



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ALEXEY LEON GOMEL BOGADO

**PATOGENICIDADE E IMUNOGENICIDADE DE UMA  
VACINA ATENUADA E VACINA CONTENDO PROTEÍNAS  
DE ESPOROZOÍTOS DE *Eimeria tenella* EM FRANGOS DE  
CORTE**

---

Londrina  
2009

**ALEXEY LEON GOMEL BOGADO**

**PATOGENICIDADE E IMUNOGENICIDADE DE UMA  
VACINA ATENUADA E VACINA CONTENDO PROTEÍNAS  
DE ESPOROZOÍTOS DE *Eimeria tenella* EM FRANGOS DE  
CORTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciência Animal – Área de Concentração em Sanidade Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. José da Silva Guimarães Junior

Co-orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia

Londrina  
2009

**ALEXEY LEON GOMEL BOGADO**

**PATOGENICIDADE E IMUNOGENICIDADE DE UMA  
VACINA ATENUADA E VACINA CONTENDO PROTEÍNAS  
DE ESPOROZOÍTOS DE *Eimeria tenella* EM FRANGOS DE  
CORTE**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José da Silva Guimarães Junior  
DMVP / CCA / UEL

---

Prof. Dr. Ademir Benedito da Luz Pereira.  
DMVP / CCA / UEL

---

Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira  
DPA / USP

Londrina, 10 de fevereiro de 2009.

Este estudo foi realizado no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias e Laboratório de Protozoologia, além do Setor de Isolamento do Hospital Veterinário, vinculados ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação do Prof. Dr. José da Silva Guimarães Junior e co-orientação do Prof. Dr. João Luis Garcia.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa, abaixo relacionados:

**1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT**

**2. UEL: Universidade Estadual de Londrina.**

## **AGRADECIMENTO**

Aos professores Dr. José da Silva Guimarães Junior e Dr. João Luis Garcia que muitas vezes dispensaram seu tempo para me orientar na execução do projeto de pesquisa e nas elaborações dos textos, contribuindo na minha formação profissional e pessoal, mas especialmente ao Prof. Dr. José Guimarães com quem tive a oportunidade de aprender desde o segundo ano de curso de graduação e me motivou a prosseguir com a carreira acadêmica.

Aos técnicos dos Laboratórios de Parasitologia e Protozoologia Dalva, Elisabete e Aldair, residentes Alessandra e Ivo, além dos alunos participantes do programa de iniciação científica Daniela e Leonardo pelas grandes contribuições dadas durante a execução do projeto.

A todos os professores do curso de graduação e pós-graduação, pelos conhecimentos transmitidos e que também concederam atenção quando necessário.

A todos os funcionários, que de uma forma ou de outra contribuíram para meu aprendizado e para o desenvolvimento dos trabalhos do meu projeto de pesquisa.

Aos meus pais George e Beatriz pelos anos de empenho e apoio para que eu pudesse vencer em mais uma etapa de minha vida.

Às minhas irmãs Talita e Tatiana, com quem pude contar sempre.

À Amália, pelo companheirismo, apoio, compreensão e dedicação.

À dona Aleta, seu Vilmar e Kelly que também me apoiaram ao longo desta jornada.

**OBRIGADO**

**“Aquele que duvida e não investiga torna-se não só infeliz, mas também injusto”.**  
Blaise Pascal (1623 – 1662)

BOGADO, A.L.G. **Patogenicidade e imunogenicidade de vacina atenuada e vacina contendo proteínas de esporozoítos de *Eimeria tenella* em frangos de corte.** 2009. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## RESUMO

A epidemiologia da coccidiose aviária caracteriza-se por uma grande disseminação de oocistos no meio ambiente, podendo ocorrer significantes prejuízos em granjas com aves infectadas, fazendo-se necessárias, portanto, medidas profiláticas para o seu controle. Estas medidas são realizadas principalmente com o uso de anticoccídicos adicionados à ração. No entanto, o manejo incorreto e a falta de critérios definidos para o uso dessas drogas têm gerado sérios problemas de resistência. Somando-se a esse quadro, existe a pressão do mercado consumidor para banir drogas da alimentação animal. Pesquisas que visam à obtenção de vacinas para o controle da coccidiose são realizadas com a finalidade de buscar alternativas frente à quimioterapia usual. O presente trabalho teve como objetivos avaliar a patogenicidade e a imunogenicidade de uma cepa atenuada de *E. tenella*, bem como avaliar uma vacina de proteínas de esporozoítos da referida espécie na proteção contra o desafio homólogo de uma cepa virulenta. Aves fêmeas da linhagem Hubbard com três dias de idade, livres de coccídios e alojadas em baterias metálicas foram divididas em cinco tratamentos com três repetições cada. Os tratamentos foram designados por: T1 (controle não inoculado e não desafiado), T2 (inoculado com 500 oocistos da cepa atenuada via oral e desafiado) e T3 (controle não inoculado e desafiado). O T4 foi inoculado com 50 $\mu$ g de antígenos de esporozoítos associados ao adjuvante Quil A e desafiado e o T5 foi inoculado com adjuvante Quil A e PBS e posteriormente desafiado. Esses tratamentos foram realizados nos dias 0, 7 e 21 e o desafio foi realizado no dia 31 com oocistos esporulados de *E. tenella* na dose de 8,0x10<sup>4</sup>. A cinética de anticorpos foi avaliada semanalmente e apresentou um aumento gradativo dos níveis de imunoglobulinas do tratamento T2 e T4 até atingir o pico no dia 21 (densidade óptica - DO - de 0,377 e 0,309, respectivamente), sendo que, em seguida, houve um decréscimo gradual desses níveis sem que ficasse abaixo da linha de corte (DO = 0,267). A análise da proliferação de linfócitos periféricos do sangue das aves, realizada no dia do desafio, mostrou uma maior proliferação nos animais do T2 e T4. Entre os parâmetros utilizados para avaliar a patogenicidade e a imunogenicidade, o ganho de peso e a conversão alimentar não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (p>0,05). O parâmetro parasitológico escore de lesão apresentou significância estatística entre os tratamentos, sendo que os tratamentos T1 e T2 apresentaram os menores escores, respectivamente 0,00 e 0,17, diferindo do T3 e T5 (3,75 e 3,33, respectivamente). O T4 apresentou um escore intermediário (1,92) e não diferiu entre os tratamentos. A contagem do número de oocistos cecais, obtidos uma semana após o desafio, foi estatisticamente significativa (p<0,01) formando dois grupos, sendo o primeiro composto por T1 e T2 (4500 $\pm$ 4800 e 1700 $\pm$ 600, respectivamente), os quais diferiram do T3, T4 e T5, que apresentaram a maior eliminação de oocistos (12093 $\pm$ 7268, 10744 $\pm$ 9987 e 13413 $\pm$ 4253, respectivamente). Nas condições em que foi realizado o experimento, pode-se concluir que houve um efeito protetor imunológico total da vacina atenuada (T2) e parcial da vacina contendo proteínas de esporozoítos (T4) contra desafio por cepa virulenta homóloga.

**Palavras-chave:** *Eimeria tenella*. Proteínas de esporozoítos. Cepa atenuada. Frango de corte. Imunogenicidade.

BOGADO, A.L.G. **Pathogenicity and immunogenicity of *Eimeria tenella* attenuated vaccine and sporozoite protein vaccine in broilers.** 2009. 75p. Dissertation (Master Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

### ABSTRACT

The epidemiology of the poultry coccidiosis is characterized by a large oocysts spread in the environment, that results in significant losses in broilers husbandry with infected birds, being necessary, therefore, prophylactic measures for its control. These measures are accomplished mainly with the anticoccidial use added to the feed. However, the incorrect management and the lack of defined criterion for the use of those drugs have been generating serious resistance problems. Being added to this square, there is the pressure of the consuming market to banish drugs of the animal feeding. Researches that look for obtaining vaccines for the control of the coccidiosis are accomplished with the purpose of looking for alternatives front to the usual chemotherapy. The objective of the experiment was to evaluate the pathogenicity and immunity of attenuated oocysts of the *Eimeria tenella* specie, as well as to evaluate a sporozoites proteins vaccine of the same species in the protection against homologous virulent strain challenge. Female chicks with three days old (Hubbard), coccidia-free and maintained in wire cages, were divided in five treatments with three repetitions each. The treatments were: T1 (unvaccinated, unchallenged control), T2 (inoculated by gavage with 500 attenuated oocysts and challenged) and T3 (unvaccinated, challenged control). The T4 was inoculated with 50µg sporozoite antigen associated to the Quil A adjuvant and challenged and T5 was inoculated with Quil A adjuvant and PBS and later it was challenged. These treatments were performed on days 0, 7 and 21. The challenge was carried on the 31 with *E. tenella* sporulated oocysts in the dose of  $8,0 \times 10^4$ . The kinetics of antibodies was measured weekly and showed a gradual increase in levels of immunoglobulin of the treatment T2 and T4 to reach a peak on day 21 (optical density - OD - of 0,377 and 0,309, respectively), and, in sequence there was a gradual decrease of these levels without being below the cut-off (OD = 0,267). The analysis of the chicken peripheral blood lymphocyte proliferation, carried out on the day of the challenge, showed a greater proliferation of animals in T2 and T4. The body weight and the challenge with *E. tenella* sporulated oocysts ( $8,0 \times 10^4$  oocysts) was carried out on day 31. Among the parameters used to evaluate the immunogenicity and pathogenicity, the weight gain and the feed conversion there were no statistical significant differences between the treatments ( $p > 0,05$ ). The parasitological parameter lesion scores showed statistical significance between the treatments ( $p < 0,05$ ), the treatment T1 and T2 showed the smallest scores, respectively 0,00 and 0,17, differing of T3 and T5 (3,75 and 3,33, respectively). The T4 presented an intermediate score (1,92) and it didn't differ among the treatments. The counting number of oocysts cecal, obtained one week after the challenge, it was statistically significant ( $p < 0,01$ ) forming two groups, where the first composed by T1 and T2 ( $4500 \pm 4800$  and  $1700 \pm 600$ , respectively), which differed of T3, T4 and T5, that presented the largest oocysts elimination ( $12093 \pm 7268$ ,  $10744 \pm 9987$  and  $13413 \pm 4253$ , respectively). The conditions that the experiment was carried, it can be concluded that there was a total protection effect immunity of the attenuated vaccine (T2) and a partial protection of the vaccine containing sporozoits proteins (T4) against challenge by homologous virulent strain.

**Keywords:** *Eimeria tenella*. Sporozoite protein. Attenuated strain. Broiler. Immunogenicity.



## LISTA DE TABELAS

### **Patogenicidade e imunogenicidade de uma cepa atenuada e proteínas de esporozoítos de *Eimeria tenella* em frangos de corte.**

- Tabela 1** – Avaliação do ganho de peso semanal entre os tratamentos, com início no dia 7 (avaliação da patogenicidade) ao dia 31 (dia do desafio) e resultados acumulados até o dia 31 ..... 58
- Tabela 2** – Avaliação conversão alimentar semanal entre os tratamentos, com início no dia 7 (avaliação da patogenicidade) ao dia 31 (dia do desafio) e resultados acumulados até o dia 31..... 58
- Tabela 3** – Avaliação da imunogenicidade por meio do ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA), escore de lesão (EL), níveis de luteína plasmática (LTP), número de oocistos (OPG) e percentagem de proteção (Prot. (%)), além da CA e do GP acumulados do dia zero ao dia 38 pós-imunização ..... 59

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO DE REVISÃO - Parâmetros utilizados nos testes com vacinas contra coccidiose em frangos de corte

**Figura 1** – Esquema geral da evolução clínica da coccidiose experimental, com base no ganho de peso diário da ave durante o período pré-patente do parasita. v = aves vacinadas, d = aves desafiadas e N = não. A – delineamento experimental em duas etapas, patogenicidade e imunogenicidade, sendo a curva do gráfico equivalente ao ganho de peso diário de uma ave sadia. B – teste de patogenicidade. C = teste de imunogenicidade. Modelo estatístico adaptado de Williams e Catchpole (2000) ..... 32

### Patogenicidade e imunogenicidade de uma cepa atenuada e proteínas de esporozoítos de *Eimeria tenella* em frangos de corte.

**Figura 1** – Redução do período pré-patente no processo de seleção dos oocistos *Eimeria tenella* UEL ao longo de 20 passagens ..... 60

**Figura 2** – Dinâmica de eliminação dos oocistos acumulados na cama do tratamento com oocistos atenuados de *Eimeria tenella* (T2) ..... 61

**Figura 3** – Regressão polinomial de quarto grau entre a eliminação dos oocistos na cama, do tratamento com oocistos atenuados..... 62

**Figura 4** – Cinética da curva de anticorpos determinada pelo teste imunoenzimático (ELISA) ..... 63

**Figura 5** – Proliferação de linfócitos em aves imunizadas com oocistos atenuados de *E. tenella* (T2), controle positivo (T3), imunizadas com vacina não infectante de *E. tenella* (T4) e controle com PBS + Quil A (T5)..... 64

## SUMÁRIO

<b>1 ARTIGO DE REVISÃO – PARÂMETROS UTILIZADOS NOS TESTES COM VACINAS CONTRA COCCIDIOSE EM FRANGOS DE CORTE</b> .....	12
INTRODUÇÃO .....	14
IMUNIDADE <i>VERSUS</i> METABOLISMO .....	16
PARÂMETROS PARA AVALIAR EFICÁCIA DE VACINAS ANTICOCIDIANAS .....	19
VACINAS .....	23
CONCLUSÕES .....	24
REFERÊNCIAS .....	25
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	33
2.1 OBJETIVO GERAL .....	33
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	33
<b>3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO – AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE E IMUNOGENICIDADE DE UMA CEPA ATENUADA E PROTEÍNAS DE ESPOROZOÍTOS DE <i>EIMERIA TENELLA</i> EM FRANGOS DE CORTE</b> .....	34
RESUMO .....	35
1 INTRODUÇÃO .....	36
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	38
2.1 LOCAL DO EXPERIMENTO .....	38
2.2 ANIMAIS UTILIZADOS .....	38
2.3 PRODUÇÃO DA CEPA VIRULENTA .....	38
2.4 SELEÇÃO DE OOCISTOS PRECOSES .....	39
2.5 EXCISTAÇÃO, PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ESPOROZOÍTOS .....	39
2.6 PRODUÇÃO DO IMUNÓGENO (ANTÍGENOS DE ESPOROZOÍTOS) .....	40
2.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	40
2.7.1 Amostras de soro, plasma, pesagens e oocistograma (OPG) .....	41
2.7.2 Teste de Patogenicidade e Imunogenicidade .....	42
2.7.3 Determinação dos carotenóides plasmáticos .....	42

2.7.4 Teste imunoenzimático (ELISA) e avaliação da proliferação de linfócitos do sangue periférico .....	43
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
3 RESULTADOS .....	43
3.1 AVALIAÇÃO DA SELEÇÃO DE OOCISTOS PRECOSES .....	43
3.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL.....	44
3.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	44
3.4 TESTE DE PATOGENICIDADE .....	44
3.5 TESTE DE IMUNOGENICIDADE .....	45
4 DISCUSSÃO .....	46
AGRADECIMENTOS .....	52
REFERÊNCIA .....	52
<b>APÊNDICES</b> .....	65
APÊNDICE A – Lista de Reagentes .....	66
APÊNDICE B – Soluções e Tampões.....	69
APÊNDICE C – Protocolo de Técnicas .....	72

## 1 ARTIGO DE REVISÃO

### PARÂMETROS UTILIZADOS NOS TESTES COM VACINAS CONTRA COCCIDIOSE EM FRANGOS DE CORTE<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Artigo redigido sob as normas de publicação do periódico *Semina*, disponível em:  
[http://www.uel.br/proppg/portal/pages/arquivos/pesquisa/semina/pdf/semina\\_29\\_3\\_19\\_27.pdf](http://www.uel.br/proppg/portal/pages/arquivos/pesquisa/semina/pdf/semina_29_3_19_27.pdf)

## Parâmetros utilizados nos testes com vacinas contra coccidiose em frangos de corte

### Parameters used in the tests with vaccines against coccidiosis in broilers

Alexey Leon Gomel Bogado<sup>\*2</sup>, João Luis Garcia<sup>2</sup>, José da Silva Guimarães Junior<sup>2</sup>

#### Resumo

Os coccídios do gênero *Eimeria* provocam um grande impacto econômico na avicultura, tornando-se necessário a adoção de medidas profiláticas para o seu controle, sendo uma delas o uso de anticoccídicos adicionados à ração das aves. Devido aos problemas de resistência encontrados no campo e as exigências de alguns países para a retirada progressiva dos anticoccídicos da ração das aves, é de grande interesse para a indústria avícola a busca por alternativas ao manejo profilático com tais drogas. As vacinas atualmente utilizadas no campo ou em fase de pesquisa, como alternativa aos quimioterápicos, podem incluir organismos vivos virulentos ou atenuados, parasitas não infectivos, vacinas de subunidades e vacinas obtidas por engenharia genética. É comum a avaliação das vacinas utilizando-se parâmetros que mensuram a imunidade protetora de modo indireto, como conversão alimentar, ganho de peso, escore de lesão e produção de oocistos. Esta revisão tem como objetivo abordar os aspectos clínicos da coccidiose aviária, associando o efeito da imunidade sobre o organismo da ave para um melhor entendimento dos principais parâmetros utilizados nos testes de vacinas vivas e vacinas não infectantes.

