

**INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE**  
**Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação**  
**Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal**



**Dissertação**

**Avaliação de tratamentos de camas de frangos contra *Clostridium perfringens*,  
enterobactérias e oocistos de *Eimeria* spp. em aviários *dark house* e convencional de  
frango de corte**

**João Paulo Benedet**

**Concórdia, 2019**

**João Paulo Benedet**

**Avaliação de tratamentos de camas de frangos contra *Clostridium perfringens*,  
enterobactérias e oocistos de *Eimeria* spp. em aviários *dark house* e convencional de  
frango de corte**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal do Instituto Federal Catarinense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Produção e Sanidade Animal).

**Orientadora: Dra. Teane Milagres Augusto Gomes**

**Coorientador: Dr. Ricardo Hummes Rauber**

**Concórdia, 2019**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática do ICMC/USP, cedido ao IFC e  
adaptado pela CTI - Araquari e pelas bibliotecas do Campus de Araquari e Concórdia.

B462a Benedet, João Paulo  
Avaliação de tratamentos de camas de frangos  
contra Clostridium perfringens, enterobactérias e  
oocistos de Eimeria spp. em aviários dark house e  
convencionais de frango de corte / João Paulo  
Benedet; orientadora Teane Milagres Augusto  
Gomes; coorientador Ricardo Hummes Rauber. --  
Concórdia, 2019.  
47 f.

Dissertação (mestrado) - Instituto Federal  
Catarinense, campus Concórdia, Programa de Pós-  
graduação em Produção e Sanidade Animal,  
Concórdia, 2019.

1. Tratamento de cama de frango. 2. Cal virgem e  
fermentação plana. 3. Clostridium perfringens. 4.  
Enterobactéria. 5. Eimeria spp.. I. Gomes, Teane  
Milagres Augusto, II. Rauber, Ricardo Hummes. III.  
Instituto Federal Catarinense. Programa de Pós-  
graduação em Produção e Sanidade Animal. IV. Título.

**João Paulo Benedet**

**Avaliação de tratamentos de camas de frangos contra *Clostridium perfringens*,  
enterobactérias e oocistos de *Eimeria* spp. em aviários *dark house* e convencional de  
frango de corte**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências,  
Curso de Pós-Graduação Produção e Sanidade Animal, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-  
Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense.

**Data da Defesa: 26/06/2019**

**Banca examinadora:**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Teane Milagres Augusto Gomes (Orientadora)**

**Doutora em Ciência Animal pela Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Clarissa Silveira Luiz Vaz**

**Doutora em Medicina Veterinária Preventiva pela Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, UFRGS**

**Prof. Dr. Paulo Augusto Esteves**

**Doutor em Medicina Veterinária Preventiva pela Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, UFRGS**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Marcella Zampoli Troncarelli**

**Doutora em Medicina Veterinária Preventiva pela Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia, UNESP**

**Dedicatória**

**À minha família, por ter fornecido todo apoio e incentivo necessários para a  
concretização desta conquista.**

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, à minha família: minha esposa Jaqueline Godoi por todo o incentivo, apoio, conversas e paciência pelas horas ausentes em casa e dedicadas aos estudos; à minha filha Helena Godoi Benedet, que me inspirou e impulsionou ainda mais com sua chegada na metade do percurso do mestrado; aos meus pais Domingos Benedet e Maria Benta Matos Benedet, que nunca mediram esforços para me proporcionar estudos e conhecimentos, e como dizem: “estudo nunca ocupa espaço e ninguém tira de você”, muita gratidão minha amada e maravilhosa família.

À minha orientadora Teane Milagres Augusto Gomes, tenho infinitos agradecimentos a fazer, por ter acreditado na minha capacidade, na minha ideia, no meu trabalho e pelo voto de confiança a mim depositado, além disso por ela ter saído de sua zona de conforto, pois ainda não tinha trabalhado na avicultura, me aceitando como orientado e entrando no campo da avicultura, meu muito obrigado e eterna gratidão por toda orientação, auxílio, conversas, inúmeras e infinitas ajudas que realizaste Teane, minha eterna Gratidão.

Aos pesquisadores da Embrapa suínos e Aves: Clarissa Silveira Luiz Vaz e Paulo Augusto Esteves, meu muito obrigado a todos, pois cada um teve sua participação especial e fundamental no projeto, com o fornecimento de metodologias usadas, tempo disponibilizado para conversas e todo o conhecimento e expertise em avicultura compartilhado, eterna Gratidão Clarissa e Paulo.

Ao co-orientador e colega de BRF Ricardo Hummes Rauber, por ter disponibilizado seu tempo, agenda fora de horário de trabalho e principalmente todo o apoio e abertura de porteiros necessárias para a liberação e execução do projeto na empresa, muita Gratidão Ricardo.

À professora Marcella Zampoli Troncarelli, agradeço por toda a disponibilidade, contribuição e dúvidas retiradas para a execução do projeto, muita Gratidão Marcella.

Às graduandas de medicina veterinária do IFC *campus* Concórdia, Fernanda Felicetti Perosa e Isabela Gimenes da Silva, agradeço imensamente por toda a colaboração, trabalho, empenho, tempo e comprometimento dedicados ao projeto, pois em momento algum

mediram esforços. Serão veterinárias extremamente competentes onde forem trabalhar, muita Gratidão mesmo gurias.

Às colegas de BRF do Laboratório de Sanidade Animal de Concórdia, Elizaine K. Kalsing, Cleide F. Rucks, Patrícia Horn, Sônia Cechi e supervisora Camila Plieski, por todo o conhecimento, prática de laboratório e ensinamentos das análises repassados e todos os materiais e ajudas cedidos para a realização das análises, muita Gratidão.

Aos meus colegas de fomento na BRF por todo o apoio, incentivo, ajuda com os produtores e propriedades, muita Gratidão mesmo meus nobres.

Aos produtores, muita Gratidão por terem aceitado participar deste projeto e por terem feito o que e como realmente precisava ser feito nos intervalos de lotes para execução do projeto.

À empresa BRF - Unidade de Concórdia/SC, a Nelson Bauermann, então Gerente de Agropecuária, Tati Petry Niendicker e Agnes Pickersgill, supervisores do Fomento de Aves, que acreditaram na relevância deste trabalho para a BRF e permitiram que eu realizasse este mestrado concomitantemente com meu trabalho e autorizaram a realização do mesmo na integração de aves.

Agradeço imensamente a todos os docentes e colaboradores do Instituto Federal Catarinense que acreditaram e viabilizaram a abertura desta modalidade de Mestrado Profissional para o *campus* de Concórdia, abrindo oportunidades de aperfeiçoamento para quem já está inserido no mercado de trabalho. A todos os funcionários e professores por toda a dedicação e conhecimentos compartilhados, minha imensa e eterna GRATIDÃO e a toda equipe do IFC.

***Epígrafe***

***“A maioria das vezes você não precisa de um novo caminho,  
Você precisa de uma nova forma de caminhar.” Bert Hellinger.***



## Resumo

BENEDET, João Paulo. **Avaliação de tratamentos de camas de frangos contra *Clostridium perfringens*, enterobactérias e oocistos de *Eimeria* spp. em aviários *dark house* e convencional de frango de corte**

2019. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Concórdia, 2019.

Considerando a tendência da avicultura de migração do sistema convencional para *dark house*, o objetivo do presente trabalho foi avaliar dois tratamentos em camas de frangos de corte para a redução de *Clostridium perfringens*, enterobactérias e *Eimeria* spp., comparando os dois sistemas de aviários. Foram avaliadas 80 amostras de camas, divididas em quatro grupos: T1 – *dark house* com cal; T2 – *dark house* com fermentação e cal; T3 – convencional com cal; T4 – convencional com fermentação e cal. As amostras foram coletadas um dia antes do abate e cinco dias após os tratamentos, sendo submetidas às análises microbiológicas para enterobactérias e *C. perfringens*. Os resultados obtidos indicaram que a carga bacteriana antes do tratamento foi similar entre os sistemas *dark house* e convencional, além disso, os grupos tratados com cal apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) de enterobactérias em ambos os sistemas. Ainda, somente no grupo T4 foi observada redução de *C. perfringens*. Contudo, ainda assim, todos os grupos apresentaram baixos valores de *C. perfringens* antes do tratamento, bem como reduzido percentual de amostras com gene de toxina  $\alpha$  (*cpa*), identificado por PCR. Para *Eimeria* spp., todos os grupos apresentaram baixa contagem na cama de frango antes e após o tratamento, o que impossibilitou a comparação entre tratamentos e sistemas de aviários. Conclui-se que o tratamento utilizando 500 g/m<sup>2</sup> de cal virgem é eficiente contra enterobactérias em ambos os sistemas, permitindo a reutilização da cama com reduzido risco de infecção de frangos de corte pelas doenças entéricas causadas pelos microorganismos avaliados no presente estudo.

**Palavras-chave:** *Enterobacteriaceae*; cama aviária; intervalo sanitário.

## Abstract

BENEDET, João Paulo. **Evaluation of broiler litters treatments against *Clostridium perfringens*, enterobacterias and oocysts of *Eimeria* spp. in dark house and conventional aviaries of broiler**

2019. 47f. Dissertation (Master degree in Science) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Concórdia, 2019.

