

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Suínos e Aves
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

**Cultivo in vivo, in vitro
e diagnóstico específico
de *Eimeria* spp. de
*Gallus gallus***

*Carlos Alberto Fagonde Costa
Doralice Pedroso-de-Paiva*

*Embrapa Informação Tecnológica
Brasília, DF
2009*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Informação Tecnológica

Parque Estação Biológica (PqEB), Av. W3 Norte (Final)
CEP 70770-901 Brasília, DF
Fone: (61) 3340-9999
Fax: (61) 3340-2753
www.sct.embrapa.br/liv
vendas@sct.embrapa.br

Embrapa Suínos e Aves

Rod. BR 153, Km 110 – Distrito de Tamanduá
Caixa Postal 21
CEP 89700-000 Concórdia, SC
Fone: (49) 3441-0400
Fax: (49) 3441-0497
www.cnpsa.embrapa.br
sac@cnpsa.embrapa.br

Coordenação editorial: *Fernando do Amaral Pereira*
Mayara Rosa Carneiro
Lucilene Maria de Andrade

Supervisão editorial: *Rúbia Maria Pereira*
Erika do Carmo Lima Ferreira

Revisão de texto: *Josmária Madalena Lopes*

Normalização bibliográfica: *Vera Viana dos Santos*

Projeto gráfico: *Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Capa: *Vivian Fracasso*

Editoração eletrônica e tratamento de ilustrações: *José Batista Dantas*

Foto da capa: *Doralice Pedroso-de-Paiva*

1ª edição

1ª impressão (2009): 3.000 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação,
no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Informação Tecnológica

Cultivo in vivo, in vitro e diagnóstico específico de *Eimeria* spp. de *Gallus gallus* / Carlos Alberto Fagonde Costa, Doralice Pedroso-de-Paiva. – Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 2009.

219 p. ; 16 cm x 22 cm.

ISBN 978-85-7383-4581

1. Ave doméstica. 2. Coccidiose. 3. Parasitose. I. Costa, Carlos Alberto Fagonde. II. Pedroso-de-Paiva, Doralice. III. Embrapa Suínos e Aves.

CDD 574.5248

© Embrapa 2009

Autores

Carlos Alberto Fagonde Costa

Médico-veterinário, D.Sc. em Ciências Biológicas, pesquisador aposentado da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC
campo.do.meio@gmail.com

Doralice Pedroso-de-Paiva

Médica-veterinária, Ph.D. em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária, pesquisadora aposentada da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC
dppaiva@concordia.psi.br

*Dedicamos este livro à
Marizete Costa da Costa,
Tatiana Costa da Costa, Viviana Costa da Costa,
Fernanda Costa da Costa,
Natália Costa da Costa, Otávio Costa da Costa,
Guilherme José de Paiva e àqueles que, fazendo
sua parte, ou indo além, nos ajudaram, nos
estimularam e nos serviram de exemplo.*

Agradecimentos

Às chefias, ao Comitê Técnico Interno e aos colegas da Embrapa Suínos e Aves, agradecemos o apoio no dia-a-dia, período em que se originaram as experiências relatadas neste livro.

Aos colegas de pesquisa e à administração e ao apoio da Embrapa Suínos e Aves que, nas suas funções, foram decisivos para a condução dos trabalhos propostos e contribuíram para um convívio agradável, o nosso muito obrigado.

Ao colega Maximino Luiz Mesacaza, agradecemos a constante presença e a disponibilidade na rotina indispensável ao sucesso dos trabalhos que já a poucos interessava.

Aos colegas Dejalmo A. da Silva e Altair Althaus, agradecemos a boa vontade e a presteza com que nos atenderam no isolamento e na sala de necropsias, o que muito contribuiu para o sucesso das atividades descritas nesta obra.

Agradecemos também às biólogas Andréia Bassani e Nelise Triches, que, como estagiárias do Laboratório de Parasitologia, deram-nos a sua contribuição.

À Dra. Fátima Regina Ferreira Jaenisch, agradecemos as discussões e o material disponibilizado para a confecção deste trabalho (lâminas de cortes histológicos).

Ao Dr. Nelson Mores, agradecemos a ajuda na produção das fotos.

Agradecemos ainda ao pessoal do Laboratório de Sanidade Animal, especialmente a Tânia Klein e a Remidio Vizzoto, que, com experiência de bancada, trouxeram-nos contribuições de valor sempre que precisamos.

