

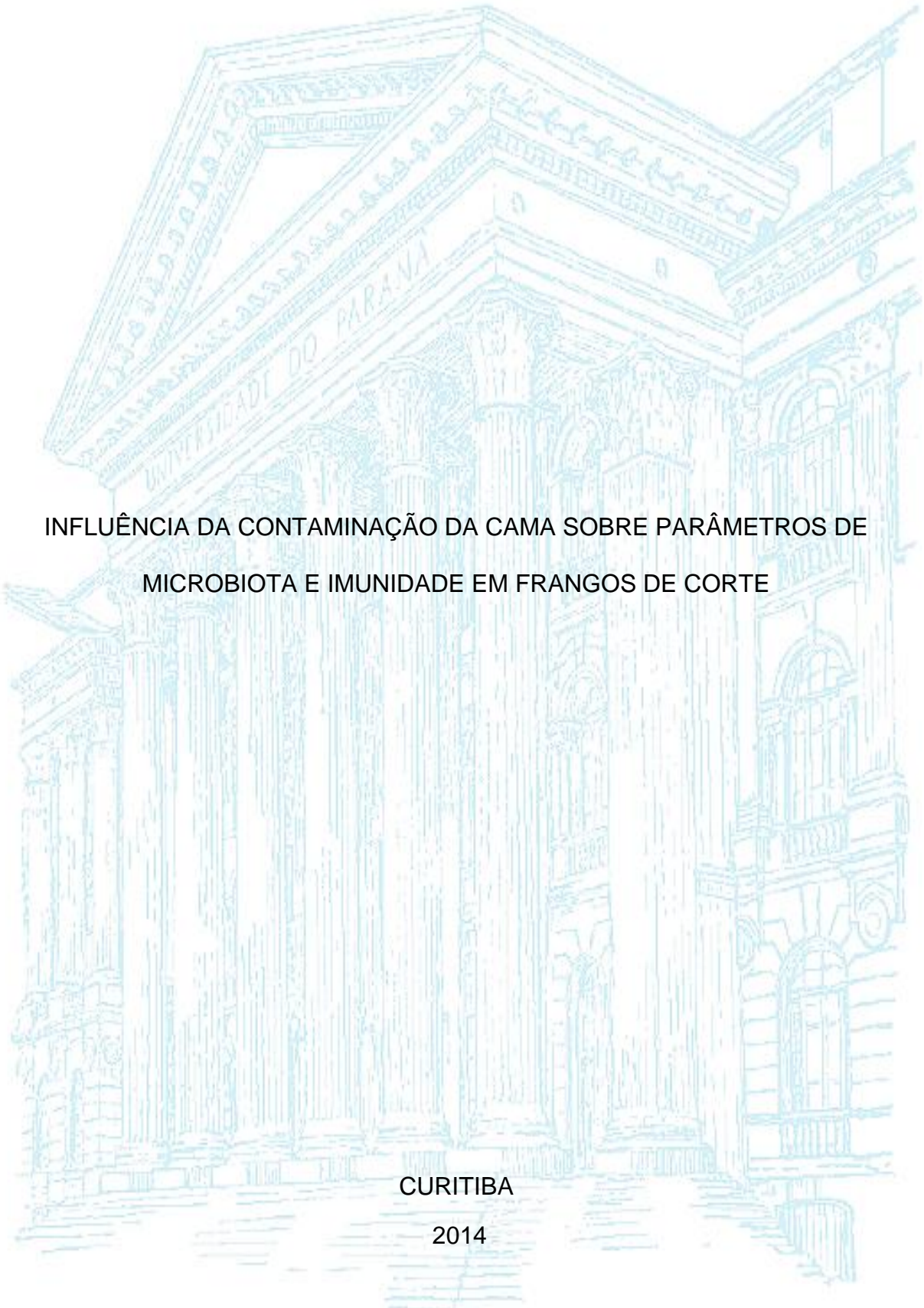
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANY ALBERTO MESA FIAGÁ

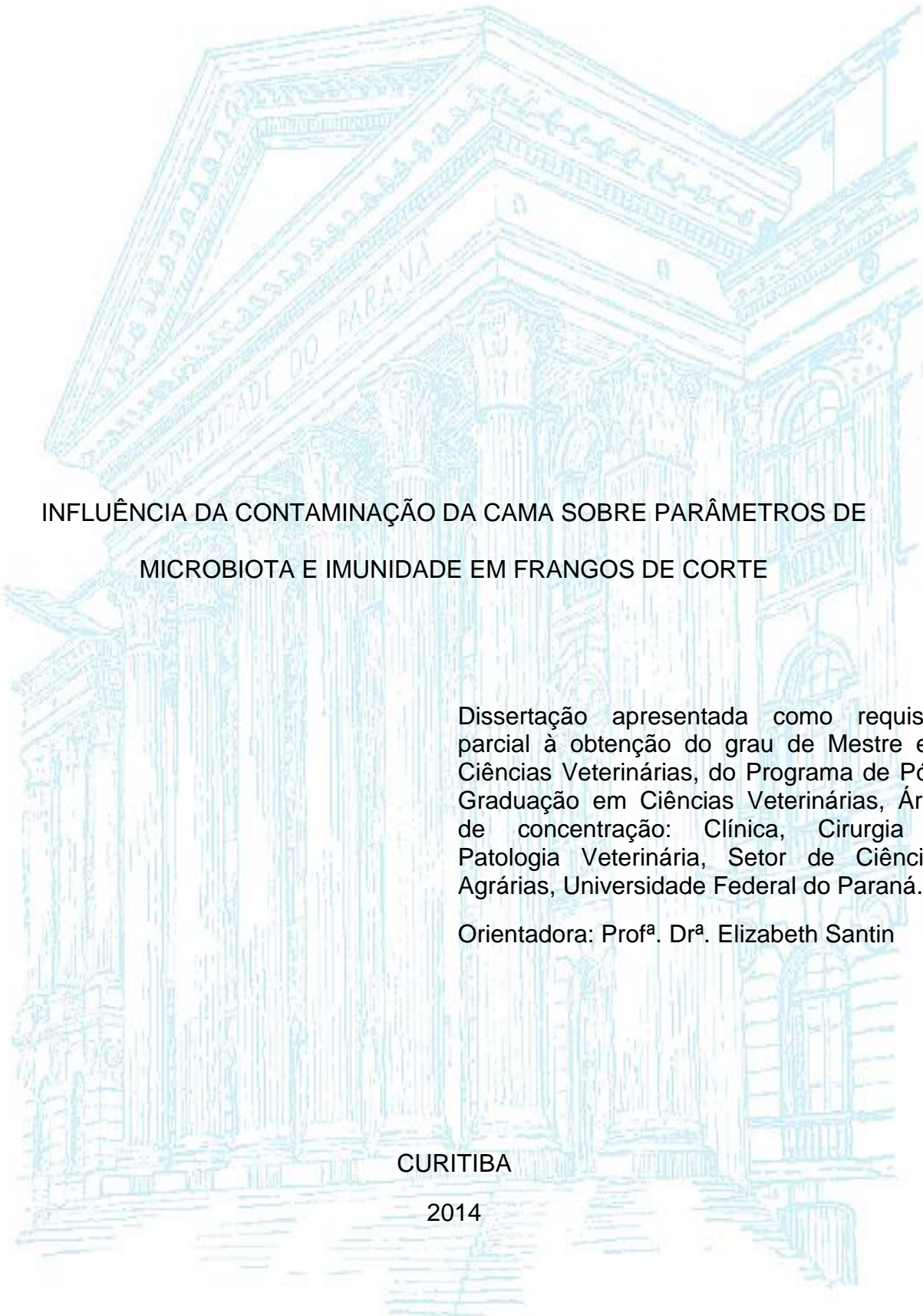
INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO DA CAMA SOBRE PARÂMETROS DE
MICROBIOTA E IMUNIDADE EM FRANGOS DE CORTE

CURITIBA

2014



DANY ALBERTO MESA FIAGÁ



INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO DA CAMA SOBRE PARÂMETROS DE
MICROBIOTA E IMUNIDADE EM FRANGOS DE CORTE

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de concentração: Clínica, Cirurgia e Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elizabeth Santin

CURITIBA

2014

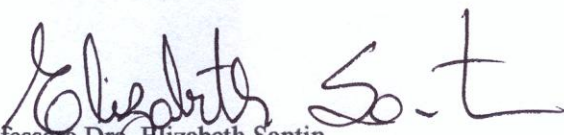
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

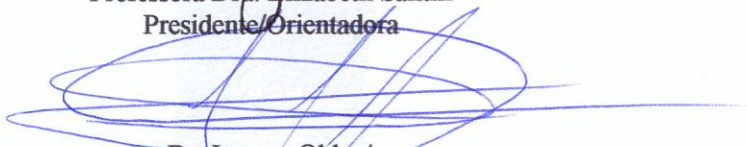


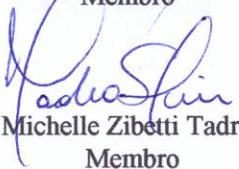
PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO DA CAMA SOBRE PARÂMETROS DE MICROBIOTA E IMUNIDADE EM FRANGOS DE CORTE” apresentada pelo Mestrando **DANY ALBERTO MESA FIAGÁ** declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou o candidato Doto para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 3 de fevereiro de 2014


Professora Dra. Elizabeth Santin
Presidente/Orientadora


Dr. Ivomar Oldoni
Membro


Dra. Michelle Zibetti Tadra Sfeir
Membro

AGRADECIMENTOS

Ao governo federal pela bolsa concedida por meio do programa REUNI. A Universidade pelo bem-estar. A Professora Elizabeth Santin por estes dois anos de trabalho nos quais me fez crescer muito profissionalmente, a toda equipe do LABMOR pela paciência e os gratos momentos compartilhados, especialmente a Mariana, Andressa e *Tonho*. A todo o pessoal do Departamento de Bioquímica da UFPR pela ajuda brindada, em especial agradeço a Michelle. Aos grandes amigos e colegas Alexandre e Eduardo, que além de me ajudar na *Alma mater* abriram as portas de suas casas e me fizeram sentir muito melhor neste belo país. A Didi por me receber na sua casa como um filho mais, a minha esposa Rocío pelo apoio e por compartilhar junto comigo esta longa viagem longe de casa. Finalmente peço desculpas a todas as pessoas que de alguma maneira me ajudaram a conseguir este trabalho e seus nomes não estão presentes, são muitas, obrigado povo brasileiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO	11
REFERÊNCIAS	12
CAPÍTULO 1 - REUTILIZAÇÃO DE CAMA DE FRANGOS – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ..	14
RESUMO	15
ABSTRACT.....	16
INTRODUÇÃO	17
Definição de cama de frango e materiais utilizados.....	18
Composição final da cama de frango.....	20
Quantificação da cama no final de lotes de frangos	22
Carga microbiana na cama de frango	23
<i>Staphylococcus</i>	24
<i>Escherichia coli</i>	25
<i>Campylobacter</i>	25
<i>Clostridium</i>	26
<i>Salmonella</i>	26
Reutilização da cama.....	27
Métodos de tratamento em camas reutilizadas para diminuir a carga microbiana	29
Uso de acidificantes	29
Uso de alcalinizantes	32
Compostagem.....	33
Fermentação	34
Cama e saúde pública	36
Influência do tipo de cama na resposta imune de frangos de corte	37
CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS	39
CAPITULO 2 - INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO DA CAMA SOBRE PARÂMETROS DE MICROBIOTA E IMUNIDADE EM FRANGOS DE CORTE.....	50

RESUMO	51
ABSTRACT.....	52
INTRODUÇÃO	53
MATERIAL E MÉTODOS.....	55
Ensaio 1: Preparação das camas	55
Coleta de material para microbiologia.....	56
Parâmetros físicos e químicos	56
Ensaio 2: Ensaio <i>In vivo</i>	57
Animais.....	57
Coleta de material para microbiologia, histopatologia, imunoistoquímica e PCR quantitativa (qPCR).....	58
Processamento das amostras para análise microbiológica.....	58
Processamento e leitura do material para histopatologia e imunoistoquímica.....	58
Iniciadores para qPCR.....	59
Extração de RNA total	60
Tratamento com DNase e síntese do cDNA	61
qPCR	61
ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
RESULTADOS.....	62
Ensaio 1: Microbiologia.....	62
Parâmetros físicos e químicos	63
Ensaio 2: Microbiologia.....	66
Linfócitos CD4+, CD8+, células caliciformes e macrófagos.....	67
qPCR de RNAm de citocinas.....	68
Peso das aves.....	69
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
ANEXO.....	83
ANEXO I.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Influencia na conversão alimentar de frangos de corte de alguns materiais utilizados como cama de aviário.	20
Tabela 2 – Porcentagem de bactérias patógenas em camas de frango isoladas com microbiologia tradicional.	24
Tabela 3 - Principais métodos utilizados para diminuir carga microbiana em camas reutilizadas.	30
Tabela 4 - Informação dos iniciadores.	59
Tabela 5 - Média e erro padrão da contagem de bactérias totais, Enterobactérias, <i>Lactobacillus</i> e oocistos de <i>Eimeria maxima</i> nos diferentes tratamentos na cama ao 1° e 8° dia (Resultados expressos em Log10 de UFC/ml e oocistos/10 gramas de cama).	63
Tabela 6 - Presença de <i>Salmonella</i> Enteritidis na cama aos dias 1 e 8. Comparação antes e depois do tratamento (resultados expressos em porcentagem).	63
Tabela 7 - Média e erro padrão da contagem de Enterobactérias, bactérias totais e <i>Lactobacillus</i> nos diferentes tratamentos em ceco aos 14 e 28 dias de idade dos frangos (Resultados expressos em Log10 de UFC/ml).	67
Tabela 8 - Média da contagem de linfócitos CD4+, CD8+, células calciformes e macrófagos no intestino das aves dos diferentes tratamentos aos 14 e 28 dias de idade (Resultados em unidades).	68
Tabela 9 - Média e erro padrão da expressão gênica de RNAm de diferentes citocinas em jejuno e fígado das aves aos 14 e 28 dias de idade, normalizada pela expressão do gene ubiquitina. Resultados apresentados em numero de vezes que o gene foi expresso quando comparado ao grupo controle (T1).	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose mostrando a integridade das unidades ribossomais 28S e 18S do RNA..... 60
- Figura 2 - Temperatura das camas durante os oito dias de tratamento. Letras diferentes apresentam diferença significativa ao dia 8 pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). 64
- Figura 3 – Mensurações de pH das camas durante dias alternados. Letras diferentes apresentam diferença significativa ao dia 8 pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). 65
- Figura 4 - Umidade das camas durante dias alternados. Letras diferentes apresentam diferença significativa ao dia 8 pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). 65
- Figura 5 - Amônia liberada nas camas em dias alternados. Letras diferentes apresentam diferença significativa ao dia 8 pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). 66

RESUMO

A avicultura industrial brasileira é consolidada como um segmento moderno fortemente estimulado pelos investimentos privados e que, principalmente a partir dos anos de 70, passou para um processo de produção mais intensificado. Esse desenvolvimento tem sido devido a fatores como melhoria genética, uso de instalações mais apropriadas, alimentação racional, ajuste de programas de biossegurança e parceria entre produtor e a agroindústria através de contratos de integração. Desde então, a avicultura passou a ter caráter industrial, impulsionada pelos constantes aumentos de produção. Atualmente, o setor representa um dos principais produtos de exportação brasileira e hoje o Brasil é o maior exportador de carne de frango do mundo. Neste grande crescimento e sucesso da avicultura uma quantidade crescente de resíduos são produzidos dentro do sistema, sendo um dos principais a cama de frango. Devido a seu volume significativo se propôs como matéria para este trabalho a pesquisa em relação à cama de frango. Este estudo está dividido em dois capítulos: Capítulo I, uma revisão sobre “Reutilização de cama de frangos” e o capítulo II, um trabalho científico intitulado “Influência da contaminação da cama sobre parâmetros de microbiota e imunidade em frangos de corte”. Foi observado na revisão de literatura que o tratamento das camas no período de vazio sanitário promove a diminuição de bactérias patogênicas, desta forma permitindo sua reutilização. No trabalho científico foi observado que as bactérias remanescentes nas camas afetam a resposta imunológica de frangos de corte.

Palavras-chave: Avicultura, cama, frango de corte, imunidade.