Due to the broiler trend to migrate from conventional to dark house system, the aim of this present work was to evaluate two treatments of broiler litters for the reduction of *Clostridium perfringens*, enterobacteria, and *Eimeria* spp., and also compare both aviary systems. Eighty litter samples were evaluated, divided in four groups: T1 - dark house with quicklime; T2 - dark house with fermentation and quicklime; T3 - conventional with quicklime; T4 - conventional with fermentation and quicklime. All samples were collected one day before slaughter and five days after treatments, being submitted to microbiological analyzes for enterobacteria and *C. perfringens*. The results indicated that the bacterial load in pre-treated litter was similar between dark house and conventional systems, in addition, the quicklime treated groups showed reduction ( $p < 0,05$ ) of enterobacteria in both systems. Still, only in the T4 group a reduction of *C. perfringens* was observed. However, all groups showed low values of *C. perfringens* before treatment, as well as a low percentage of samples with  $\alpha$ -toxin (cpa) gene, identified by PCR. For *Eimeria* spp., all groups showed very low values of *Eimeria* spp. in litter before and after treatment, which deprived comparing treatments and aviary systems. In conclusion, quicklime treatment ( $500 \text{ g/m}^2$ ) is suitable against enterobacterias in both systems, allowing the recycled of litters with low risk of infection of broiler by enteric diseases caused by the microorganisms evaluated in the present study.

**Keywords:** Enterobacteriaceae; litter; sanitary interval

## Lista de Figuras

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Figura 1: Distribuição equidistante dos pontos de coleta .....   | 26 |
| Figura 2 | Figura 2: Presença do gene <i>cpa</i> em isolados de <i>C. perfringens</i> de cama de frango, por PCR convencional ..... | 30 |

## Lista de Tabelas

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Contagem de enterobactérias ( $\log_{10}$ UFC/g) nas camas de frango em aviários <i>dark house</i> e convencional, tratadas com cal virgem ou fermentação e cal .....  | 28 |
| Tabela 2 | Contagem de <i>Clostridium perfringens</i> ( $\log_{10}$ UFC/g) nas camas de frango em aviários <i>dark house</i> e convencional, tratadas com cal virgem ou fermentação e cal .....   | 28 |
| Tabela 3 | Detecção de gene <i>cpa</i> (% amostra positiva e total) em <i>Clostridium perfringens</i> isolados de cama de frango por PCR convencional (10/67)..   | 29 |
| Tabela 4 | Quantificação média de oocistos de <i>Eimeria</i> spp. (OPG, valores mínimo e máximo) em fezes frescas e cama de frangos, em aviários <i>dark house</i> e convencional, tratadas com cal virgem ou fermentação e cal virgem..... | 40 |

## Lista de Abreviaturas e Siglas

|     |                                |
|-----|--------------------------------|
| BEA | Bem-Estar Animal               |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico      |
| FWD | <i>Forward</i>                 |
| Min | Minuto                         |
| OPG | Oocistos por grama             |
| Pb  | Pares de bases                 |
| PBS | Tampão fosfato-salino          |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| REV | <i>Reverse</i>                 |
| Rpm | Rotação por minuto             |
| T1  | Tratamento 1                   |
| T2  | Tratamento 2                   |
| T3  | Tratamento 3                   |
| T4  | Tratamento 4                   |
| UFC | Unidade formadora de colônia   |

## Lista de Símbolos

|                |                |
|----------------|----------------|
| g              | Gramas         |
| m <sup>2</sup> | Metro quadrado |
| cm             | Centímetro     |
| °C             | Grau Celsius   |
| μL             | Microlitro     |
| μM             | Micromolar     |
| ml             | Mililitro      |
| spp.           | Espécies       |
| sp.            | Espécie        |

## SUMÁRIO

|      |   |    |
|------|---|----|
| 1.   | CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE ..... | 16 |
| 2.   | OBJETIVOS .....                                     | 19 |
| 2.1. | Geral.....  | 19 |
| 2.2. | Específicos.....                                    | 19 |
| 3.   | CAPÍTULO I - MANUSCRITO.....                        | 20 |
| 4.   | CAPÍTULO II - COCCIDIOSE EM FRANGOS DE CORTE .....  | 35 |
| 4.1  | Introdução.....                                     | 35 |
| 4.2  | Objetivos .....                                     | 37 |
| 4.3  | Material e Métodos .....                            | 38 |
| 4.4  | Resultados e Discussão .....                        | 40 |
| 4.5  | Conclusão.....                                      | 42 |
| 5    | CONSIDERAÇÕES FINAIS.....                           | 43 |
| 6    | REFERÊNCIAS.....                                    | 45 |

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE

A avicultura atual está dentre as atividades produtoras de alimentos que mais se destacam por sua rápida, constante e importante evolução, nos últimos anos, nos índices zootécnicos. Entretanto, há uma pressão mundial pela produção de carne de aves sem qualquer tipo de risco à saúde humana, com total segurança alimentar (Souza et al., 2009). Além disso, há uma crescente preocupação dos consumidores com o uso excessivo de antibióticos como promotores de crescimento e uso de fármacos para o controle da coccidiose. Este uso excessivo de fármacos está sendo associado à emergência de microorganismos resistentes aos antimicrobianos em humanos.

Os consumidores esperam que as aves sejam alimentadas com produtos naturais, diminuindo o uso de antimicrobianos e anticoccidianos na sua criação. Em contra partida, os produtores almejam atender esta demanda de consumo, porém, com o mínimo de prejuízo econômico e máximo desempenho zootécnico das aves, mantendo a competitividade no cenário mundial (Souza et al., 2009). Assim, é de extrema importância e urgência pesquisas e estudos de formas eficientes de controle de coccidiose e bactérias patogênicas intestinais sem o uso profilático de produtos anticoccidianos e de antibióticos.

O intestino é o local onde ocorre a absorção de nutrientes, vitaminas e minerais vitais ao adequado desenvolvimento zootécnico e propicia uma vida sob os princípios de bem-estar animal para a ave. A ave gasta cerca de 20% da energia bruta consumida para manutenção do epitélio intestinal, sendo assim, quando ocorrem injúrias nesse tecido, além da redução da digestão e absorção de nutrientes, há ainda uma maior demanda energética para a renovação celular (Santana et al., 2011).

A família *Enterobacteriaceae* constitui um grande grupo heterogêneo de bactérias Gram negativas que podem ser encontradas no solo, na água e na vegetação, além de poderem ser encontradas na microbiota intestinal dos animais e do ser humano (Puerta-García e Mateos-Rodríguez, 2010). Dentro desta família de microrganismos, algumas bactérias se destacam por causarem doenças entéricas, tanto em humanos quanto em animais, como *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. e *Shigella* spp. (Brasil, 2013).

As infecções, em parte, ocorrem por causa do desequilíbrio da microbiota intestinal benéfica, o que favorece o desenvolvimento de bactérias nocivas, causando prejuízo à saúde



intestinal e da ave de modo geral (Maiorka, 2004). Conforme Maiorka et al. (2006), o intestino delgado é colonizado na segunda semana de vida.

Outros patógenos de relevância em frangos de corte incluem *Clostridium perfringens* toxigênicos dos tipos A e C, que causam a enterite necrótica (EN), caracterizada por necrose hemorrágica da mucosa intestinal (Baba et al., 1997). A apresentação clínica da EN inclui depressão, falta de apetite, apatia, prostração, desidratação e morte. Entretanto, as perdas podem estar também relacionadas às manifestações subclínicas da doença, como a diminuição da absorção de nutrientes, alta conversão alimentar e baixo ganho de peso. Entre os fatores predisponentes importantes à EN, está a infecção por *Eimeria* spp., o que favorece a colonização e a multiplicação de *C. perfringens* no trato intestinal das aves (Gomes et al., 2008). Os agentes infecciosos podem permanecer nas camas de aves (Cressman et al., 2010), já que estas têm sido reutilizadas como uma prática necessária na atual criação de frangos de corte.

Para Cressman et al. (2010), a cama de frango influencia no estabelecimento da microbiota intestinal. Em estudo comparando camas frescas e reutilizadas, as camas frescas continham mais bactérias ambientais e as aves criadas nessas camas abrigaram as bactérias de origem dessa cama. Usualmente formada por maravalha, este é o principal substrato que forma a cama de frango na região do Oeste Catarinense e em inúmeros outros lugares produtores no Brasil. A cada ano, este se torna um insumo de grande importância na produção do frango de corte, impactando diretamente nos ganhos e na sustentabilidade da propriedade, pois após várias reutilizações e chegando no final do ciclo, esta cama pode ser usada como fertilizante natural que se transforma quando misturada às fezes dos frangos. A cama de aviário pode ser renovada a cada ciclo de produção ou reutilizada entre quatro e seis lotes de frangos, conforme as orientações das agroindústrias (Oliveira et al., 2004). Entretanto, é de extrema importância que se proceda algum tratamento na cama a ser reutilizada, para que evite a perpetuação e malefícios de patógenos de um lote de frangos a outro.

Um dos tratamentos indicado para a cama é a cobertura com lona em todo o aviário, por ser eficiente na redução da carga de enterobactérias (Silva et al., 2007). Outro importante tratamento é a aplicação de cal virgem. Há estudos que indicam a eficiência da cal virgem na redução de alguns dos principais patógenos entéricos de frangos, inclusive no controle de *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp. (Dai Prá et al., 2009). A fermentação

concomitante com cal virgem é um método também eficaz, podendo ser usado em propriedades com desafios sanitários, o que proporciona redução de patógenos e sustentabilidade com as várias reutilizações das camas nos lotes subsequentes. Segundo Silva et al. (2007), há uma redução da carga bacteriana na cama de frango nos três primeiros lotes, tendendo a uma estabilização em níveis mais baixos dessa carga a partir do quarto lote, o que demonstra vantagens na reutilização das camas.

O uso de aviários *dark house* fornece um controle de ambiência melhor nas instalações, propiciando um ambiente agradável que atende as necessidades de bem-estar animal (BEA) às aves, evitando a variação de agentes microbianos que compõem a microbiota intestinal das aves durante o lote (Gallo, 2009).