**Palavras-chave:** Vacinas, *Eimeria tenella*, Patogenicidade, Imunopatogenicidade.

---

<sup>2</sup> Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração em Sanidade Animal, UEL/CCA/DMVP, Caixa Postal 6001, CEP 86051-970, Londrina-PR.

<sup>2</sup> Docente do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva-UEL. UEL/CCA/DMVP.

\*Autor para correspondência: Tel.: 55 43 3348 5997, fax: 55 43 3348 599, e-mail: alexey\_leon@yahoo.br.

## **Abstract**

The coccidia of the genus *Eimeria* cause great economical impact in the poultry, becoming necessary the adoption of preventive measures for its control, which one to them use of anticoccidials added to the chickens feed. Due to the resistance problems found out in the field and the demands of some countries for the progressive retreat of the anticoccidícos of the birds feed, there is a large interest from the poultry industry looking for alternatives to the management profilatic with such drugs. The vaccines now used in the field or in research phase, as alternative to the quimioterapics, they can include virulent alive organisms or attenuated one, no infectives parasites, subunit vaccines and vaccines obtained by genetic engineering. It is common to evaluation of the vaccines, to use parameters that measure the protecting immunity in an indirect way, as alimentary conversion, weight gain, lesion score and oocysts production. This revision has as objective to approach the clinical aspects of the poultry coccidiosis, associating the effect of the immunity over to the organism of the bird for a better understanding about the principal parameters used in the tests of live vaccines and vaccines no infectives.

**Key words:** Vaccines, *Eimeria tenella*, Pathogenicity, Immunophatogenicity.

## **Introdução**

O aumento da demanda por alimentos como fonte de proteínas, a criação intensiva de frangos de corte e as práticas de criação adotadas têm levado a um aumento do estresse animal e da incidência de doenças, tal como a coccidiose, que atualmente é um fator determinante de grandes prejuízos na indústria avícola (YUN et al, 2000).

As espécies mais encontradas no campo são a *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* e *Eimeria tenella*, cada qual infectando uma região específica do intestino (LILLEHOJ et al. 2004). A *E. tenella* é uma das mais importantes e está associada à perdas econômicas nas granjas (GUIMARÃES JR et al., 1988). A redução do ganho de peso e o aumento na conversão alimentar são

as principais características da coccidiose aviária, contribuindo com a elevação dos custos na indústria avícola (MIN et al, 2004)

O custo estimado das perdas anuais no mundo, decorrente da coccidiose aviária, é de aproximadamente US\$ 3 bilhões, sendo que cerca de 80% dos gastos são provenientes da mortalidade, ganho de peso e conversão alimentar e os 20% restantes correspondem aos custos com profilaxia (WILLIAMS, 1999; LILLEHOJ et al., 2004, HONG et al., 2006; DALLOUL et al., 2007).

Uma classificação sobre a infecção é sugerida por Williams (2002) onde coccidiose pode ser clínica ou subclínica, sendo a primeira caracterizada por morte, morbidade, diarreia ou fezes com sangue, perda de peso e aumento na conversão alimentar. Na forma subclínica a ave apresenta diminuição de peso e/ou aumento da conversão alimentar sem quaisquer outros sinais clínicos da doença. A terceira forma é denominada coccidíase, na qual ocorre uma leve infecção sem repercussão no desenvolvimento ponderal da ave.

Williams (1999) relata ser muito raro encontrar uma granja comercial de aves que não esteja infectada por coccídios, no entanto, os sinais clínicos mais severos da coccidiose são relativamente incomuns, enquanto a coccidiose subclínica é a maior responsável por perdas econômicas.

Dentre os métodos utilizados para o controle desta parasitose, destaca-se o uso de anticoccídicos acrescidos à ração de frangos de corte, no entanto, se tem observado a ocorrência de resistência por *Eimeria* spp a estes. (CHAPMAN, 1997; VERMEULEN et al., 2001; WILLIAMS, 1998).

Outro fator importante é que o Conselho da União Européia determina a exclusão progressiva dos anticoccídicos e dos histomonostáticos utilizados como aditivos na alimentação animal, até 31 de Dezembro de 2012 (SHIRLEY et al., 2007). Soma-se a este fato a mudança comportamental da população consumidora, que busca e exige produtos isentos de resíduos químicos (VERMEULEN et al., 2001; MIN et al., 2004).



O objetivo desta revisão foi abordar os aspectos clínicos da coccidiose aviária, associando o efeito da imunidade sobre o organismo da ave para um melhor entendimento dos principais parâmetros utilizados nos testes de vacinas vivas e vacinas não infectantes.

### **Imunidade *versus* Metabolismo**

Barreiras não específicas como secreção gástrica, sais biliares, lisozima, movimentos peristálticos e competição com a microbiota, representam um importante componente da primeira linha de defesa do Tecido Linfóide Associado à Mucosa (MALT), de acordo com Sanderson et al. (1994) e Kruzel et al. (1998).

O desenvolvimento da resposta imune contra a coccidiose aviária é complexo, composto primeiramente pela imunidade não específica, seguido por mecanismos da imunidade específica (celular e humoral) (LILLEHOJ et al., 2004; MIN et al., 2004). Estudos também demonstram que a resposta humoral tem pouco impacto na imunidade protetora (LILLEHOJ; OKAMURA, 2003; MIN et al., 2004).

A imunidade desenvolvida em uma infecção causada por *Eimeria* é espécie específica e, relativamente, de longa duração, sendo que o estágio assexuado é mais imunogênico do que o sexuado (CONSTANTINOIU et al., 2007). Diferenças na imunogenicidade ocorrem pela ausência de proteção cruzada entre as espécies, sendo que a *E. maxima*, necessita da ingestão de poucos oocistos na primeira infecção para desenvolver sólida imunidade, enquanto as espécies *E. acervulina* e *E. tenella* necessitam de maior número de oocistos ingeridos para alcançar níveis semelhantes de imunidade (DALLOUL; LILLEHOJ, 2006).

Dalloul e Lillehoj (2006) descreveram que as infecções, quando não promovem a mortalidade, induzem uma imunidade protetora contra desafio subsequente. De acordo com Hong et al. (2006) e Li et al. (2002), aves naturalmente infectadas ou vacinadas com parasitas vivos de *Eimeria* produzem imunidade específica mediada por linfócitos T, conferindo proteção contra as reinfecções.

Portanto, a expressão da resistência e desenvolvimento da imunidade a coccidiose é decorrente da resposta mediada por células e citocinas (LILLEHOJ; TROUT, 1996).

Segundo Murtaugh et al. (1996) e Ovington et al. (1995), a resposta imune de mucosa envolve a produção das citocinas inflamatórias, que são rapidamente induzidas e expressadas nas doenças e processos de injúria celular, sendo os macrófagos e monócitos os tipos celulares responsáveis pela maioria da expressão destas citocinas, embora um grande número de células também secrete estas proteínas.

Até recentemente poucas citocinas das galinhas haviam sido descritas, mas com o advento do projeto genoma das galinhas, têm-se descoberto genes que produzem citocinas e quimiocinas (HONG et al, 2006). Isto facilita a realização de vários experimentos e revisões com os objetivos de melhor caracterizá-los e de quantificar seus níveis (HONG et al., 2006; LILLEHOJ et al., 2004).

Hong et al. (2006) avaliaram o gene de expressão de citocinas e quimiocinas em aves infectadas por *E. tenella* e *E. acervulina*, tendo sido obtida uma produção de moléculas de citocinas e quimiocinas em grande quantidade e diversidade na primeira infecção, sendo que o mesmo não ocorreu na segunda infecção.

O interferon gama (IFN- $\gamma$ ), uma das mais importantes citocinas com função protetora contra as espécies de *Eimeria* spp (LILLEHOJ et al, 2000), é responsável pela ativação dos macrófagos, durante a fase inflamatória da resposta imune do hospedeiro, os quais têm a importante função de defesa contra as infecções por meio da liberação de altos níveis de NO (óxido nítrico), catalizado por INOS (óxido nítrico sintetase induzido) (MACMICKING et al., 1997)

Esta importante função dos macrófagos tem ação tanto na resposta imune inata quanto na resposta adquirida do hospedeiro contra a *Eimeria* (DALLOUL; LILLEHOJ, 2006; DALLOUL et al. 2007). Em aves imunizadas por *E. tenella*, os macrófagos e outros leucócitos se infiltram no ceco mais rapidamente do que em aves não imunizadas (VERVELDE et al., 1996).

De acordo com Fekete et al. (2007), em casos de infecções ou estresse imunológico brando, os linfócitos ativados excretam citocinas em baixas concentrações, garantindo proteção

celular, humoral e a integridade do organismo sem o desenvolvimento da resposta imune aguda sistêmica. Relatam ainda que na infecção severa, o número de células ativadas aumenta substancialmente, assim como a liberação de mediadores pró-inflamatórios interleucina (IL)-1, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e principalmente IL-6.

Segundo Johnson (1997), estas citocinas produzidas durante uma resposta imunológica são grandes intermediadores do metabolismo, produzindo efeitos regulatórios na reprodução, homeostase, sistema neuro-endócrino, diferenciação e desenvolvimento hematopoiético, além de outros processos de crescimento.

A sua ação se manifesta principalmente na indução da febre e anorexia, levando à queda de consumo alimentar, comprometimento do metabolismo das proteínas, lipídios, minerais e carboidratos e provoca redução da secreção e motilidade gastrointestinal. (ITO et al., 2000).

Johnson (1997) cita que as citocinas pró-inflamatórias são responsáveis por um baixo crescimento em animais imunologicamente desafiados. Isto ocorre devido à acelerada degradação protéica dos músculos e aumento da síntese de proteínas de fase aguda no fígado pela ação da IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . As principais citocinas que se relacionam com outros sistemas orgânicos são as IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 e o TNF- $\alpha$  (MURTAUGH et al., 1996).

Hoste (2001) afirma que a presença de *Eimeria* no intestino provoca alterações locais e sistêmicas, sendo essas alterações decorrentes de mecanismos adaptativos do hospedeiro, na tentativa de restabelecer a homeostasia, os quais têm como um dos objetivos reverter os efeitos da anorexia.

O desafio é uma forma comum de estresse imunológico encontrado principalmente em sistema de criação intensivo, podendo ou não resultar em doenças clínicas, dependendo da patogenicidade dos microrganismos e da imunocompetência do animal (KLASIN et al., 1987). Relatam ainda que o estresse imunológico é indicado principalmente pela diminuição das taxas de crescimento e mudanças quantitativas no requerimento nutricional.

O trabalho realizado por Zhang et al. (1995) demonstrou que uma grande produção de TNF sérico na primo-infecção das aves por *E. tenella* leva à diminuição do ganho de peso,

enquanto na segunda infecção o TNF apresenta baixos níveis. O mesmo autor também comenta não haver efeito significativo do TNF no escore de lesão.

Desta forma, a patogênese da coccidiose está associada com o primeiro pico de produção do TNF- $\alpha$ , enquanto o segundo pico está relacionado com o desenvolvimento da imunidade protetora, sendo que a alta produção de TNF durante três a seis dias pós-infecção por *E. tenella* ou *E. maxima* tem relação com as mudanças patofisiológicas locais e sistêmicas induzidas pelo parasita (BYRNES et al., 1993). Os níveis séricos ou duodenal de TNF- $\alpha$ , em aves infectadas com *E. tenella*, apresentam uma correlação positiva com a resistência contra reinfecções (LI et al., 2002).

Normalmente o ganho de peso não é afetado ou é levemente reduzido em infecções brandas, enquanto em infecções severas o ganho de peso pode reduzir de 40 a 60% em relação ao controle não infectado (CONWAY et al., 1990).

Klasin et al. (1987), ao testar a influência da IL-1 e corticosteróides no ganho de peso das aves, chegaram à conclusão de que as aves submetidas a estresse imunológico ou inoculadas com esses tratamentos apresentaram menor ganho de peso, sendo que testes *in vitro* indicaram diminuição da taxa de síntese de proteínas causada pelos corticóides e elevação da taxa de catabolismo protéico decorrentes da IL-1.

Segundo Dalloul et al. (2007), existe uma limitação no conhecimento sobre a imunobiologia do parasita, a partir da invasão até o desenvolvimento intracelular e sua eliminação. Estas pesquisas de cunho básico são necessárias para compreender os detalhes da imunidade protetora e seu processo fisiológico.

### **Parâmetros para avaliar eficácia de vacinas anticoccidianas**

Para a avaliação da eficácia das vacinas contra coccidiose aviária, contendo o parasita vivo ou morto, é freqüente o uso de parâmetros parasitológicos, como produção de oocistos e escore de lesão, parâmetros estes adotados para avaliar a eficácia de drogas nas aves, não sendo necessariamente adequados para os testes de eficácia de vacinas (WILLIAMS; CATCHPOLE, 2000).

Segundo Williams e Catchpole (2000), a produção de oocistos nem sempre demonstra a verdadeira habilidade da vacina em conferir proteção às aves quando desafiadas com altas doses da cepa virulenta.

De acordo com Williams (2001), quando as aves são desafiadas com altas doses de oocistos pode ocorrer o efeito “crowding”, no qual a ave apresenta diminuição na eliminação dos oocistos com presença dos sinais clínicos da coccidiose, portanto sem indícios de proteção, podendo confundir os resultados. Este fato ocorre porque os espaços necessários para a produção sexuada e formação do oocisto estão ocupados pelas formas assexuadas.

Por definição, a produção de oocistos demonstra a capacidade do parasita em se multiplicar no hospedeiro (CHAPMAN et al., 2005a, CHAPMAN et al., 2005b). Para que o resultado deste critério possa indicar o nível de proteção contra o desafio, é necessário que este seja composto de um inóculo com baixa dose, variando entre 100 a 1000 oocistos por ave, (WILLIAMS; CATCHPOLE, 2000; CHAPMAN et al., 2005a, CHAPMAN et al., 2005b), para evitar a ocorrência do efeito “crowding”.

Ao desafiar as aves com uma baixa dose de oocistos, a eliminação dos oocistos do tratamento vacinal sofrerá efeito da imunidade, tendo como consequência uma diminuição da capacidade de multiplicação do parasita no hospedeiro e um menor número de oocistos eliminado nas fezes, enquanto o tratamento controle positivo possibilitará a maior expressão do potencial reprodutivo dos oocistos. A avaliação por este parâmetro não é capaz de demonstrar proteção contra coccidiose clínica (WILLIAMS; CATCHPOLE, 2000), pois o desafio é o suficiente para provocar apenas a forma clínica coccidíase.