ABSTRACT

The Brazilian poultry industry was consolidated as a modern segment strongly stimulated by private investment, mainly since 1970s, it has intensively increased in their production process. This development has been possible due to factors such as genetic improvement, use of more appropriate facilities, rational nutrition, implementation of biosecurity programs and partnership between producer and agribusiness. Since then, the poultry industry began to have industrial character, addressed by sustained increases in production. Currently, it has a major importance in Brazilian exports, becoming this Country as the largest exporter of chicken meat in the world. Thus, due to enormous growth and success of the Brazilian poultry industry an increasing amount of by-product are produced in the system, one the main is poultry litter. It is proposed to study the broiler litter as matter of research for this thesis. This study is divided into two chapters: Chapter I a review of "Reuse of broiler litter" and Chapter II a research article entitled "Influence of litter contamination on microbiota and immunity parameters in broilers". It was noted in the review that the treating litter, during the down time between flocks, decrease a microbial load. In scientific research it was observed that the bacteria remaining on the litter affect the immune response of broilers.

Key-words: Poultry, litter, broiler, immunity.

INTRODUÇÃO

Na indústria avícola, a cama de frango é constituída de materiais vegetais absorventes, tais como maravalha, casca de café, sabugo de milho triturado, capins, restos de cultura, casca de arroz, casca de amendoim (Musa et al., 2012), e vai sendo acrescida paulatinamente, durante o período de criação das aves, com uma mistura da excreta, restos de ração e penas dos frangos (Singh et al., 2004).

O contínuo crescimento da produção avícola brasileira resultou em atividades que geram uma quantidade grande e crescente de resíduos. No caso específico da avicultura de corte, os resíduos produzidos nos galpões de criação compreendem a cama e as carcaças de animais mortos (Oviedo, 2008). O manejo correto destas camas é muito importante, uma vez que, quando mal manejadas, estas podem poluir as águas superficiais e o lençol freático com altas concentrações de nitrogênio, fósforo e potássio, e também a qualidade do ar por emissões de gases como amônia (Harmel et al., 2004; Meda et al., 2011), ou contaminar a água e solos com microrganismos com potencial risco para a saúde pública (Roberts et al., 2013).

Atualmente no Brasil pratica-se a reutilização da cama, que dependendo da sua qualidade, volume e manejo, pode ser ocorrer por até 14 lotes consecutivos (Roll et al., 2011). Reutilizações de cama contribuem imensamente para a redução do volume de resíduos a ser disposto, minimizando assim, os eventuais impactos causados ao meio ambiente. No entanto, para reutilização de cama com segurança, essa deve ser submetida a tratamentos adequados, para a redução de riscos microbiológicos e garantia de sustentabilidade ambiental (Lopes et al., 2013).

Um dos métodos maciçamente utilizados na indústria avícola brasileira para redução dos níveis bacteriológicos nestas camas é a cobertura com lona plástica por

alguns dias ao final da criação de cada lote (Muniz et al., 2014). Passado esse tempo, a cama é sujeita a um processo de transformação e poderá receber em forma segura um novo lote de animais, permitindo assim o uso do mesmo substrato sequencialmente.

Objetivou-se com esse trabalho avaliar o processo de cobertura da cama, no que se refere ao impacto na microbiologia, antes e depois do tratamento, assim como mensurar os parâmetros físicos e químicos decorrentes do processo, e ainda observar a influência destas camas sobre a microbiota intestinal e a resposta imune de frangos de corte.

Os capítulos foram elaborados nas normas para publicação na revista *Archives of Veterinary Science*, da Universidade Federal do Paraná. Ver anexo.

REFERÊNCIAS

HARMEL, R. D.; TORBERT, H. A.; HAGGARD, B. E. et al. Water quality impacts of converting to a poultry litter fertilization strategy. **Journal Environmental Quality**, v. 33, n. 6, p. 2229-2242 2004.

LOPES, M.; ROLL, V. F. B.; LEITE, F. L. et al. Quicklime treatment and stirring of different poultry litter substrates for reducing pathogenic bacteria counts. **Poultry Science**, v. 92, n. 3, p. 638-644 2013.

MEDA, B.; HASSOUNA, M.; AUBERT, C. et al. Influence of rearing conditions and manure management practices on ammonia and greenhouse gas emissions from poultry houses. **World's Poultry Science Journal**, v. 67, n. 03, p. 441-456 2011.

MUNIZ, E.; MESA, D.; CUASPA, R. et al. Presence of *Salmonella* spp. in reused broiler litter. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 27, n. 1, p. 12-17 2014.

MUSA, W. I.; SA'IDU, L.; KALTUNGO, B. Y. et al. Poultry litter selection, management and utilization in Nigeria. **Asian Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 2, p. 44-55 2012.

OVIEDO, R. E. Tecnologias para mitigar o impacto ambiental da produção de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 239-252 2008.

ROBERTS, B. N.; BAILEY, R. H.; MCLAUGHLIN, M. R. et al. Spatial and temporal analysis of microbial populations in production broiler house litter in the southeastern United States. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 4, p. 759-770 2013.

ROLL, V. F.; DAI PRA, M. A.; ROLL, A. P. Research on *Salmonella* in broiler litter reused for up to 14 consecutive flocks. **Poultry Science**, v. 90, n. 10, p. 2257-62 2011.

SINGH, A.; BICUDO, J. R.; TINOCO, A. L. et al. Characterization of nutrients in built-up broiler litter using trench and random walk sampling methods. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 13, n. 3, p. 426-432 2004.

**CAPÍTULO 1 - REUTILIZAÇÃO DE CAMA DE FRANGOS – REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA**

REUTILIZAÇÃO DE CAMA DE FRANGOS – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA (*Reused broiler litter – Review*)

RESUMO

A cama de frango, como um subproduto da indústria avícola de corte, é o resultado final da mistura de um material vegetal junto com fezes, restos de ração e penas das aves. Toda essa massa interage dinamicamente em um delicado ambiente no qual coabitam microrganismos como bactérias, vírus e fungos que estão frequentemente em relação direta com as condições químicas e físicas deste nicho. Tanto o material da cama como qualquer outro componente pode modificar as condições deste ambiente. Devido ao volume crescente deste subproduto e ao possível impacto que poderia ter no ambiente, a cada dia se torna mais importante se conhecer formas de aproveitamento de camas de frangos por vários lotes consecutivos. Nesse contexto é necessário avaliar o impacto desta reutilização para o ambiente, a saúde pública, assim como para o desempenho e saúde dos frangos.

Palavras-chave: frango de corte, maravalha, compostagem, microbiologia da cama.

ABSTRACT

Poultry litter, as a by-product of the broiler industry, is the final output of a combination of vegetal material with feces, food remains and chicken feathers. This whole mass interacts dynamically in a delicate environment in which coexist microorganisms such as bacteria, viruses and fungi. They are often in direct relation to the chemical and physical conditions of this niche, in which both the litter as any component can modify the conditions of this environment. Due to high volume production of this by-product and the possible impact it could have on the environment, it gains more significance to be used by several consecutive flocks. In that context, it is very important to assess the impact of litter reused on the environment, in public health, as well as the performance and health of broilers.

Key-words: Broiler, wood shavings, composting, microbiology of litter.

INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira é considerada um dos setores mais tecnificados do agronegócio nacional, representa 1,5% do produto interno bruto (PIB) do país, gerando 4,5 milhões de empregos diretos e indiretos, e mais de 7 bilhões de reais em exportações (UBA, 2013). A produção de carne de frango chegou a 12.645 milhões de toneladas em 2012, em uma redução de 3,17% em relação a 2011. O Brasil manteve a posição de maior exportador mundial com mais de 150 países como destino, e de terceiro maior produtor de carne de frango, atrás dos Estados Unidos e da China. Do volume total de frangos produzido pelo país, 69% foi destinado ao consumo interno, e 31% para exportações. Com isto, o consumo *per capita* de carne de frango atingiu 45 quilos por pessoa/ano (UBA, 2013).

Mas, para atingir estes resultados, o setor teve que fazer grandes esforços como modernização das instalações, nutrição balanceada, controle sanitário, melhoramento em ambiência, aumento na biosseguridade e melhoramento genético (Simitzis et al., 2012). Entretanto, essa crescente modernização têm também trazido alguns desafios para o setor, principalmente os relacionados ao aproveitamento de subprodutos do sistema, já que estes podem ter graves impactos ambientais quando são incorporados ao meio ambiente.

Um desses subprodutos da atividade avícola é a cama de frango. A falta de tratamento, ou mesmo o tratamento, e a disposição de maneira inadequada deste resíduo pode resultar no aporte excessivo de nutrientes ao meio ambiente, principalmente nitrogênio e fósforo. Esses compostos podem alcançar mananciais de água pelo processo de escoamento superficial, causando eutrofização (Watts et

al., 2011). E em outros casos quando as camas de frango não são bem tratadas e são utilizadas como adubos orgânicos, podem contaminar água e alimentos com bactérias patógenas, representando potencial risco para a saúde pública (Pandey e Soupir, 2011).

Visando complementar mais informação com respeito à cama de frango, foi feita a seguinte revisão de literatura, abordando principalmente os temas relacionados a materiais utilizados na cama de frango, composição final, reutilização, métodos para diminuir a carga microbiana, e efeito da reutilização de cama sobre a saúde pública e na imunidade dos frangos.

Definição de cama de frango e materiais utilizados

A cama de frango ou aquilo que é conhecido em inglês como “litter” é o resultado final da mistura do material vegetal que aloja as aves, que pode ser maravalha de pinus ou eucalipto, casca de arroz, casca de café, entre outros, junto com as fezes, restos de ração, penas das aves, secreções e descamação da pele (Kelley et al., 1996; Liang et al., 2013).

As funções da cama no aviário são absorção da umidade das fezes e também dos equipamentos, o isolamento térmico, evitando a perda de calor da ave para o piso; e absorver o impacto do peso da ave sob uma superfície macia evitando que ocorram lesões de patas e peito das aves (Smith, 1956). Por isso é fundamental que o material que a compõe tenha boa capacidade de absorção e que esteja numa altura adequada.

Vários materiais têm sido utilizados como substrato para a cama de aviário, sendo que, a maravalha é a matéria-prima mais frequentemente usada na avicultura brasileira. Entretanto, materiais alternativos, como casca de arroz, sabugo de milho triturado, capim picado, palha de soja picada, palha de feijão, resto de cultura de milho triturada, serragem, bagaço de cana tem sido utilizados com diversos resultados (Andrews e Mcpherson, 1963; Garcês et al., 2013).

Vários autores (Tabela 1) têm avaliado diferentes materiais utilizados como cama de frango e a maioria destes (Burke et al., 1993; Malone e Gedamu, 1995; Angelo et al., 1997; Bilgili et al., 1999; Grimes et al., 2006; Avila et al., 2008) observaram que os diferentes materiais não afetaram a conversão alimentar de frangos. Entretanto, outros autores (Mizubuti et al., 1994; Anisuzzaman e Chowdhury, 1996; Toghyani et al., 2010; Abreu et al., 2013) observaram diferenças significativas do material utilizado na cama de frangos sobre a conversão alimentar dos mesmos. Entende-se por conversão alimentar o índice fornecido pela relação entre o consumo de alimento e o ganho de peso dos frangos. Uma profunda revisão de literatura sobre matérias para camas de frangos foi feita por Grimes et al. (2002).

Tabela 1 - Influencia na conversão alimentar de frangos de corte de alguns materiais utilizados como cama de aviário.

Material da cama	Influenciou a conversão alimentar	Referência
Maravalha de pinus e papel reciclado.	Não	(Lien et al., 1992)
Jornal picado e maravalha de pinus.	Não	(Burke et al., 1993)
Casca de arroz e capim.	Sim	(Mizubuti et al., 1994)
Papel picado e maravalha.	Não	(Martinez e Gernat, 1995)
Serragem, palha de arroz, areia e casca de arroz.	Sim	(Anisuzzaman e Chowdhury, 1996)
Feno e casca de arroz.	Não	(Angelo et al., 1997)
Maravalha de pinus e folhas de arvores.	Não	(Willis et al., 1997)
Areia e maravalha de pinus.	Não	(Bilgili et al., 1999)
Polpa de citros peletizada.	Não	(Sorbara et al., 2000)
Cepilho de madeira, casca de arroz, casca de café e sabugo de milho triturado.	Não	(Santos et al., 2000)
Fibra de coco picada, maravalha e casca de arroz.	Não	(Swain e Sundaram, 2000)
Cinza de casca de arroz e maravalha.	Não	(Chamblee e Yeatman, 2003)
Resíduos de algodão, gesso e papel de jornal.	Não	(Grimes et al., 2006)
Casca de arroz, bagaço de cana e maravalha.	Não	(Araújo et al., 2007)
Folhas de chá e palha de arroz.	Não	(Atapattu e Wickramasinghe, 2007)
Maravalha, casca de arroz, sabugo de milho triturado, capim picado, palha de soja picada, resto da cultura do milho picado, e serragem.	Não	(Avila et al., 2008)
Areia, maravalha, casca de arroz e papel.	Sim	(Toghyani et al., 2010)
Palha de soja e casca de arroz.	Sim	(Abreu et al., 2013)

Composição final da cama de frango

A cama de frango ao final da criação do lote contém Nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S), além de resíduos de

medicamentos e disruptores endócrinos (DE). Algumas revisões sobre a composição química da cama de frangos foram descritas por Edwards e Daniel (1992) e Sims e Wolf (1994). A alta variabilidade na concentração de nutrientes nas camas de frangos ocorre devido à variação no material vegetal utilizado na cama, manejo da cama, idade das aves, número de reutilizações da cama e ração das aves (Guo e Song, 2009).

Algumas moléculas com função antimicrobiana e anticoccidiana são utilizadas na produção industrial de frangos de corte, geralmente fornecidas na ração das aves e eliminadas por meio das fezes na cama (Hobson-Frohock e Johnson, 1983; Omeira et al., 2006). A concentração destes resíduos químicos nas camas está relacionada com a frequência de fornecimento, taxa de retenção e estabilidade do composto químico (Leal et al., 2012; Bohn et al., 2013; Sun et al., 2013).

As consequências da aplicação de camas contendo resíduos destas moléculas em solos não têm sido avaliadas adequadamente (Bohn et al., 2013), neste contexto é importante ressaltar que um longo processo de compostagem das fezes de frango tem demonstrado diminuir a concentração destas moléculas (Ho et al., 2013).

Outras moléculas que são encontrados nas camas de frango são os disruptores endócrinos (DE), estes são um grupo de compostos de origem sintética ou natural e incluem vários hormônios excretados pelas fezes dos animais, assim como, pesticidas, herbicidas, fito-estrógenos que podem interagir com o sistema endócrino (Powers e Angel, 2008).

Os frangos de corte podem produzir e excretar DE na forma de hormônios esteroides endógenos (produzidos pelo próprio frango) e algumas pesquisas (Hanselman et al., 2003; Jenkins et al., 2006), tem mostrado que camas de frangos contêm 17β -estradiol, estrógenos, testosterona, e que podem persistir nestas camas em concentrações mensuráveis, embora o impacto destes compostos no meio ambiente ainda é desconhecido (Salierno et al., 2012).

Alguns trabalhos (Jenkins et al., 2006; Jenkins et al., 2009) referentes à utilização de camas de frangos em solos mostraram que os hormônios endógenos 17β -estradiol e testosterona parecem não apresentar um risco para a drenagem subterrânea e do escoamento superficial. Também, tem se observado de maneira inexplicável que a inclusão de fitases na dieta dos frangos incrementa a concentração de 17β -estradiol na cama (Delaune e Moore Jr, 2013). Estes autores afirmaram que são necessárias mais pesquisas para esclarecer se existe uma relação direta da dieta com o 17β -estradiol liberado nas fezes.

Quantificação da cama no final de lotes de frangos

A quantidade de cama produzida por um aviário de frango depende do material vegetal utilizado como suporte, consumo de ração, digestibilidade, manejo dos frangos, entre outros, (Malone, 1992; Coufal et al., 2006). A produção média diária de fezes pelos frangos de corte é de 43 kg/1000 quilos de peso vivo, este valor de fezes em matéria seca equivale a 6,9 kg/1000 quilos de peso vivo. Segundo Bolan et al. (2010), 1000 frangos em 42 dias podem produzir entre 0.7-2 toneladas de cama. Coufal et al. (2006), observaram a produção média de 228 gramas de

cama em matéria seca por cada 1000 gramas de peso vivo avaliando 18 lotes de frangos consecutivos, o que equivale a aproximadamente 15 toneladas de resíduo final em matéria seca.

Em comunicação pessoal, Alexandre de Souza, gerente de unidade da JBS Foods (Souza, 2013), descreve que, um aviário com 2100m² de área, com uma capacidade de criação de 30.000 frangos precisa 147 m³ de material vegetal (maravalha, casca de café, etc.) para alojar os pintinhos do primeiro lote. Isso é equivalente a 10,5 toneladas de material vegetal, e, após 42 dias de criação este material vegetal é transformado em aproximadamente 40 toneladas de cama em um primeiro lote, esse incremento é devido à inclusão de fezes, principalmente.