Sendo assim, é extremamente importante, tanto para os produtores quanto às agroindústrias, que a eficiência do tratamento da cama reutilizada no intervalo sanitário seja avaliada, para confirmar se foi alcançada uma redução significativa dos patógenos do lote atual para o lote seguinte. Isto diminuirá o risco de transmissão de agentes nocivos de frangos de 40 dias para os pintinhos, através de monitorias da qualidade microbiológica das camas após seu tratamento. Esta avaliação das camas se torna ainda mais importante na tecnologia *dark house*, que já desponta de forma significativa na produção nacional, porém, ainda carece de informações a respeito da qualidade microbiológica da cama de aves neste sistema.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Avaliar a qualidade microbiológica da cama de frango reutilizada, após o seu tratamento no intervalo sanitário contra microorganismos entéricos, em diferentes tecnologias de produção de frango de corte.

### 2.2. Específicos

I – Quantificar *C. perfringens* e enterobactérias em cama de frango reutilizada após tratamento com cal virgem ou fermentação procedida de cal virgem no intervalo sanitário;

II - Quantificar oocistos totais de *Eimeria* spp. nas fezes frescas e na cama de frango em cada sistema;

III – Comparar a contagem destes patógenos nas diferentes tecnologias de instalações, *dark house* e convencional;

IV – Determinar a presença de genes *cpa*, que codifica toxina  $\alpha$ , em amostras de *C. perfringens* isoladas de camas de frango.

## CAPÍTULO I

### 3. MANUSCRITO

De acordo com as normas para publicação em:

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia ([www.scielo.br/abmvz](http://www.scielo.br/abmvz)).

Avaliação de tratamentos de camas de frangos contra *Clostridium perfringens* e enterobactérias em aviários *dark house* e convencional de frango de corte.

Evaluation of broiler litter treatments against *Clostridium perfringens* and enterobacteria in dark house and conventional aviaries of broiler.

João Paulo Benedet<sup>1,2</sup>, Fernanda Felicetti Perosa<sup>2</sup>, Isabela Gimenes da Silva<sup>2</sup>, Marcella Zampoli Troncarelli<sup>2</sup>, Ricardo Hummes Rauber<sup>1</sup>, Teane Milagres Augusto Gomes<sup>\*2</sup>

<sup>1</sup>Brasil Foods, Concórdia, SC, Brasil.

<sup>2</sup>Escola de Medicina Veterinária, Instituto Federal Catarinense *campus* Concórdia, Concórdia, SC, Brasil.

\*Corresponding author: [teane.gomes@ifc.edu.br](mailto:teane.gomes@ifc.edu.br)

Avaliação de tratamentos de camas de frangos contra *Clostridium perfringens* e enterobactérias em aviários *dark house* e convencional de frango de corte.

Evaluation of broiler litter treatments against *Clostridium perfringens* and enterobacteria in dark house and conventional aviaries of broiler.

### RESUMO

Considerando a tendência da avicultura de corte de migração do sistema convencional para *dark house*, o objetivo deste trabalho foi avaliar dois tratamentos em camas de frango de corte para a redução de *Clostridium perfringens* e enterobactérias, comparando os dois sistemas de aviários. Foram avaliadas 80 amostras de camas, divididas em quatro grupos: T1 – *dark house* com cal; T2 – *dark house* com fermentação e cal; T3 – convencional com cal; T4 – convencional com fermentação e cal. As amostras foram coletadas um dia antes do abate e cinco dias após tratamento, e submetidas à análise microbiológica quantitativa para enterobactérias e *C. perfringens*. A carga bacteriana antes do tratamento foi similar entre os sistemas *dark house* e convencional. Os grupos tratados com cal apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) de enterobactérias em ambos os sistemas. Redução de *C. perfringens* foi observada somente no grupo T4. Contudo, todos os grupos apresentaram níveis aceitáveis de *C. perfringens* antes do tratamento, assim como reduzido percentual de amostras com gene de toxina  $\alpha$  (*cpa*), identificado por PCR. Conclui-se que o tratamento utilizando cal virgem, nas condições avaliadas, é eficiente contra enterobactérias em ambos os sistemas, permitindo a reutilização da cama com reduzido risco de doenças entéricas no frango de corte.

Palavras chave: *Enterobacteriaceae*, cama aviária, intervalo sanitário.

## ABSTRACT

Due to the broiler trend to migrate from conventional to dark house system, the aim of this present work was to evaluate two treatments of broiler litters for the reduction of *Clostridium perfringens* and enterobacterias, comparing both aviary systems. Eighty litters samples were evaluated, divided in four groups: T1 - dark house with quicklime; T2 - dark house with fermentation and quicklime; T3 - conventional with quicklime; T4 - conventional with fermentation and quicklime. All samples were collected one day before slaughter and five days after treatments, and submitted to quantitative microbiological analyzes for enterobacterias and *C. perfringens*. The bacterial load in pre-treated litter was similar between dark house and conventional systems. The quicklime treated groups showed reduction ( $p < 0,05$ ) of enterobacterias in both systems. Reduction of *C. perfringens* was observed only T4 group. However, all groups showed acceptable levels of *C. perfringens* before treatment, as well as a low percentage of samples with  $\alpha$ -toxin (*cpa*) gene, identified by PCR. In conclusion, quicklime treatment, at evaluated conditions, is suitable against enterobacterias in both systems, allowing the recycled of litters with low risk of enteric diseases in broiler.

Keywords: *Enterobacteriaceae*, litter, sanitary interval.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor e o maior exportador de carne de frango, levando este alimento a mais de 140 países. A avicultura atual proporciona uma evolução constante de todos os aspectos ligados à qualidade e segurança do produto, alta produtividade e um excelente *status* sanitário no frango de corte, devido principalmente à exigência do mercado consumidor pela redução no uso de antimicrobianos e anticoccidianos, além de se manter economicamente viável e alcançar a competitividade frente aos inúmeros produtores (ABPA, 2018).

Em 1997, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou um relatório vinculando os antibióticos usados na alimentação dos animais e o aumento da resistência aos antimicrobianos na população humana (WHO, 1997). Assim, desde 2006, a União Europeia proibiu o uso de qualquer antibiótico ou quimioterápico para melhorar o desempenho na produção animal (CEU, 2003). Isto tem incentivado o uso de agentes tróficos como glutamina, ácidos graxos de cadeia curta e prebióticos, como formas alternativas para controle microbiano, principalmente os que causam infecções intestinais nos frangos e, conseqüentemente, prejuízos sanitários, zootécnicos e econômicos para a avicultura (Maiorka, 2004).

Dentre os microorganismos entéricos, destacam-se as enterobactérias, que abrangem 31 gêneros distintos de bactérias na cama aviária (Kwak et al., 2005), e *Clostridium perfringens*, que causa a enterite necrótica em frangos, ocasionando depressão, falta de apetite, apatia, prostração, desidratação e morte (Gomes et al., 2008). Entretanto, as perdas produtivas podem estar também relacionadas às manifestações subclínicas da doença, como diminuição da absorção de nutrientes, alta conversão alimentar e baixo ganho de peso (Gomes et al., 2008).

Os agentes infecciosos podem permanecer nas camas de aves (Cressman et al., 2010), já que estas têm sido reutilizadas como uma prática necessária na atual criação de frangos de corte.

Isto se deve ao seu alto custo inicial, o qual vai diluindo à medida em que são criados vários lotes de frango na mesma cama, podendo chegar a dois ou três anos sem que ocorra sua troca total (Dai Prá e Roll, 2012).

Segundo orientações oficiais, a reutilização de cama é permitida, desde que se

33 mantenha a sanidade e qualidade destas aves, um controle e equilíbrio da microbiota  
34 benéfica na cama e o excelente desempenho zootécnico (MAPA, 2007). Assim, é de extrema  
35 importância que se proceda algum tratamento na cama a ser reutilizada, para evitar a  
36 contaminação por patógenos entéricos de um lote de frangos a outro. Dessa forma, os  
37 métodos de tratamento mais utilizados na avicultura industrial brasileira são: aplicação de  
38 cal na cama; métodos fermentativos como o enleiramento da cama no centro do aviário; e a  
39 cobertura com lona em todo o aviário (Silva et al., 2007; Dai Prá e Roll, 2012).

40 No Brasil, muitos aviários ainda são do tipo convencional, com o uso de ventiladores  
41 e manejo de cortinas (Silva et al., 2007). Porém, nos últimos anos, tem-se aumentado a  
42 quantidade de aviários construídos e transformados no sistema *dark house*, o qual possui  
43 cortina preto/prata, exaustores, placa evaporativa e painel controlador, com o intuito de ter  
44 um melhor controle da ambiência e BEA para os frangos, podendo alojar mais aves no  
45 mesmo aviário (Carvalho et al., 2015). Há evidências de que aviários *dark house* propiciam  
46 um melhor ganho de peso, menor conversão alimentar e menores níveis de estresse,  
47 quando comparados a aviários convencionais (Carvalho et al., 2015). Muitos trabalhos  
48 relacionados ao sistema *dark house* evidenciam o bem-estar animal, performance  
49 zootécnica das aves e emissão de gases, contudo, há poucos estudos que avaliam a  
50 qualidade microbiológica da cama neste sistema. Assim, os objetivos deste estudo foram: (i)  
51 avaliar a efetividade de tratamentos com cal virgem e fermentação em camas de frango  
52 reutilizadas contra os microorganismos *C. perfringens* e enterobactérias, comparando os  
53 aviários *dark house* e convencional; e (ii) identificar quais as amostras isoladas de *C.*  
54 *perfringens* possuem potencial toxigênico, com a presença do gene *cpa*.

55

56

57

## MATERIAL E MÉTODOS

58

### 59 Seleção das Propriedades

60 As propriedades selecionadas localizavam-se no estado de Santa Catarina, e possuem  
61 mais de um aviário, sendo estes do modelo convencional ou *dark house* ou de ambas as  
62 tecnologias de aviário na mesma propriedade. A quantidade de aves alojadas varia conforme  
63 a tecnologia do aviário, sendo de 12 aves/m<sup>2</sup> em aviário convencional e 14 aves/m<sup>2</sup> em  
64 aviário *dark house*. No total foram utilizados 40 aviários, 16 aviários *dark house* e 24 aviários



65 convencionais, no qual cada aviário representava uma amostra, totalizando 80 amostras de  
66 cama de frango no projeto, 40 antes e 40 após os tratamentos na cama. Além disso, todas os  
67 aviários avaliados apresentam camas de frango com 4 a 14 reutilizações, com distribuição da  
68 seguinte forma: da 4° a 6° reutilização - 43% (17/40); da 7° a 9° - 30% (12/40); da 10° a 12° -  
69 15% (6/40); e da 13° a 14° - 13% (5/40). O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética  
70 Animal do IFC - *campus* Concórdia (CEUA, protocolo nº 25/2017).