O escore de lesão é um método subjetivo de avaliação da patologia macroscópica e dos danos físicos causados no local de interação parasita-hospedeiro (CHAPMAN et al., 2005a). Chapman (2000) menciona que, quando se utiliza o critério escore de lesão, devem-se diferenciar as lesões primárias (resultantes da vacinação) e lesões secundárias (resultantes do desafio das reinfecções da cepa vacinal ou de cepa virulenta).

Chapman et al. (2005a) mencionam que a lesão primária é mais confiável em expressar a falta de proteção contra o parasita, já que as aves infectadas são totalmente suscetíveis, enquanto na lesão secundária, a interpretação do escore de lesão pode ser confusa, apresentando-se de forma moderada ou severa, com pouca ou nenhuma forma parasitária e sem depressão no ganho de peso, o que sugere que as aves estão parcialmente ou totalmente imunes, indicando uma lesão provocada pela própria resposta imunológica do hospedeiro.

De acordo com Williams (2003), a presença de qualquer lesão intestinal em uma ave imune, avaliada pelo critério de desempenho ponderal, pode ser interpretada como sucesso do combate ao parasita pelo hospedeiro. Portanto, a presença de lesão em aves vacinadas e desafiadas não representa falta de proteção, a não ser que o ganho de peso também seja afetado, enquanto a falta de lesão é um indicativo de proteção (WILLIAMS, 2001; WILLIAMS, 2003). Conway et al. (1990) ao avaliarem a correlação entre ganho de peso e escore de lesão verificaram que o escore de lesão não reflete completamente os níveis da severidade da doença em infecções induzidas.

Outros critérios, incluindo oocistos presentes na cama e testes imunoenzimáticos (ELISA), demonstram claramente se as aves tiveram contato com o parasita, mas não se estão de fato imunes contra um desafio virulento (WILLIAMS; CATCHPOLE, 2000).

A resistência contra a coccidiose pode ser considerada uma característica quantitativa de difícil mensuração, sendo quase impossível medir diretamente a resistência genética de um modo viável (ZHU et al., 2000). Para refletir o estado de resistência ou suscetibilidade individual, são utilizados os parâmetros ganho de peso, escore de lesão, conversão alimentar e eliminação de oocistos mensurados pós-desafio com oocistos (ZHU et al., 2000).

Zhu et al. (2000) relatam que o ganho de peso não é considerado uma medida sensível para determinar se a ave encontra-se infectada, sendo necessárias doses muito altas para produzir uma resposta neste parâmetro e causar a manifestação da coccidiose clínica ou subclínica. Os autores relatam ainda que, quando combinada com outros parâmetros que apresentam correlação entre si, como conversão alimentar, concentração de  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$  e concentração de carotenóides, propicia o melhor indicador da resistência genética para coccidiose.

A medida dos níveis de carotenóides plasmáticos é um parâmetro muito sensível, ou seja, é capaz de detectar o maior número de aves que sofreram infecção por coccidiose, pela presença do baixo nível de caroteno plasmático dentro da população que se encontra parasitada, podendo variar até quando ocorre a forma mais branda da infecção, denominada coccidíase, (CONWAY et al., 1990; 1993).

Estes níveis podem ser significativamente reduzidos quando a ave é inoculada com baixas doses de oocistos com qualquer uma das espécies (*E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*) e o efeito de redução é maior quando se aumenta a dose inoculada, além de ser um excelente indicador da integridade fisiológica do intestino e ceco. (CONWAY et al., 1990; 1993).

Para determinar a verdadeira capacidade de proteção de uma vacina e o estado clínico das aves frente a um desafio, os principais critérios propostos por Chapman et al. (2005a) e Williams e Catchpole (2000) são o ganho de peso (GP) e a conversão alimentar (CA). A figura 1 representa o delineamento experimental do teste de vacinas contra coccidiose aviária.

Os critérios de GP e CA têm relação direta com o metabolismo, funcionamento de outros sistemas e o desenvolvimento da imunidade devido aos efeitos diretos das citocinas, como já mencionados, produzidas pelo estímulo da imunidade específica, seja na vacinação (momento que se determina a patogenicidade da cepa testada em aves suscetíveis) ou no desafio (quando é determinada a imunogenicidade das aves vacinadas).

Deste modo, o GP e CA caracterizam a doença clínica ou subclínica e estas fases somente se manifestam quando o desafio sobrepõe à imunidade inespecífica e/ou a ave for incapaz de montar uma resposta específica eficaz, portanto uma vacina, que embora altere os parâmetros mais sensíveis como carotenóides e níveis de anticorpos circulantes, uma vacina só poderá ser comprovadamente eficaz se o GP e CA forem estatisticamente diferentes do controle positivo e o mais parecido possível com o controle negativo.

## Vacinas

As vacinas atualmente utilizadas no campo ou em fase de pesquisa, como alternativa aos quimioterápicos, podem incluir organismos vivos virulentos ou atenuados, parasitas não infectivos, vacinas de subunidades e vacinas obtidas por engenharia genética (HONG et al., 2006).

Segundo Hong et al (2006), as vacinas vivas são as mais eficientes na produção de imunidade protetora de longa duração, principalmente por melhor simular uma infecção intestinal natural. O seu uso promove o desenvolvimento da imunidade das aves através de um sistema onde os oocistos são eliminados na cama e novamente ingeridos pelas aves, levando deste modo, o sistema imune das aves a sofrer estímulos antigênicos pelas reinfecções sucessivas e apresentar ao final da quarta semana uma imunidade duradoura contra o parasita (WILLIAMS; GOBBI, 2002; VERMEULEN et al., 2001).

As vacinas vivas podem ser virulentas ou atenuadas, com as virulentas apresentando os efeitos patogênicos semelhantes à cepa de campo (WILLIAMS, 1998), enquanto, as principais características da vacina atenuada, de acordo com Williams (1998; 2002), são a redução do período pré-patente, redução do potencial reprodutivo resultando na atenuação da virulência e diminuição dos seus efeitos patogênicos, retenção da imunogenicidade e uma estabilidade geneticamente controlada da característica adquirida.

A descrição do método de obtenção da linha precoce da cepa de *Eimeria tenella* foi realizada primeiramente por Jeffers (1974; 1975), o qual sugeriu o potencial uso dessa cepa para imunização das aves. Este processo consiste em eliminar algumas fases assexuadas ou reduzir substancialmente a sua multiplicação (SHIRLEY; HARVEY, 2000), sendo estas características geneticamente estáveis e herdáveis (JEFFERS, 1976; SUTTON et al., 1986).

Segundo Cacho et al. (2005), ainda são pouco claras as diferenças entre o DNA da cepa virulenta e a linhagem precoce. Shirley et al. (1989) observaram algumas mudanças significantes no genoma, capazes de afetar essa característica do parasita. Uma diferença importante foi a observação de uma redução gradativa da expressão da proteína HSP70 conforme o aumento da



precocidade da cepa de *E. tenella*, o que sugere que tal proteína talvez esteja envolvida com a patogenicidade da cepa (CACHO et al., 2005).

As vacinas vivas têm algumas desvantagens como produção trabalhosa e de alto custo (KLOTZ et al., 2007; VERMEULEN, 1998), alto potencial reprodutivo das cepas vacinais virulentas de *Eimeria* spp e a eficácia das vacinas a qual pode diferir geograficamente devido às variações antigênicas nas populações das cepas (LI et al., 2002; KLOTZ et al., 2007).

Klotz et al. (2007), registram que esta desvantagem das vacinas vivas pode ser superada com o desenvolvimento das vacinas de subunidades, as quais apresentam um número promissor de antígenos identificados e utilizados em estudos experimentais.

Trabalhos realizados produziram e avaliaram as vacinas mortas de subunidades (BREED et al, 1999; KARKHANIS et al, 1991; GARG et al, 1999; BREED et al, 1997). Segundo Breed et al (1999), as vacinas de subunidades seriam o método mais adequado de imunoprofilaxia contra coccidiose, por razões de segurança e custo. No entanto, as vacinas não infectivas, mesmo quando inoculados por diferentes vias, não são tão efetivas e não induzem imunidade protetora de longa duração como as vacinas vivas (YUN et al, 2000), promovendo frequentemente uma proteção parcial contra o parasita.

Com os avanços recentes nas pesquisas envolvendo biologia molecular e um maior conhecimento sobre a imunidade das aves, são necessárias mais pesquisas para encontrar antígenos e adjuvantes que confirmam um maior estímulo protetor. Min et al. (2004) comentam que as vacinas mais promissoras são baseadas na análise do genoma e proteoma de várias espécies de *Eimeria*, além da caracterização de moléculas efetoras do hospedeiro que tenham impacto no desenvolvimento da resistência da infecção contra estas espécies.

## **Conclusões**

As informações geradas sobre a imunidade das aves, testes de vacinas e patologia da coccidiose estão disponíveis de forma fragmentadas, sendo necessárias revisões para interligá-las e

buscar um amplo entendimento da relação parasita hospedeiro, o qual envolve um complexo mecanismo para reaver o equilíbrio que o parasita desfez.

Esta retomada da homeostasia ocorre por uma atuação do sistema imune e suas citocinas e quimiocinas produzidas, podendo afetar a fisiologia e o metabolismo da ave, que por sua vez são expressos através da mensuração dos parâmetros utilizados nas avaliações das vacinas.

Estes fatores relacionados à interação parasito-hospedeiro, imunologia, fisiologia, metabolismo e patologia da coccidiose devem ser levados em consideração para auxiliar no caminho para a busca de antígenos e associações de antígenos e adjuvantes, pertencentes às *Eimerias*, capazes de promover um efeito protetor.

## Referências

BREED, D.G.J.; SCHETTERS T.P.M.; VERHOEVEN, N.A.P.; BOOT-GROENINK, A.; VERMEULEN A.N. Vaccination against *Eimeria tenella* infection using a fraction of *E. tenella* sporozoites selected by the capacity to activate T cells. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v.29, n.8, p.1231-1240, 1999.

BREED, D.G.J.; SCHETTERS, T.P.M.; VERHOEVEN, N.A.P.; VERMEULEN, A.N. Characterization of phenotype related responsiveness of peripheral blood lymphocytes from *Eimeria tenella* infected chickens. *Parasite Immunology*, Oxford, v.19, n.12, p.563-569, 1997.

BYRNES, S.; EATON, R.; KOGUT, M. In vitro interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  production by macrophages from chicken infected with *Eimeria maxima* or *Eimeria tenella*. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v.23, n.5, p.639-645, 1993.

CHAPMAN, H.D. Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian Pathology*, Houghton, v.26, n.2, p.221-224, 1997.

CHAPMAN, H.D. Practical use of vaccines for the control of coccidiosis in the chicken. *World's Poultry Science Journal*, Ithaca, v.56, n.1, p.7-20, 2000.

CHAPMAN, H.D.; MATSLER, P.L.; MUTHAVARAPU, V.K.; CHAPMAN, M.E. Acquisition of immunity to *Eimeria maxima* in newly hatched chickens given 100 oocysts. *Avian Diseases*, Kennett Square, v.49, n.3, p.426-429, 2005a.

CHAPMAN, H.D.; ROBERTS, B.; SHIRLEY, M.W.; WILLIAMS, R.B. Guidelines for evaluating the efficacy and safety of live anticoccidial vaccines, and obtaining approval for their use in chickens and turkeys. *Avian Pathology*, Houghton, v.34, n.4, p.279-290, 2005b.

CONSTANTINOIU, C.C.; MOLLOY, J.B.; JORGENSEN, W.K.; COLEMAN, G.T. Development and validation of an ELISA for detecting antibodies to *Eimeria tenella* in chickens. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.150, n.4, p.306-313, 2007.

CONWAY, D.P.; MCKENZIE, M.E.; DAYTON, A.D. Relationship of coccidial lesion scores and weight gain in infections of *E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella* in broilers. *Avian Pathology*, Houghton, v.19, n.3, p.489-496, 1990.

CONWAY, D.P.; SASAI, K.; GAAFAR, S.M.; SMOTHERS, C.D. Effects of different levels of oocyst inocula of *Eimeria* Effects of different concentrations of oocyst inocula of *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, and *E. maxima* on plasma constituents, packed cell volume, lesion scores, and performance in chickens. *Avian Diseases*, Kennett Square, v.37, n.1, p.118-123, 1993.

DALLOUL, R.A.; BLISS, T.W.; HUNG, Y.H.; BEN-CHOUIKHA, I.; PARK, D.W.; KEELER, JR.C.L; LILLEHOJ, H.S. Unique responses of the avian macrophage to different species of *Eimeria*. *Molecular Immunology*, Oxford, v.44, n.4, p.558-566, 2007.

DALLOUL, R.A.; LILLEHOJ, H.S. Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert review of vaccines*, London, v.5, n.1, p.143-163, 2006.

DEL CACHO, E.; GALLEGO, M.; LOPEZ-BERNAD, F.; QUILEZ, J.; SANCHEZ-ACEDO, C. Differences in Hsp70 expression in the sporozoites of the original strain and precocious lines of *Eimeria tenella*. *Journal of parasitology*, Lawrence, v.91, n.5, p.1127-1131, 2005.

FEKETE, S.GY.; KELLEMS, R.O. Interrelationship of feeding with immunity and parasitic infection: a review. *Veterinarni Medicina*, Prague, v.52, n.4, p.131-143, 2007.

GARG, R.; BANERJEE, D.P.; GUPTA, S.K. Immune response in chickens against *E. tenella* sporozoite antigen. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.81, n.1, p.1-10, 1999.

GUIMARÃES JUNIOR, J.S., COSTA, J.O., BAIÃO, N.C. Control of eimeriosis in broiler breeding. I. Use of monesin, salinomycin and nicarbazin. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.40, p.17-24, 1988.

HONG, Y.H.; LILLEHOJ, H.S.; LEE, S.; DALLOUL, R.A.; LILLEHOJ, E. Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v.114, n.3-4, p.220-223, 2006.

HOSTE, H. Adaptive physiological processes in the host during gastrointestinal parasitism. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v.31, n.3, p.231-244, 2001.

ITO, N.M.K; MIYAJI, C.I.; LIMA, E.A.; OKABAYASHI, S. *Enfermidades do Sistema Digestório e Anexos*. In: BERCHIERI Jr, A., MACARI, M. Doenças das aves. Campinas: Fundação APINCO, 2000, p. 47-60.

JEFFERS, T.K. Immunization against *Eimeria tenella* using an attenuated strain. In: WORLD POULTRY CONGRESS, 15., 1974, New Orleans. *Proceedings...* New Orleans, 1974. p. 105-107.

JEFFERS, T.K. Attenuation of *Eimeria tenella* through selection for precociousness. *Journal of Parasitology*, Lawrence, v.61, n.6, p.1083-1090, 1975.

JEFFERS, T.K. Genetic recombination of precociousness and anticoccidial drug resistance in *Eimeria tenella*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, Berlin, v.50, n.3, p.251-255, 1976.

JOHNSON R.W. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: an integrated view. *Journal of Animal Science*, Champaign, v.75, n.5, p.1244-1255, 1997.

KARKHANIS, Y.D.; NOLTSTADT, K.A.; BHOGAL, B.S.; RAVINO, O.; PELLEGRINO, R.; CRANE, M.S.; MURRAY, P.K.; TURNER, M.J. Purification and characterization of a protective antigen from *Eimeria tenella*. *Infection and immunity*, Bethesda, v.59, n.3, p.983-989, 1991.

KLASING, K.C.; LAURIN, D.E.; PENG, R.K.; FRY, D.M. Immunologically mediated growth depression in chicks: Influence of feed intake, corticosterone and interleukin-1. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, v.117, n.9, p.1629-1637, 1987.