Carga microbiana na cama de frango

A cama de frango alberga uma diversidade muito grande de microrganismos, entre eles vírus, bactérias, fungos e protozoários. Para se ter uma ideia da quantidade, somente a concentração de bactérias pode exceder as 10¹⁰ UFC/g (Unidades formadoras de colônias por grama) de cama (Terzich et al., 2000; Rothrock et al., 2008a). Estes números podem variar conforme alguns fatores como idade das aves e material da cama (Macklin et al., 2005).

Dentro destas bactérias totais o gênero Gram positivo ocupa perto de 90% da população presente nas camas (Lu et al., 2003; Lovanh et al., 2007). De modo geral dois grupos de bactérias tem interesse na comunidade científica: o grupo de

bactérias que produzem gases tóxicos (Dumas et al., 2011), e aquelas com potencial patogênico (Fries et al., 2005).

No primeiro grupo encontram-se bactérias com diferentes atividades enzimáticas, responsáveis pela degradação de nitrogênio e emissão de amônia ao meio ambiente (Rothrock et al., 2008a). No segundo grupo encontram-se as bactérias que podem causar doença nas aves e em seres humanos, algumas como, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus* spp., *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. (Kelley et al., 1995; Line, 2002). Alguns dos trabalhos onde foram avaliadas bactérias patogênicas em camas de frango estão na tabela 2.

Tabela 2 – Distribuição de bactérias patogênicas em amostras de camas de frango isoladas com microbiologia tradicional.

Referência	(N) Amostras	Reutilizada	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	<i>Clostridium</i> spp.	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp
(Alexander et al., 1968)	44	Não	100%	NA	52%	NA	7%
(Lu et al., 2003)	20	Sim	13%	NA	7,78%	NA	0,00%
(Omeira et al., 2006)	24	NI	80%	42%	8%	NA	7,3%
(Dhanarani et al., 2009)	NI	Sim	29,1%	12,5%	NA	NA	8,3%
(Cressman et al., 2010)	24	Sim	19,2%	NA	NA	NA	NA

NA = Não analisado NI = Não informado

Staphylococcus

Bactérias do gênero *Staphylococcus* têm sido frequentemente observadas em altas concentrações em camas de frango. Alexander et al. (1968) isolaram *Staphylococcus* de 100% das camas analisadas e Omeira et al. (2006) observaram

que mais do 80% das bactérias totais das camas de frangos correspondiam a *Staphylococcus*, ambos estudos trabalhando com métodos tradicionais de cultivo microbiológico. Já Lu et al. (2003) isolaram 13% de *Staphylococcus* por métodos de cultivo tradicional e acharam 33% por sequenciamento gênico, Dhanarani et al. (2009) acharam por cultivo tradicional que 29,1% das bactérias presentes nas camas eram *Staphylococcus* e por sua parte Cressman et al. (2010) observaram, em camas reusadas, por meio de provas moleculares que *Staphylococcus* representava 19,2% da microbiota.

Escherichia coli

Dhanarani et al. (2009) observaram que do total de bactérias presentes nas camas dos frangos, *E. coli* representava 12,5%. A contagem de *E. coli* em camas de frangos tem sido reportada entre 10^5 e 10^{10} com uma média de 10^9 UFC/g de cama (Terzich et al., 2000). Estes números são maiores aos reportados por Martin et al. (1998), onde os autores analisaram 86 amostras de cama, das quais, somente duas foram positivas para *E. coli*.

Campylobacter

O microrganismo presente na cama de frangos pode infectar aves susceptíveis (Montrose et al., 1985), embora o isolamento de *Campylobacter* em camas de frangos é pouco frequente. Em estudos moleculares não foi achado *Campylobacter* em camas de frango (Lu et al., 2003; Dumas et al., 2011). Em outros

trabalhos também foi evidente a pouca recuperação do microrganismo a partir de amostras de cama (Chinivasagam et al., 2010; Thakur et al., 2013). Estes achados demonstram que o microrganismo tem pouca capacidade de se manter viável durante muito tempo na cama de frangos.

Clostridium

O gênero *Clostridium* é outro importante grupo de bactérias frequentemente isolado de camas de frangos. Alexander et al. (1968), isolaram *Clostridium* spp. em 23 de 44 camas (52%), e acharam *Clostridium perfringens* em 8 de 44 amostras de camas. Por outro lado Lu et al. (2003), por meio do análise do gene 16S rRNA encontraram 7,78% de *Clostridium* spp em amostras de camas. Cressman et al. (2010) observaram nas camas novas uma alta presença do gênero *Clostridium* spp, e nas camas reutilizadas maior presença de *Lactobacillus* e *Staphylococcus*.

Salmonella

Enticknap et al. (2006) não identificaram *Salmonella* em camas com três dias de compostagem. Já Rothrock et al. (2008b), observaram uma concentração muito baixa de *Salmonella* ($<5 \times 10^3$ células/g de cama) em camas reutilizadas por cinco lotes consecutivos de frango.

Chinivasagam et al. (2010) acharam níveis muito baixos de *Salmonella* em 80% de granjas utilizando camas de segundo reuso. Em 2012, Chinivasagam et al. (2012) comparando a concentração de *Salmonella* em camas novas e reutilizadas,

verificaram que em camas novas a quantidade de *Salmonella* encontrada foi de 10^4 e 10^5 UFC/g de cama aos 5 e 11 dias após o alojamento, enquanto que não foi isolado esse microrganismo em camas reutilizadas por dois lotes neste mesmo período. Finalmente, Thakur et al. (2013) observaram 28% de presença de *Salmonella* em camas reusadas de um total de 10 granjas avaliadas no estudo. Estes trabalhos são uma boa evidencia que *Salmonella* tem uma baixa sobrevivência em camas de frango, sendo ainda mais baixa quando as camas são reutilizadas.

Reutilização da cama

No Brasil a cama de frango foi fornecida para ruminantes por muito tempo, porém, devido aos problemas sanitários ocorridos na Europa em 2001, como a encefalopatia espongiforme bovina, o Ministério da Agricultura e Pecuária publicou uma Instrução Normativa (Brasil, 2001) proibindo, entre outros, a comercialização da cama de frango com a finalidade de alimentação para ruminantes.

Com esta proibição, o destino para cama de frango tornou-se restrito à aplicação como adubo para lavouras, sendo assim são necessárias maiores pesquisas com objetivo de estudar alternativas para o aproveitamento deste resíduo, como por exemplo, na produção de energia (Kelleher et al., 2002; Lynch et al., 2013), ou minhocultura (Turnell et al., 2007). Nesse cenário, a reutilização da cama é uma alternativa viável para diminuir o impacto ambiental provindo do acúmulo deste resíduo. Apesar deste processo de reutilização de cama ocorrer de forma mais intensificada nestes últimos anos, existem trabalhos de mais de 30 anos mostrando

a prática da reutilização e suas vantagens (Kennard e Chamberlin, 1948; Jones e Hagler, 1983).

A reutilização da cama dos frangos de corte por vários lotes, após o manejo adequado, tem duas vantagens principais que são redução do impacto ambiental e os custos de produção. A queda da demanda por matérias vegetais como maravalha, evita o desmatamento de árvores e torna a avicultura um sistema ambientalmente sustentável (Pote et al., 2011; Roll et al., 2011; Watts et al., 2011). A reutilização da cama diminui a compra de novos materiais para cama a cada lote, reduzindo assim o custo de produção (Lopes et al., 2013).

A principal dúvida quanto ao período ou número de lotes em que seria possível reutilizar a mesma cama está relacionada ao aspecto sanitário. Não é recomendável reutilizar a cama quando o lote anterior passou por algum desafio sanitário relevante. Nesse caso, a limpeza, a desinfecção do galpão, o vazio sanitário e a colocação de cama nova são processos fundamentais antes de alojar o novo lote (Muniz et al., 2014).

Segundo Malone (1992) e Brake et al. (1993), a cama pode ser reutilizada de 1 a 6 vezes sem que haja diferenças significativas no que se refere à mortalidade, ganho de peso, consumo de ração, eficiência alimentar e qualidade das carcaças. Mas, para reutilizar estas camas é necessário o manejo adequado deste material entre lotes, com a finalidade de diminuir a carga microbológica, evitando assim a infecção dos lotes novos criados na cama reutilizada (Thaxton et al., 2003). Por isso, o manejo destas camas entre lotes é uma medida importante nas boas práticas de produção avícola (Pope e Cherry, 2000; Larrison et al., 2010).

Vários processos para o manejo da cama entre lotes têm sido reportados na literatura científica como efetivos na diminuição de patógenos, entre eles o tratamento da cama com cal virgem (Pra et al., 2009), compostagem (Macklin et al., 2006) e bissulfito de sódio (Williams et al., 2012). Entretanto, muitos aspectos relacionados com potencial risco sanitário associado a esta prática são discutidos, principalmente por países da União Europeia, os quais trocam a cama dos frangos a cada lote novo.

Métodos de tratamento em camas reutilizadas para diminuir a carga microbiana

Várias metodologias têm sido empregadas para o tratamento de camas durante o período de vazio sanitário e que serão reutilizadas. A seguir serão descritos os principais métodos utilizados e um resumo destes está na tabela 3.

Uso de acidificantes

O uso de produtos acidificantes tem como objetivo reduzir o pH da cama até níveis que gerem um ambiente pouco favorável à multiplicação das bactérias (Line e Bailey, 2006). Inicialmente estes produtos foram desenvolvidos para diminuir a volatilização da amônia e a solubilidade do potássio em camas de frangos (Kim e Choi, 2009).

Nesse contexto, em trabalhos conduzidos em laboratório, Ivanov (2001) observou que o tratamento de camas de frangos com ácido cítrico (5%), ácido

tartárico (4%) e ácido salicílico (1,5%) inibiram o crescimento de *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis.

Tabela 3 - Principais métodos utilizados para diminuir carga microbiana em camas reutilizadas.

Uso de condicionadores de cama	Acidificantes	Bissulfato de sódio	(Pope e Cherry, 2000)
			(Line, 2002)
			(Payne et al., 2002)
			(Line e Bailey, 2006)
			(Williams et al., 2012)
		Sulfato de alumínio	(Line, 2002)
			(Line e Bailey, 2006)
			(Rothrock et al., 2008b)
		Ácido sulfúrico	(Payne et al., 2002)
			(Vicente et al., 2007)
Ácidos orgânicos	(Ivanov, 2001)		
	Alcalinizantes	Cal hidratada	(Bennett et al., 2005)
			Cal virgem
		(Ruiz et al., 2008)	
		(Pra et al., 2009)	
		(Stringfellow et al., 2010)	
		(Roll et al., 2011)	
		(Lopes et al., 2013)	
Processos biológicos	Compostagem		(Kwak et al., 2005)
			(Lavergne et al., 2006)
			(Macklin et al., 2006)
			(Macklin et al., 2008)
			(Barker et al., 2011)
		Fermentação	(Silva et al., 2007)
	(Muniz et al., 2014)		
Outros	Formol	(Williams, 1980)	

Pope e Cherry (2000) trataram a cama de frango com bissulfato de sódio e tiveram médias significativamente menores na contagem de bactérias totais e *Escherichia coli* nas camas tratadas em relação às não tratadas. Line (2002), no seu estudo observou redução significativa da frequência da colonização de *Campylobacter* spp. no ceco de aves criadas em camas tratadas com diferentes doses de sulfato de alumínio e bissulfato de sódio onde, previamente, foram alojadas aves inoculadas com a bactéria.

Line e Bailey (2006) também utilizaram sulfato de alumínio e bissulfato de sódio, porém nas condições de granjas comerciais, e verificaram queda da colonização de *Campylobacter* spp. entre a cama tratada com ambos os produtos e a não tratada. Por sua vez, Oliveira et al. (2003), concluíram que o sulfato de alumínio pode atuar como acidificante em cama de frango em reutilização, diferente do gesso agrícola, cal hidratada e superfosfato simples.

Vicente et al. (2007) observaram que um acidificante à base de ácido sulfúrico (40%) em duas doses diferentes, 815g/2.27m² e 1631 g/2.27m² diminuíram a transmissão horizontal de *Salmonella* Enteritidis aos 11, mas não aos 21 dias de idade das aves em relação às aves da cama controle não tratada.

Entretanto, Payne et al. (2002) observaram que para poder atingir níveis baixos na contagem de *Salmonella* Typhimurium em camas tratadas com bissulfato de sódio e ácido sulfúrico, era necessário utilizar o produto em doses duas vezes acima das recomendadas pelo fabricante, quando estas apresentaram significativa redução de pH quando comparadas as camas não tratadas. Já, Williams et al. (2012) não observaram redução significativa na contagem de *Salmonella* spp. em

camas tratadas somente com bissulfato de sódio na dose de 68,0 kg/92,9 m². Em ambos os casos os autores afirmaram que a falta de efeito destes ácidos sobre a *Salmonella* seja devido ao mecanismo de resistência a ácidos, desenvolvido por estas bactérias (Bearson et al., 1997).

Uso de alcalinizantes

A utilização da cal nas suas diferentes apresentações tem sido avaliada com o principal objetivo de manter o pH da cama acima de 7, condição que também é prejudicial para os microrganismos (Stringfellow et al., 2010). Segundo Oliveira et al. (2004), o uso da cal hidratada [Ca(OH)₂] promove valor de pH da cama significativamente maior no 1º lote de criação em relação aos tratamentos com sulfato de alumínio, gesso agrícola e superfosfato simples, porém o valor foi semelhante à cama não tratada na reutilização nos 2 lotes subsequentes de criação, entretanto estes autores não avaliaram o efeito sobre os microrganismos.

Ruiz et al. (2008) submeteram cama, utilizada previamente por dois lotes de frangos, ao tratamento com óxido de cálcio (CaO – cal virgem). As camas foram submetidas ao empilhamento, individualmente, e foram reviradas uma vez ao dia durante 10 dias consecutivos. Os tratamentos da cama com a cal virgem promoveram pH mais elevados (aproximadamente 12), no primeiro dia de tratamento, e se mantiveram mais elevados até o 10º dia em relação às camas não tratadas. Os autores observaram também diminuição considerável na contagem total de bactérias aeróbias nas camas tratadas.

Da mesma maneira, Pra et al. (2009), observaram redução significativa de *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp. em camas de aviário tratadas com cal virgem. Os valores médios observados para o pH da cama após o 12º dia de aplicação de cal virgem foram entre 8,95 e 11,11. O número mais provável Log10 (UFC) de *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp foi reduzido em 82 e 97% com a aplicação de cal na dosagem de 300g/ m² e 100% na dosagem de 600 e 900g/ m², ambos diferindo significativamente em relação a mesma cama antes do tratamento.

Compostagem

A compostagem é um método que tira proveito da produção espontânea de calor por causa do metabolismo microbiológico que se instala na cama. No processo real de compostagem ocorre degradação aeróbica do resíduo orgânico, durante 4 a 6 semanas, e, ao final do período, a matéria orgânica se encontra estabilizada (Kelleher et al., 2002). No método empregado no setor avícola, entretanto, o tempo em que a cama fica em compostagem é bem menor, 4 a 17 dias, não ocorrendo a estabilização da matéria, porém esse manejo da cama pode ser considerado como um método que promove a redução da quantidade de bactérias em aviários no intervalo entre lotes (Macklin et al., 2006).

Devido a esse processo, utilizado a campo, não ser realmente uma verdadeira compostagem, têm se proposto alguns nomes para se referir à pratica de amontoar a cama em pilhas e deixar que a temperatura aumente, alguns deles são: amontoamento profundo “*deepstacking*” (Kwak et al., 2005), empilhamento “*in-*

house windrowing" (Barker et al., 2011), pasteurização "*pasteurization*" (Lavergne et al., 2006).

No estudo de Macklin et al. (2006) foi observado que a compostagem em leiras de aproximadamente 0,9m de altura, comprimento variando de 1,5 a 1,0m e largura de 0,7 a 0,5m, a temperatura interna atingia 50°C entre 32 a 42h e se mantinham por pelo menos 12h. Estes autores observaram na análise microbiológica diminuição significativa na a contagem de bactérias aeróbicas.

Em outro estudo, Macklin et al. (2008) criando pilhas de camas de dimensões de 1 x 1 x 1 m e também camas não empilhadas (mantidas com 8 cm de camada), durante 7 dias, verificaram eliminação completa de *Salmonella* nas camas empilhadas, enquanto este agente ainda era isolado nas camas não empilhadas. Os autores salientaram que as temperaturas internas de 50°C nas pilhas de cama e sua manutenção por 1 a 2 dias são fundamentais para inativar bactérias, vírus, fungos.