71

## 72 **Tratamentos das Camas**

73 Após a retirada das aves para o abate, o qual ocorria em torno dos 40 dias, o avicultor  
74 realizava a retirada de cascões, quando presentes, e queima das penas para posteriormente  
75 dar início aos tratamentos. Os tratamentos de cama avaliados foram: (i) aplicação de 500 g  
76 de cal virgem por m<sup>2</sup> de cama de frango; e (ii) fermentação da cama coberta com lona plana  
77 por sete dias, seguida de aplicação da cal virgem (500 g/m<sup>2</sup>). A aplicação da cal virgem era  
78 realizada com o uso de carrinho espalhador, distribuindo de forma homogênea por toda a  
79 cama, após foi realizada a incorporação da cal na cama com mexedor de cama,  
80 posteriormente o aviário permanecia por 5 dias com as cortinas fechadas, completando o  
81 tratamento, e procedendo a coleta da cama após este período (comunicação pessoal,  
82 Benedet, 2018). Já no outro tratamento, foi estendido a lona plástica na extensão de toda a  
83 cama do aviário (não colocando a lona entra a borda da cama e parede do aviário),  
84 permanecendo em processo de fermentação por 7 dias, após se retirava a lona e realizava a  
85 aplicação da cal virgem (500 g/m<sup>2</sup>), da mesma maneira como mencionada anteriormente  
86 (comunicação pessoal, Benedet, 2018). Ambos tratamentos foram realizados tanto no  
87 sistema *dark house* como no convencional.

88

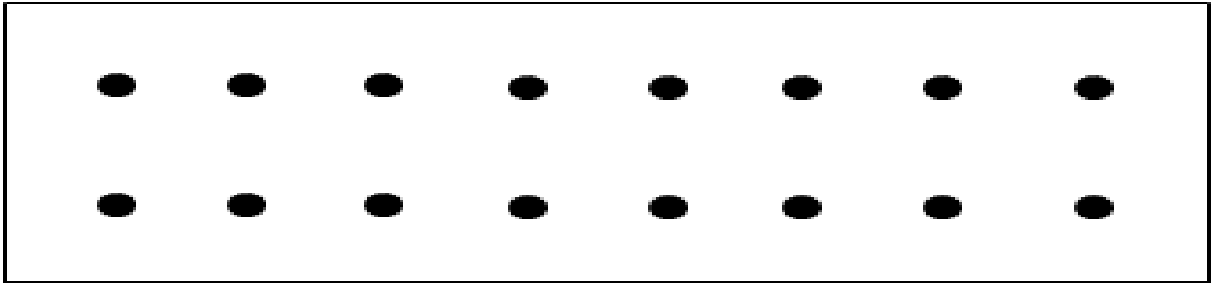
## 89 **Coletas das Amostras**

90 Ao total, foram 80 amostras de cama em 40 aviários, sendo a primeira coleta um dia  
91 antes do abate dos frangos e a segunda coleta cinco dias após a aplicação da cal virgem.  
92 Cada amostra foi formada por um pool de coletas realizadas em 16 pontos equidistantes  
93 entre si ao longo do aviário, 8 pontos de cada lado do aviário (Fig. 1).

94

95

96



97

98 Figura 1: Distribuição equidistante dos pontos de coleta.

99 Cada ponto representa 1 ponto de coleta, sendo 8 pontos de cada lado do aviário, totalizando 16  
100 pontos de coleta.

101

102 Em cada ponto foi coletado aproximadamente 40 g de cama a 5 cm de profundidade  
103 da superfície desta, sendo cada medida dividida em dois sacos nasco (3M, Brasil), contendo  
104 em torno de 320 g de cama cada saco nasco, e encaminhados resfriados de 2°C até 8°C para  
105 análise microbiológica nos Laboratório de Patologia Veterinária - IFC *campus* Concórdia e  
106 Laboratório de Sanidade Animal da BRF, unidade de Concórdia (comunicação pessoal,  
107 Benedet, 2018).

108

### 109 **Bacteriologia para enterobactérias e *Clostridium perfringens***

110 A quantificação microbiológica foi realizada conforme Silva et al. (2007). As amostras  
111 de cama foram homogeneizadas em saco nasco (3M, Brasil), dissolvidas em PBS na  
112 proporção 1:10, colocadas sob agitação de 200 rpm a 25°C por 10 minutos, seguido por  
113 diluição seriada e plaqueamento em duplicata. O limite de detecção das amostras foi de 100  
114 UFC/g de cama.

115 Para enterobactérias, o meio utilizado foi o ágar MacConkey (Kasvi, Itália). Foram  
116 diluídas aproximadamente 10 g de cama em 90 mL de PBS (diluição 1:10), posteriormente  
117 foi adicionado 100 µL de amostra em 900 µL de PBS, formando as diluições de 0 a -3, as  
118 quais foram plaqueadas e incubadas a 37°C por 24 horas. Foram contabilizadas as colônias  
119 rosas (fermentadoras de lactose) e as translúcidas (não fermentadoras).

120 Para *C. perfringens*, utilizou-se o meio seletivo sulfito polimixina sulfadiazina (SPS,  
121 Merck, EUA) a temperatura aproximada de 43°C. Após a diluição de 1:10 de  
122 aproximadamente 30 g de cama, foram diluídos 500 µL da amostra em 4,5 mL de solução  
123 salina, formando as diluições de 0 a -2. Após homogeneização, foi adicionado 100 µL da  
124 amostra diluída na placa sobre a camada do meio SPS já solidificada, em seguida, mais uma  
125 camada do meio SPS foi adicionada a placa. Após a solidificação do meio, foram incubadas a

126 37°C por 48 horas, em jarras de anaerobiose com sachê de anaerobiose (AnaeroGen™,  
127 Oxoid, Inglaterra). Foram consideradas somente as colônias pretas, redutoras de sulfito.

128

### 129 **PCR para gene *cpa* de toxina $\alpha$ de *Clostridium perfringens***

130 Para a detecção do gene *cpa* de *C. perfringens*, que codifica a toxina  $\alpha$ , um *pool* das  
131 colônias crescidas no cultivo em meio SPS de cada amostra (n = 67) foi ressuspensa em  
132 100  $\mu$ L de água destilada estéril. A extração do DNA foi feita por fervura em banho seco a  
133 100°C por 10 minutos, seguida de centrifugação em 1000 x *g* por 5 min. Os *primers*  
134 específicos para amplificar o gene *cpa* foram Fwd 5'-TGCATGAGCTTCAATTAGGT-3' e Rev 5'-  
135 TTAGTTTTGCAACCTGCTGT-3', com um produto final de 400 pb, como descrito  
136 anteriormente (Heikinheimo e Korkeala, 2005). A reação de PCR utilizada para cada amostra  
137 foi de 23  $\mu$ L do *Supermix*® (Invitrogen, Brasil), 0,5  $\mu$ L de cada *primer* a 25  $\mu$ M, 0,25  $\mu$ L de Taq  
138 polimerase (Ludwig, Brasil) e 2  $\mu$ L de DNA de cada amostra. O protocolo de amplificação no  
139 termociclador foi: desnaturação por 5 minutos a 95°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a  
140 53°C, 1 min a 72°C; e extensão final por 10 minutos a 72°C. Posteriormente, as amostras  
141 foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Para controle positivo, foi  
142 utilizado DNA de uma amostra isolada de *C. perfringens* gentilmente cedida pela BRF e  
143 previamente confirmada.

144

### 145 **Análise estatística**

146 Valores de UFC (unidade formadora de colônia) por grama de cama sofreram  
147 transformação logarítmica ( $\log_{10}$ ) e as médias dos diferentes grupos foram submetidas à  
148 análise estatística por teste T não pareado (GraphPad InStat 3). Valores de  $p < 0,05$  foram  
149 considerados significativos.

150

151

152

## 152 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

153

154 A aplicação da cal virgem, tanto no aviário *dark house* quanto no convencional,  
155 promoveu uma redução significativa de enterobactérias ( $p < 0,05$ ), após o tratamento da  
156 cama de aves no intervalo sanitário (Tab. 1). O uso da cal virgem mostrou ser mais eficiente  
157 na redução de enterobactérias do que o tratamento conjunto da fermentação com lona

158 plana e posterior aplicação da cal virgem.

159

160 Tabela 1: Contagem de enterobactérias ( $\log_{10}$  UFC/g) nas camas de frango em aviários *dark*  
161 *house* e convencional, tratadas com cal virgem ou fermentação e cal.

| Tipo de Aviário     | Tratamento da Cama | Antes Tratamento |               | Após Tratamento |               | Valor P* |
|---------------------|--------------------|------------------|---------------|-----------------|---------------|----------|
|                     |                    | Média            | Desvio Padrão | Média           | Desvio Padrão |          |
| <b>Dark House</b>   | Cal                | 3,20             | 1,13          | 2,04            | 0,11          | <0,05*   |
|                     | Fermentação + Cal  | 3,05             | 1,56          | 2,78            | 1,14          | >0,05    |
| <b>Convencional</b> | Cal                | 3,50             | 1,27          | 2,48            | 0,88          | <0,05*   |
|                     | Fermentação + Cal  | 2,96             | 1,23          | 2,17            | 0,58          | >0,05    |

162 \*Valores  $p < 0,05$  possuem diferença significativa pelo teste T não pareado.