KLOTZ, C.; GEHRE, F.; LUCIUS, R.; POGONKA, T. Identification of *Eimeria tenella* genes encoding for secretory proteins by a functional complementation in yeast and evaluation of candidates by DNA immunisation studies in chickens. *Vaccine*, Amsterdam, v.25, n.36, p.6625-6634, 2007.

KRUZEL, M.L.; HARARI, Y.; CHEN, C.Y.; CASTRO, G.A. The gut. A key metabolic organ protected by lactoferrin during experimental systemic inflammation in mice. *Advances in experimental medicine and biology*, New York, v.443, p.167-173, 1998.

LI, G.; LILLEHOJ, E.P.; LILLEHOJ, H.S. Interleukin-2 production in SC and TK chickens infected with *Eimeria tenella*. *Avian Diseases*, Kennett Square, v.46, n.1, p.2-9, 2002.

LILLEHOJ H.S.; MIN, W.; DALLOUL, R.A. Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*. *Poultry Science*, Menasha, v.83, n.4, p.611-623, 2004.

LILLEHOJ, H.S.; CHOI, K.D.; JENKINS, M.C.; VAKHARIA, V.N.; SONG, K.D.; HAN, J.Y.; LILLEHOJ, E.P. A recombinant *Eimeria* protein inducing interferon- $\gamma$  production. Comparison of different gene expression systems and immunization strategies for vaccination against coccidiosis. *Avian Diseases*, Kennett Square, v.44, n.2, p.379-389, 2000.

LILLEHOJ, H.S.; OKAMURA, M. Host immunity and vaccine development to coccidia and salmonella infections in chickens. *Poultry Science*, Menasha, v.40, n.3, p.151-193, 2003.

LILLEHOJ, H.S.; TROUT, J.M. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v.9, n.3, p.349-360, 1996.

MACMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology*, Palo Alto, v.15, p.323-350, 1997.

MIN, W.; DALLOUL, R.A.; LILLEHOJ, H.S. Application of biotechnological tools for coccidia vaccine development. *Journal of Veterinary Science*, Suwon, v.5, n.4, p.279-288, 2004.

MURTAUGH, M.P.; BAARSCH, M.J.; ZHOU, Y.; SCAMURRA, R.W.; LIN, G. Inflammatory cytokines in animal health and disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v.54, n.1-4, p.45-55, 1996.

OVINGTON, K.S.; ALLEVA, L.M.; KERR, E.A. Cytokines and immunological control of *Eimeria* spp. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v.25, n.11, p.1331-1351, 1995.

SANDERSON, I.R.; HE, Y. Nucleotide uptake and metabolism by intestinal epithelial cells. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, v.124, n.1, p.131-137, 1994.

SHIRLEY, M.W.; CHAPMAN, H.D.; JEFFERS, T.K.; BEDRNIK, P. Enzyme variation and pathogenicity of recent field isolates of *Eimeria tenella*. *Research in Veterinary Science*, Oxford, v.46, n.1, p.79-83, 1989.

SHIRLEY, M.W.; HARVEY, D.A. A genetic linkage map of the apicomplexan protozoan parasite *Eimeria tenella*. *Genome Research*, Cold Spring Harbor, v.10, n.10, p.1587-1593, 2000.

SHIRLEY, M.W.; SMITH, A.L.; BLAKE, D.P. Challenges in the successful control of the avian coccidia. *Vaccine*. Amsterdam, v.25, n.30, p.5540-5547, 2007.

SUTTON, C.A.; SHIRLEY, M.W.; McDONALD, V. Genetic recombination of markers for precocious development, arprinocid resistance, and isoenzymes of glucose phosphate isomerase in *Eimeria acervulina*. *Journal of Parasitology*, Lawrence, v.72, n.6, p.965-967, 1986.

VERMEULEN, A.N. Progress in recombinant vaccine development against coccidiosis. A review and prospects into next century. *International Journal of Parasitology*, Oxford, v.28, n.7, p.1121-1130, 1998.

VERMEULEN, A.N.; SCHAAP, D.C.; SCHETTERS, Th.P.M. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.100, n.1-2, p.13-20, 2001.

VERVELDE, L.; VERMEULEN, A.N.; JEURISSEN, S.H. In situ characterization of leucocyte subpopulations after infection with *Eimeria tenella* in chickens. *Parasite Immunology*, Oxford, v.18, n.5, p.247-256, 1996.

WILLIAMS, R.B. A compartmentalized model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v.29, n.8, p.1209-1229, 1999.

WILLIAMS, R.B. Anticoccidial vaccination: the absence or reduction of numbers of endogenous parasites from gross lesions in immune chickens after virulent coccidial challenge. *Avian Pathology*, Houghton, v.32, n.5, p.535-543, 2003.

WILLIAMS, R.B. Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to success. *Avian Pathology*, Houghton, v.31, n.2, p.317-353, 2002.

WILLIAMS, R.B. Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v.28, n.7, p.1089-1098, 1998.

WILLIAMS, R.B. Quantification of the crowding effect during infections with the seven *Eimeria* species of the domesticated fowl: its importance for experimental designs and the production of oocyst stocks. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v.31, n.10, p.1056-1069, 2001.

WILLIAMS, R.B.; CATCHPOLE, J. A new protocol for a challenge test to assess the efficacy of live anticoccidial vaccines for chickens. *Vaccine*, Amsterdam, v.18, n.13, p.1178-1185, 2000.

WILLIAMS, R.B.; GOBBI, L. Comparison of an attenuated anticoccidial vaccine and an anticoccidial drug programme in commercial broiler chickens in Italy. *Avian Pathology*, Houghton, v.31, n.3, p.253-265, 2002.

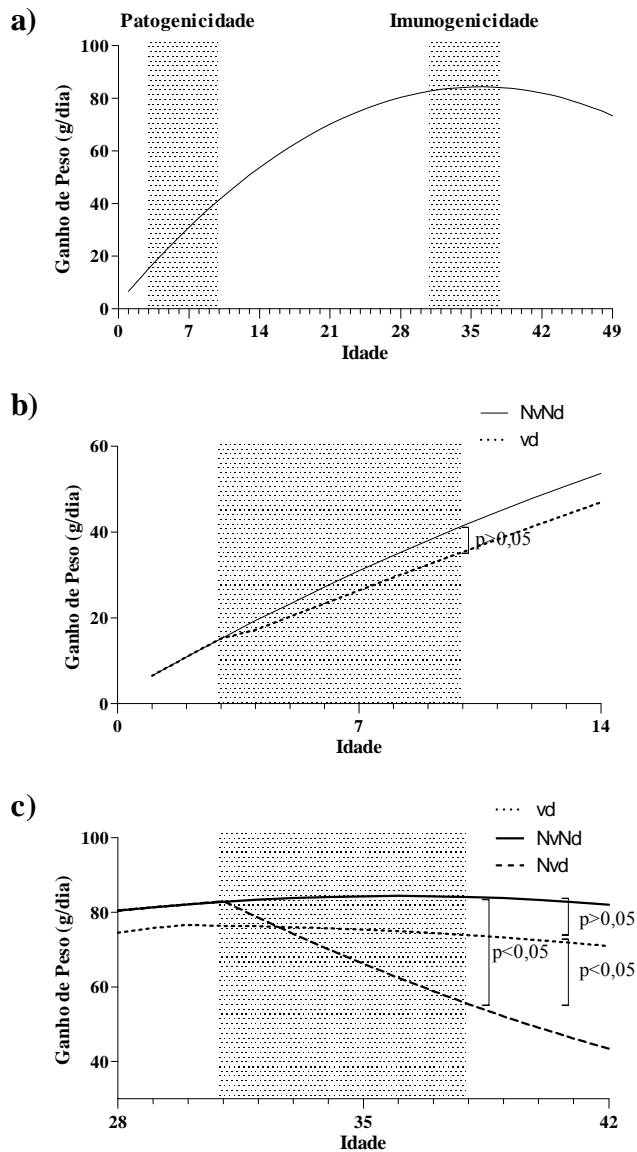
YUN, C.H.; LILLEHOJ, H.S.; LILLEHOJ, E.P. Intestinal immune responses to coccidiosis. *Developmental and Comparative Immunology*, Elmsford, v.24, n.2-3, p.303-324, 2000.

ZHANG, S.; LILLEHOJ, H.S.; RUFF, M.D. In vivo role of tumor necrosis-like factor in *Eimeria tenella* infection. *Avian Diseases*, Kennett Square, v.39, n.4, p.859-866, 1995.

ZHU, J.; LILLEHOJ, H.S.; ALLEN, P.; YUN, C.H.; POLLOCK, D.; EMARA, M. Analysis of disease resistance associated parameters in broiler chicken challenged with *Eimeria maxima*. *Poultry Science*, Menasha, v.79, n.5, p.619-625, 2000.



## Lista de figuras



**Figura 1.** Esquema geral da evolução clínica da coccidiose experimental, com base no ganho de peso diário da ave durante o período pré-patente do parasita. v = aves vacinadas, d = aves desafiadas e N = não. A – delineamento experimental em duas etapas, patogenicidade e imunogenicidade, sendo a curva do gráfico equivalente ao ganho de peso diário de uma ave sadia. B – teste de patogenicidade. C = teste de imunogenicidade. Modelo estatístico adaptado de Williams e Catchpole (2000).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

- Avaliar a patogenicidade e imunogenicidade de vacina atenuada e vacina contendo proteínas de esporozoítos de *Eimeria tenella* em frangos de corte, frente ao desafio com cepa virulenta homóloga.

### **2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Avaliar as vacinas produzidas, após o desafio, por meio dos parâmetros clínicos ganho de peso, conversão alimentar, níveis de luteína plasmática e dos parâmetros imunológicos proliferação de linfócitos periféricos do sangue e ensaio imunoenzimático (ELISA).

### 3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

#### **PATOGENICIDADE E IMUNOGENICIDADE DE UMA CEPA ATENUADA E PROTEÍNAS DE ESPOROZOÍTOS DE EIMERIA TENELLA EM FRANGOS DE CORTE<sup>3</sup>**

---

<sup>3</sup>Artigo redigido sob as normas de publicação do periódico *Veterinary Parasitology*, disponível em: [www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/503321/authorinstructions](http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/503321/authorinstructions)

**Patogenicidade e imunogenicidade de uma cepa atenuada e proteínas de esporozoítos de  
*Eimeria tenella* em frangos de corte.**

Alexey Leon Gomel Bogado\*, João Luis Garcia, José da Silva Guimarães Junior

Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, Departamento de Medicina Preventiva,  
Universidade Estadual de Londrina (UEL).  
Campus Universitário, Caixa Postal 6001, 86051-990,

\*Autor. Tel.: 55 43 3348 5997; fax: 55 43 3348 5997.

E-mail: alexey\_leon@yahoo.com.br

**Resumo**

O presente trabalho avaliou a imunidade em frangos de corte previamente inoculados com oocistos atenuados e proteínas de esporozoítos de *Eimeria tenella* frente a um desafio com inóculo virulento homólogo. Utilizou-se 510 fêmeas da linhagem Hubbard, com três dias de idade, livres de coccídios e alojadas em baterias metálicas distribuídas em cinco tratamentos com três repetições cada, sendo 12 aves por repetição. Os tratamentos, realizados no dia 0, foram constituídos por: T1 (controle não inoculado e não desafiado), T2 (inoculado com 500 oocistos atenuados via oral e desafiado) e T3 (controle não inoculado e desafiado). O T4 foi inoculado com 50µg de antígenos de esporozoítos associados ao adjuvante Quil A e desafiado e o T5 foi inoculado com adjuvante Quil A sem esporozoítos e desafiado, ambos os tratamentos foram submetidos a três inoculações nos dias 0, 7 e 21. No dia 31, foram realizados pesagem e desafio com oocistos esporulados de cepa virulenta homóloga da espécie *E. tenella* na dose de  $8,0 \times 10^4$  oocistos, excetuando o T1. Entre os parâmetros

utilizados para avaliar a patogenicidade e a imunogenicidade, o ganho de peso e a conversão alimentar não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). A cinética de anticorpos, avaliada semanalmente, demonstrou um aumento gradativo das imunoglobulinas do tratamento T2 e T4 até atingir o pico no dia 21 (densidade óptica (DO) de 0,377 e 0,309, respectivamente), sendo que, em seguida houve um decréscimo gradual dos níveis de anticorpos sem que ficasse abaixo do ponto de corte (DO = 0,267). A análise da proliferação de linfócitos periféricos do sangue das aves, realizada no dia do desafio, mostrou uma maior proliferação nas aves do T2 e T4. Os parâmetros parasitológicos, como escore de lesão e contagem do número de oocistos cecais, obtidos uma semana após o desafio, apontaram um efeito protetor imunológico total da vacina atenuada (T2) e parcial da vacina inativada de esporozoítos (T4) contra desafio por cepa virulenta homóloga.

*Palavras-chave:* Frango de corte, *Eimeria tenella*, Cepa precoce, Proteínas de esporozoítos, Imunopatogenicidade.

## **1. Introdução**

Devido ao aumento da demanda por alimentos como fonte de proteínas, a criação intensiva de frangos de corte e as práticas de criação adotadas têm levado a um aumento do estresse e da incidência de doenças, como a coccidiose, sendo que a presença de um elevado número do parasita em criatórios comerciais determina grandes prejuízos na indústria avícola (Yun et al, 2000), sendo a *Eimeria tenella* uma das espécies mais importantes na avicultura (Guimarães Jr. et al., 1988).

O custo estimado das perdas anuais, decorrente da coccidiose aviária, gira em torno de US\$ bilhões, sendo aproximadamente 80% dos gastos devido aos efeitos diretos da mortalidade, ganho de peso e conversão alimentar e os 20% restantes correspondem aos

custos com profilaxia (Williams, 1999; Lillehoj et al., 2004, Hong et al., 2006; Dalloul et al., 2007).

Williams (1999; 2002) sugere uma classificação para infecção por *Eimeria* com base na patogenicidade, podendo manifestar-se no hospedeiro de três formas, clínica, subclínica e coccidíase. A coccidiose clínica é caracterizada por mortalidade, morbidade, diarreia ou fezes com sangue, perda de peso ou diminuição no ganho de peso e aumento na conversão alimentar. Na forma subclínica, a mais importante economicamente, a ave não apresenta sintomas da doença, sendo observados uma diminuição do ganho de peso e o aumento da conversão alimentar. A terceira forma é denominada coccidíase, a qual é responsável por uma leve infecção sem causar efeito na ave.

Esta forma clínica é a mais freqüente na avicultura (Williams, 1999) podendo ocorrer devido à infecção do hospedeiro com um número pequeno de oocistos viáveis em aves parcialmente imunes, infecção por cepa de menor patogenicidade e aves submetidas à medicação profilática contra coccidiose.

O principal método utilizado para o controle desta parasitose consiste no uso de anticoccídicos acrescentados à ração de frangos de corte, nos quais se observa a ocorrência de resistência por *Eimeria* spp. (Chapman, 1997; Vermeulen et al., 2001; Williams, 1998). Soma-se a este fato a exigência da população consumidora, que busca produtos isentos de resíduos de agentes químicos (Vermeulen et al., 2001; Min et al., 2004) e, conforme Shirley et al. (2007), deve ocorrer adequações quanto ao modo de produção para atender a mercados como a União Européia, cujo Conselho determinou a exclusão progressiva dos anticoccídicos e dos histomonostáticos utilizados como aditivos na alimentação animal até 31 de dezembro de 2012 (Regulation [EC] No. 1831/2003, Article 11).

As vacinas utilizadas a campo ou em fase de testes, como alternativa aos quimioterápicos, podem incluir organismos vivos virulentos, vivos atenuados, parasitas não

infectivos (subunidades) e vacinas de subunidades obtidas por engenharia genética (Hong et al., 2006).