Fermentação

Fermentação é o processo metabólico que ocorre em condições anaeróbicas e envolve reações em que o substrato orgânico é convertido em uma forma mais reduzida, por exemplo, a conversão de glicose em etanol e CO₂, sendo os carboidratos os substratos mais adequados para a fermentação (Müller et al., 2012). No Brasil, de acordo com Silva et al. (2007), se denomina fermentação da cama ao processo pelo qual a cama do aviário em sua totalidade, após a saída das aves, é molhada e coberta com uma lona plástica durante o período de 10 dias.

Porém, em outros países o uso do termo fermentação de cama é bastante questionado, pois, de acordo com a definição conceitual é necessário conhecer as bactérias responsáveis, as vias metabólicas, os produtos finais do processo (álcool, ácidos, etc.). Assim esse processo de cobrir as camas de frango com uma lona plástica durante o período de vazío sanitário, apesar de promover a diminuição de bactérias patógenas (Muniz et al., 2014), deve ser questionado quanto ao fato de ser considerado um processo de fermentação.

Embora se saiba que a metodologia de colocar uma lona plástica acima da cama possa promover um estado de anaerobiose, e ainda, que algumas espécies de fungos como *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus nidulans* são capazes de produzir amônia por fermentação (Takasaki et al., 2004), são necessárias mais provas para denominar este como um processo de fermentação.

Neste contexto é importante mostrar com evidência científica que esta metodologia aplicada para reutilização da cama é segura e que existe todo um conhecimento como base para classificá-la como fermentação. A ausência de conhecimento dos gêneros de bactérias ou fungos envolvidos, produtos formados, entre outros evidenciam que ainda é cedo para chamar este processo de fermentação, sugerindo que o mesmo seja chamado por enquanto de cobertura da cama.

Finalmente, enquanto à capacidade da metodologia para diminuir o crescimento bacteriano, Silva et al. (2007) observaram significativa redução de enterobactérias nas camas tratadas. Muniz et al. (2014) observaram diminuição de *Salmonella* spp. em camas reutilizadas e cobertas por 7 dias,. Já no trabalho de

Resende (2010), não foi avaliado o efeito bactericida do processo, porém, foram avaliados os parâmetros físicos e químicos durante a cobertura das camas, sendo observadas concentrações superiores a 300 ppm de amônia nas camas cobertas com lona plástica, versus 60 ppm das camas descobertas. Isso sugere que provavelmente a amônia seja o principal composto envolvido em reduzir bactérias patogênicas na cama.

No que se refere a outras alternativas para diminuir a carga bacteriana em camas de frango, no estudo de Williams (1980) foi observado que 500 mL/0,37m² de uma solução de formol 6% podia eliminar *Salmonella* Typhimurium das camas de frangos.

Cama e saúde pública

A cama de frango possui alto número de microrganismos, incluindo bactérias da família Enterobacteriaceae (Fries et al., 2005), e outras bactérias responsáveis por zoonoses como, por exemplo, *Salmonella* Enteritidis (Cook et al., 2012) e cepas de *Escherichia coli* patogênica (Scallan et al., 2011).

A transferência destes patógenos na cadeia alimentícia pode acontecer quando no abatedouro as carcaças dos frangos são contaminadas, acidentalmente, com conteúdo do papo ou do intestino (Haapapuro et al., 1997). Ou ainda, quando, estas camas de frango são aplicadas no solo como adubos orgânicos, resultando assim na possível contaminação dos produtos vegetais frescos (Lovanh et al., 2007; Volkova et al., 2009).

Vários autores (Macklin et al., 2006; Macklin et al., 2008; Pra et al., 2009; Cressman et al., 2010; Roll et al., 2011; Chinivasagam et al., 2012; Wei et al., 2013; Muniz et al., 2014) concordam que o tratamento e reutilização da cama reduzem a presença de patógenos em cama de frango. Embora outros autores (Kelley et al., 1995; Sonoda et al., 2012) não observaram diminuição de bactérias patogênicas em camas tratadas e reutilizadas.

Influência do tipo de cama na resposta imune de frangos de corte

Poucos trabalhos são encontrados na literatura científica sobre a resposta imune de frangos alojados em camas novas ou reutilizadas, todos em geral apontam que a microbiota presente nestas camas poderia chegar a afetar a microbiota intestinal das aves, e com isso a resposta imune local e geral.

Por este motivo Lee et al. (2011) avaliaram a resposta imunológica de frangos alojados em cama nova e outros alojados em camas reutilizadas com e sem história de surto de *Clostridium perfringens*, os parâmetros avaliados foram óxido nítrico sanguíneo, títulos de anticorpos contra *Clostridium*, perfil de células imunes intestinais como linfócitos CD4+, CD8+. Estes autores concluíram que o contato de aves com camas reutilizadas aumentou os parâmetros tanto da resposta humoral como celular, possivelmente devido ao contato das aves com patógenos entéricos.

Shanmugasundaram et al. (2012) avaliaram a resposta imune de frangos alojados em camas reutilizadas por três lotes consecutivos sem histórico de problemas sanitários. Foram avaliadas citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4) e

pró-inflamatórias (IL-1) na tonsila cecal, assim como CD4+ e CD25+ nas tonsilas cecais. Foi observado que frangos alojados em camas reutilizadas expressaram mais IL-1, IL-4, e as aves alojadas em camas novas expressaram mais IL-10.

Como ainda são poucos os trabalhos avaliando este aspecto imunológico de frangos criados em camas novas e reutilizadas, e, sobretudo, o conhecimento de seu efeito sobre o desempenho destes animais, são necessários mais estudos para melhor se esclarecer esta relação da cama com a saúde de frangos.

CONCLUSÕES

Os trabalhos demonstram que a reutilização das camas, quando utilizando corretamente uma metodologia de tratamento, é uma prática segura que promove a diminuição de bactérias patogênicas.

A reutilização da cama é uma alternativa viável que diminui o impacto ambiental e custos de produção.

Entretanto ainda se faz necessário mais estudos sobre o impacto desta reutilização das camas no que se refere a emissões de gases como amônia, impacto quando usadas como adubos e ainda, seu efeito no desempenho, saúde e bem-estar dos frangos criados sobre estas camas.

REFERÊNCIAS

ABREU, N. V. M.; ABREU, P. G.; PAIVA, P. D. et al. **Evaluation of soybean straw as litter material in poultry production and substrate in composting of broiler carcasses.** 2013.

ALEXANDER, D. C.; CARRIÈRE, J. A.; MCKAY, K. A. Bacteriological studies of poultry litter fed to livestock. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 9, n. 6, p. 127–131 1968.

ANDREWS, L. D.; MCPHERSON, B. N. Comparison of Different Types of Materials for Broiler Litter. **Poultry Science**, v. 42, n. 1, p. 249-254 1963.

ANGELO, J. C.; GONZALES, E.; KONDO, N. et al. Material da cama: Qualidade, quantidade e efeito sobre o desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, n. 1, p. 121-130 1997.

ANISUZZAMAN, M.; CHOWDHURY, S. D. Use of four types of litter for rearing broilers. **British Poultry Science**, v. 37, n. 3, p. 541-545 1996.

ARAÚJO, J. D. S.; OLIVEIRA, V. D. D.; BRAGA, G. C. Desempenho de frangos de corte criados em diferentes tipos de cama e taxa de lotação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 1, p. 59-64 2007.

ATAPATTU, N. S. B. M.; WICKRAMASINGHE, K. P. The use of refused tea as litter material for broiler chickens. **Poultry Science**, v. 86, n. 5, p. 968-972 2007.

AVILA, V. S. D.; OLIVEIRA, U. D.; FIGUEIREDO, E. A. P. D. et al. Avaliação de materiais alternativos em substituição à maravalha como cama de aviário. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 273-277 2008.

BARKER, K. J.; COUFAL, C. D.; PURSWELL, J. L. et al. In-house windrowing of a commercial broiler farm during the summer months and its effect on litter composition. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 20, n. 2, p. 168-180 2011.

BEARSON, S.; BEARSON, B.; FOSTER, J. W. Acid stress responses in enterobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 147, n. 2, p. 173-180 1997.

BENNETT, D. S.; HIGGINS, S. E.; MOORE, R. et al. Effect of addition of hydrated lime to litter on recovery of selected bacteria and poult performance. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 14, n. 4, p. 721-727 2005.

BILGILI, S. F.; MONTENEGRO, G. I.; HESS, J. B. et al. Sand as litter for rearing broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 8, n. 3, p. 345-351 1999.

BOHN, P.; BAK, S. A.; BJÖRKLUND, E. et al. Abiotic degradation of antibiotic ionophores. **Environmental Pollution**, v. 182, n. 0, p. 177-183 2013.

BOLAN, N. S.; SZOGI, A. A.; CHUASAVATHI, T. et al. Uses and management of poultry litter. **World's Poultry Science Journal**, v. 66, n. 04, p. 673-698 2010.

BRAKE, J. D.; FULLER, M. J.; BOYLE, C. R. et al. Evaluations of whole chopped kenaf and kenaf core used as a broiler litter material. **Poultry Science**, v. 72, n. 11, p. 2079-2083 1993.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 15. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, v. Brasília 2001.

BURKE, G. B.; PESCATORE, A. J.; CANTOR, A. H. et al. Newspaper as litter material and its effects on the performance of broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 2, n. 2, p. 154-158 1993.

COOK, A.; ODUMERU, J.; LEE, S. et al. *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, verotoxigenic *Escherichia coli*, and *Escherichia coli* prevalence, enumeration, and subtypes on retail chicken breasts with and without skin. **Journal Food Protection**, v. 75, n. 1, p. 34-40 2012.

COUFAL, C.; CHAVEZ, C.; NIEMEYER, P. et al. Measurement of broiler litter production rates and nutrient content using recycled litter. **Poultry Science**, v. 85, n. 3, p. 398-403 2006.

CRESSMAN, M. D.; YU, Z.; NELSON, M. C. et al. Interrelations between the microbiotas in the litter and in the intestines of commercial broiler chickens. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6572-82 2010.

CHAMBLEE, T. N.; YEATMAN, J. B. Evaluation of rice hull ash as broiler litter. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 12, n. 4, p. 424-427 2003.

CHINIVASAGAM, H. N.; REDDING, M.; RUNGE, G. et al. Presence and incidence of food-borne pathogens in Australian chicken litter. **British Poultry Science**, v. 51, n. 3, p. 311-318 2010.

CHINIVASAGAM, H. N.; TRAN, T.; BLACKALL, P. J. Impact of the Australian litter re-use practice on *Salmonella* in the broiler farming environment. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 891-896 2012.

DELAUNE, P. B.; MOORE JR, P. A. 17 β -estradiol in runoff as affected by various poultry litter application strategies. **Science of The Total Environment**, v. 444, n. 0, p. 26-31 2013.

DHANARANI, T. S.; SHANKAR, C.; PARK, J. et al. Study on acquisition of bacterial antibiotic resistance determinants in poultry litter. **Poultry Science**, v. 88, n. 7, p. 1381-1387 2009.

DUMAS, M. D.; POLSON, S. W.; RITTER, D. et al. Impacts of poultry house environment on poultry litter bacterial community composition. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. 1-12 2011.

EDWARDS, D. R.; DANIEL, T. C. Environmental impacts of on-farm poultry waste disposal — A review. **Bioresource Technology**, v. 41, n. 1, p. 9-33 1992.

ENTICKNAP, J. J.; NONOGAKI, H.; PLACE, A. R. et al. Microbial diversity associated with odor modification for production of fertilizers from chicken litter. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 4105-4114 2006.

FRIES, R.; AKCAN, M.; BANDICK, N. et al. Microflora of two different types of poultry litter. **British Poultry Science**, v. 46, n. 6, p. 668-72 2005.

GARCÊS, A.; AFONSO, S. M. S.; CHILUNDO, A. et al. Evaluation of different litter materials for broiler production in a hot and humid environment: 1. Litter characteristics and quality. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 2, p. 168-176 2013.

GRIMES, J.; CARTER, T.; GODWIN, J. Use of a litter material made from cotton waste, gypsum, and old newsprint for rearing broiler chickens. **Poultry Science**, v. 85, n. 3, p. 563-568 2006.

GRIMES, J. L.; SMITHI, J.; WILLIAMS, C. M. Some alternative litter materials used for growing broilers and turkeys. **World's Poultry Science Journal**, v. 58, n. 04, p. 515-526 2002.

GUO, M.; SONG, W. Nutrient value of alum-treated poultry litter for land application. **Poultry Science**, v. 88, n. 9, p. 1782-1792 2009.

HAAPAPURO, E. R.; BARNARD, N. D.; SIMON, M. Review--animal waste used as livestock feed: dangers to human health. **Preventive Medicine**, v. 26, n. 5 Pt 1, p. 599-602 1997.

HANSELMAN, T. A.; GRAETZ, D. A.; WILKIE, A. C. Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: A review. **Environmental Science Technology**, v. 37, n. 24, p. 5471-5478 2003.

HO, Y. B.; ZAKARIA, M. P.; LATIF, P. A. et al. Degradation of veterinary antibiotics and hormone during broiler manure composting. **Bioresource Technology**, v. 131, n. 0, p. 476-484 2013.

HOBSON-FROHOCK, A.; JOHNSON, H. A. Coccidiostat residues in poultry excreta. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 34, n. 1, p. 37-44 1983.

IVANOV, I. E. Treatment of broiler litter with organic acids. **Research in Veterinary Science**, v. 70, n. 2, p. 169-173 2001.

JENKINS, M. B.; ENDALE, D. M.; SCHOMBERG, H. H. et al. 17β -Estradiol and testosterone in drainage and runoff from poultry litter applications to tilled and no-till crop land under irrigation. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 8, p. 2659-2664 2009.

JENKINS, M. B.; ENDALE, D. M.; SCHOMBERG, H. H. et al. Fecal bacteria and sex hormones in soil and runoff from cropped watersheds amended with poultry litter. **Science of The Total Environment**, v. 358, n. 1-3, p. 164-177 2006.

JONES, F. T.; HAGLER, W. M. Observations on new and reused litter for growing broilers. **Poultry Science**, v. 62, n. 1, p. 175-179 1983.

KELLEHER, B. P.; LEAHY, J. J.; HENIHAN, A. M. et al. Advances in poultry litter disposal technology--a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 27-36 2002.

KELLEY, T. R.; PANCORBO, O. C.; MERKA, W. C. et al. Bacterial pathogens and indicators in poultry litter during re-utilization. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 4, n. 4, p. 366-373 1995.

KELLEY, T. R.; PANCORBO, O. C.; MERKA, W. C. et al. Elemental concentrations of stored whole and fractionated broiler litter. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 5, n. 3, p. 276-281 1996.

KENNARD, D. C.; CHAMBERLIN, V. D. Built-up floor litter as a source of dietary factors essential for the growth of chickens. **Poultry Science**, v. 27, n. 2, p. 240-243 1948.

KIM, Y. J.; CHOI, I. H. Effect of alum and liquid alum on pH, EC, moisture, ammonium and soluble phosphorus contents in poultry litter during short term: A laboratory experiment. **The Journal of Poultry Science**, v. 46, n. 1, p. 63-67 2009.

KWAK, W. S.; HUH, J. W.; MCCASKEY, T. A. Effect of processing time on enteric bacteria survival and on temperature and chemical composition of broiler poultry litter processed by two methods. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 14, p. 1529-1536 2005.

LARRISON, E. L.; BYRD, J. A.; DAVIS, M. A. Effects of litter amendments on broiler growth characteristics and *Salmonella* colonization in the crop and cecum. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 19, n. 2, p. 132-136 2010.

LAVERGNE, T. K.; STEPHENS, M. F.; SCHELLINGER, D. et al. In-house pasteurization of broiler litter. **Louisiana State University Agricultural Center**, v. 2955, p. 1-16 2006.

LEAL, R. M. P.; FIGUEIRA, R. F.; TORNISIELO, V. L. et al. Occurrence and sorption of fluoroquinolones in poultry litters and soils from São Paulo State, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 432, n. 0, p. 344-349 2012.

LEE, K. W.; LILLEHOJ, H. S.; LEE, S. H. et al. Impact of fresh or used litter on the posthatch immune system of commercial broilers. **Avian Diseases**, v. 55, n. 4, p. 539-44 2011.

LIANG, W.-Z.; CLASSEN, J.; SHAH, S. et al. Ammonia fate and transport mechanisms in broiler litter. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 225, n. 1, p. 1-9 2013.