163

164 Em relação a *C. perfringens*, somente o tratamento conjunto da fermentação com lona  
165 plana e posterior aplicação da cal virgem no aviário convencional reduziu significativamente  
166 ( $p < 0,05$ ) os valores de UFC no intervalo sanitário (Tab. 2). Contudo, todos os grupos  
167 apresentaram reduzidos níveis de *C. perfringens* já antes do tratamento, independente do  
168 tipo de aviário e tipo de tratamento de cama.

169

170 Tabela 2: Contagem de *Clostridium perfringens* ( $\log_{10}$  UFC/g) nas camas de frango em  
171 aviários *dark house* e convencional, tratadas com cal virgem ou fermentação e cal.

| Tipo de Aviário     | Tratamento da Cama | Antes Tratamento |               | Após Tratamento |               | Valor P* |
|---------------------|--------------------|------------------|---------------|-----------------|---------------|----------|
|                     |                    | Média            | Desvio Padrão | Média           | Desvio Padrão |          |
| <b>Dark House</b>   | Cal                | 2,30             | 0,42          | 2,21            | 0,53          | >0,05    |
|                     | Fermentação + Cal  | 2,33             | 0,41          | 2,08            | 0,17          | >0,05    |
| <b>Convencional</b> | Cal                | 2,29             | 0,34          | 2,23            | 0,47          | >0,05    |
|                     | Fermentação + Cal  | 2,33             | 0,36          | 2,04            | 0,14          | <0,05*   |

172 \* Valor  $p < 0,05$  possui diferença significativa pelo teste T não pareado.

173

174 Os valores de *C. perfringens* encontrados nas camas no presente trabalho foram  
175 menores quando comparado ao descrito por Cressman et al. (2010). Porém, os dados  
176 corroboram a ocorrência da doença nos lotes analisados, uma vez que a empresa na qual

177 todos os aviários são integrados não teve nenhum caso de quadro clínico ou diagnóstico  
 178 laboratorial de enterite necrótica no mesmo ano das coletas (comunicação pessoal,  
 179 Benedet, 2018). Além disso, evidenciou-se a baixa contagem de *C. perfringens* nas camas  
 180 antes do tratamento, o que demonstra o efeito positivo dos procedimentos de  
 181 biosseguridade e das demais medidas sanitárias aplicadas nos aviários analisados.

182 Das amostras de cama que apresentaram crescimento microbiológico para *C.*  
 183 *perfringens*, foi verificada a presença do gene *cpa* por PCR convencional, sendo os resultados  
 184 apresentados na Tabela 3.

185

186 Tabela 3: Detecção de gene *cpa* (% , amostra positiva e total) em *Clostridium perfringens*  
 187 isolados de cama de frango por PCR convencional (10/67).

| Tipo de Aviário e Tratamento            | Tratamento             |                        |
|---|------------------------|------------------------|
|   | Antes                  | Após                   |
| <b>Dark house – Cal</b>                 | 14,3% (1 / 7)          | 16,7% (1 / 6)          |
| <b>Dark house – Fermentação + Cal</b>   | 0% (0 / 7)             | 0% (0 / 7)             |
| <b>Convencional – Cal</b>               | 22,2% (2 / 9)          | 33,3% (3 / 9)          |
| <b>Convencional – Fermentação + Cal</b> | 16,7% (2 / 12)         | 10% (1 / 10)           |
| <b>Total</b>                            | <b>14,28% (5 / 35)</b> | <b>15,63% (5 / 32)</b> |

188

189 De um total de 67 amostras positivas para *C. perfringens*, detectou-se a presença do  
 190 gene *cpa* em 10 amostras, sendo 14,92%, tanto antes quanto após os tratamentos (Fig. 2).

191

192

193

194

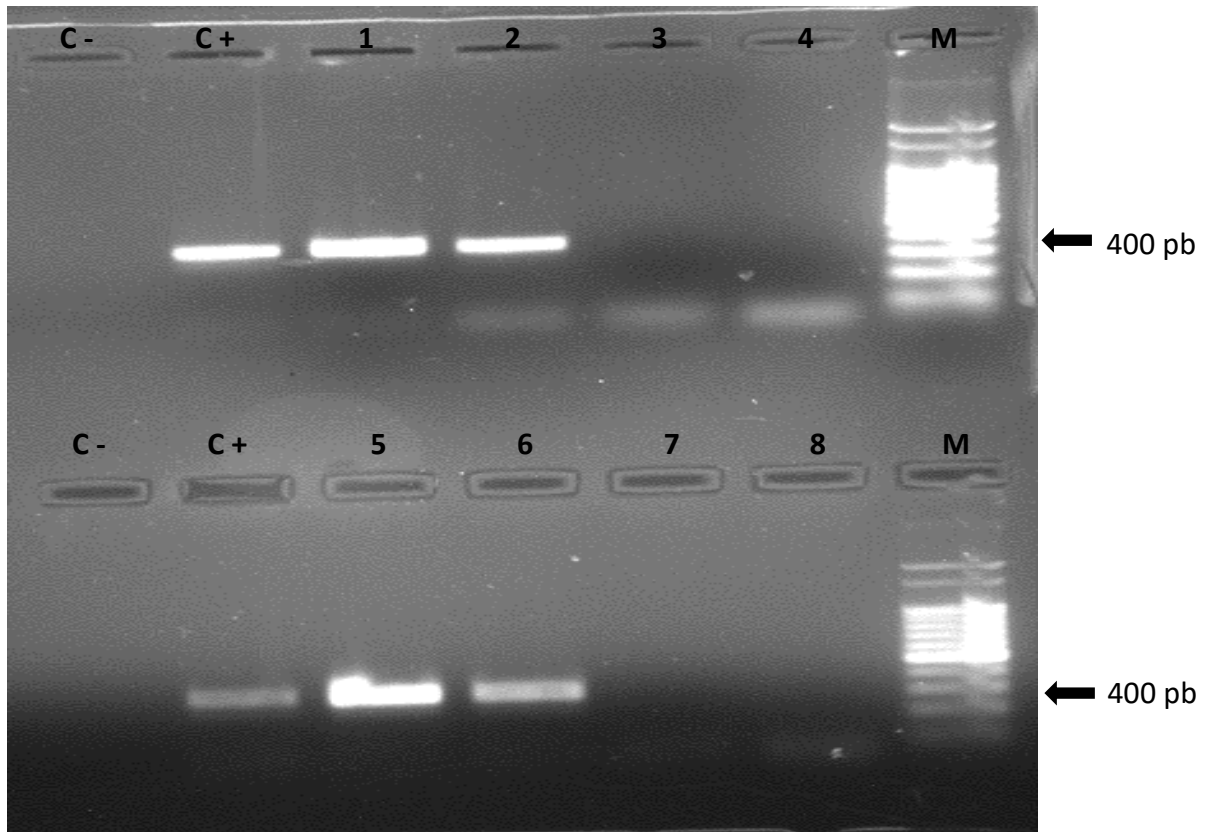
195

196

197

198

199



200

201 Figura 2: Presença do gene *cpa* em isolados de *C. perfringens* de cama de frango, por PCR  
 202 convencional.

203 Gene *cpa* de *Clostridium perfringens* – PCR específico (amplificação de 400 pares de bases está  
 204 indicada pela seta); C- : controle negativo; C+ : controle positivo; 1 – 8: amostras de cama de frango;  
 205 M: marcador de peso molecular – números 1, 2 e 5 são fortemente positivas e número 6 é  
 206 fracamente positiva.  
 207

208 Dos 35 aviários positivos para *C. perfringens* antes do tratamento, somente em dois  
 209 aviários convencionais, dos quais um com cama tratada com cal e o outro com cama tratada  
 210 com lona e cal houve detecção de cepas que apresentaram o gene tanto antes quanto  
 211 depois do tratamento. Nos demais aviários, detectou-se o gene somente antes ou após o  
 212 tratamento.

213 Os resultados encontrados no presente trabalho evidenciam um baixo percentual de  
 214 *C. perfringens* portadores do gene *cpa*, sendo 14,28% (5/35) das amostras de cama antes do  
 215 tratamento e 15,63% (5/32) das camas após o tratamento.

216 A amplificação do gene *cpa* indica um potencial risco de ocorrência da enterite  
 217 necrótica em frangos, já que este é responsável por codificar a toxina  $\alpha$ , sendo conservado  
 218 em todos os tipos de *C. perfringens* toxigênicos que acometem frangos (Heikinheimo e  
 219 Korkeala, 2005). Esta toxina tem a capacidade de causar a hidrólise da porção fosfolipídica  
 220 da membrana celular e lise das células. Consequentemente, estas lesões levam à perda da

221 integridade da mucosa intestinal, afetando a capacidade de absorção das células, gerando  
222 perdas econômicas significativas (Justin et al., 2002).

223 O isolamento de *Clostridium perfringens* em amostras de fezes de frango nem  
224 sempre está relacionado à ocorrência clínica e subclínica de enterite necrótica (Ito, 2000).

225 Para Cressman et al. (2010), a cama influencia no estabelecimento da microbiota  
226 intestinal, pois em estudo comparando camas frescas e reutilizadas, as camas frescas  
227 continham mais bactérias ambientais e as aves criadas nessas camas abrigaram as bactérias  
228 de origem dessa cama. Por outro lado, há evidências de que, a partir do terceiro lote, as  
229 camas apresentam carga de enterobactérias equivalentes ou inferiores às camas frescas, o  
230 que significa que a reutilização deste material para os lotes seguintes pode ser mais segura  
231 do que a substituição por cama fresca (Silva et al., 2007). Esta afirmação corrobora com Vaz  
232 et al., (2017), na qual, a partir do terceiro lote, o nível médio de enterobactérias na cama  
233 tratada e reutilizada foi menor do que em cama fresca, mostrando que a cama reutilizada  
234 pode ser mais segura do que cama fresca, dependendo de sua origem e condições de  
235 armazenamento.