O presente estudo teve por objetivo avaliar a patogenicidade e imunogenicidade desenvolvida por frangos de corte, inoculados com oocistos atenuados e proteínas de esporozoítos de *Eimeria tenella* e desafiados com uma cepa virulenta homóloga.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Local do experimento**

O experimento foi realizado no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias e no setor de Isolamento do Hospital Veterinário, vinculados ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

### **2.2. Animais utilizados**

Foram utilizadas 510 aves, fêmeas da linhagem Hubbard com um dia de idade, livres de coccídios, as quais foram alojadas em baterias metálicas com fornecimento de ração e água *ad libitum*. O experimento foi conduzido em acordo aos princípios éticos do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEEA/UEL) sob o número 52/07.

### **2.3. Produção da Cepa Virulenta**

Utilizou-se uma cepa virulenta de *Eimeria tenella*, obtida a campo e armazenada sob refrigeração no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias. Um total de 14 pintinhos foi utilizado para o processamento e a purificação dos oocistos, conforme a técnica descrita por Long (1971), sendo, em seguida, reproduzidos em 80 pintinhos, os quais receberam ração com anticoccídico nos primeiros dez dias de vida, seguido por ração sem nenhum tipo de

medicamento até o final desta etapa. No 15º dia de idade as aves foram submetidas a seis horas de jejum antecedendo a inoculação, sendo os oocistos recuperados da cama. Após a esporulação, os oocistos foram preservados a 8°C em solução de dicromato de potássio a 2,5%, até o momento do desafio no teste de imunogenicidade. Uma alíquota de oocistos desta cepa foi separada para a preparação do antígeno que compôs o imunógeno de subunidades de proteínas de esporozoítos.

#### **2.4. Seleção de Oocistos Precoces**

Para a atenuação da cepa virulenta foi utilizada a técnica descrita por Jeffers (1974). Para isso, dez pintinhos da linhagem Hubbard com um dia de idade, receberam manejo alimentar idêntico ao das aves destinadas à produção da cepa virulenta e foram inoculados com doses variando de 3.000 a 5.000 oocistos esporulados de *E. tenella* por ave. A inoculação foi realizada conforme o método descrito por Li et al. (2004) e, para o monitoramento da eliminação dos oocistos contidos na cama, foi utilizada a técnica descrita por Gordon e Withlock (1939) modificada. Após a esporulação dos oocistos de cada uma das 20 passagens, uma alíquota foi armazenada em dicromato de potássio a 2,5%. Subseqüente à obtenção da cepa atenuada, foi realizada a sua multiplicação em 40 pintinhos, sendo os oocistos recuperados do ceco, após eutanásia feita com CO<sub>2</sub>. Decorrida a esporulação, os oocistos foram preservados a 8°C em solução de dicromato de potássio a 2,5%, para avaliar o seu real potencial como vacina, por meio dos testes de patogenicidade e imunogenicidade.

#### **2.5. Excistação, Purificação e Quantificação dos Esporozoítos**

Oocistos de *E. tenella* obtidos do ceco foram purificados, esterilizados em hipoclorito de sódio e excistados de acordo com as técnicas descritas por Schmatz et al. (1984) e Dulski e Torneiro (1988). Após a esterilização, os oocistos sofreram esporulação em dicromato de



potássio 2,5%, sendo em seguida lavados em 10mM de PBS (Salina Fosfatada Tamponada) com pH 7.5 e suspensos em tubos de 50ml de PBS frio contendo esferas de vidro de 3mm, para a ruptura da parede do oocisto por meio do vortex (5 minutos). A sedimentação dos esporocistos foi feita por centrifugação a 1600xg por 10 minutos e, em seguida, executou-se a ressuspensão do sedimento em solução de sacarose 1M, seguida por uma nova centrifugação. Os esporocistos sedimentados foram ressuspensos em tubos de 50ml contendo tripsina 0.25% e ácido taurodeoxicolato 4% (Sigma) em PBS e permaneceram sob agitação em banho-maria a 41°C por 45 minutos. Os esporozoítos excistados foram centrifugados, para sedimentação, a 700 x g por 20 minutos e o sobrenadante cuidadosamente decantado. Em seguida, foram realizadas três lavagens em PBS e sua concentração foi ajustada para 10<sup>7</sup> esporozoítos/ml.

## **2.6. Produção do Imunógeno (Antígenos de Esporozoítos)**

Um volume de 2ml de esporozoítos, obtidos na etapa de excistação, foram sonicados a 80 mA por seis períodos de um minuto em banho de gelo e centrifugado por 10 minutos a 10.000 x g. O sobrenadante, contendo as proteínas solúveis, foi associado ao adjuvante Quil A para a imunização das aves. Uma alíquota sem o adjuvante foi separada para a realização dos testes de ELISA e de proliferação celular de linfócitos. A quantificação de proteínas solúveis foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976).

## **2.7. Delineamento Experimental**

O experimento foi constituído por cinco tratamentos com três repetições, cada uma contendo 12 aves, perfazendo 36 aves por tratamento, exceto o tratamento T2 no qual foram alocadas duas aves a mais por repetição (n=14), para o teste de patogenicidade, totalizando 42 aves, denotando um experimento inteiramente casualizado. Durante a etapa de avaliação da

patogenicidade e imunogenicidade, foi utilizada ração convencional para as fases inicial, crescimento e final, sem a adição de anticoccídicos. Os tratamentos foram: T1 - não imunizado e não desafiado, T2 - imunizado com cepa viva atenuada e desafiado, T3 - não imunizado e desafiado, T4 - imunizado com antígenos de esporozoítos associado ao adjuvante Quil A e desafiado e T5 - imunizado com PBS associado ao adjuvante Quil A e desafiado. A imunização ocorreu no terceiro dia de vida das aves, considerando-se o primeiro dia de tratamento como dia 0 para organização e interpretação dos dados. Os animais do T2 receberam 500 oocistos/ave, via oral, o T4 recebeu 50µg de antígenos de esporozoítos associados à Quil A (20 µg/ave), via nasal e o T5 recebeu PBS + Quil A (20 µg/ave), via nasal. Os controles T1 e T3 (negativo e positivo respectivamente) receberam somente PBS via oral. Os tratamentos T4 e T5 foram imunizados nos dias 0, 7, e 21 do experimento. No dia 31, todos os tratamentos foram desafiados com  $8,0 \times 10^4$  oocistos esporulados de *E. tenella*, exceto o controle negativo (T1).

### **2.7.1. Amostras de soro, plasma, pesagens e oocistograma (OPG)**

Foi feita, semanalmente, a pesagem da ração e das aves pertencentes a cada uma das repetições. Durante esta etapa foi colhido 0.5ml de sangue, via veia jugular, das aves com até sete dias de idade e 1 ml de sangue, via veia braquial, das aves com duas ou mais semanas. Foi utilizada uma ave de cada repetição, para obtenção dos soros nos dias 7, 14, 21, 31, 38 e 45 do experimento, os quais foram utilizados para determinar a cinética dos anticorpos.

No dia do desafio, foram colhidos 2 ml de sangue de três animais de cada tratamento, sendo 1 ml colhido com heparina para avaliar a proliferação de linfócitos periféricos do sangue (PBL) e 1 ml colhido com EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) para obtenção do plasma para quantificação dos carotenóides. Os animais restantes foram eutanasiados no dia 45. A contagem dos oocistos na cama do tratamento T2 foi realizada a cada três dias até o

desafio, enquanto a dos oocistos presentes no ceco foi realizada diariamente durante uma semana em todos os tratamentos após o desafio, aproveitando os animais destinados ao descarte. A percentagem de proteção contra a eliminação de oocistos (Rose and Mockett, 1983) foi calculada como segue: % Prot. =  $100 \times [(\text{número de oocistos do controle} - \text{número de oocistos das aves imunizadas}) / \text{número de oocistos do controle}]$ .

### **2.7.2. Teste de Patogenicidade e Imunogenicidade**

Para o teste de patogenicidade foram utilizados os dados das pesagens dos dias zero e sete para o cálculo de ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA) dos tratamentos. O escore de lesão cecal (EL) de seis aves do tratamento T2 foi avaliado sete dias após a vacinação de acordo com o descrito por Johnson e Reid (1970). O teste de imunogenicidade foi realizado utilizando-se os dados das pesagens dos dias 31 e 38 para determinar o GP e CA. Adicionalmente, no dia 38 foram realizados contagem de oocistos presentes no ceco, EL, teste imunoenzimático ELISA e proliferação de linfócitos. As avaliações da CA e GP acumulados foram realizadas subseqüentes às avaliações da patogenicidade e imunogenicidade, sendo utilizados os dados do dia zero ao 31 e do dia zero ao 38, respectivamente.

### **2.7.3. Determinação dos carotenóides plasmáticos**

A extração do caroteno foi feita a partir de 150 $\mu$ l do plasma, o qual foi misturado com acetona na proporção de 1:10. Após a homogeneização em vortex, a amostra foi centrifugada a 10000xg por 10 minutos a temperatura de 4°C segundo Allen et al. (1996). O sobrenadante foi examinado em espectrofotômetro Cintra 20 GBC a 446nm e a concentração, em  $\mu$ g de luteína/ml de plasma, foi calculada com base no coeficiente de extinção da luteína em acetona,  $E_{1cm}^{1\%} = 2340$  (Melendez-Martinez et al., 2007).

#### **2.7.4. Teste imunoenzimático (ELISA) e avaliação da proliferação de linfócitos do sangue periférico.**

O ELISA foi realizado de acordo com o descrito por Garcia et al. (2008). As diluições foram estabelecidas utilizando comparações entre as diluições do soro, antígenos e conjugado. A avaliação da Proliferação de Linfócitos Periféricos (PBL) foi conduzida conforme descrito por Breed et al (1996; 1997) e Garcia et al. (2008).

#### **2.8. Análise Estatística**

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significantes ( $p < 0,05$ ), as médias das variáveis GP, CA, OPG cecal, teste imunoenzimático (ELISA) e níveis de luteína foram comparadas pelo teste de Tukey. O EL foi analisado pelo teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis e em seguida submetido ao teste de comparações múltiplas para dados não-paramétricos (teste de Dunn), sendo os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Os dados que não cumpriram os pressupostos da análise de variância (normalidade e homogeneidade das variâncias), passaram pela transformação de Johnson, do programa estatístico Minitab 15, com a finalidade de normalizar sua distribuição. Todas as análises foram realizadas por meio do programa estatístico Minitab 15 e os gráficos pelo PrismaGraphPad 5.

### **3. Resultados**

#### **3.1. Avaliação da seleção de oocistos precoces**

Após uma série de 20 passagens, a cepa que inicialmente apresentava um período pré patente (ppp) de 167 horas apresentou uma redução de 30 horas, passando para um ppp de 137 horas. A Figura 1 apresenta três pontos nos quais se observa um aumento do ppp nas passagens 11, 13 e 16, caracterizando um relaxamento da pressão de seleção não intencional.

### **3.2. Avaliação da resposta imune humoral**

Houve um aumento gradativo das imunoglobulinas do tratamento T2 e T4 até atingir o pico no dia 21, (DO = 0,377 e 0,309, respectivamente) conforme demonstra a Figura 5, ocorrendo, em seguida, um decréscimo gradual dos níveis de anticorpos sem que ficasse abaixo da linha de corte (DO = 0,267). Durante todo o período em que foram quantificados os anticorpos, os tratamentos T2 e T4 apresentaram níveis de imunoglobulinas acima da linha de corte e os tratamentos T3 e T5 ultrapassaram a linha de corte somente 14 dias após o desafio, enquanto os níveis de imunoglobulinas do T1 permaneceram abaixo da linha de corte por todo o experimento (Figura 5).

### **3.3. Proliferação celular**

A análise da proliferação de linfócitos periféricos do sangue das aves mostrou uma maior proliferação nos animais do T2 e T4 (Figura 5). No entanto, os índices de estimulação (SI) ficaram abaixo de 2.

### **3.4. Teste de Patogenicidade**

#### **3.4.1. Ganho de peso e conversão alimentar**

Avaliados uma semana após a imunização, não ocorreu diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos para GP e CA (Tabela 1 e 2, respectivamente). As avaliações subsequentes ao teste da patogenicidade apontaram um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) da CA do tratamento T2 nos dias 14, 21 e na CA acumulada. No dia 21, o GP do T2 foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que o tratamento T5.

#### **3.4.2. Escore de lesão e eliminação de oocistos**

O valor médio do EL do T2 mensurado uma semana após a imunização foi 1,33. O tratamento T4, proteínas de esporozoítos, não apresentou EL assim como os tratamentos T1, T3 e T5.

O oocistograma da cama realizado a cada três dias demonstrou que as aves do T2 sofreram exposição aos oocistos durante o período entre a imunização e o desafio, apresentando um pico de eliminação na cama (32.450 oocistos/g de cama) no dia 19, conforme Figura 2. A partir deste dia ocorreu uma diminuição brusca na eliminação de oocistos, cuja concentração de oocistos oscilou entre 367 e 8.080 oocistos por grama de cama até o final do monitoramento, com o desenvolvimento e consolidação da imunidade.

O comportamento da eliminação de oocistos (Figura 3) do dia sete ao dia 37, apresentou uma curva associada a uma equação polinomial de quarto grau ( $p=0,004$ ), sendo que a eliminação é explicada em 33,0% ( $R^2$ ) por esta equação, no qual o número de oocistos eliminados (OPG) em função dos dias pós-vacinação ( $X$ ) é:  $\text{Log}_{10}(\text{OPG}) = 7,22 - 1,04(X) + 0,0986(X)^2 - 0,00378(X)^3 + 0,000049(X)^4$ .

### **3.5. Teste de Imunogenicidade**

#### **3.5.1. Ganho de peso, conversão alimentar e carotenóides**

Após o desafio com cepa homóloga virulenta o GP, a CA e os níveis plasmáticos de luteína não apresentaram significância estatística ( $p>0,05$ ), conforme tabela 3. Adicionalmente ao teste de imunogenicidade, foi obtido o GP e CA acumulados, (calculados a partir dos dados do dia 0 ao 38). O GP acumulado não apresentou significância estatística ( $p>0,05$ ), enquanto a CA acumulada foi significativa ( $p<0,01$ ) com T2 apresentando a maior CA, diferindo dos tratamentos T4 e T5.

#### **3.5.2. Escore de lesão e eliminação de oocistos**

O EL apresentou significância ( $p<0,001$ ) no teste de Kruskal-Willis e o teste de comparação múltipla de Dunn originou dois grupos sendo: os tratamentos T3 e T5 (3,75 e 3,33 respectivamente) com os maiores escores de lesão e um segundo grupo formado por T1 e

T2 (0,00 e 0,17 respectivamente) com EL insignificante. O tratamento T4 (1,92) apresentou lesão intermediária aos dois grupos acima citados (Tabela 3).

A eliminação de oocistos apresentou diferença entre os tratamentos ( $p < 0,01$ ), formando um grupo constituído por T2 (com 99% de proteção) e o outro por T3, T4 e T5 (0; 11,2 e – 10,9% de proteção).

#### 4. Discussão

Um programa de seleção tem por objetivo aumentar a frequência dos genes que expressam uma determinada característica (Gianononi & Giannoni, 1983). O critério de seleção utilizado neste trabalho foi baseado na característica fenotípica para diminuição do período-pré-patente (ppp).

Li et al. (2004) e Montes et al. (1998), diferentemente deste trabalho, realizaram a recuperação dos oocistos do lúmen cecal das aves e a seleção dos oocistos resultou na diminuição do ppp em 49 horas para a espécie *E. tenella* e em 30 horas para a espécie *E. necatrix*, respectivamente. Jorgensen et al. (2006), em um estudo com a espécie *E. tenella*, obtiveram uma redução do ppp de 24 horas para a cepa Redlands e 23 horas para a cepa Darryl, recuperando os oocistos contidos nas fezes. As diferenças dos ppp's, obtidas entre os autores e o presente trabalho, no qual os oocistos da espécie *E. tenella* foram colhidos das fezes e apresentaram uma diminuição de 30 horas do ppp, provavelmente se devem às características de patogenicidade das espécies trabalhadas e ao método utilizado para a colheita dos primeiros oocistos eliminados.