LIEN, R. J.; CONNER, D. E.; BILGILI, S. F. The use of recycled paper chips as litter material for rearing broiler chickens. **Poultry Science**, v. 71, n. 1, p. 81-87 1992.

LINE, J. E. *Campylobacter* and *Salmonella* populations associated with chickens raised on acidified litter. **Poultry Science**, v. 81, n. 10, p. 1473-1477 2002.

LINE, J. E.; BAILEY, J. S. Effect of on-farm litter acidification treatments on *Campylobacter* and *Salmonella* populations in commercial broiler houses in northeast Georgia. **Poultry Science**, v. 85, n. 9, p. 1529-1534 2006.

LOPES, M.; ROLL, V. F. B.; LEITE, F. L. et al. Quicklime treatment and stirring of different poultry litter substrates for reducing pathogenic bacteria counts. **Poultry Science**, v. 92, n. 3, p. 638-644 2013.

LOVANH, N.; COOK, K. L.; ROTHROCK, M. J. et al. Spatial shifts in microbial population structure within poultry litter associated with physicochemical properties. **Poultry Science**, v. 86, n. 9, p. 1840-9 2007.

LU, J.; SANCHEZ, S.; HOFACRE, C. et al. Evaluation of broiler litter with reference to the microbial composition as assessed by using 16S rRNA and functional gene markers. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 901-8 2003.

LYNCH, D.; HENIHAN, A. M.; BOWEN, B. et al. Utilisation of poultry litter as an energy feedstock. **Biomass and Bioenergy**, v. 49, n. 0, p. 197-204 2013.

MACKLIN, K. S.; HESS, J. B.; BILGILI, S. F. In-house windrow composting and its effects on foodborne pathogens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 17, n. 1, p. 121-127 2008.

MACKLIN, K. S.; HESS, J. B.; BILGILI, S. F. et al. Bacterial levels of pine shavings and sand used as poultry litter. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 14, n. 2, p. 238-245 2005.

MACKLIN, K. S.; HESS, J. B.; BILGILI, S. F. et al. Effects of in-house composting of litter on bacterial levels. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 15, n. 4, p. 531-537 2006.

MAGUIRE, R. O.; HESTERBERG, D.; GERNAT, A. et al. Liming poultry manures to decrease soluble phosphorus and suppress the bacteria population. **Journal of Environmental Quality**, v. 35, n. 3, p. 849-857 2006.

MALONE, G. W. Nutrient enrichment in integrated broiler production systems. **Poultry Science**, v. 71, n. 7, p. 1117-1122 1992.

MALONE, G. W.; GEDAMU, N. Pelleted newspaper as a broiler litter material. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 4, n. 1, p. 49-54 1995.

MARTIN, S. A.; MCCANN, M. A.; WALTMAN, W. D. Microbiological survey of Georgia poultry litter. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 7, n. 1, p. 90-98 1998.

MARTINEZ, D. F.; GERNAT, A. G. The effect of chopped computer and bond paper mixed with wood shavings as a litter material on broiler performance. **Poultry Science**, v. 74, n. 8, p. 1395-1399 1995.

MIZUBUTI, I. Y.; FONSECA, N. A. N.; PINHEIRO, J. W. Desempenho de duas linhagens de frangos de corte criadas sob diferentes densidades populacionais e diferentes tipos de cama. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 23, n. 3, p. 477-484 1994.

MONTROSE, M.; SHANE, S.; KATHLEEN, H. Role of litter in the transmission of *Campylobacter jejuni*. **Avian Diseases**, v. 29, n. 2, p. 392-399 1985.

MÜLLER, M.; MENDEL, M.; VAN HELLEMOND, J. J. et al. Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 2, p. 444-495 2012.

MUNIZ, E.; MESA, D.; CUASPA, R. et al. Presence of *Salmonella* spp. in reused broiler litter. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 27, n. 1, p. 12-17 2014.

OLIVEIRA, M. C.; ALMEIDA, C. V.; ANDRADE, D. O. et al. Teor de matéria seca, pH e amônia volatilizada da cama de frango tratada ou não com diferentes aditivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 951-954 2003.

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**, v. 56, p. 536-541 2004.

OMEIRA, N.; BARBOUR, E. K.; NEHME, P. A. et al. Microbiological and chemical properties of litter from different chicken types and production systems. **Science of The Total Environment**, v. 367, n. 1, p. 156-162 2006.

PANDEY, P. K.; SOUPIR, M. L. *Escherichia coli* inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. **AMB Express**, v. 1, n. 1, p. 18 2011.

PAYNE, J. B.; KROGER, E. C.; WATKINS, S. E. Evaluation of litter treatments on *Salmonella* recovery from poultry litter. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, n. 3, p. 239-243 2002.

POPE, M. J.; CHERRY, T. E. An evaluation of the presence of pathogens on broilers raised on poultry litter treatment-treated litter. **Poultry Science**, v. 79, n. 9, p. 1351-5 2000.

POTE, D. H.; WAY, T. R.; KLEINMAN, P. J. et al. Subsurface application of poultry litter in pasture and no-till soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 40, n. 2, p. 402-11 2011.

POWERS, W.; ANGEL, R. A review of the capacity for nutritional strategies to address environmental challenges in poultry production. **Poultry Science**, v. 87, n. 10, p. 1929-1938 2008.

PRA, M. A. D.; CORRÊA, É. K.; ROLL, V. F. et al. Uso de cal virgem para o controle de *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp. em camas de aviário. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1189-1194 2009.

RESENDE, F. M. S. **Análises físico-químicas e virucidas da fermentação com cobertura e sem amontoamento da cama de aves** 2010. Dissertação de Mestrado Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ROLL, V. F.; DAI PRA, M. A.; ROLL, A. P. Research on *Salmonella* in broiler litter reused for up to 14 consecutive flocks. **Poultry Science**, v. 90, n. 10, p. 2257-62 2011.

ROTHROCK, M. J.; COOK, K. L.; LOVANH, N. et al. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay to target a novel group of ammonia-producing bacteria found in poultry litter. **Poultry Science**, v. 87, n. 6, p. 1058-1067 2008a.

ROTHROCK, M. J.; COOK, K. L.; WARREN, J. G. et al. The effect of alum addition on microbial communities in poultry litter. **Poultry Science**, v. 87, n. 8, p. 1493-1503 2008b.

RUIZ, V.; RUIZ, D.; GERNAT, A. G. et al. The effect of quicklime (CaO) on litter condition and broiler performance. **Poultry Science**, v. 87, n. 5, p. 823-827 2008.

SALIERNO, J. D.; POLLACK, S. J.; VELD, P. A. et al. Steroid hormones and anthropogenic contaminants in poultry litter leachate. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, n. 5, p. 2181-2187 2012.

SANTOS, E. C.; COTTA, J. T. B.; MUNIZ, J. A. et al. Avaliação de alguns materiais usados como cama sobre o desempenho de frangos de corte. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 4, p. 1024-1030 2000.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J. et al. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7-15 2011.

SHANMUGASUNDARAM, R.; LILBURN, M. S.; SELVARAJ, R. K. Effect of recycled litter on immune cells in the cecal tonsils of chickens. **Poultry Science**, v. 91, n. 1, p. 95-100 2012.

SILVA, V. S.; VOSS, D.; COLDEBELLA, A. et al. Efeito de tratamentos sobre a carga bacteriana de cama de aviário reutilizada em frangos de corte. **Embrapa Suínos e Aves: Comunicado técnico 467**, 2007.

SIMITZIS, P. E.; KALOGERAKI, E.; GOLIOMYTIS, M. et al. Impact of stocking density on broiler growth performance, meat characteristics, behavioural components and indicators of physiological and oxidative stress. **British Poultry Science**, v. 53, n. 6, p. 721-730 2012.

SIMS, J. T.; WOLF, D. C. Poultry waste management: Agricultural and environmental issues. In: DONALD, L. S. (Ed.). **Advances in Agronomy**: Academic Press, v. Volume 52, 1994. p.1-83. ISBN 0065-2113.

SMITH, R. C. Kind of litter and breast blisters on broilers. **Poultry Science**, v. 35, n. 3, p. 593-595 1956.

SONODA, L.; MOURA, D.; BUENO, L. et al. Broiler litter reutilization applying different composting concepts. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 14, p. 227-232 2012.

SORBARA, J.; RIZZO, M.; LAURENTIZ, A. et al. Avaliação da polpa de citros peletizada como material para cama de frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, p. 273-280 2000.

SOUZA, A. **Comunicação pessoal (Universidade Federal do Paraná)** 2013.

STRINGFELLOW, K.; CALDWELL, D.; LEE, J. et al. Pasteurization of chicken litter with steam and quicklime to reduce *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 19, n. 4, p. 380-386 2010.

SUN, P.; BARMAZ, D.; CABRERA, M. L. et al. Detection and quantification of ionophore antibiotics in runoff, soil and poultry litter. **Journal of Chromatography A**, v. 1312, n. 0, p. 10-17 2013.

SWAIN, B. K.; SUNDARAM, R. N. S. Effect of different types of litter material for rearing broilers. **British Poultry Science**, v. 41, n. 3, p. 261-262 2000.

TAKASAKI, K.; SHOUN, H.; YAMAGUCHI, M. et al. Fungal ammonia fermentation, a novel metabolic mechanism that couples the dissimilatory and assimilatory pathways of both nitrate and ethanol: Role of acetyl CoA synthetase in anaerobic ATP synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 12414-12420 2004.

TERZICH, M.; POPE, M. J.; CHERRY, T. E. et al. Survey of pathogens in poultry litter in the United States. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 9, n. 3, p. 287-291 2000.

THAKUR, S.; BRAKE, J.; KEELARA, S. et al. Farm and environmental distribution of *Campylobacter* and *Salmonella* in broiler flocks. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 1, p. 33-42 2013.

THAXTON, Y.; BALZLI, C. L.; TANKSON, J. D. Relationship of broiler flock numbers to litter microflora. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 12, n. 1, p. 81-84 2003.

TOGHYANI, M.; GHEISARI, A.; MODARESI, M. et al. Effect of different litter material on performance and behavior of broiler chickens. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 122, n. 1, p. 48-52 2010.

TURNELL, J. R.; FAULKNER, R. D.; HINCH, G. N. Recent advances in Australian broiler litter utilisation. **World's Poultry Science Journal**, v. 63, n. 02, p. 223-231 2007.

UBA. Relatório Anual. **União Brasileira de Avicultura**, v. São Paulo, n. 20, p. 109 2013.

VICENTE, J. L.; HIGGINS, S. E.; HARGIS, B. M. et al. Effect of poultry guard litter amendment on horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in broiler chicks. **International Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 5, p. 314-317 2007.

VOLKOVA, V. V.; BAILEY, R. H.; WILLS, R. W. *Salmonella* in broiler litter and properties of soil at farm location. **PLoS One**, v. 4, n. 7, p. e6403 2009.

WATTS, D. B.; WAY, T. R.; TORBERT, H. A. Subsurface application of poultry litter and its influence on nutrient losses in runoff water from permanent pastures. **Journal of Environmental Quality**, v. 40, n. 2, p. 421-30 2011.

WEI, S.; GUTEK, A.; LILBURN, M. et al. Abundance of pathogens in the gut and litter of broiler chickens as affected by bacitracin and litter management. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 3-4, p. 595-601 2013.

WILLIAMS, J. E. Formalin Destruction of Salmonellae in Poultry Litter. **Poultry Science**, v. 59, n. 12, p. 2717-2724 1980.

WILLIAMS, Z. T.; BLAKE, J. P.; MACKLIN, K. S. The effect of sodium bisulfate on *Salmonella* viability in broiler litter. **Poultry Science**, v. 91, n. 9, p. 2083-2088 2012.

WILLIS, W.; MURRAY, C.; TALBOTT, C. Evaluation of leaves as a litter material. **Poultry Science**, v. 76, n. 8, p. 1138-1140 1997.

**CAPITULO 2 - INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO DA CAMA SOBRE
PARÂMETROS DE MICROBIOTA E IMUNIDADE EM FRANGOS DE CORTE**
(Influence of litter on microbiota and immunity parameters in broilers)

INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO DA CAMA SOBRE PARÂMETROS DE MICROBIOTA E IMUNIDADE EM FRANGOS DE CORTE

(Influence of litter on microbiota and immunity parameters in broilers)

RESUMO

A reutilização segura de camas de frangos depende de um tratamento correto com o objetivo de diminuir a carga microbiana. A cobertura com lona plástica é uma metodologia utilizada sendo uma prática industrial da qual pouca informação científica esta disponível. No primeiro ensaio deste estudo, camas usadas de frango foram divididas em três tratamentos de oito dias consecutivos, cada um com seis repetições: T1 (controle negativo, camas livres de *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Eimeria maxima* (EM), camas não cobertas), T2 (controle positivo, camas com SE e EM, camas não cobertas), T3 (camas com SE e EM, camas cobertas com lona plástica). Foram feitas contagens nas camas de bactérias totais (BT), *Enterobactérias* (EN), *Lactobacillus* (LAC), SE e EM aos dias 1 e 8, assim como a mensuração de pH, temperatura, umidade e amônia. No segundo ensaio, foram alojados frangos de corte nestas camas e avaliou-se aos 14 e 28 dias BT, EN, LAC, SE, linfócitos CD4+, CD8+ e macrófagos no intestino, e interleucinas (IFN- γ , IL-1 β e IL-18) no intestino e fígado dos frangos. Os resultados mostram diminuição significativa das populações bacterianas, aumento significativo dos parâmetros físicos e químicos das camas cobertas com lona plástica, e influencia significativa das populações remanescentes nas camas sobre a microbiota intestinal e parâmetros imunológicos.

Palavras-chave: *Salmonella*, *Lactobacillus*, amônia, citocinas, macrófagos.

ABSTRACT

In Brazilian poultry production, the litter is reused for consecutive flocks. To ensure this condition, the litter is treated during the down time between flocks for decreasing microbial load. Covering litter with plastic sheet is a methodology used by broiler growers, being a practice with little scientific information available. In the first trial of this study, broiler reused litters were divided in three treatments with eight consecutive days, each with six replicates: T1 (negative control, litter free of *Salmonella* Enteritidis (SE) and *Eimeria maxima* (EM) uncovered litter), T2 (positive control, litter with SE and EM, uncovered litter), T3 (Litter with SE and EM, covered litter with plastic sheet). In these litters, total bacteria, *Enterobactérias*, *Lactobacillus*, SE and EM were counted at day 1 and 8, as well as the measurement of pH, temperature, moisture and ammonia release. In the second trial, broilers were housed in these litters after the treatments described above and at day 14 and 28 the intestinal microbiota, CD4+, CD8+ lymphocytes, and macrophages in gut, and pro-inflammatory interleukins (IFN- γ , IL-1 β e IL-18) in liver and gut were evaluated. Results show a significant reduction of bacterial populations, a significant increase in all physical and chemical parameters of litters covered with plastic sheet, and a significant influence of the remnant microbial populations in litters on the intestinal microbiota and immunological parameters.

Key-words: *Salmonella*, *Lactobacillus*, ammonia, cytokines, macrophages.

INTRODUÇÃO

Nos atuais sistemas de produção de frangos de corte os pintinhos são colocados diretamente sobre um material de origem vegetal que pode ser maravalha de pinus ou eucalipto, casca de arroz, casca de café (Grimes et al., 2002). Este composto tem a função de forrar o aviário e evitar o contato das aves com o chão, fornecendo desta maneira uma superfície confortável para que as aves possam crescer.

Este material vegetal no Brasil é conhecido como “cama” (Neme et al., 2000), e em países de língua inglesa é conhecido como “bedding for poultry” ou “bedding material” (Bilgili et al., 2009). Depois do ciclo de criação do frango, este material misturado com as fezes, restos de ração, penas, secreções e descamação da pele em países de língua inglesa passa a ser chamado “litter” (Kelley et al., 1995, 1996).

Para aproveitar os recursos e fazer do sistema de produção de frangos de corte um sistema sustentável, a cama do primeiro lote ou “litter” é reutilizada por vários lotes consecutivos de frango, tem-se relatos na literatura de até 14 reutilizações (Roll et al., 2011). Mas, para atingir isto é necessário que a cama receba um tratamento entre lotes, com um período de vazio sanitário de alguns dias junto à implantação de alguma metodologia para diminuir a carga microbiana (Thaxton et al., 2003).