236 No presente trabalho, o tratamento com a utilização de cal virgem foi mais eficiente  
237 para a redução de enterobactérias em ambos os tipos de aviários avaliados (*dark house* e  
238 convencional), sendo semelhante ao descrito por Dai Prá et al., (2009), no qual utilizaram  
239 300 g de cal virgem por m<sup>2</sup> de cama para o controle de *Salmonella* spp. Pois um dos efeitos  
240 esperados da adição de cal virgem para a cama é a redução do nível de umidade (Ritz et al.,  
241 2014). No entanto, a porcentagem de matéria seca identificada na cama tratada com cal  
242 virgem e na cama considerada controle (sem tratamento) estavam em níveis semelhantes,  
243 indicando que a redução de umidade pela cal virgem foi inexpressiva (Vaz et al., 2017).

244 Outro efeito antimicrobiano da cal virgem se dá pelo pH elevado na cama de frangos  
245 de corte (Ritz et al., 2014), contudo, isso nem sempre se reflete em uma redução  
246 significativa da carga bacteriana (Bennett et al., 2005). De fato, no tratamento com cal  
247 virgem, foi possível identificar um aumento do pH com o decorrer dos lotes, porém, as  
248 alterações encontradas não tiveram nenhuma inibição bacteriana (Vaz et al., 2017).

249 Já Silva et al. (2007), que demonstraram que a fermentação com lona plana em todo  
250 o aviário mostrou ser mais eficiente no aviário convencional para a redução da carga de  
251 enterobactérias. Ainda, foi encontrada uma redução do nível de enterobactérias e aeróbica  
252 mesófilos em cama tratada por fermentação com lona plana e fermentação com

253 enleiramento, respectivamente (Vaz et al., 2017).

254 O tratamento de cama no intervalo sanitário em aviários convencionais pode ser  
255 baseado conforme o desafio sanitário que a granja possui, já que, para enterobactérias, o  
256 tratamento mais efetivo foi a aplicação da cal virgem, enquanto para o controle de *C.*  
257 *perfringens*, o mais efetivo foi o uso concomitante da fermentação com lona plana e  
258 posterior aplicação da cal virgem. Porém, este último tratamento é mais laborioso, pois são  
259 necessários sete dias de fermentação com lona plana e posteriormente mais cinco dias após  
260 aplicação da cal virgem, necessitando de pelo menos 12 dias de intervalo sanitário somente  
261 para o tratamento da cama, além disso, há a necessidade de mais alguns dias de intervalo  
262 sanitário para a preparação da pinteira no aviário para o alojamento dos pintos. A presença  
263 de bactérias residuais na cama é crítica na avaliação do risco microbiológico do processo de  
264 reutilização da cama de frango (Global G. A. P., 2016).

265 Os resultados encontrados no presente trabalho fortalecem a necessidade da  
266 realização de monitorias dos agentes patogênicos de interesse na avicultura, auxiliando na  
267 determinação do *status* sanitário dos aviários de frango de corte. Isto contribui para  
268 tomadas de decisões de programas sanitários a serem utilizados, além de aprimorar o  
269 programa de biossegurança das granjas e evitar o uso abusivo de antibióticos.

270

271

272

## CONCLUSÃO

273

274 O uso de cal virgem 500 g/m<sup>2</sup>, nas condições avaliadas, foi o método mais eficaz para  
275 a redução de enterobactérias em camas de frango no sistema *dark house*, com resultados  
276 similares aos demonstrados em aviários convencionais.

277 A redução de *C. perfringens* mostrou ser mais eficiente em aviários convencionais  
278 submetidos ao tratamento conjunto de fermentação com lona plana por 7 dias e posterior  
279 aplicação de 500 g/m<sup>2</sup> da cal virgem.

280 Além disso, a PCR convencional para detecção do gene *cpa* demonstrou ser uma  
281 importante ferramenta para o monitoramento do patógeno que causa a enterite necrótica,  
282 indicando o potencial risco de ocorrência desta enfermidade nos frangos, através da  
283 identificação de cepas toxigênicas de *C. perfringens* nas amostras de cama de frangos,  
284 porém há de se analisar o custo benefício desta ferramenta.



285

286 Agradecimentos: Este projeto foi financiado por PROPI-IFC, edital 267/2017.

287

288

289

## REFERÊNCIAS

290

291 BENNETT, D. S., S. E. HIGGINS, R. MOORE, J. A. BYRD, R. BELTRAN, C. CORSIGLIA, D.  
292 CALDWELL, and B. M. HARGIS. Effect of addition of hydrated lime to litter on recovery of  
293 selected bacteria and poult performance. **The Journal of Applied Poultry Research**. 14, 721–  
294 727, 2005.

295

296 BRASIL, Estabelece os Procedimentos para Registro, Fiscalização e Controle de  
297 Estabelecimentos Avícolas de Reprodução e Comerciais. **Texto da Instrução Normativa nº**  
298 **56**, de 4 de dezembro de 2007. Disponível em: <  
299 [www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimariaanimal/files/2012/09/IN-nº-56.072.pdf](http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimariaanimal/files/2012/09/IN-nº-56.072.pdf)>. Acessado em:  
300 10 jan. 2016.

301

302 CARVALHO, R. H.; SOARES, A. L.; GRESPAN, M.; SPURIO, R. S.; CORÓ, F. A. G.; OBA, A.;  
303 SHIMOKOMAKI, M. The effects of the dark house system on growth, performance and meat  
304 quality of broiler chicken. **Animal Science Journal**. 86, 189-193, 2015. Disponível em:  
305 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/asj.12262>>. Acessado em: 15 jan. 2019.

306

307 CRESSMAN, M.D.; YU, Z.; NELSON, M. C.; MOELLER, S. J.; LILBURN, M. S.; ZERBY, H. N.  
308 Interrelations between the microbiota in the litter and in the intestines of commercial  
309 broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**. 76, 6572-6582, 2010.

310

311 DAI PRÁ, M. A.; CORREA, E. K.; ROLL, V. F.; XAVIER, E. G.; LOPES, D. C. N.; LOURENÇO, F. F.;  
312 ZANUSSO, J. T.; ROLL, A. P. Uso de cal virgem para o controle de *Salmonella* spp. e  
313 *Clostridium* spp. em camas de aviário. **Ciência Rural**. 39, 1189-1194, 2009.

314

315 DAI PRÁ, M. A.; ROLL, V. F. B. Cama de aviário: utilização, reutilização e destino. 1 Ed. Porto  
316 Alegre: Editora Manas / Evangraf, 86p, 2012.

317

318 GLOBAL G. A. P; Integrated farm assurance. All farm base – Livestock base - **Poultry**. 2016.  
319 Disponível em: <<http://www.globalgap.org/uk/en/for-producers/livestock/PY/>>. Acessado  
320 em: 13 de mai. 2019.

321

322 GOMES, A. de M.; LOBATO, F. C. F.; MARTINS, N. R. da S.; ASSIS, R. A. de. Genotipificação de  
323 *Clostridium perfringens* isolados de frangos de corte através da PCR Múltipla. **Ciência Rural**.  
324 38, 1943-1947, 2008.

325

326 HEIKINHEIMO, A.; KORKEALA, H. Multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium*  
327 *perfringens* isolates obtained from Finnish broiler chickens. **Letters in Applied Microbiology**.  
328 40, 407-411, 2005.

- 329  
330 ITO, N. M. K. **Morfofisiologia do intestino**. São Paulo: ELANCO, 44p, 2000.  
331
- 332 JUSTIN, N.; WALKER, N.; BULLIFENT, H.L.; SONGER, G.; BUESCHEL, D. M.; JOST, H.; NAYLOR,  
333 C.; MILLER, J.; MOSS, D. S.; TITBALL, R. W.; BASAK, A. K. The first strain of *Clostridium*  
334 *perfringens* isolated from avian source has an alpha-toxin with divergent structural and  
335 kinetic properties. **Biochemistry**. 41, 6253-6262, 2002.  
336
- 337 KWAK, W.S.; HUH, J.W.; MCCASKEY, T.A. Effect of processing time on enteric bacteria  
338 survival and on temperature and chemical composition of broiler poultry litter processed by  
339 two methods. **Bioresource Technology**. 9, 1529-1536, 2005.  
340
- 341 MAIORKA, A. Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. *In*: SIMPÓSIO BRASIL SUL  
342 DE AVICULTURA, 5, 2004. Chapecó.  
343
- 344 MEDICAL IMPACT OF ANTIMICROBIAL USE IN FOOD ANIMALS. Berlin: World Health  
345 Organization, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21978202>>.  
346 Acessado em: 15 nov. 2016.  
347
- 348 REGULATION N° 1831/2003 - ON ADDITIVES FOR USE IN ANIMAL NUTRITION. England:  
349 European Parliament And Council, 2003. Disponível em: <[https://eur-lex.europa.eu/legal-](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831&from=EN)  
350 [content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831&from=EN](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831&from=EN)> Acessado em: 5 de abr. 2018.  
351
- 352 RELATÓRIO ANUAL 2018. São Paulo: Associação Brasileira De Proteína Animal, 2018.  
353 Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>> Acessado  
354 em: 5 de abr. 2018.  
355
- 356 RITZ, C. W.; FAIRCHILD, B. D.; LACY, M. P. Litter quality and broiler performance. **University**  
357 **of Georgia Extension Bulletin 1267**. 1-8, 2014.  
358
- 359 SILVA, V. S.; VOSS, D.; COLDEBELLA, A.; BOSETTI, N.; AVILA, V. S. de. Efeito de tratamento  
360 sobre a carga bacteriana de cama de aviário reutilizada em frangos de corte. **Comunicado**  
361 **técnico 467 - Embrapa Suínos e Aves**. 1-10, 2007.  
362
- 363 VAZ, C. S. L.; VOSS-RECH, D.; AVILA, V. S. DE; COLDEBELLA, A.; SILVA, V. S. Interventions to  
364 reduce the bacterial load in recycled broiler litter. **Poultry Science**. 96, 2587–2594, 2017.