Observou-se neste estudo um aumento do ppp, (Figura 1) possivelmente decorrente da mortalidade elevada dos lotes utilizados nas passagens 11, 13 e 16, caracterizando um relaxamento da pressão de seleção não intencional, diferindo do obtido por Montes et al.

(1998), os quais provocaram um relaxamento na pressão de seleção com o intuito de obter uma maior produção de oocistos.

O relaxamento da pressão de seleção observado neste trabalho provavelmente ocorreu devido à produção de oocistos de poucas aves, em cujas passagens ocorreram alta mortalidade, e também pelo fato dos oocistos terem sido colhidos das fezes e não diretamente do ceco. Para a utilização desta estratégia de seleção, é recomendável ter um número suficiente de aves para que aumente a chance dessas eliminarem as fezes cecais no momento da liberação dos oocistos maduros.

Os resultados do teste de patogenicidade mostraram que a dose imunizante de 500 oocistos/ave do tratamento T2 apresentou mínima patogenicidade, não alterando os parâmetros do GP e da CA. O EL obtido durante a avaliação da cepa atenuada (1,33) confirma a baixa patogenicidade da dose utilizada.

Após o teste de patogenicidade, o T2 apresentou menor eficiência na CA em relação aos demais tratamentos nos dias 14 e 21 e menor GP no dia 21, provavelmente devido ao aumento dos oocistos presentes na cama das aves do dia 10 (1850 oocistos/g de cama) para o dia 13 (6867 oocistos/g de cama), assim como do dia 16 (2483 oocistos/g de cama) para o dia 19 (32450 oocistos/g de cama), representando um desequilíbrio na relação parasita hospedeiro, onde o sistema imune das aves foi incapaz de protegê-las frente a um aumento no desafio da cama. As reinfecções sucessivas ao longo das quatro semanas não apresentaram diferenças estatisticamente significantes no GP acumulado entre os tratamentos (T1 =  $528 \pm 37$ ; T2 =  $1468 \pm 46$ ; T3 =  $1479 \pm 69$ ; T4 =  $1604 \pm 74$  e T5 =  $1552 \pm 50$ ). No entanto, ocorreu um aumento na CA acumulada, sendo que o tratamento T2 diferiu dos tratamentos T3 e T4, apresentando uma média de desempenho melhor em 7% no GP para cada um kg de ração consumida.



Resultados semelhantes sobre patogenicidade foram obtidos por Jorgensen et al (2006), os quais não observaram diferença entre GP e CA com doses até  $2 \times 10^4$  oocistos da cepa atenuada de *Eimeria tenella*, enquanto a cepa homóloga virulenta apresentou diferenças significativas com dose de  $1 \times 10^4$ .

No entanto, Li et al. (2004) obtiveram uma redução de 57 % (EL = 1,00) e 53% (EL = 1,08) no GP das aves infectadas com dose de  $1 \times 10^3$  oocistos/ave das cepas obtidas com período pré patente de 119 e 115h respectivamente. A cepa homóloga virulenta reduziu em 73% (EL = 1,13) o GP, sendo que esta redução ocorreu, provavelmente, pela maior patogenicidade da cepa em relação às outras testadas.

Das manifestações clínicas sugeridas por Williams (2002), no teste de imunogenicidade, esperava-se que as aves do T3 apresentassem a doença com um quadro clínico ou mesmo subclínico com a dose do desafio de  $8 \times 10^4$  oocistos por ave. No entanto, foi obtida a terceira forma, denominada coccidíase, que ocorreu possivelmente pela diminuição da patogenicidade da cepa, devido às constantes passagens em aves, ou pela diminuição da viabilidade da mesma, decorrente do período de armazenamento.

O EL não reflete completamente os níveis da severidade da doença nas infecções por coccidiose, significando que a presença de grandes escores de lesão intestinal em uma ave imune, que apresenta GP e CA estatisticamente igual ao controle negativo, pode ser interpretada como sucesso do combate ao parasita pelo hospedeiro, sendo que estas lesões apresentam poucas ou nenhuma forma endógena do parasita (Williams, 2001; 2003; Williams e Andrews, 2001; Conway et al., 1990).

No presente trabalho, as aves mais suscetíveis (não imunizadas e desafiadas) apresentaram GP e CA estatisticamente semelhantes ao controle negativo após o desafio na quarta semana e altos escores de lesão, os quais também não refletiram completamente os níveis da severidade da doença.

Neste experimento, a eliminação de oocistos constituiu-se no principal parâmetro para apontar diferenças entre os tratamentos uma semana após o desafio. O tratamento T2 apresentou uma eficaz diminuição de eliminação do número de oocistos, provavelmente por utilizar-se de recursos da imunidade específica, desenvolvida devido à exposição prévia ao parasita.

Embora os resultados parasitológicos (eliminação de oocistos e EL) indicassem diferentes graus de proteção aos tratamentos T2 e T4, não foi possível concluir se os tratamentos realizados foram de fato eficazes, uma vez que os resultados do GP e CA não foram significantes entre os tratamentos controle negativo (T1) e controle positivo (T3).

Os resultados acumulados da CA demonstram que o tratamento T2 foi 7% menos eficiente na conversão alimentar em relação à média da CA dos tratamentos T4 e T5. O GP acumulado do T2 foi 41% maior em relação ao peso acumulado até o dia 31, enquanto o T4 apresentou um GP 30% maior em relação ao mesmo período. Estes resultados podem representar um possível ganho compensatório do T2, ocorrido durante o período do desafio, e um pequeno comprometimento do desenvolvimento produtivo devido ao aumento da conversão alimentar em relação aos tratamentos T4 e T1.

Li et al. (2004) e Jorgensen et al. (2006) produziram cepas atenuadas da espécie *E. tenella* e realizaram o teste da imunogenicidade frente à desafio virulento homólogo, sendo utilizados os parâmetros GP e CA como critérios primários, ambos obtendo proteção com base no GP obtidos aos seis e 10 a 12 dias após o desafio, respectivamente. Os níveis de proteção obtidos nos trabalhos acima citados foram obtidos frente a um desafio capaz de provocar a doença clínica nos controles positivos, enquanto o presente trabalho mensurou a proteção por meio da produção de oocistos e escore de lesão.

Não se observou diferenças nos níveis de luteína entre os tratamentos, no entanto, Conway et al. (1993) observam que níveis de carotenóides plasmáticos podem variar

significativamente em aves infectadas por coccídios, sem a ocorrência de alterações no GP e CA para infecções com cepa de *E. tenella*.

Garcia et al. (2008) avaliaram uma vacina nasal contendo antígenos de esporozoítos de *E. tenella* associada ao adjuvante ISCOM obtendo uma percentagem de proteção fornecida pela redução do número de oocistos pós-desafio (73,2%). O tratamento T4 do presente trabalho utilizou a mesma via para a imunização, obtendo uma proteção de 11,2% em relação ao controle positivo. Esta diferença na redução de oocistos pode ser devido ao adjuvante utilizado.

O tratamento T2 apresentou um pico de produção de anticorpos aos 21 dias pós imunização (dpi), acompanhando o pico de produção de oocistos na cama (aos 19 dpi). Isto indica que o desafio presente na cama foi crescente e refletiu proporcionalmente na produção de anticorpos. Quando os níveis de anticorpos atingiram o pico de produção, o número de oocistos acumulados na cama reduziu rapidamente e o título de anticorpos sofreu leve declínio, mantendo-se, porém, em níveis altos. Os resultados aqui alcançados estão em acordo com os obtidos por Tajima et al. (2003) e Constantinoiu et al. (2008), com as espécies *E. necatrix* e *E. tenella*, respectivamente.

De modo geral, os níveis de anticorpos mantêm-se altos após atingir o pico, aproximadamente aos 21 dias, mas há uma diversidade de metodologias adotadas pelos pesquisadores, cujos resultados caracterizam a produção de anticorpos com um aumento substancial e pico de produção de imunoglobulina entre os dias 10 e 37, para imunizações com oocistos ou antígenos de esporozoítos da espécie *Eimeria tenella*, conforme demonstram os trabalhos de Hasbullah et al (1992), Garg et al. (1999) e Garcia et al. (2008).

Deve-se levar em consideração que os níveis de anticorpos apontados pelo teste ELISA não são capazes de indicar se a imunidade produzida é protetora, mas têm uma importante função de informar sobre a existência de estímulo imunológico pelo parasita *Eimeria*, ou seja,

se a ave foi exposta à infecção pelo coccídio. Em função disso, Constantinoiu et al. (2008) sugerem o uso deste teste como uma ferramenta útil para monitorar o desenvolvimento da imunidade em aves expostas ao parasita de forma natural ou por vacina.

É frequente o uso da proliferação de linfócitos periféricos para avaliar a imunidade mediada por células de cepas de oocistos ou antígenos de subunidades, como os trabalhos realizados por Telabi et al. (2005), Brake et al. (1997) e Parmentier et al. (2001), os quais, de modo geral, apresentaram aumento significativo do número de linfócitos quando estimulados pelos antígenos da espécie *Eimeria* spp.

Quanto à avaliação da proliferação de linfócitos periféricos o T2 e o T4 apresentaram maiores índices de proliferação quando comparados com os seus grupos controle, porém, estes índices ficaram abaixo de 2, o que revela uma baixa estimulação destas células. Garcia et al. (2008) verificaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de 2.3 a 2.6 vezes da proliferação de linfócitos nos animais vacinados com vacina de subunidade associada ao adjuvante ISCOM em relação aos controles. Esta diferença poderia estar associada ao tipo de adjuvante utilizado nos dois trabalhos, sendo que este último utilizou ISCOM e o trabalho atual utilizou Quil-A, no entanto, outros estudos devem ser realizados para avaliar tal hipótese.

Devido a constatação da baixa patogenicidade da cepa virulenta utilizada no desafio, torna-se imperativa a necessidade de novas pesquisas no sentido de melhor caracterizar o atual estado da cepa virulenta em estudo, como estabelecer a melhor titulação da dose infectante, avaliar o efeito “crowding” e o período de armazenamento que garanta a viabilidade dos oocistos.

Nas condições em que foi realizado o experimento, pode-se auferir que a seleção de oocistos resultou na atenuação da cepa, reduzindo o ppp em 30 horas. O tratamento constituído por oocistos atenuados (T2) apresentou baixa patogenicidade e segurança às aves

durante seu processo de acumulação na cama. De acordo com os parâmetros parasitológicos, o T2 exerceu um fator de proteção total e o T4 apresentou um fator de proteção parcial.

### **Agradecimentos**

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (número da concessão 476069/2004-1).

### **Referência**

- Allen, P.C., Danforth, H.D., Morris, V.C., Levander, O. A., 1996. Association of lowered carotenoids with protection against cecal coccidiosis by diets high in n-3 fatty acids. *Poultry Sci.* 75, 966-972.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brake, D.A., Fedor, C.H., Werner, B.W., Miller, T.J., Taylor, R.L. Jr., Clare, R.A. , 1997. Characterization of immune response to *Eimeria tenella* antigens in a natural immunity model with hosts which differ serologically at the B locus of the major histocompatibility complex. *Infect. Immun.* 65, 1204-1210.
- Breed, D.G., Dorrestein, J., Vermeulen, A.N., 1996. Immunity to *Eimeria tenella* in chickens: phenotypical and functional changes in peripheral blood T-cell subsets. *Avian Dis.* 40, 37-48.
- Breed, D.G.J., Schetters, T.P.M., Verhoeven, N.A.P., Vermeulen, A.N., 1997. Characterization of phenotype related responsiveness of peripheral blood lymphocytes from *Eimeria tenella* infected chickens. *Parasite Immunol.* 19, 563-569.

- Chapman, H.D., 1997. Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian Pathol.* 26, 221-224.
- Constantinoiu, C.C., Molloy, J.B., Jorgensen, W.K., Coleman, G.T., 2008. Antibody response against endogenous stages of an attenuated strain of *Eimeria tenella*. *Vet. Parasitol.* 154, 193-204.
- Conway, D.P., McKenzie, M.E., Dayton, A.D., 1990. Relationship of coccidial lesion scores and weight gain in infections of *E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella* in broilers. *Avian Pathol.* 19, 489-496.
- Conway, D.P., Sasai, K., Gaafar, S.M., Smothers, C.D., 1993. Effects of different concentrations of oocyst inocula of *Eimeria* Effects of different concentrations of oocyst inocula of *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, and *E. maxima* on plasma constituents, packed cell volume, lesion scores, and performance in chickens. *Avian Dis.* 37, 118-123.
- Dalloul, R.A., Bliss, T.W., Hung, Y.H., Ben-Chouikha, I., Park, D.W., Keeler, Jr. C.L.; Lillehoj, H.S., 2007. Unique responses of the avian macrophage to different species of *Eimeria*. *Mol. Immunol.* 44, 558-566.
- Dulski, P., Turner, M., 1998. The purification of sporocysts and sporozoites from *Eimeria tenella* oocysts using percoll density gradients. *Avian Dis.* 32, 235-239.
- Garcia, J.L., Navarro, I.T. Vidotto, O., Gennari, S.M., Machado, R.Z., Sinhorini, I.L. 2006. *Toxoplasma gondii*: comparison of a rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs. *Exp. Parasitol.* 113, 100-105.
- Garcia, J.L., Silva Guimarães Junior, J.d., Headley, S.A., Gomel Bogado, A.L., Bugni, F.M., Ramalho, D.C., Montemor de Souza, L., 2008. *Eimeria tenella*: utilization of a nasal vaccine with sporozoite antigens incorporated into iscom as protection for broiler breeders against a homologous challenge, *Exp. Parasitol.* 120, 185-190.

- Garg, R., Banerjee, D.P., Gupta, S.K., 1999. Immune responses in chickens against *Eimeria tenella* sporozoite antigen. *Vet. Parasitol.* 81, 1-10.
- Giannoni, M.A., Giannoni, M.L. (Ed.), 1983. *Genética e melhoramento de rebanho nos trópicos*. Nobel, São Paulo, 463 pp.
- Gordon, H.McL., Whitlock, H.V. 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Counc. Sci. Ind. Res.* 12, 50-52.
- Guimarães Junior, J.S., Costa, J.O., Baião, N.C., 1988. Control of eimeriosis in broiler breeding. I. Use of monesin, salinomycin and nicarbazin. *Arq. bras. med. vet. zootec.* 40, 17-24.
- Hasbullah, T.N., Kawaguchi, H., Nakai, Y., Ogimoto, K., 1992. Detection of serum antibodies in *Eimeria tenella*-infected chickens by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) with merozoite and oocyst antigens. *J. Vet. Med. Sci.* 54, 201-206.
- Hong, Y.H., Lillehoj, H.S., Lee, S., Dalloul, R.A., Lillehoj, E., 2006. Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 114, 220-223.
- Jeffers, T.K., 1974. Immunization against *Eimeria tenella* using an attenuated strain. In: *Proceedings of the 15th World Poultry Congress, New Orleans*, pp. 105-107.
- Johnson, J., Reid, W.M., 1970. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp. Parasitol.* 28, 30-36.
- Jorgensen, W.K., Anderson, G.R., Jeston, P.J., Blight, G.W., Molloy, J.B., 2006. Selection and characterisation of two attenuated vaccine lines of *Eimeria tenella* in Australia. *Aust. Vet. J.* 84, 89-94.
- Li, G.Q., Kanu, S., Xiang, F.Y., Xiao, L.Z., Chen, H.W., Ye, H.J., 2004. Isolation and selection of ionophore-tolerant *Eimeria* precocious lines: *E. tenella*, *E. maxima* and *E. acervulina*. *Vet. Parasitol.* 119, 261-276.

