.; Shirley, M.W. 1982. A preliminary study of the nature of infection and immunity in chickens given an attenuated line of *Eimeria acervulina*. *Parasitology* **84**:21-30.
- McDonald, V.; Shirley, M.W.; Millard, B.J. 1986. 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* **15**: 323-335.
- Montes, C.; Rojo, F.; Hidalgo, R.; Ferre, I.; Badiola, C. 1998. Selection and development of Spanish precocious strain of *Eimeria necatrix*. *Veterinary Parasitology* **78**: 169-183.
- Norton, C.C. & Joyner, L.P. 1980. Studies with *Eimeria acervulina* e *E. mivati*: pathogenicity and cross-immunity. *Parasitology* **81**: 315-323.

- Roberts, L.S., & Janovy-Jr., J. 1996. **Foundations of Parasitology**. 5th edition. Kemp, M.J. (ed). Wm. C. Brown Publishers. U.S.A. pp. 120.
- Ruff, M.D. 1999. Important parasites in poultry production systems. *Veterinary Pathology* **84**: 337-347.
- Shirley, M.W. & Bedrník, P. 1997. Live attenuated vaccines against avian coccidiosis: success with precocious and egg-adapted lines of *Eimeria*. *Parasitology Today* **13**: 481-484.
- Shirley, M.W. & Bellatti, M.A. 1984. *Eimeria necatrix*: Selection and characteristics of a precocious (and attenuated) line. *Avian Pathology* **13**: 657-668.
- Shirley, M.W.; McDonald, V. Chapman, H.D.; Millard, B.J. 1984. *Eimeria praecox*: Selection and characteristics of precocious lines. *Avian Pathology* **13**: 669-682.
- Shirley, M.W.; McDonald, V.; Bellati, M.A. 1986. *Eimeria brunetti*: Selection and characteristics of a precocious (and attenuated) line. *Avian Pathology* **15**: 705-717.
- Smith, L.A.; Hesketh, P.; Archer, A.; Shirley, M.W. 2002. Antigenic diversity in *Eimeria maxima* and the influence of host genetics and immunization schedule on cross-protective immunity. *Infection and Immunity* **70**:2472-2479.
- Smith, N.C.; Wallach, M.; Petracca, M.; Braun, R.; Eckert, J. 1994. Maternal transfer of antibodies induced by infection with *Eimeria maxima* partially protects chickens against challenge with *Eimeria tenella*. *Parasitology* **109**: 551-557.

- Wallach, M. 1997. The importance of transmission-blocking immunity in the control of infections by apicomplexam parasites. *International Journal for Parasitology* **27**: 1159-1167.
- Wallach, M.; Smith, N.C.; Braun, R.; Eckert, J. 1995. Potencial control of chicken coccidiosis by maternal immunization. *Parasitology Today* **11**: 262-265.
- Watkins, K.L.; Shryock, T.R.; Dearth, R.N.; Saif, Y.M. 1997. In-vitro antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. *Veterinary Microbiology* **54**: 195-200.
- Williams, R.B. 1995. Epidemiological studies of coccidiosis in the domesticated fowl (*Gallus gallus*): The fate of ingested oocysts of *Eimeria tenella* during the prepatent period in susceptible chicks. *Applied Parasitology* **36**: 83-89.
- Williams, R.B. 1998. Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. *International Journal for Parasitology* **28**: 1089-1098.
- Williams, R.B. 1999. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *International Journal for Parasitology* **29**: 1209-1229.
- Williams, R.B. 2002. Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to sucess. *Avian Pathology* **31**: 317-353.
- Williams, R.B. & Catchpole, J. 2000. A new protocol for a challenge test to assess the efficacy of live anticoccidial vaccines for chickens. *Vaccine* **18**: 1178-1185.

- Williams, R.B.; Bushell, A.C.; Répérant, J.M.; Doy, T.G.; Morgan, J.H.; Shirley, M.W.; Yvoré, P.; Margaret, M.C.; Frémont, Y. 1996. A survey of *Eimeria* species in commercially-reared chickens in France during 1994. *Avian Pathology* **25**: 113-130.
- Williams, R.B.; Marshall, R.N.; La Ragione, R.M.; Catchpole, J. 2003. A new method for the experimental production of necrotic enteritis and its use for studies on the relationships between necrotic enteritis, coccidiosis and anticoccidial vaccination of chickens. *Parasitology Research* **90**: 19-26.
- Yun, C.H.; Lillehoj, H.S.; Zhu, J.; Min, W. 2000. Kinetic differences in intestinal and systemic interferon- γ and antigen-specific antibodies in chickens experimentally infected with *Eimeria maxima*. *Avian Diseases* **44**: 305-312.