## CAPÍTULO II

### 4. COCCIDIOSE EM FRANGOS DE CORTE

#### 4.1 Introdução

Uma das doenças mais importantes na avicultura é a coccidiose, causada por protozoários do gênero *Eimeria*, que geram enormes prejuízos sanitários e econômicos na avicultura de corte (Muthamilselvan et al., 2016). Esse patógeno causa danos no epitélio intestinal de aves domésticas, diminuindo o aproveitamento dos nutrientes, prejudicando a ingestão, digestão e absorção da ração, o que leva a grandes perdas por queda de produção e mortalidade das aves (Kawazoe et al., 2009).

As aves tornam-se infectadas ao ingerir os oocistos esporulados juntamente com a ração e água, os quais se alojam intracelularmente no epitélio intestinal (Kawazoe et al., 2009). O ciclo é relativamente curto e, em condições favoráveis, se completa em três dias, sendo que os oocistos podem permanecer por até um ano no ambiente em lugares úmidos e com sombra (Albino e Tavernari, 2012). *Eimeria* spp. possuem duas fases do seu ciclo no hospedeiro (assexuada e sexuada), e outra no ambiente, onde ocorre a esporulação (Kawazoe et al., 2009).

As espécies *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* e *Eimeria tenella* são mais frequentes na avicultura e, portanto, constantemente monitoradas através de necropsia dos frangos, uma vez que acometem porções distintas do trato digestório (Prado, 2005).

Com relação às lesões causadas por cada uma destas três espécies citadas acima, cabe aqui destacar que *Eimeria acervulina* causa lesões esbranquiçadas no duodeno, enquanto *Eimeria maxima* acomete jejuno e íleo, levando ao aparecimento de petéquias e enterite hemorrágica, ambas causando grandes perdas em ganho de peso e aumento da conversão alimentar nas aves. Por outro lado, *Eimeria tenella* causa sangramento e espessamento da parede do ceco, levando a ave à morte (Kawazoe et al., 2009).

O controle de *Eimeria* spp. é realizado com anticoccidianos, tornando a produção intensiva moderna de frango de corte altamente dependente de quimioprofilaxia para seu controle (Chapman, 2009).

Com o crescente aumento de aviários *dark house* na produção de frangos de corte, é de extrema importância monitorar a qualidade parasitológica da cama de frangos neste sistema, pois neste ainda há carência de informações referentes a qualidade parasitológica desta cama. Com isso, o objetivo deste trabalho vem ser a quantificação de oocistos de *Eimeria* spp. nas fezes frescas e cama de frangos em aviários *dark house* e convencional, podendo ser uma ferramenta a ser utilizada para a determinação do nível de infestação dos aviários por oocistos de *Eimeria* spp., além de poder fornecer informações mais precisas sobre os desafios de coccidiose e auxiliar em tomadas de decisões para melhorar o controle desta enfermidade nos diferentes sistemas de aviários.

## 4.2 Objetivos

### Geral

Avaliar a qualidade microbiológica da cama de frango reutilizada, após o seu tratamento no intervalo sanitário contra microorganismos entéricos, em diferentes tecnologias de produção de frango de corte.

### Específicos

I - Quantificar oocistos totais de *Eimeria* spp. nas fezes frescas e na cama de frango em cada sistema;

II – Comparar a contagem destes patógenos nas diferentes tecnologias de instalações, *dark house* e convencional.

### 4.3 Material e Métodos

#### Seleção das Propriedades

Algumas propriedades em Santa Catarina com mais de um aviário, sendo estes do modelo convencional ou *dark house* ou de ambas as tecnologias, alojando 12 aves/m<sup>2</sup> e 14 aves/m<sup>2</sup>, respectivamente, foram selecionadas para este projeto. Ao todo foram utilizados 40 aviários, 16 do sistema *dark house* e 24 do convencional, possuindo de 4 a 14 reutilizações de cama distribuídas da seguinte forma: da 4° a 6° reutilização - 43% (17/40); da 7° a 9° - 30% (12/40); da 10° a 12° - 15% (6/40); e da 13° a 14° - 13% (5/40). Todos os 40 aviários amostrados, receberam via ração o mesmo protocolo de tratamento profilático com anticoccidianos até aproximadamente sete dias antes do abate. Após este período, os frangos foram alimentados com ração livre de anticoccidianos (comunicação pessoal, Benedet, 2018). Além disso, todos os aviários possuem a estrutura e executam os procedimentos de biossegurança necessários para o atendimento da legislação de sanidade de aves (Brasil, 2007). O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal do IFC - campus Concórdia (CEUA, protocolo nº 25/2017).

#### Tratamentos das Camas

Após a saída das aves para o abate, ocorria a retirada de cascos, quando presentes, e queima das penas para posteriormente iniciar os tratamentos na cama: (i) aplicação de 500 g de cal virgem por m<sup>2</sup> de cama de frango; e (ii) fermentação da cama coberta com lona plana por sete dias, seguida de aplicação da cal virgem (500 g/m<sup>2</sup>). A aplicação da cal virgem era realizada com o auxílio de carrinho espalhador, o distribuindo de forma homogênea por toda a cama, posteriormente foi realizado o revolvimento da cama com mexedor de cama para a incorporação da cal, após o aviário permanecia completamente fechado por 5 dias, concluindo este tratamento, e procedendo a coleta da cama após este período (comunicação pessoal, Benedet, 2018). Já no 2° tratamento, foi estendido a lona plástica na extensão de toda a cama do aviário, sem enterrá-la nas bordas da cama, e permanecia em processo de fermentação com lona plana por 7 dias, após se retirava a lona e realizava a aplicação da cal virgem (500 g/m<sup>2</sup>), conforme já mencionado anteriormente (comunicação pessoal, Benedet, 2018). Os dois tratamentos foram realizados em ambos os sistemas de aviário, *dark house* e convencional.

### **Coleta de Amostras**

Ao total, foram 80 amostras de cama, sendo a primeira coleta um dia antes do abate das aves e a segunda coleta cinco dias após a aplicação da cal virgem, além de 40 amostras de fezes frescas coletadas um dia antes do abate.

As camas e fezes frescas foram coletadas em 16 pontos equidistantes entre si ao longo do aviário, sendo 8 pontos de cada lado do aviário. As fezes foram coletadas com a mão, formando um *pool* com 16 fezes frescas por aviário, as quais foram colocadas em um saco nasco (3M, Brasil). Já para a cama, em cada ponto foi coletado aproximadamente 20 g de cama de frango a 5 cm de profundidade da superfície desta, com um pote coletor e colocada em saco nasco (3M, Brasil). Ambas amostras foram encaminhadas resfriadas de 2°C até 8°C para análise parasitológica no Laboratório de Patologia Veterinária - IFC *campus* Concórdia (comunicação pessoal, Benedet, 2018).

### **Análise Parasitológica**

Para as análises de oocistos de *Eimeria* spp., a amostra foi homogeneizada no saco nasco, dissolvida 4 g da amostra em 56 mL de solução hipersaturada de cloreto de sódio (NaCl), filtrado com tamiz plástico convencional e transferido o filtrado para copo plástico. De cada amostra foi pipetado o sobrenadante e preenchido a câmara de Mc Master e, após dois minutos, realizada a leitura em microscópio óptico na objetiva de 10 X. O valor foi multiplicado o número de oocistos por 50, resultando em oocisto por grama (OPG) de amostra, conforme Costa e Pedroso-de-Paiva, (2009). Esta metodologia para contagem de oocistos foi utilizada tanto para cama de frango quanto para as fezes frescas.

#### 4.4 Resultados e Discussão

A contagem de oocistos de *Eimeria* spp. nas amostras de cama de frango revelou valores de OPG bastante reduzidos, tanto antes como após o tratamento (Tab. 4). Apenas três amostras de cama antes do tratamento apresentaram presença de oocistos e somente em uma amostra após o tratamento, além do valor máximo ser de 150 OPG em todas as amostras.

Tabela 4: Quantificação média de oocistos de *Eimeria* spp. (OPG, valores mínimo e máximo) em fezes frescas e cama de frangos, em aviários *dark house* e convencional, tratadas com cal virgem ou fermentação e cal virgem.

| Tipo de Aviário e Tratamento                 | Fezes Frescas      | Cama de Frangos  |                 |
|--|--------------------|------------------|-----------------|
|  |                    | Antes Tratamento | Após Tratamento |
| <b><i>Dark house</i> - Cal</b>               | 3.131 (150-18.700) | 6 (0-50)         | 6 (0-50)        |
| <b><i>Dark house</i> - Fermentação + Cal</b> | 4.138 (0-19.900)   | 19 (0-150)       | 0               |
| <b>Convencional - Cal</b>                    | 2.012 (0-16.150)   | 4(0-50)          | 0               |
| <b>Convencional - Fermentação + Cal</b>      | 4.092 (0-15.700)   | 0                | 0               |

Por outro lado, das 40 amostras de fezes frescas foram encontrados oocistos em 35 destas (87,5%), sendo seus valores médios elevados em todos os grupos (Tab. 4), contudo, estes valores não condizem com os encontrados na cama de frango. Isto indica que o grau de eliminação de oocistos nos frangos pode ser avaliado pelas fezes.

Para Costa e Ávila (2003), o número de oocistos na cama variou conforme a idade dos frangos e o número de reutilizações da cama do aviário. As contagens foram maiores a partir dos 28 dias de idade e a partir da terceira reutilização da cama (Costa e Ávila, 2003).