- Lillehoj H.S., Min, W., Dalloul, R.A., 2004. Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*. Poultry Sci. 83, 611-623.
- Long, P.L., 1971. Maintenance of intestinal protozoa in vivo with particular reference to *Eimeria* and *Histomonas*. In: Taylor, A.E.R., Muller, R. (Eds.), Isolation and Maintenance of Parasites In Vivo. Blackwell Scientific Publication, Oxford, pp. 65-75.
- Melendez-Martinez, A.J., Britton, G., Vicario, I.M., Heredia F.J., 2007. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. Food Chem. 101, 1145-1150.
- Min, W., Dalloul, R.A., Lillehoj, H.S., 2004. Application of biotechnological tools for coccidia vaccine development. J. Vet. Sci. 5, 279-288.
- Montes, C., Rojo, F., Hidalgo, R., Ferre, I., Badiola, C., 1998. Selection and development of Spanish precocious strain of *Eimeria necatrix*. Vet. Parasitol. 78, 169-183.
- Parmentier, H.K., Abuzeid, S.Y., Reilingh, G.D., Nieuwland, M.G., Graat, E.A., 2001. Immune responses and resistance to *Eimeria acervulina* of chickens divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. Poultry Sci. 80, 894-900.
- Rose, M.E., Mockett, A.P., 1983. Antibodies to coccidia: detection by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Parasite Immunol. 5, 479-489.
- Schmatz, D.M., Crane, M.S.J., Murray, P.K., 1984. Purification of *Eimeria* sporozoites by DE-52 anion exchange chromatography. J. Protozool. 31, 181-183.
- Shirley, M.W., Smith, A.L., Blake, D.P., 2007. Challenges in the successful control of the avian coccidia. Vaccine. 25, 5540-5547.
- Tajima, O., Onaga, H., Nakamura, T., 2003. An enzyme-linked immunosorbent assay with the recombinant merozoite protein as antigen for detection of antibodies to *Eimeria necatrix*. Avian Dis. 47, 309-318.



- Talebi, A., Mulcahy, G., 2005. Partial protection against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* induced by synthetic peptide vaccine. *Exp. Parasitol.* 110, 342-348.
- Vermeulen, A.N., Schaap, D.C., Schetters, Th.P.M. , 2001. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. *Vet. Parasitol.* 100, 13-20.
- Williams, R.B., 1998. Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. *Int. J. Parasitol.* 28, 1089-1098.
- Williams, R.B., 1999. A compartmentalized model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *Int. J. Parasitol.* 29, 1209-1229.
- Williams, R.B., 2001. Quantification of the crowding effect during infections with the seven *Eimeria* species of the domesticated fowl: its importance for experimental designs and the production of oocyst stocks. *Int. J. Parasitol.* 31, 1056-1069.
- Williams, R.B., 2002. Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to success. *Avian Pathol.* 31, 317-353.
- Williams, R.B., 2003. Anticoccidial vaccination: the absence or reduction of numbers of endogenous parasites from gross lesions in immune chickens after virulent coccidial challenge. *Avian Pathol.* 32, 535-543.
- Williams, R. B., Andrews, S. J., 2001. The origins and biological significance of the coccidial lesions that occur in chickens vaccinated with a live attenuated anticoccidial vaccine. *Avian Pathol.* 30, 215-220.
- 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.
- Yun, C.H., Lillehoj, H.S., Lillehoj, E.P., 2000. Intestinal immune responses to coccidiosis. *Dev. Comp. Immunol.* 24, 303-324.

Zhu, J., Lillehoj, H.S., Allen. P., Yun, C.H., Pollock, D., Emara, M., 2000. Analysis of disease resistance associated parameters in broiler chicken challenged with *Eimeria maxima*. Poultry Sci. 79, 619-625.

**Tabela 1.** Avaliação do ganho de peso semanal entre os tratamentos, com início no dia 7 (avaliação da patogenicidade) ao dia 31 (dia do desafio) e resultados acumulados até o dia 31.

Tratamento	Ganho de Peso (g) $\pm$ Desvio Padrão				
	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 31	Acumulado
T1	122 $\pm$ 6	297 $\pm$ 7	425 $\pm$ 27 <sup>ab</sup>	685 $\pm$ 19	1528 $\pm$ 37
T2	127 $\pm$ 6	274 $\pm$ 17	389 $\pm$ 29 <sup>b</sup>	677 $\pm$ 32	1468 $\pm$ 46
T3	118 $\pm$ 9	265 $\pm$ 29	434 $\pm$ 9 <sup>ab</sup>	662 $\pm$ 51	1479 $\pm$ 69
T4	126 $\pm$ 1	303 $\pm$ 12	431 $\pm$ 7 <sup>ab</sup>	744 $\pm$ 62	1604 $\pm$ 74
T5	127 $\pm$ 9	290 $\pm$ 11	447 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	688 $\pm$ 30	1552 $\pm$ 50
Valor de P	0,406	0,094	0,021	0,235	0,080

Os índices ( <sup>a</sup> ) e ( <sup>b</sup> ), representam a diferença das médias (das colunas) determinada por teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Avaliação conversão alimentar semanal entre os tratamentos, com início no dia 7 (avaliação da patogenicidade) ao dia 31 (dia do desafio) e resultados acumulados até o dia 31.

Tratamento	Conversão Alimentar $\pm$ Desvio Padrão				
	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 31	Acumulada
T1	1,36 $\pm$ 0,07	1,31 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	1,46 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>	1,87 $\pm$ 0,08	1,50 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>
T2	1,38 $\pm$ 0,01	1,44 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	1,68 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	1,84 $\pm$ 0,02	1,58 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
T3	1,29 $\pm$ 0,01	1,31 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>	1,44 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	1,90 $\pm$ 0,14	1,48 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
T4	1,30 $\pm$ 0,03	1,29 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	1,49 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	1,75 $\pm$ 0,12	1,46 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
T5	1,33 $\pm$ 0,06	1,33 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>	1,47 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>	1,88 $\pm$ 0,06	1,50 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>
Valor de P	0,138	0,019	0,025	0,469	0,016

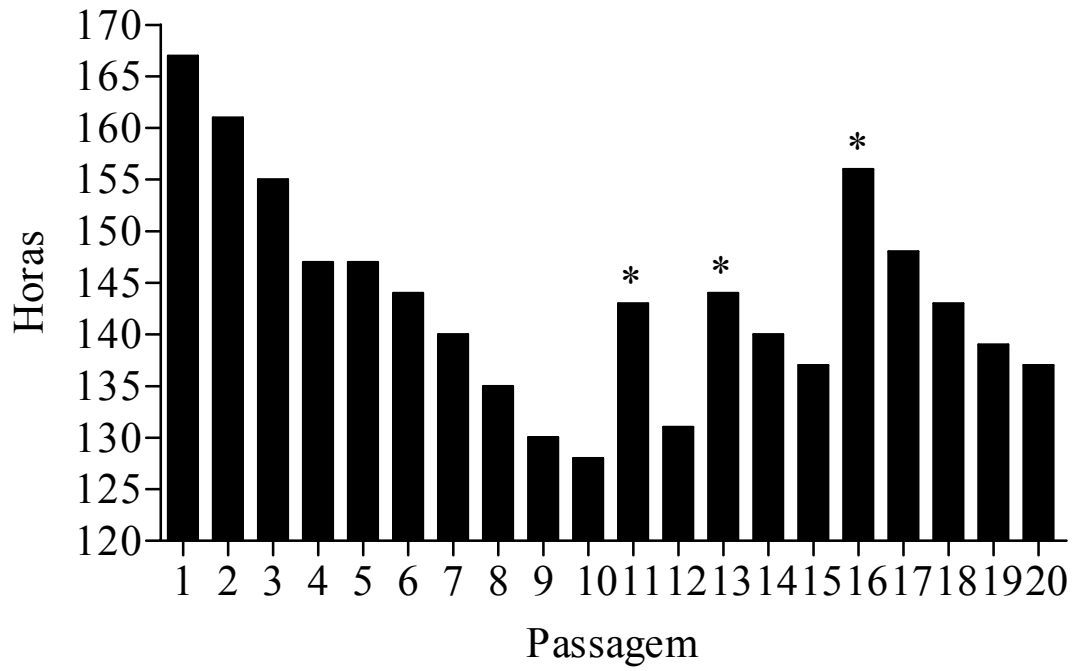
Os índices ( <sup>a</sup> ) e ( <sup>b</sup> ), representam a diferença das médias (das colunas) determinada por teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3.** Avaliação da imunogenicidade por meio do ganho de peso (GP), conversão alimentar (CA), escore de lesão (EL), níveis de luteína plasmática (LTP), número de oocistos (OPG) e percentagem de proteção (Prot. (%)), além da CA e do GP acumulados do dia zero ao dia 38 pós-imunização.

Trat.	Imunogenicidade (dia 38)						CA $\pm$ DP	GP (g) $\pm$ DP
	CA $\pm$ DP	GP (g) $\pm$ DP	EL	LTP $\mu$ g/mL	OPG $\times 10^5 \pm$ DP	Prot. (%)	Acumulado	Acumulado
T1	1,94 $\pm$ 0,08	574 $\pm$ 76	0,00 <sup>b</sup>	4,65 $\pm$ 0,59	0,045 $\pm$ 0,048 <sup>b</sup>	NR	1,69 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>	2102 $\pm$ 64
T2	2,07 $\pm$ 0,06	605 $\pm$ 48	0,17 <sup>b</sup>	5,64 $\pm$ 1,16	0,017 $\pm$ 0,006 <sup>b</sup>	99,9	1,77 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	2072 $\pm$ 81
T3	1,97 $\pm$ 0,04	535 $\pm$ 19	3,75 <sup>a</sup>	4,92 $\pm$ 1,12	12,093 $\pm$ 7,268 <sup>a</sup>	0	1,70 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>	2014 $\pm$ 51
T4	1,99 $\pm$ 0,17	461 $\pm$ 150	1,92 <sup>ab</sup>	4,47 $\pm$ 0,46	10,744 $\pm$ 9,987 <sup>a</sup>	11,2	1,54 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	2084 $\pm$ 55
T5	1,98 $\pm$ 0,24	626 $\pm$ 112	3,33 <sup>a</sup>	4,50 $\pm$ 0,12	13,413 $\pm$ 4,253 <sup>a</sup>	-10,9	1,64 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	2195 $\pm$ 170
VP	0,753	0,314	0,000	0,790	0,005	NR	0,009	0,328

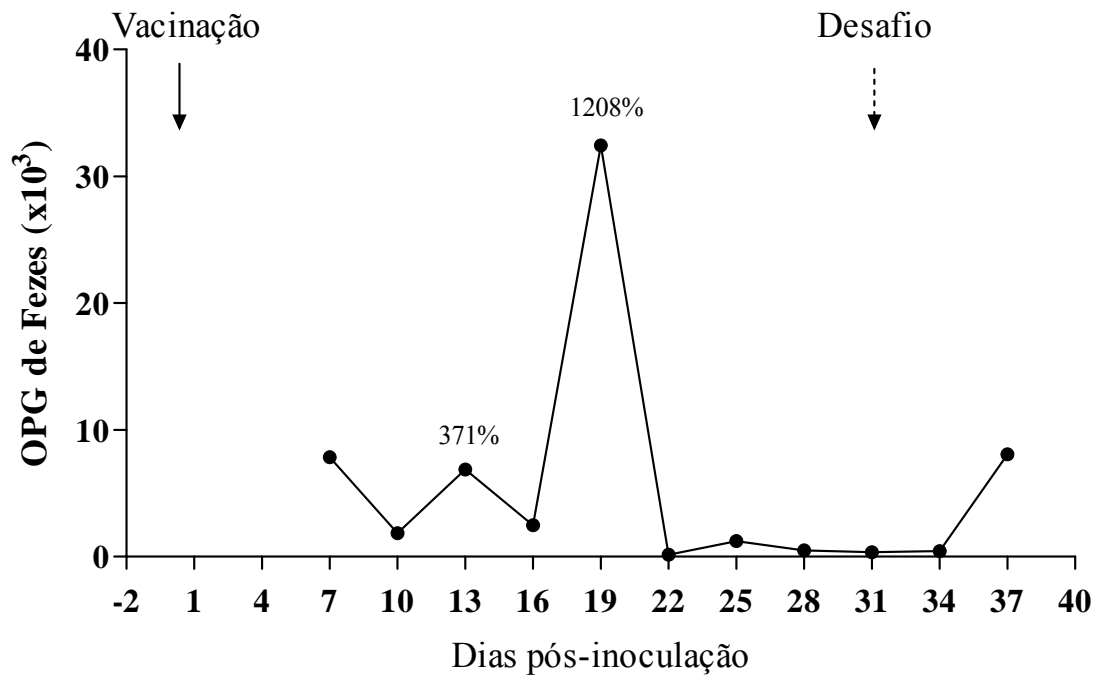
Os índices (<sup>a</sup>) e (<sup>b</sup>) da CA acumulada e OPG representam a diferença das médias obtidas por teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) e escore de lesão por Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ).

Trat. = Tratamento, VP = Valor de P, NR = Não realizado.

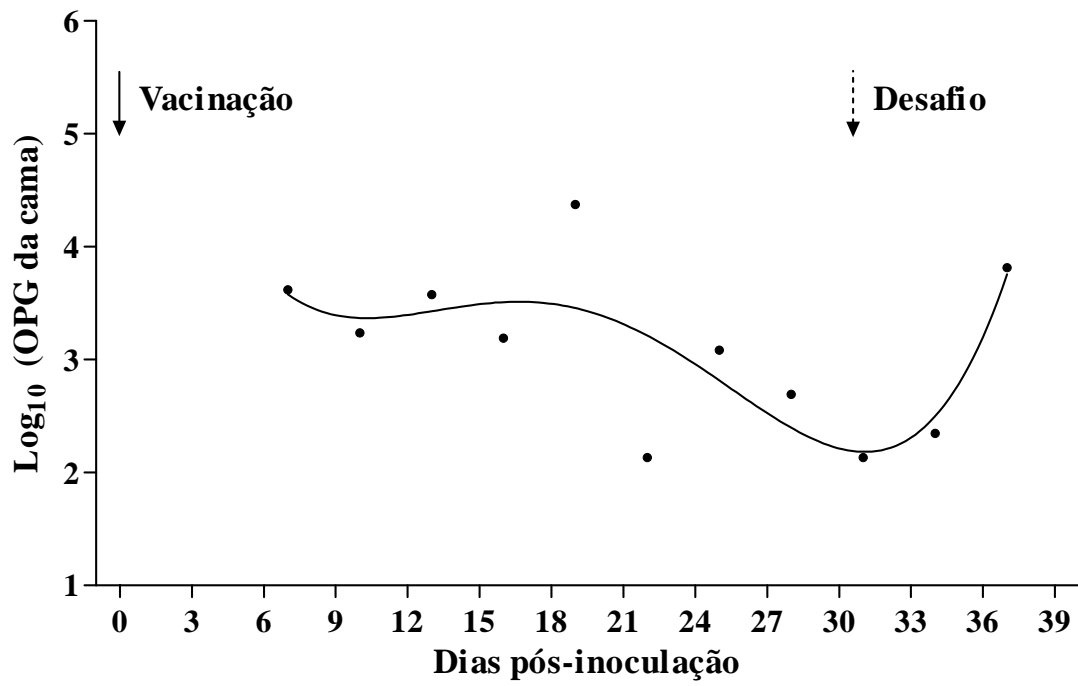


**Fig. 1** . Redução do período pré-patente no processo de seleção dos oocistos *Eimeria tenella* UEL ao longo de 20 passagens.