As principais formas de tratamento de cama são a compostagem (Macklin et al., 2006), incorporação de cal virgem (Pra et al., 2009), sulfato de alumínio (Line, 2002) e bissulfito de sódio (Williams et al., 2012). Outra metodologia que pode ser implementada é a prática de molhar a cama e cobri-la com lona plástica durante um

curto período de tempo. Dessa forma, Muniz et al. (2014) observaram diminuição na contagem de *Salmonella* spp. em camas reutilizadas e cobertas por sete dias durante sete lotes consecutivos de frango, mas os autores não avaliaram outras bactérias presentes nas camas nem os parâmetros físicos e químicos durante o processo.

Por outro lado, alguns trabalhos (Lee et al., 2011; Shanmugasundaram et al., 2012) também tem apresentado que a reutilização de cama afeta a imunidade de frangos de corte, tanto na resposta de células e anticorpos como de citocinas. Estas citocinas são peptídeos reguladores que atuam na comunicação entre células, tanto no desenvolvimento do sistema imunológico, como nas respostas imunológicas do hospedeiro e estão classificados em: interleucinas (IL), interferon (IFN), fator de transformação do crescimento β (TGF- β), fator de necrose de tumor (TNF), entre outros.

Lee et al. (2011) observaram que o contato de aves com camas reutilizadas incrementou os parâmetros tanto da resposta humoral como celular. Shanmugasundaram et al. (2012) observaram que frangos alojados em camas reutilizadas expressaram mais IL-1, IL-4, e as aves alojadas em camas novas expressaram mais IL-10.

Frente a isso, foi delineado o presente estudo para avaliar o processo de tratamento com cobertura de cama sobre a microbiologia, parâmetros físicos e químicos da cama e adicionalmente o efeito destas camas sobre a microbiota intestinal e imunidade de frangos de corte.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Centro de Estudos da Resposta Imunológica das Aves (CERIA-LABMOR), localizado no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, durante o período de junho de 2013, onde a temperatura média foi de 14,8 °C (Simepar, 2013).

Ensaio 1: Preparação das camas

Foram utilizadas camas de maravalha de um experimento prévio com frangos de corte, contaminadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) e oocistos de *Eimeria maxima* (EM), exceto as camas do T1 que não foram infectadas. O ensaio com as camas teve uma duração de oito dias consecutivos em um delineamento inteiramente casualizado dividido em três tratamentos, cada um com seis repetições: T1 (controle negativo, camas livres de SE e EM, camas não cobertas). T2 (controle positivo, camas contaminadas com SE e EM, camas não cobertas). T3 (camas contaminadas com SE e EM, camas cobertas).

As camas foram distribuídas em salas fechadas, separadas lado a lado, porém iguais e colocadas em chão de concreto. Cada cama tinha 70 cm de comprimento, 40 cm de largura e 30 cm de altura. As camas do T1 e T2 ficaram sem nenhum tipo de cobertura e as camas do T3 foram cobertas com uma lona plástica preta de 150 micras durante oito dias. Um dia antes de começar o experimento em todas as camas foram incorporados cinco litros de água pelo total de cama (84.000 cm³), quantidade para que as camas ficassem com uma umidade superior a 30% (Lavergne et al., 2006).

Coleta de material para microbiologia

No primeiro e oitavo dia do ensaio, foram coletadas 100 gramas de cama de três lugares diferentes de cada repetição para análise quantitativa de bactérias totais (BT), *Lactobacillus* (LAC) e enterobactérias (EN), totalizando 18 amostras por tratamento. Para avaliação de SE foram coletadas seis amostras de cada repetição, totalizando 36 amostras por tratamento. As análises microbiológicas de BT, EN e SE foram realizadas de acordo com a normativa nº 62 (Brasil, 2003), no caso dos LAC utilizou-se metodologia de Souza et al. (2007). Para análise de SE, houve crescimento bacteriano apenas após enriquecimento em meios seletivos, por esse motivo, os resultados estão expressos em porcentual de positividade em relação às amostras analisadas.

Para a contagem de oocistos de EM na cama aos dias 1 e 8 do ensaio, foram coletadas 10 gramas de cama de três pontos diferentes de cada repetição e diluídas em 50 ml de água destilada, depois o material foi filtrado com uma peneira de 70 malhas/cm². Na sequência, foi realizada a contagem desta suspensão tomando uma gota e suspendendo em câmara de contagem de células Neubauer conforme Fagonde e Pedroso (2009).

Parâmetros físicos e químicos

Diariamente era mensurada a temperatura das camas com o uso de termômetro digital da marca INCOTERM[®], com precisão de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$, com a sonda metálica inserida no centro e com profundidade de 15 cm. Os parâmetros, pH, umidade e liberação de amônia foram mensurados durante os dias 1, 3, 5 e 8 do

experimento. Para mensurar o pH foi adotada a metodologia de Benabdeljelil e Ayachi (1996), com a leitura em pHmetro digital, modelo 330i/SET, marca WTW. A umidade das camas foi determinada conforme Carvalho et al. (2011), para mensurar a amônia liberada pelas camas foi seguida a metodologia de Hernandez e Cazetta (2001).

Ensaio 2: Ensaio *In vivo*

A execução do experimento foi aprovada pelo comitê de ética em experimentação animal do setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, protocolado com o número 041/2013. Foram utilizadas como tratamentos as camas preparadas no ensaio anterior, sendo que no 8º dia de tratamento foi retirado a cobertura da cama do T3 e todas as camas ficaram 2 dias em descanso antes do alojamento das aves.

Animais

Foram alojados 60 frangos de corte Cobb[®] de um dia de idade de acordo com os tratamentos de cama descritos no ensaio 1. Cada tratamento com 20 aves, divididas em duas salas isoladores, sendo cada ave uma repetição. No alojamento as aves foram pesadas e distribuídas entre os tratamentos para que a distribuição de peso fosse uniforme. As aves foram alimentadas com água e ração à vontade por um período de 28 dias. As dietas oferecidas às aves foram de acordo com Rostagno (2011).

Coleta de material para microbiologia, histopatologia, imunoistoquímica e PCR quantitativa (qPCR)

Para análise quantitativa de BT, LAC, EN e presença de SE aos 14 e aos 28 dias de idade, cinco aves por tratamento foram necropsiadas para coleta de ceco. Foram realizadas também coletas de fragmentos de jejuno e ceco de cinco animais por tratamento, fixados em formol tamponado 10% para análise de células caliciformes, fragmentos dos mesmos segmentos foram incluídos em gel Tissue-Tek[®] (Miles, Elkhart IN, US) e congelados para posterior análise de linfócitos T CD8+, CD4+, células caliciformes e macrófagos. Também foram coletadas amostras de raspagem de jejuno e uma porção de fígado para avaliação da expressão gênica de citocinas interferon gama (IFN- γ), interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 18 (IL-18), estas amostras foram coletadas em tubos plásticos contendo 1 mL de RNAlater[®] e refrigeradas até o processamento.

Processamento das amostras para análise microbiológica

As análises microbiológicas foram feitas da mesma forma que no ensaio 1, conforme os anexos I e IV da normativa nº 62 do ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, publicada em 26 de agosto de 2003 (Brasil, 2003).

Processamento e leitura do material para histopatologia e imunoistoquímica

As amostras de jejuno e ceco foram processadas rotineiramente para histologia e coradas com Alcian blue para contagem de células caliciformes, de acordo com Smirnov et al. (2004). Foi feita leitura de 20 campos por tratamento com

microscópio de luz em aumento de 40x. Para as análises de linfócitos T CD4+, CD8+ e macrófagos através de imunoistoquímica, as amostras foram processadas conforme Muniz et al. (2013). Para a leitura foram analisados 20 campos para cada grupo experimental, em microscopia de luz com ampliação de 100x (Olympus BX41 Olympus America INC., NY, USA).

Iniciadores para qPCR

Na tabela 4 está a informação dos genes analisados das citocinas IFN- γ , IL-1 β , IL-18, e três genes de referencia β -actina, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e ubiquitina (UB).

Tabela 4 - Informação dos iniciadores. Genes de controle endógeno (β -actina, UB e GAPDH). Genes alvo (IFN- γ , IL-1 β , IL-18).

Gene	Sentido	Sequência 5'- 3'	Referência
β-actina	Forward (F)	CACAGATCATGTTTGAGACCTT	(De Boever et al., 2008)
	Reverse (R)	CATCACAATACCAGTGGTACG	
UB	F	GGGATGCAGATCTTCGTGAAA	(Fan et al., 2012)
	R	CTTGCCAGCAAAGATCAACCTT	
GAPDH	F	GGTGGTGCTAAGCGTGTTAT	(Hong et al., 2006)
	R	ACCTCTGTCATCTCTCCACA	
IFN-γ	F	GTGAAGAAGGTGAAAGATATCATGGA	(Kaiser et al., 2000)
	R	GCTTTGCGCTGGATTCTCA	
IL-1β	F	GCTCTACATGTCGTGTGTGATGAG	(Eldaghayes et al., 2006)
	R	TGTCGATGTCCCGCATGA	
IL-18	F	AGGTGAAATCTGGCAGTGGAAT	(Eldaghayes et al., 2006)
	R	ACCTGGACGCTGAATGCAA	

Extração de RNA total

A partir dos tecidos coletados na necropsia e guardados em tubos contendo RNAlater[®] realizou-se a extração do RNA total utilizando o reagente Trizol[®], seguindo o protocolo do fabricante (Invitrogen[®]). O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria a 260nm utilizando o espectrofotômetro NanoDrop[®] 2000 (ThermoScientific). Para avaliar a integridade do RNA extraído, todas as amostras foram corridas por eletroforese em gel de agarose 1%, coradas com uma solução de brometo de etídeo 1% e visualizadas com luz ultravioleta em transiluminador UV (Figura 1).

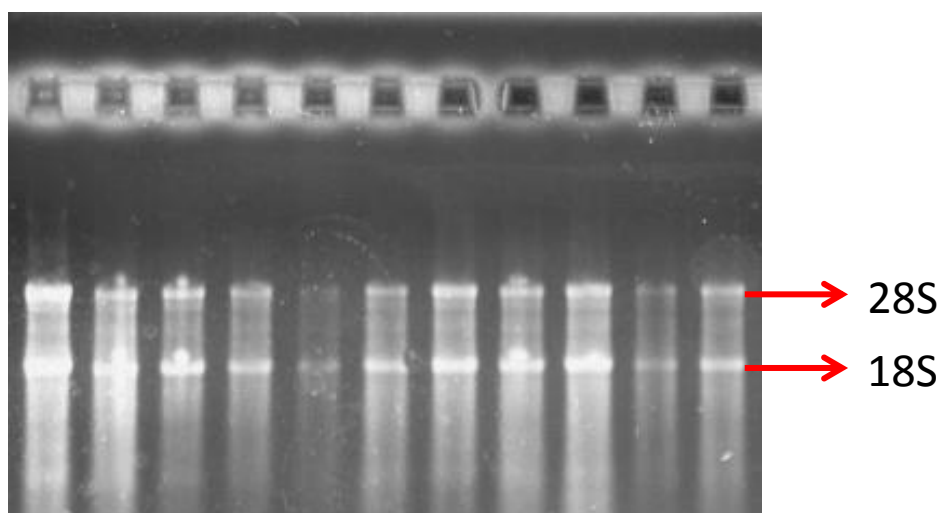


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose mostrando a integridade das unidades ribossomais 28S e 18S do RNA.

Tratamento com DNase e síntese do cDNA

Após a verificação da integridade do RNA total, foi realizado o tratamento desse material com DNase I (Ambion[®]), seguindo as recomendações do fabricante. Para a síntese do cDNA foi realizada a transcrição reversa utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Invitrogen[®]), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

qPCR

Foi utilizado o kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems[®]), com o seguinte protocolo: 2.5 µL de SYBR, 0.5 µL de água Milli-Q, 1.0 µL de mix dos iniciadores e 1.0 µL de amostra, completando finalmente 5.0 µL de reação por cada poço. Os níveis de expressão gênica foram analisados em um termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems[®]) utilizando um protocolo de 95°C por 15 min, seguida de 40 ciclos de 15s a 95°C, 30s a 58°C e 30s a 72°C. Os resultados do PCR em tempo real foram analisados usando o método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ de acordo com Schmittgen e Livak (2008). Esse método se baseia na redução dos valores de Ct (threshold cycle ou ciclo limiar) do grupo controle em relação ao grupo de interesse. Cada amostra foi analisada em triplicata, cujo valor de Ct de cada triplicata para o gene alvo foi subtraído ao valor médio de Ct das triplicatas para o gene constitutivo, finalmente estes resultados foram utilizados para a análise estatística.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados por meio do programa estatístico Statistix 9[®]. Sendo analisados pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk e posteriormente submetidos à análise de variância (ANOVA). Dados paramétricos foram submetidos ao teste de Tukey e dados com distribuição não paramétrica ao teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade para as médias que apresentarem diferença significativa. Os dados de presença de SE foram avaliados pelo teste de Qui-Quadrado a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Ensaio 1: Microbiologia

A contagem de BT, LAC, EN e EM nas camas está resumida na tabela 5. No caso das BT, não houve diferença significativa entre os tratamentos de cama nos dias 1 e 8, porém no T3 verificou-se redução significativa no número de BT entre os dias 1 e 8. Para as enterobactérias, o T3 apresentou maior quantidade dessas bactérias que os T2 e T1 tanto ao 1^o como aos 8^o dias de tratamento. No grupo T3 o tratamento reduziu o número de EN aos 8^o dias comparado ao dia 1. No caso dos LAC ao dia 1 não foi possível obter contagem com as diluições utilizadas (10^4 e 10^5), já no dia 8 obteve-se contagem com as diluições (10^3 e 10^4), e não houve diferença significativa entre os tratamentos. As análises de contagem de oocistos de EM na cama mostraram que não houve diferença entre os tratamentos para esse parâmetro.

Tabela 5 - Média e erro padrão da contagem de bactérias totais, Enterobactérias, *Lactobacillus* e oocistos de *Eimeria maxima* nos diferentes tratamentos na cama ao 1° e 8° dia (Resultados expressos em Log10 de UFC/ml e oocistos/10 gramas de cama).

Variável	Dia	Rep. (n)	T1	T2	T3
Bactérias totais	1	18	8,10 ± 0,48	8,83 ± 0,07	8,96 ± 0,04 ^a
	8	18	8,62 ± 0,05	8,13 ± 0,48	8,23 ± 0,49 ^b
Enterobacterias	1	18	1,27 ± 0,34 ^B	1,62 ± 0,49 ^B	4,64 ± 0,29 ^{aA}
	8	18	0,69 ± 0,37 ^B	1,48 ± 0,41 ^B	3,45 ± 0,64 ^{bA}
<i>Lactobacillus</i>	1	18	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	8	18	1,68 ± 0,51	1,48 ± 0,45	1,33 ± 0,46
<i>E. maxima</i>	1	18	0,00 ± 0,00	4,19 ± 0,26	3,95 ± 0,37
	8	18	0,00 ± 0,00	3,96 ± 0,48	3,93 ± 0,52

Letras minúsculas ^{a,b} diferentes na mesma coluna para cada variável e letras maiúsculas ^{A,B} diferentes na mesma linha são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal Wallis $P \leq 0,05$.

No caso de SE não foi possível fazer contagem com as diluições utilizadas, devido a isso, foi feita análise de presença de SE nas camas (Tabela 6). Houve uma diminuição significativa na presença de SE nas camas do T3 após o tratamento.

Tabela 6 - Presença de *Salmonella* Enteritidis na cama aos dias 1 e 8. Comparação antes e depois do tratamento (resultados expressos em porcentagem de 36 amostras).

	Dia 1	Dia 8
T1	0/36 0%	0/36 0%
T2	11/36 31%	10/36 28%
T3	9/36 25% ^a	4/36 11% ^b

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes pelo teste de Qui-Quadrado $P \leq 0,05$.

Parâmetros físicos e químicos

A temperatura das camas do T3 teve um aumento máximo ao dia 3 (30,8°C) e posteriormente declinou gradualmente até 22,97°C no dia 8, as temperaturas de T1 e T2 apresentaram a mesma tendência de um aumento leve nos primeiros dias

(temperaturas máximas foram 19,70 e 22,26°C respectivamente ao dia 3) para depois diminuir gradualmente até 17,18 e 19,34°C ao dia 8 (Figura 2).