Comparando os tratamentos realizados com enleiramento e cobertura da cama com lona plástica com os tratamentos envolvendo apenas enleiramento, observa-se que aqueles com cobertura da cama com lona acabam permitindo maior contaminação por oocistos (Costa e Ávila, 2003). Estes resultados diferem dos encontrados por Santiani e Silva (2017), que demonstraram elevada contaminação de camas por oocistos em 10 granjas com desafio clínico de coccidiose, avaliadas no município de Concórdia - SC.



Como todos os aviários possuem a estrutura e executam os procedimentos necessários para atender a Instrução Normativa nº 56 de 2007 e receberam anticoccidianos via ração até 7 dias antes do abate, provavelmente favoreceram a redução do número de oocistos na cama de frangos, mesmo antes do tratamento no intervalo sanitário, como observado no presente trabalho.

A quantificação de oocistos nas fezes pode contribuir para futuras decisões e ações necessárias para a redução do uso de anticoccidianos na produção de frangos, além de poder servir de parâmetro para a melhoria do programa de biossegurança das granjas. Contudo, um dos métodos mais utilizados à campo para monitorar a coccidiose é através do score de lesões macroscópicas no intestino causada pelas diferentes *Eimerias* spp. (Johnson e Reid, 1970).

#### 4.5 Conclusão

Devido ao reduzido número de amostras positivas antes do tratamento, não foi possível comparar o efeito dos tratamentos e dos sistemas *dark house* e convencional na redução de oocistos de *Eimeria* spp. na cama de frangos. Contudo, sugere-se que a ocorrência de *Eimeria* spp. nos frangos continue sendo monitorada pelo score de lesões macroscópicas na necropsia ou por OPG de fezes frescas, e não de cama reutilizada, uma vez que baixa contagem de oocistos na cama não indica ausência da enfermidade no lote.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou haver similaridade nos resultados dos tratamentos de cama no intervalo sanitário para enterobactérias entre *dark house* e convencional, sendo o mais eficaz o uso de cal virgem 500 g/m<sup>2</sup> na cama de frangos. Porém, para a redução de *C. perfringens*, o tratamento concomitante de fermentação com lona plana e posterior aplicação de 500 g/m<sup>2</sup> da cal virgem nos aviários convencionais teve melhor resultado. Assim, é de extrema importância conhecer quais os principais patógenos circulantes nas granjas de frango de corte, para então direcionar o tratamento de cama conforme a tecnologia de aviário e o principal patógeno existente na propriedade.

Como o tratamento com fermentação com lona plana e posterior aplicação da cal se torna mais laborioso de ser realizado pelo produtor (pois necessita de 12 dias somente para o tratamento), pode ser substituído pela incorporação da cal virgem na cama, o qual necessita de 5 dias para o tratamento, pois este teve bons resultados, porém há de se respeitar um intervalo sanitário mínimo de 12 dias para o alojamento do novo lote.

Outra ferramenta que pode auxiliar na monitoria do *C. perfringens*, em situações específicas, é a detecção do gene *cpa* através da PCR convencional, identificando cepas toxigênicas de *C. perfringens* nas amostras de cama de frangos, e obtendo um indicativo do potencial risco de ocorrência de enterite necrótica nos frangos, porém há de se considerar o custo destas análises. No presente estudo, os resultados encontrados evidenciaram um reduzido percentual de *C. perfringens* portadores do gene *cpa*, tanto antes quanto após o tratamento.

Em relação à coccidiose, foi verificado baixo número de amostras positivas e reduzido valor de OPG de oocistos de *Eimeria* spp. na cama de frangos, tanto antes quanto após os tratamentos. Porém, quando avaliado nas fezes frescas, havia presença de oocistos em 87,5% das amostras, indicando que a monitoria de OPG deve ser realizada nas fezes frescas. Assim, se caso for monitorar coccidiose por OPG, que seja de fezes frescas e não de cama de frangos.

O presente estudo permitiu um conhecimento mais aprofundado dos desafios

sanitários aos quais as granjas de frango de corte estão sujeitas, além disso, ficou clara e evidente a necessidade de se conhecer e monitorar os principais patógenos nas granjas, levando em consideração a tecnologia de aviário, e determinar o tratamento de cama no intervalo sanitário de forma mais eficiente, para quebrar o ciclo de perpetuação destes patógenos ao lote subsequente.

## 6 REFERÊNCIAS

- ALBINO, L. F. T.; TAVERNARI, F. C. **Produção e manejo de frangos de corte**. 1 Ed. Minas Gerais: Editora UFV, 88p, 2012.
- BABA, E., IKEMOTO, T.; FUKATA, T.; SASAI, K.; ARAKAWA, A.; MCDUGALD, L. R. Clostridial population and the intestinal lesions in chickens infected with *Clostridium perfringens* and *Eimeria necatrix*. **Veterinary Microbiology**, 54, 301-308, 1997.
- BRASIL, Estabelece os Procedimentos para Registro, Fiscalização e Controle de Estabelecimentos Avícolas de Reprodução e Comerciais. **Texto da Instrução Normativa nº 56**, de 4 de dezembro de 2007. Disponível em: <[www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimariaanimal/files/2012/09/IN-nº-56.072.pdf](http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimariaanimal/files/2012/09/IN-nº-56.072.pdf)>. Acessado em: 10 jan. 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Módulo VI, 2013. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia.asp>>. Acessado em: 5 mar. 2017.
- CHAPMAN, H. D. A landmark contribution to poultry Science - Prophylactic control of coccidiosis in poultry. **Poultry Science**, 88, 813-815, 2009. Disponível em: <<http://ps.oxfordjournals.org>>. Acessado em: 19 nov. 2016.
- COSTA, C. A. F.; ÁVILA, V. S. Efeito da idade das aves e da reutilização e manejo da cama de aviário sobre a coccidiose em frangos de corte. Embrapa - CNPSA, 2003. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/58257/1/CUsersPiazzonDocuments327.pdf>> Acessado em: 5 de abr. 2018.
- COSTA, C. A. F.; PEDROSO-DE-PAIVA, D. **Cultivo in vivo, in vitro e diagnóstico específico de Eimeria spp. de Gallus gallus**. 1 Ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 219p, 2009.
- CRESSMAN, M.D.; YU, Z.; NELSON, M. C.; MOELLER, S. J.; LILBURN, M. S.; ZERBY, H. N. Interrelations between the microbiota in the litter and in the intestines of commercial broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**. 76, 6572-6582, 2010.
- DAI PRÁ, M. A.; CORREA, E. K.; ROLL, V. F.; XAVIER, E. G.; LOPES, D. C. N.; LOURENÇO, F. F.; ZANUSSO, J. T.; ROLL, A. P. Uso de cal virgem para o controle de *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp. em camas de aviário. **Ciência Rural**. 39, 1189-1194, 2009.
- GALLO, B. B. Dark house: manejo x desempenho frente ao sistema tradicional. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA E I BRASIL SUL POULTRY FAIR, 10, 2009, Chapecó. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2009, 140p.

GOMES, A. de M.; LOBATO, F. C. F.; MARTINS, N. R. da S.; ASSIS, R. A. de. Genotipificação de *Clostridium perfringens* isolados de frangos de corte através da PCR Múltipla. **Ciência Rural**. 38, 1943-1947, 2008.

JOHNSON, J.; REID, W. M. Anticoccidial Drugs: lesion scoring and floor-pen experiments with chickens. **Experimental parasitology**. 28, 30-36, 1970.

KAWAZOE, U. Coccidiose. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. (2º Ed). **Doenças das aves**. Campinas: Facta. p. 837-855, 2009.

MAIORKA, A. Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 5, 2004. Chapecó.

MAIORKA, A.; DAHLKE, F.; MORGULIS, M. S. F. de A. Broiler adaptation to posthatching period. **Ciência Rural**. 36, 701-708, 2006.

MUTHAMILSELVAN, T.; KUO, T. F.; WU, Y. C.; YANG, W. C. Herbal remedies for coccidiosis control: a review of plants, compounds, and anticoccidial actions. **Hindawi Publishing Corporation**, 1-19, 2016.

OLIVEIRA, M. C.; FERREIRA, H.A.; CANCHERINI, L. C. Efeito de condicionadores químicos sobre a qualidade da cama de frango. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 56, 542-546, 2004.

PRADO, Odilei Rogerio. **Ocorrência de *Eimeria acervulina*, *E. máxima*, *E. tenella* e *E. mitis* em frangos de corte na região Oeste de Santa Catarina**. 2005. 75p. Tese (Mestre em Patologia Veterinária) - Curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

PUERTA-GARCÍA, A.; MATEOS-RODRÍGUEZ, F. Enterobacterias. **Medicine**, 10, 3426-3431, 2010.

SANTANA, E. S.; MENDES, F. R.; BARNABÉ, A. C. de S.; OLIVEIRA, F. H. de; ANDRADE, M. A. Uso de produtos alternativos aos antimicrobianos na avicultura. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, 7, 985-1009, 2011.

SANTIANI, F.; SILVA, T. M. A. DA Comparativo de prevalência de *Eimeria* spp. em cama fermentada e não fermentada de frangos de corte e lesões no intestino das aves, na região do Meio Oeste Catarinense. In: VII MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA IFC CAMPUS CONCÓRDIA, CONCÓRDIA, 2017. **Anais da VII MIC IFC- campus Concórdia**, 2017. Disponível em: <<http://mic.concordia.ifc.edu.br/wp-content/uploads/sites/30/2017/12/anais-2017-13.pdf>>.

SILVA, V. S.; VOSS, D.; COLDEBELLA, A.; BOSETTI, N.; AVILA, V. S. de. Efeito de tratamento sobre a carga bacteriana de cama de aviário reutilizada em frangos de corte. **Comunicado técnico 467 - Embrapa Suínos e Aves**. 1-10, 2007.

SOUZA, A. V. C. de; LIMA, C. A. R. de; SILVA, A. A. da; GREGORUT, F. P. Alternativas ao uso de antibióticos como aditivos promotores de crescimento em Frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, 10, 18-28, 2009.