O nosso muito obrigado também ao pessoal de Minas Gerais (do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais – ICB/UFMG, e do Laboratório Nacional de Referência Animal – Lanara, de Pedro Leopoldo), onde algumas das técnicas descritas começaram a ser montadas.

Apresentação

A coccidiose é uma doença parasitária importante nas aves domésticas, que se mostra mais agressiva naquelas confinadas. É causada por protozoários do gênero *Eimeria*, diferenciado em sete espécies importantes (*acervulina*, *brunetti*, *maxima*, *mitis*, *praecox*, *necatrix* e *tenella*).

Ao longo dos últimos anos, essa parasitose tem dificultado a criação de aves em confinamento, por possibilitar essa prática apenas com o seu controle preventivo via aplicação de medicação na ração das aves. Método esse que, por sua vez, revelou-se polêmico, pois os consumidores passaram a questionar o efeito dos resíduos de medicamentos em alimentos, carne e ovos; embora cada vez mais sejam pesquisados princípios ativos menos nocivos.

Resultado de pesquisas desenvolvidas pelo médico-veterinário Carlos Alberto Fagonde Costa, no período de 1988 a 2005, assim como de pesquisa da médica-veterinária Doralice Pedroso-de-Paiva, ambos pesquisadores da Embrapa Suínos e Aves, este livro apresenta técnicas de combate dessa parasitose, desenvolvidas a partir da compilação de outras descritas na literatura, as quais foram testadas e adaptadas para a nossa realidade.

Para suprir uma lacuna na área de Parasitologia, esta obra visa a apoiar a continuidade de pesquisas sobre coccidiose aviária, com dados que se propõem, inclusive, a facilitar a montagem de laboratório destinado ao estudo dessa parasitose.

Assim, a Embrapa Suínos e Aves orgulha-se de apresentar este livro, entendendo que muitos usuários encontrarão nele um caminho pavimentado para o prosseguimento das pesquisas e o aperfeiçoamento das técnicas de cultivo, que permitirão o desenvolvimento de formas de controle da coccidiose nas aves domésticas.

Dirceu João Duarte Talamini
Chefe-Geral
Embrapa Suínos e Aves

Sumário

CAPÍTULO 1 – Coccidiose aviária	19
Histórico	19
Importância econômica na avicultura industrial	21
Diagnóstico	22
Controle	30
CAPÍTULO 2 – Cuidados com o preparo do material e dos equipamentos	35
Desinfecção	35
CAPÍTULO 3 – Técnica 1 – Manejo de aves para reprodução in vivo de <i>Eimeria</i> de galinhas	45
Objetivo	45
Material	45
Reagentes	46
Soluções	46
Estrutura física	46
Características das aves a serem utilizadas para multiplicação de <i>Eimeria</i>	47
Equipamentos	48
Procedimentos	48
Resíduos gerados	53
CAPÍTULO 4 – Técnica 2 – Teste de negatividade para <i>Eimeria</i>, pela concentração e pesquisa de oocistos nas fezes	55
Objetivo	55
Material	55
Reagentes	56
Soluções	56
Equipamentos	56
Procedimentos	57
Resultado	60
Resíduos gerados	60

CAPÍTULO 5 – Técnica 3 – Inoculação de oocistos de <i>Eimeria</i> spp. em aves livres do parasito, para multiplicação in vivo	61
Objetivo	61
Material	61
Reagentes	62
Soluções	62
Equipamentos	63
Procedimentos	63
Resultados e registros	67
Resíduos gerados	67
CAPÍTULO 6 – Técnica 4 – Colheita de fezes e limpeza de oocistos	69
Objetivo	69
Material	69
Reagentes	70
Soluções	70
Equipamentos	70
Procedimentos	71
Resultados e registros	74
Resíduos gerados	74
CAPÍTULO 7 – Técnica 5 – Contagem de oocistos	77
Objetivo	77
Material	77
Reagentes	78
Soluções	78
Equipamentos	78
Procedimentos	79
Cálculos	81
Resultados	82
Resíduos gerados	82
CAPÍTULO 8 – Técnica 6 – Esporulação e armazenagem de oocistos	83
Objetivo	83
Material	83