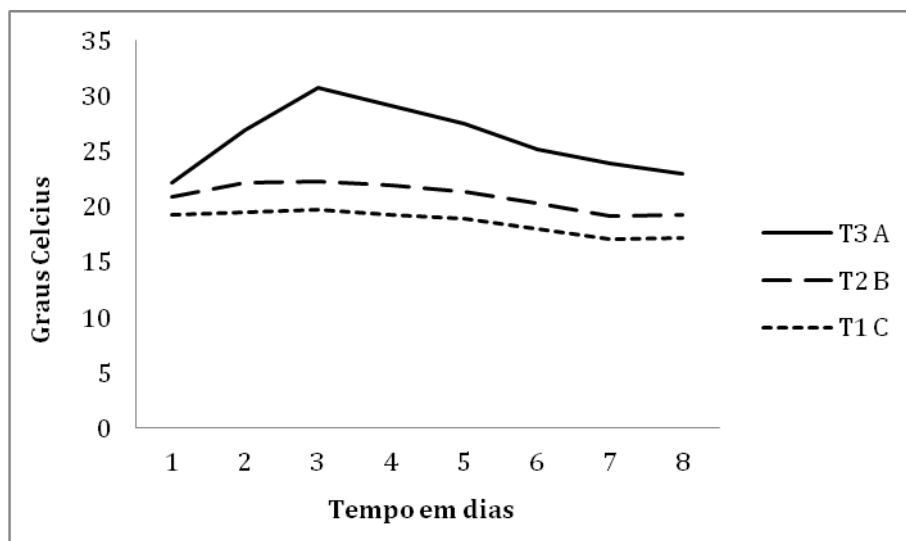


Figura 2 - Temperatura das camas durante os oito dias de tratamento. Letras diferentes apresentam diferença significativa ao dia 8 pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

O pH das camas dos três tratamentos apresentou a mesma tendência à alcalinidade, no dia 1 o pH do T3 foi de 8,98 para finalizar em 9,29 ao dia 8, nos T1 e T2 os valores de pH ao dia 1 foram de 8,81 e 8,94 respectivamente e de 9,15 e 9,20 ao dia 8 (Figura 3).

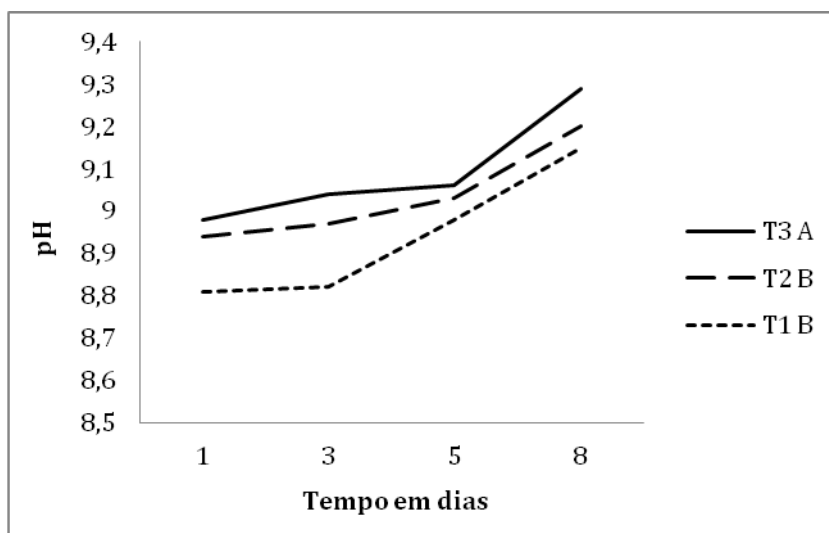


Figura 3 – Mensurações de pH das camas durante dias alternados. Letras diferentes apresentam diferença significativa ao dia 8 pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A umidade das camas no T3 apresentou-se estável até o dia 5 quando aumentou gradualmente até o dia 8, passando de 37 a 40%. Já as camas de T1 e T2 apresentaram diminuição gradual, passando de 35 a 27% em 8 dias (Figura 4).

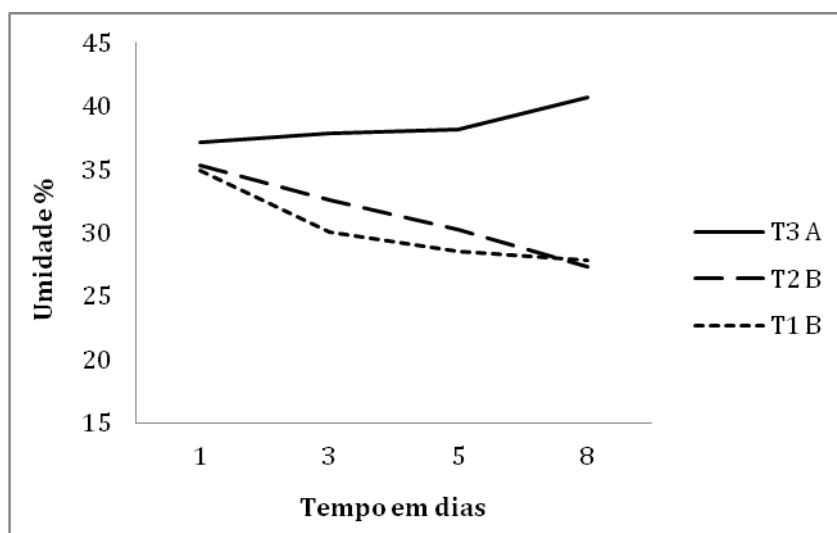


Figura 4 - Umidade das camas durante dias alternados. Letras diferentes apresentam diferença significativa ao dia 8 pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Os valores de amônia liberada pelas camas estão representados na figura 5, camas do T3 tiveram um aumento bem marcado na concentração de amônia, iniciando ao dia 1 com 47 e finalizando ao dia 8 com 114 ppm de amônia/75 gramas de cama. Já o T1 iniciou com 39 e ao dia 8 apresentou 89 ppm de amônia/75 gramas de cama, T2 iniciou com 40 e ao dia 8 apresentou 91 ppm de amônia/75 gramas de cama. Todos estes parâmetros físico-químicos avaliados apresentaram diferença estatística quando comparados entre tratamentos, sendo que as camas do T3 apresentaram valores mais altos que os demais tratamentos para todos os parâmetros ao dia 8.

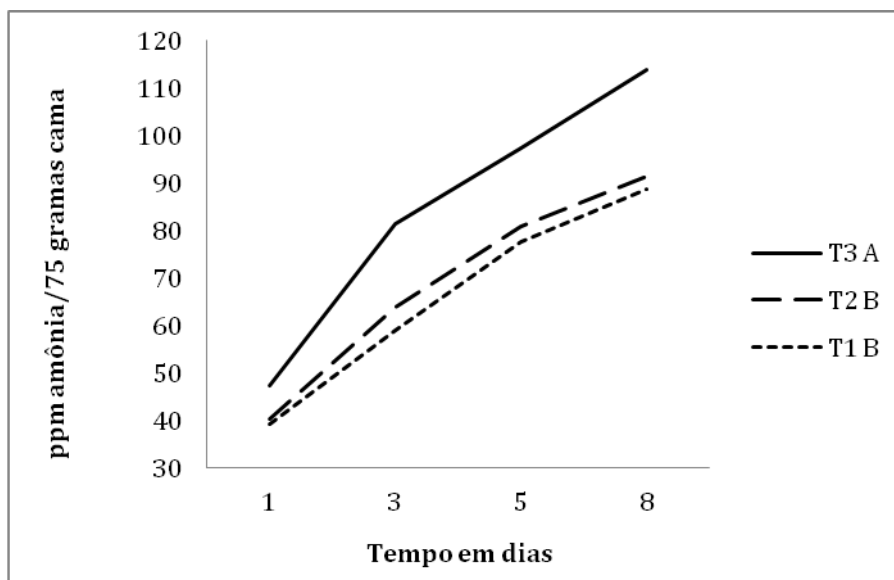


Figura 5 - Amônia liberada nas camas em dias alternados. Letras diferentes apresentam diferença significativa ao dia 8 pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Ensaio 2: Microbiologia

A contagem de BT, LAC e EN no ceco dos frangos aos 14 e 28 dias de idade está resumida na tabela 7. Não houve diferença significativa na contagem de EN e

BT entre os tratamentos aos dias 14 e 28. No caso dos LAC aos 14 dias, nas camas do T3, não foi possível obter contagem com a diluição utilizada (10^3 e 10^4), e, portanto foi diferente estatisticamente que os tratamentos T1 e T2. No dia 28 não houve crescimento de colônias de LAC em nenhum dos três tratamentos. No que se refere a SE houve ausência da bactéria em todas as amostras do ceco.

Tabela 7 - Média e erro padrão da contagem de Enterobactérias, bactérias totais e *Lactobacillus* nos diferentes tratamentos em ceco aos 14 e 28 dias de idade dos frangos (Resultados expressos em Log₁₀ de UFC/ml).

Idade	Variável	Rep. (n)	T1	T2	T3
14 dias	Enterobactérias	10	7,73 ± 0,43	7,57 ± 0,58	7,24 ± 0,42
	Bactérias totais	10	7,84 ± 0,42	8,00 ± 0,43	7,71 ± 0,57
	<i>Lactobacillus</i>	10	1,92 ± 1,00 ^a	1,91 ± 0,68 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
28 dias	Enterobactérias	10	8,72 ± 0,09	9,06 ± 0,17	8,72 ± 0,18
	Bactérias totais	10	9,10 ± 0,09	9,08 ± 0,11	9,03 ± 0,11
	<i>Lactobacillus</i>	10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal Wallis $P \leq 0,05$.

Linfócitos CD4+, CD8+, células calciformes e macrófagos

Na tabela 8 estão apresentados os resultados da contagem de células CD4+ e CD8+ e células calciformes no jejuno e ceco aos 14 e 28 dias de idade dos frangos. De forma geral todas as células do T3, tanto no jejuno como em ceco, nas duas coletas, apresentaram diferença significativa quando comparadas com os outros tratamentos. Foi observado que no T2 houve maior contagem de células CD4+ e CD8+ no jejuno aos 14 e 28 dias e macrófagos no jejuno aos 28 e macrófagos no ceco aos 14 e 28 dias quando comparadas as aves do T1.

Tabela 8 - Média da contagem de linfócitos CD4+, CD8+, células caliciformes e macrófagos no intestino das aves dos diferentes tratamentos aos 14 e 28 dias de idade (Resultados em unidades).

Fragmento/Idade	Variável	Rep. (n)	T1	T2	T3
Jejuno/14 dias	CD4+	10	15,0 ^c	24,2 ^b	31,8 ^a
	CD8+	10	17,5 ^c	20,8 ^b	26,2 ^a
	Caliciformes	20	12,6 ^b	12,3 ^b	16,4 ^a
	Macrófagos	10	12,9 ^b	13,6 ^b	17,0 ^a
Jejuno/28 dias	CD4+	10	11,0 ^c	18,6 ^b	21,7 ^a
	CD8+	10	9,6 ^c	13,5 ^b	19,1 ^a
	Caliciformes	20	16,4 ^b	24,9 ^a	25,6 ^a
	Macrófagos	10	9,2 ^c	13,4 ^b	17,4 ^a
Ceco/14 dias	CD4+	10	6,1 ^b	6,7 ^b	10,8 ^a
	CD8+	10	6,4 ^b	6,6 ^b	9,1 ^a
	Caliciformes	20	3,0	2,5	3,5
	Macrófagos	10	6,1 ^c	7,9 ^b	10,6 ^a
Ceco/28 dias	CD4+	10	9,1 ^b	10,6 ^b	12,6 ^a
	CD8+	10	7,8 ^b	9,4 ^b	11,8 ^a
	Caliciformes	20	2,6 ^b	2,6 ^b	3,9 ^a
	Macrófagos	10	8,7 ^c	10,9 ^b	13,6 ^a

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal Wallis $P \leq 0,05$.

qPCR de RNAm de citocinas

Os resultados da expressão gênica estão resumidos na tabela 9. A expressão de RNAm para o gene IFN- γ apresentou uma expressão significativa maior no jejuno e fígado de aves do T3 quando comparada ao animais do T2 aos 28 dias (12,5 vezes). Para expressão de RNAm de IL-1 β e IL-18 observou-se aumento na expressão destes genes no fígado de aves do T3, comparado a aves do T2 aos 14 dias e 28 dias.

Tabela 9 - Média e erro padrão da expressão gênica de RNAm de diferentes citocinas em jejuno e fígado das aves aos 14 e 28 dias de idade, normalizada pela expressão do gene ubiquitina. Resultados apresentados em numero de vezes que o gene foi expresso quando comparado ao grupo controle (T1).

Idade	Tecido	IFN- γ	IL-1 β	IL-18
14 dias	Jejuno T2	4,271 \pm 1,520	2,455 \pm 0,765	3,666 \pm 1,264
	Jejuno T3	1,097 \pm 0,237	1,547 \pm 0,324	1,108 \pm 0,217
	Fígado T2	3,091 \pm 0,441	0,716 \pm 0,072 ^b	0,703 \pm 0,131 ^b
	Fígado T3	2,646 \pm 0,756	12,212 \pm 1,542 ^a	7,909 \pm 1,319 ^a
28 dias	Jejuno T2	3,139 \pm 0,665 ^b	2,304 \pm 0,440	2,474 \pm 0,526
	Jejuno T3	12,545 \pm 1,865 ^a	1,630 \pm 0,291	2,254 \pm 0,313
	Fígado T2	5,956 \pm 0,709 ^b	0,286 \pm 0,062 ^b	0,191 \pm 0,098 ^b
	Fígado T3	10,794 \pm 0,960 ^a	9,643 \pm 0,792 ^a	4,274 \pm 0,182 ^a

Letras minúsculas ^{a,b} diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Kruskal Wallis $P \leq 0,05$ para o mesmo órgão. Valores de expressão menores de 1 significam que o gene foi reprimido, os resultados foram obtidos pelo método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$

Peso das aves

Os frangos do T1 no final do período de 28 dias apresentaram maior peso vivo significativo quando comparados aos outros tratamentos (T1=1842^a; T2=1757^b; T3=1753^b gramas) pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

DISCUSSÃO

Os resultados do ensaio 1 apresentaram uma média de BT nas camas em Log10 de 8,5 UFC/g (10^8 UFC) antes de começar os tratamentos, resultado que está em concordância com outros autores (Terzich et al., 2000; Macklin et al., 2005; Rothrock et al., 2008a). Dentro da contagem de BT, observamos que a média para EN foi de Log10 2,4 UFC/g de cama (10^3 UFC), resultados similares também foram obtidos por outros autores (Martin et al., 1998; Fries et al., 2005). De acordo com apresentado na literatura (Lu et al., 2003; Lovanh et al., 2007) em camas de frango o

grupo dominante é de bactérias Gram positivas, e, em uma concentração muito menor encontra-se o grupo Gram negativo. Embora não avaliamos contagem de bactérias Gram positivas, pode se observar uma diferença muito grande entre BT e EN, nesse caso a diferença em Log₁₀ é de 6,1 UFC/g (10^5 UFC).

De modo geral observa-se diminuição significativa nas populações de BT, EN e SE nas camas submetidas ao processo de cobertura quando comparadas aos outros tratamentos, fato que pode ser explicado pelos parâmetros físicos e químicos mensurados no experimento. Dentro destes, parece que o principal parâmetro relacionado com a redução das bactérias é a amônia. A amônia afeta importantes vias do metabolismo celular como glicólise e ciclo do ácido cítrico, isso somado a outros mecanismos tóxicos podem levar rapidamente a morte celular (Martinelle e Häggström, 1993; Schneider et al., 1996).

A quantidade de amônia mensurada nas camas do T3 foi significativamente maior que as das camas do T1 e T2, sugerindo que o fato de cobrir a cama com uma lona plástica inibe a liberação desta amônia para o ar sendo desta maneira retida na cama e chegando a níveis tóxicos para as bactérias. Por outro lado os parâmetros pH, umidade e temperatura estão ligados diretamente a produção de amônia. Tem-se demonstrado que o aumento de algum destes fatores aumenta diretamente a produção de amônia em camas de frango (Weaver e Meijerhof, 1991; Derikx et al., 1994; Nahm, 2003; Lovanh et al., 2007; Miles et al., 2011). Segundo Rothrock et al. (2008), quando estes parâmetros aumentam criam-se as condições ideais para o desenvolvimento de bactérias produtoras de amônia. O presente estudo apresentou aumento significativo de pH, umidade e temperatura na cama do

T3 quando comparados aos outros tratamentos, isso pode explicar o aumento significativo nos níveis de amônia das camas cobertas, mas também pode ter acontecido o contrário, o fato de cobrir as camas reteve a amônia e a umidade, pois é sabido também que a amônia tem um efeito alcalino (Resch et al., 2011), dessa forma aumentando o pH das camas (Turnbull e Snoeyenbos, 1973).