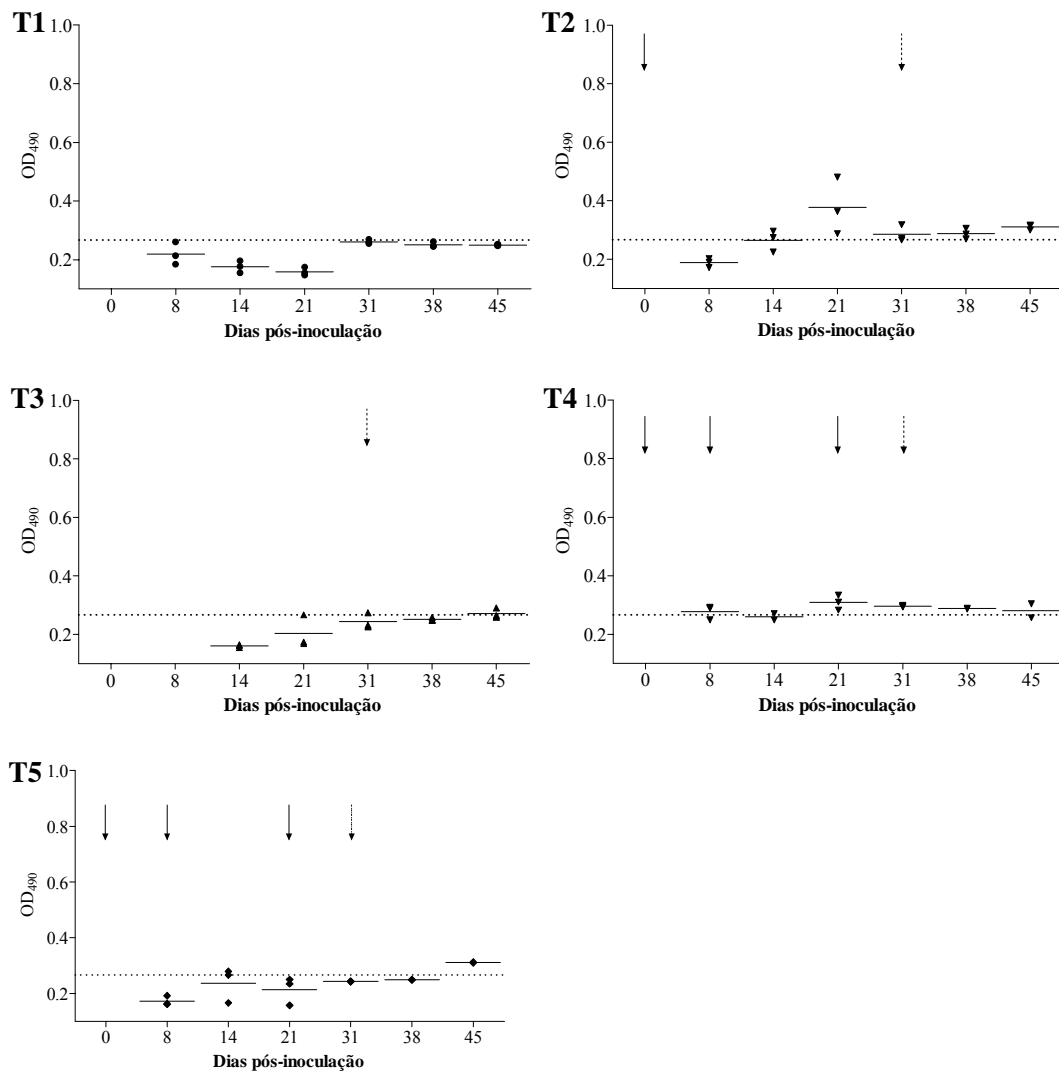
\* = passagens que apresentaram um relaxamento da pressão de seleção.



**Fig. 2** . Dinâmica de eliminação dos oocistos acumulados na cama do tratamento com oocistos atenuados de *Eimeria tenella* (T2).



**Fig. 3.** Regressão polinomial de quarto grau entre a eliminação dos oocistos na cama, do tratamento com oocistos atenuados.



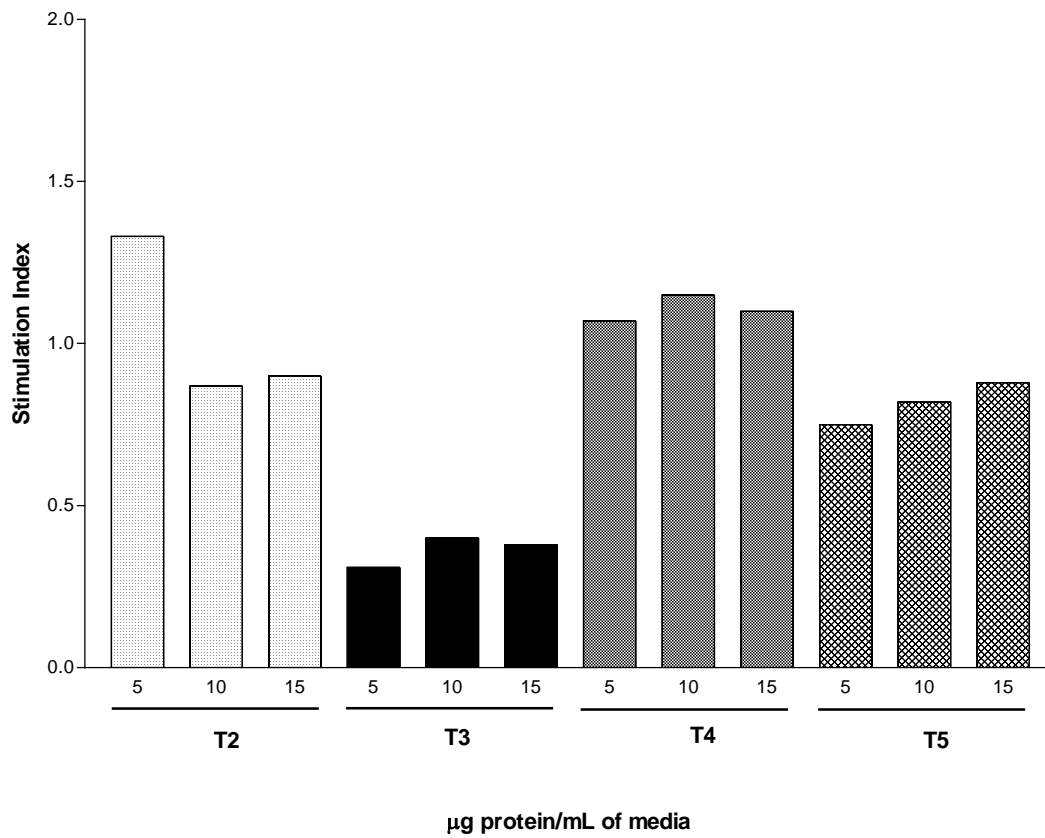
**Fig. 4.** Cinética da curva de anticorpos determinada pelo teste imunoenzimático (ELISA).

A linha pontilhada horizontal é o ponto de corte = 0,267.

↓ = dias da realização das imunizações.

↓ = dia do desafio ( $8 \times 10^4$  oocistos por ave – dia 31).





**Fig. 5.** Proliferação de linfócitos em aves imunizadas com oocistos atenuados de *E. tenella* (T2), controle positivo (T3), imunizadas com vacina não infectante de *E. tenella* (T4) e controle com PBS + Quil A (T5).

## **APÊNDICES**

**APÊNDICE A**  
**LISTA DE REAGENTES**

**APÊNDICE A – Lista De Reagentes**

1. Acetona ( $C_3H_6O$ )
2. Ácido cítrico
3. Ácido clorídrico (HCl)
4. Ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA ( $C_{10}H_{16}N_2O_8$ )
5. Ácido taurodeoxicolato
6. Azul de tripan
7. Bicarbonato de Sódio ( $NaHCO_3$ )
8. Carbonato de Sódio ( $Na_2CO_3$ )
9. Cloreto de potássio (KCl)
10. Cloreto de Sódio (NaCl)
11. Concavalina A
12. Dicromato de Potássio ( $K_2Cr_2O_7$ )
13. Dihidrogenofosfato de potássio ( $KH_2PO_4$ )
14. Extrato de saponinas de *Quillaja saponaria* - Quil A<sup>®</sup>
15. Fosfato disódio heptaidratado ( $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ )
16. Fosfato dissódico dodecahidratado ( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ )
17. H<sub>2</sub>O destilada
18. Heparina
19. Hidróxido de sódio (NaOH)
20. Hipoclorito de Sódio (NaOCl)
21. L – Glutamina
22. Leite em pó desnatado - Molico
23. Monolaurato de polioxietileno sorbitano - Tween 20
24. Orthophenilenediamino - OPD
25. Penicilina e estreptomicina
26. Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )
27. Piruvato de sódio
28. RPMI 1640 médio

29. Sacarose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ )
30. Soro de galinha 0,6%
31. Tripsina

**APÊNDICE B**  
**SOLUÇÕES E TAMPÕES**

## APÊNDICE B – Soluções e Tampões

- **TESTE IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (GARCIA et al., 2006; 2008)**
  - **Tampão de sensibilização (0,05 M Carbonato/Bicarbonato pH 9,6)**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	1,59 g
NaHCO <sub>3</sub> .....	2,93 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.....	1000 ml
  - **Tampão de bloqueio**

Tampão de sensibilização + 5% de leite em pó desnatado
  - **PBS-Tween 20 (pH 7,4)**

NaCl .....	8,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O .....	2,9 g
KCl.....	0,2 g
Tween 20.....	0,5 ml
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.....	1000 ml
  - **Substrato cromógeno**

Tampão do substrato cromógeno .....	100 ml
- 0,1M Ácido Cítrico (21 g/litro = 0,1M) .....	1,026 g
- H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.....	48,6 ml
- 0,2M Fosfato (28 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /litro = 0,2M) .....	1,439 g
- H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.....	51,4 ml
OPD.....	40 mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> PA 30%.....	40 µl
- **PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO (BREED et al., 1996; 1997 e GARCIA et al., 2008)**
  - **RPMI completo**

2 mM glutamina

50 µM 2-mercaptoetanol

100 U/mL penicilina/estreptomicina

10% soro fetal bovino inativado
  - **Azul de Tripán 0,1%**

Azul de tripan.....	1 mg
Água destilada q.s.p.....	10 ml

- **DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO BRADFORD (BRADFORD, 1976)**

- **Corante**

Brilliant Blue.....	25 mg
Etanol 95%.....	12 ml
Ácido orto-fostórico 85% .....	25 ml
Água bidestilada q.s.p.....	250 ml

Obs.: Filtre em papel de filtro.

- **Preparo do Soro Albumina Bovina (SAB)**

SAB.....	6 mg
NaCl 0,9%.....	10 ml

- **Dosagem de proteínas solúveis**

Proteínas.....	50 µl
Corante.....	1950 µl

- **EXCISTAÇÃO DE ESPOROZOÍTOS**

- **Solução para excitação de esporozoítos**

Ácido taurodeoxicolato 0,25%
Tripsina 0,25%
Ácido biliar 0,25%



**APÊNDICE C**  
**PROTOCOLO DE TÉCNICAS**

## APÊNDICE C – Protocolo de Técnicas

### • PURIFICAÇÃO E EXCISTAÇÃO DOS ESPOROZOÍTOS

1. As amostras foram processadas através das técnicas de centrífugo-flutuação em solução de sacarose (método de Sheater –  $d = 1,205$ ).
2. A solução de sacarose é misturada a amostra centrifugada na proporção de 1:10. Após a homogeneização, todo o sobrenadante é diluído em água destilada na proporção de 1:10 para a diminuição da molaridade da solução e permitir que os oocistos sedimentem.
3. Os oocistos sedimentados são esterilizados com hipoclorito de sódio 2% por 10 minutos, sendo em seguida lavados em água destilada por pelo menos três vezes em centrífuga, por meio da sedimentação e descarte do sobrenadante.
4. A liberação dos esporocistos foi realizada com pérolas de vidro em um tubo falcon de 15 ml agitado por um vortex por aproximadamente cinco minutos.
5. Após centrifugação os esporocistos são suspensos em solução de sacarose 1 M e o sobrenadante descartado.
6. Os esporocistos foram colocados na solução para a excitação dos esporozoítos e após duas horas a 41°C os esporozoítos liberados foram lavados por 3 vezes e armazenados para processamento futuro

### • TESTE IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (GARCIA et al., 2006; 2008)

1. Preparar a solução de antígeno adicionando-o ao tampão de sensibilização carbonato/bicarbonato pH 9,6 para obter a concentração final de 10 µg/ml, em seguida, adsorver cada poço com 100 µl e deixar “overnight” a 4 °C;
2. Lavar 3 vezes com 200 µl de PBS-Tween 20;
3. Cobrir os poços com 200 µl do tampão de bloqueio (Tampão de sensibilização + 5% de leite em pó desnatado) por 45 minutos em temperatura de 37°C (câmara úmida);
4. Lavar 3 vezes com 200 µl de PBS-Tween 20;
5. Adicionar em duplicata 100 µl do soro diluído (1:20). O soro deve ser diluído em PBS-Tween 20 contendo 5% de leite em pó desnatado, e incubar a 41 °C por 1:30 h em câmara úmida;
6. Lavar 3 vezes com 200 µl de PBS-Tween 20;

7. Adicionar 100 µl de conjugado peroxidase espécie específica diluído 1:500 em PBS Tween 20 contendo 5% de leite em pó desnatado e incubar a 41 °C durante 45 min em câmara úmida;
8. Lavar 3 vezes com 200 µl de PBS-Tween 20;
9. Adicionar 100 µl de Tampão substrato cromógeno e manter em agitação;
10. Para a reação após 10 minutos com 50 µl de HCl 1 M, fazer a leitura em espectrofotômetro a 490nm.

• **PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO (BREED et al., 1996; 1997 e GARCIA et al., 2008)**

1. Esta etapa do experimento foi realizada com três aves de cada tratamento no dia do desafio aos 31 dias pós-vacinação. O sangue (cerca de 1ml) das aves foi colhido por punção da veia braquial e armazenado em tubos de ensaio previamente heparinizados.
2. Todo o material utilizado deve ser devidamente autoclavado. A proliferação de células será determinada por Kit de Ensaio de Proliferação Celular Vybrant MTT (Sondas Moleculares).
3. O sangue é centrifugado e faz-se a colheita da parte branca sobre as hemácias com uma pipeta. Estas células são suspensas em água ultrapura para hemolisar as hemácias.
4. Fazem-se três ou quatro centrifugações para retirar o sobrenadante e obter somente a série branca do sangue. A viabilidade das células deverão ser maiores que 85% como determinado pelo corante vital azul de Trypan.
5. Serão semeadas  $10^6$  células por poço em triplicata em placas de microtitulação de 96 poços com fundo chato (Costar) contendo 200 µl do meio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com 0.6% soro de galinha normal, L-glutamina (2 mM; BioWhittaker), piruvato de sódio (1 mM; Sigma), e penicilina-estreptomicina (1 mM; Sigma).
6. A proliferação dos linfócitos será avaliada frente às concentrações de 5, 10, e 15µg de proteínas de esporozoítos por ml ou 10µg de concanavalina A (Sigma)/ml como controle positivo para proliferação ou sem aditivo como controle negativo.
7. As placas serão incubadas em 5% de CO<sub>2</sub> a 41°C por 64 horas.
8. A determinação de Absorbância a 570nm será realizada usando um leitor de microplacas e a proliferação será expressa como o número total de células.

- **DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO BRADFORD (BRADFORD, 1976)**
  1. Após calibrar a equação da reta do corante produzido com o soro albumina bovina, em uma cubeta coloca-se 50  $\mu$ l de água destilada, ou preferencialmente o meio em que estão as proteínas a serem dosadas, em 1950  $\mu$ l do corante para fazer a amostra “branca”.
  2. Em outra cubeta coloca-se 50  $\mu$ l da proteína a ser dosada em 1950  $\mu$ l do corante.
  3. Espera-se dois minutos para realizar a leitura no espectrofotômetro calibrado em 590nm.