Reagentes	84
Solução	84
Equipamentos	84
Procedimentos	84
Resíduos gerados	87

CAPÍTULO 9 – Técnica 7 – Extração e congelamento

de esporocistos de <i>Eimeria</i>	89
Objetivo	89
Material	89
Reagentes	90
Soluções	91
Equipamentos	91
Procedimentos	92
Resultados e registros	97
Resíduos gerados	98

CAPÍTULO 10 – Técnica 8 – Extração de DNA de grande

número de oocistos de <i>Eimeria</i>	99
Objetivo	99
Material	99
Reagentes	100
Soluções	101
Equipamentos	102
Procedimentos	103
Resultados e registros	107
Resíduos gerados	107

CAPÍTULO 11 – Técnica 9 – Extração de DNA de pequeno

número de oocistos de <i>Eimeria</i> spp.	109
Objetivo	109
Material	109
Reagentes	110
Soluções	110
Equipamentos	111
Procedimentos	111

Resultados e registros	114
Resíduos gerados	114

CAPÍTULO 12 – Técnica 10 – PCR para diagnóstico

específico de <i>Eimeria</i>	115
Objetivo	115
Material	115
Reagentes	116
Soluções	117
Equipamentos	117
Estrutura física	118
Procedimentos	119
Resultados e registros	123
Resíduos gerados	123

CAPÍTULO 13 – Técnica 11 – Teste de pureza de cepa

de <i>Eimeria</i> spp. (in vivo), mediante características morfológicas e biológicas	127
Objetivo	127
Material	127
Reagentes	129
Soluções	129
Equipamentos	129
Procedimentos	130
Resultados e registros	133
Resíduos gerados	133

CAPÍTULO 14 – Técnica 12 – Isolamento de espécies puras

de <i>Eimeria</i> de aves a partir de um oocisto	135
Objetivo	135
Material	135
Reagentes	136
Soluções	137
Equipamentos	137
Procedimentos	138
Resultados e registros	143
Resíduos gerados	143

CAPÍTULO 15 – Técnica 13 – Cultivo de <i>Eimeria</i> em embrião de galinha	147
Objetivo	147
Material	147
Reagentes	148
Soluções	149
Equipamentos	150
Procedimentos	150
Resultados e registros	155
Resíduos gerados	155
CAPÍTULO 16 – Tratamento dos resíduos da análise	157
Aves infectadas	157
Dicromato de potássio diluído	158
Fezes	158
Luvas de borracha	158
Sobras de ração	158
Solução de cloreto de sódio contaminada com fezes (resultante da centrifugação)	158
Suspensão de fezes com detergentes (sobrenadante das lavagens)	158
Solução de hipoclorito de sódio	159
Ponteiras e gel contaminados com brometo de etídio	159
CAPÍTULO 17 – Experimentos com <i>Eimeria</i>	161
Alojamento e ração	161
Frangos	162
Inóculo	162
Exemplo de tratamentos experimentais	163
Delineamento experimental	163
Variáveis de resposta aos tratamentos	163
LISTA DE SÍMBOLOS, DE FÓRMULAS, DE SIGLAS, DE ABREVIATURAS E DE TERMOS ESTRANGEIROS	165
APÊNDICES	169
I Material	169

II	Reagentes	176
III	Soluções e tampões	181
IV	Equipamentos	193
V	Cálculos	198
REFERÊNCIAS		205
ÍNDICE		213

Coccidiose aviária

Carlos Alberto Fagonde Costa

Histórico

Os primeiros sinais da coccidiose a chamarem atenção dos criadores e estudiosos foram as diarréias sanguinolentas que levavam à prostração das aves seguida de grande mortalidade, embora não se tenha notícias da primeira descrição dela como doença das aves, especialmente nas galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*). Certamente esse quadro passou a ser mais observado quando as galinhas começaram a ser criadas em ambientes restritos, com maior número de aves por unidade de área. Railliet e Lucet (1891), citados por Pellérdy (1974), descreveram o protozoário *Coccidium tenellum* no ceco dessas galinhas com diarréia de sangue. A partir disso, popularizou-se o termo coccidiose para designar essa afecção, que se supunha ser causada apenas pelo agente descrito por Railliet e Lucet. Antes dessa descrição, porém, Schneider, em 1875, descreveu o gênero *Eimeria* para abrigar um parasito intestinal de camundongos, e Leuckart, em 1879, o gênero *Coccidium* para abrigar parasito do intestino de coelhos (LEVINE, 1973).