No caso da contagem de EM não foi observada diferença significativa nas camas cobertas comparada as camas não tratadas, esse fato difere do descrito na literatura no que se refere ao efeito da amônia sobre estes oocistos. Horton-Smith et al. (1940) observaram em condições experimentais a morte de 100% dos oocistos de *Eimeria* spp. colocados em solução de hidróxido de amônia a 1% por 24 horas. Os mesmos autores também observaram que a amônia em forma de gás tinha também efeitos letais nestes oocistos, onde uma concentração de 25 mg/litro matou 100% dos oocistos em 1 hora. Por sua parte, Samaha et al. (2013), evidenciaram a morte de 99% dos oocistos de *Eimeria tenella* quando submetidos a uma solução de hidróxido de amônia a 5% por 24 horas. Estes resultados mostram que para obter uma diminuição significativa na contagem destes oocistos é necessário atingir concentrações mais altas de amônia, sendo as concentrações de amônia neste estudo muito inferiores aos citados.

No segundo ensaio, buscou se avaliar como estas populações bacterianas remanentes nestas camas poderiam afetar a resposta imunológica, microbiota intestinal e peso de frangos de corte. Foi observado que o grupo alojado sobre camas cobertas (T3) apresentaram maior número de células imunológicas na

mucosa intestinal quando comparado a T1 e T2, e maior número de citocinas pró-inflamatórias no fígado que os animais alojados sobre T2.

Estes resultados podem ser explicados devido ao fato das camas do T3, no momento do alojamento, apresentarem contagem de EN significativamente superior aos outros tratamentos. Dentro destas bactérias EN, alguns gêneros como *Proteus*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli* estão relacionados com a produção de amônia em camas de frango (Alexander et al., 1968; Ivanov, 2001), mas também, podem chegar a ser patógenas (Rocha et al., 2002; Cortes et al., 2004; Nasrin et al., 2013). Estas EN possuem flagelos, a flagelina pertence às proteínas que são identificadas como padrão molecular associado a patógenos (PAMPs), e é reconhecida pelo receptor Toll-like 5 (TLR5) do hospedeiro (Hayashi et al., 2001; Yoon et al., 2012). TLR5 é expresso em células epiteliais do intestino e macrófagos teciduais, e conduz à ativação da secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β (Haiko e Westerlund-Wikström, 2013; Keestra et al., 2013). Este aumento de IL-1 β também pode ser o resultado dos lipopolissacarídeos (LPS) destas EN, os LPS são reconhecidos pelo TLR4 (Juul-Madsen et al., 2014), levando a maior expressão desta citocina no fígado e intestino (Iqbal et al., 2005).

No que se refere ao aumento de IL-18 e de IFN- γ , é sabido que a IL-18 é liberado por macrófagos ativados e é um potente indutor de IFN- γ (Li et al., 2013), e de linfócitos CD4⁺ (Hung et al., 2010). Foi evidente no presente estudo, que o fígado das aves do T3, aos 28 dias, apresentaram aumento significativo na expressão de IL-18 e de IFN- γ , fato que parece mostrar a relação entre estas duas citocinas. Entretanto, não se observou uma relação direta entre a concentração de RNAm para

IL-18 e o aumento de linfócitos CD4+ na mucosa intestinal. Entretanto, foi observado uma relação entre o aumento significativo destas células no intestino e o aumento significativo na expressão de RNAm para IL-18 e IFN- γ no fígado, nas duas coletas. Tanto o aumento dos CD4+ como de IFN- γ estão relacionados a patógenos de tipo intracelular (Guo et al., 2013).

Somado a isso, a maior umidade das camas antes do alojamento do T3 (40%) comparado a T1 e T2 (27%) podem ser a responsável pela sobrevivência destas populações bacterianas ao longo do ensaio 2 (Miles et al., 2011; Sonoda et al., 2012), gerando maiores quantidades de amônia e afetando o desempenho das aves (Carlile, 1984; Beker et al., 2004).

Entretanto, a única diferença entre os tratamentos T1 e T3 na contagem microbiológica do ceco dos frangos foi para presença de LA, onde aves do T1 apresentavam a presença destes, não verificada no grupo de aves do T3. Provavelmente a presença destas bactérias no ceco do T1 promoveu o melhor desempenho deste grupo quando comparado ao T3. Já foi descrito por, Huang et al. (2004) e Salim et al. (2013) os efeitos benéficos deste gênero bacteriano no desempenho de frangos de corte.

Estas observações mostram uma relação direta da microbiota comensal intestinal com a resposta imunológica do hospedeiro como observado por alguns autores (Honjo et al., 1993; Mwangi et al., 2010), e a influência da microbiota da cama com a microbiota intestinal (Cressman et al., 2010; Wei et al., 2013), considerando que até 4% da ingestão diária em frangos de corte é cama (Malone, 1992).

CONCLUSÃO

Estes resultados mostram que a cobertura das camas com lona plástica é um método que promoveu a diminuição da carga bacteriana inicial devido à interação de parâmetros físicos e químicos.

Camas com maior contagem de *Enterobactérias* promovem um aumento de linfócitos CD4+, CD8+, macrófagos no intestino e maior expressão de RNAm de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-18 e IFN- γ no fígado e intestino.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, D. C.; CARRIÈRE, J. A.; MCKAY, K. A. Bacteriological studies of poultry litter fed to livestock. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 9, n. 6, p. 127–131 1968.

BEKER, A.; VANHOOSER, S. L.; SWARTZLANDER, J. H. et al. Atmospheric ammonia concentration effects on broiler growth and performance. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 13, n. 1, p. 5-9 2004.

BENABDELJELIL, K.; AYACHI, A. Evaluation of alternative litter materials for poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 5, n. 3, p. 203-209 1996.

BILGILI, S. F.; HESS, J. B.; BLAKE, J. P. et al. Influence of bedding material on footpad dermatitis in broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 18, n. 3, p. 583-589 2009.

BRASIL. **Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água: Instrução normativa nº62** MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. Brasília 26 de agosto: MAPA 2003.

CARLILE, F. S. Ammonia in poultry houses: A literature review. **World's Poultry Science Journal**, v. 40, n. 02, p. 99-113 1984.

CARVALHO, T. M. R. D.; MOURA, D. J. D.; SOUZA, Z. M. D. et al. Qualidade da cama e do ar em diferentes condições de alojamento de frangos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 351-361 2011.

CORTES, C.; TÉLLEZ, I.; LÓPEZ, C. et al. Aislamiento bacteriano a partir de huevo fértil, huevo incubable y aves con infección del saco vitelino. **Revista Latinoamericana de Microbiología** v. 46, p. 12-16 2004.

CRESSMAN, M. D.; YU, Z.; NELSON, M. C. et al. Interrelations between the microbiotas in the litter and in the intestines of commercial broiler chickens. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6572-82 2010.

DE BOEVER, S.; VANGESTEL, C.; DE BACKER, P. et al. Identification and validation of housekeeping genes as internal control for gene expression in an intravenous LPS inflammation model in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 122, n. 3-4, p. 312-317 2008.

DERIKX, P. J. L.; WILLERS, H. C.; TEN HAVE, P. J. W. Effect of pH on the behaviour of volatile compounds in organic manures during dry-matter determination. **Bioresource Technology**, v. 49, n. 1, p. 41-45 1994.

ELDAGHAYES, I.; ROTHWELL, L.; WILLIAMS, A. et al. Infectious bursal disease virus: Strains that differ in virulence differentially modulate the innate immune response to infection in the chicken bursa. **Viral Immunology**, v. 19, n. 1, p. 83-91 2006.

FAGONDE, C. A.; PEDROSO, D. **Cultivo in vivo, in vitro e diagnostico específico de *Eimeria* spp. de *Gallus gallus***. 1a edição. Brasília: Embrapa, 2009. 219

FAN, W.-Q.; WANG, H.-N.; ZHANG, Y. et al. Comparative dynamic distribution of avian infectious bronchitis virus M41, H120, and SAIBK strains by quantitative real-time RT-PCR in SPF chickens. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 76, n. 12, p. 2255-2260 2012.

FRIES, R.; AKCAN, M.; BANDICK, N. et al. Microflora of two different types of poultry litter. **British Poultry Science**, v. 46, n. 6, p. 668-72 2005.

GRIMES, J. L.; SMITHI, J.; WILLIAMS, C. M. Some alternative litter materials used for growing broilers and turkeys. **World's Poultry Science Journal**, v. 58, n. 04, p. 515-526 2002.

GUO, P.; THOMAS, J. D.; BRUCE, M. P. et al. The chicken TH1 response: Potential therapeutic applications of ChIFN- γ . **Developmental & Comparative Immunology**, v. 41, n. 3, p. 389-396 2013.

HAIKO, J.; WESTERLUND-WIKSTRÖM, B. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. **Biology**, v. 2, n. 4, p. 1242-1267 2013.

HAYASHI, F.; SMITH, K. D.; OZINSKY, A. et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1099-1103 2001.

HERNANDES, R.; CAZETTA, J. O. Método simples e acessível para determinar amônia liberada pela cama aviária. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 824-829 2001.

HONG, Y. H.; LILLEHOJ, H. S.; LEE, S. H. et al. Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, n. 3–4, p. 209-223 2006.

HONJO, K.; HAGIWARA, T.; ITOH, K. et al. Immunohistochemical analysis of tissue distribution of B and T cells in germfree and conventional chickens. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, n. 6, p. 1031-1034 1993.

HORTON-SMITH, C.; TAYLOR, E. L.; TURTLE, E. E. Ammonia fumigation for coccidial disinfection. **Veterinary Record**, v. 52, p. 829-832 1940.

HUANG, M.; CHOI, Y.; HOUDE, R. et al. Effects of Lactobacilli and an acidophilic fungus on the production performance and immune responses in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 83, n. 5, p. 788-795 2004.

HUNG, L.-H.; LI, H.-P.; LIEN, Y.-Y. et al. Adjuvant effects of chicken interleukin-18 in avian Newcastle disease vaccine. **Vaccine**, v. 28, n. 5, p. 1148-1155 2010.

IQBAL, M.; PHILBIN, V. J.; SMITH, A. L. Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 104, n. 1–2, p. 117-127 2005.

IVANOV, I. E. Treatment of broiler litter with organic acids. **Research in Veterinary Science**, v. 70, n. 2, p. 169-173 2001.

JUUL-MADSEN, H. R.; VIERTLBÖECK, B.; HÄRTLE, S. et al. Chapter 7 - Innate Immune Responses. In: SCHAT, K. A.; KASPERS, B. e KAISER, P. (Ed.). **Avian Immunology (Second Edition)**. Boston: Academic Press, 2014. p.121-147. ISBN 978-0-12-396965-1.

KAISER, P.; ROTHWELL, L.; GALYOV, E. E. et al. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum. **Microbiology**, v. 146, n. 12, p. 3217-3226 2000.

KEESTRA, A. M.; DE ZOETE, M. R.; BOUWMAN, L. I. et al. Unique features of chicken Toll-like receptors. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 41, n. 3, p. 316-323 2013.

KELLEY, T. R.; PANCORBO, O. C.; MERKA, W. C. et al. Bacterial pathogens and indicators in poultry litter during re-utilization. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 4, n. 4, p. 366-373 1995.

KELLEY, T. R.; PANCORBO, O. C.; MERKA, W. C. et al. Elemental concentrations of stored whole and fractionated broiler litter. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 5, n. 3, p. 276-281 1996.

LAVERGNE, T. K.; STEPHENS, M. F.; SCHELLINGER, D. et al. In-house pasteurization of broiler litter. **Louisiana State University Agricultural Center**, v. 2955, p. 1-16 2006.

LEE, K. W.; LILLEHOJ, H. S.; LEE, S. H. et al. Impact of fresh or used litter on the posthatch immune system of commercial broilers. **Avian Diseases**, v. 55, n. 4, p. 539-44 2011.

LI, K.; GAO, H.; GAO, L. et al. Adjuvant effects of interleukin-18 in DNA vaccination against infectious bursal disease virus in chickens. **Vaccine**, v. 31, n. 14, p. 1799-1805 2013.

LINE, J. E. *Campylobacter* and *Salmonella* populations associated with chickens raised on acidified litter. **Poultry Science**, v. 81, n. 10, p. 1473-1477 2002.

LOVANH, N.; COOK, K. L.; ROTHROCK, M. J. et al. Spatial shifts in microbial population structure within poultry litter associated with physicochemical properties. **Poultry Science**, v. 86, n. 9, p. 1840-9 2007.

LU, J.; SANCHEZ, S.; HOFACRE, C. et al. Evaluation of broiler litter with reference to the microbial composition as assessed by using 16S rRNA and functional gene markers. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 901-8 2003.

MACKLIN, K. S.; HESS, J. B.; BILGILI, S. F. et al. Bacterial levels of pine shavings and sand used as poultry litter. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 14, n. 2, p. 238-245 2005.

MACKLIN, K. S.; HESS, J. B.; BILGILI, S. F. et al. Effects of in-house composting of litter on bacterial levels. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 15, n. 4, p. 531-537 2006.

MALONE, G. W. Nutrient enrichment in integrated broiler production systems. **Poultry Science**, v. 71, n. 7, p. 1117-1122 1992.

MARTIN, S. A.; MCCANN, M. A.; WALTMAN, W. D. Microbiological survey of Georgia poultry litter. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 7, n. 1, p. 90-98 1998.

MARTINELLE, K.; HÄGGSTRÖM, L. Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: Transport across cell membranes. **Journal of Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 339-350 1993.

MILES, D. M.; ROWE, D. E.; CATHCART, T. C. Litter ammonia generation: Moisture content and organic versus inorganic bedding materials. **Poultry Science**, v. 90, n. 6, p. 1162-1169 2011.

MUNIZ, E.; MESA, D.; CUASPA, R. et al. Presence of *Salmonella* spp. in reused broiler litter. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 27, n. 1, p. 12-17 2014.

MUNIZ, E.; PICKLER, L.; LOURENÇO, M. C. et al. Probióticos na ração para o controle de *Salmonella* minnesota em frangos de corte **Archives of Veterinary Science**, v. 18, n. 3, p. 52-60 2013.

MWANGI, W. N.; BEAL, R. K.; POWERS, C. et al. Regional and global changes in TCR $\alpha\beta$ T cell repertoires in the gut are dependent upon the complexity of the enteric microflora. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 34, n. 4, p. 406-417 2010.

NAHM, K. H. Evaluation of the nitrogen content in poultry manure. **World's Poultry Science Journal**, v. 59, n. 01, p. 77-88 2003.

NASRIN, S.; ISLAM, M.; KHATUN, M. et al. Characterization of bacteria associated with omphalitis in chicks. **Bangladesh Veterinarian**, v. 29, n. 2, p. 63-68 2013.

NEME, R.; SAKOMURA, N. K.; OLIVEIRA, M. D. S. D. et al. Adição de gesso agrícola em três tipos de cama de aviário na fixação de nitrogênio e no desempenho de frango de corte. **Ciência Rural**, v. 30, p. 687-692 2000.

PRA, M. A. D.; CORRÊA, É. K.; ROLL, V. F. et al. Uso de cal virgem para o controle de *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp. em camas de aviário. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1189-1194 2009.

RESCH, C.; WÖRL, A.; WALTENBERGER, R. et al. Enhancement options for the utilisation of nitrogen rich animal by-products in anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2503-2510 2011.

ROCHA, A. C. G. P.; SILVA, A. B.; BRITO, B. G. et al. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the south of Brazil. **Avian Diseases**, v. 46, n. 3, p. 749-753 2002.

ROLL, V. F.; DAI PRA, M. A.; ROLL, A. P. Research on *Salmonella* in broiler litter reused for up to 14 consecutive flocks. **Poultry Science**, v. 90, n. 10, p. 2257-62 2011.

ROSTAGNO, H. S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**. 3 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 252p

ROTHROCK, M. J.; COOK, K. L.; LOVANH, N. et al. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay to target a novel group of ammonia-producing bacteria found in poultry litter. **Poultry Science**, v. 87, n. 6, p. 1058-1067 2008.

SALIM, H. M.; KANG, H. K.; AKTER, N. et al. Supplementation of direct-fed microbials as an alternative to antibiotic on growth performance, immune response, cecal microbial population, and ileal morphology of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 92, n. 8, p. 2084-2090 2013.

SAMAHA, H. A. T.; HAGGAG, Y. N.; NOSSAIR, M. A. S. et al. Assessment of the efficiency of some chemical disinfectants used in poultry farms against coccidiosis. **Alexandria Journal of Veterinary Sciences**, v. 39, n. 1, p. 82-90 2013.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108 2008.

SCHNEIDER, M.; MARISON, I. W.; VON STOCKAR, U. The importance of ammonia in mammalian cell culture. **Journal of Biotechnology**, v. 46, n. 3, p. 161-185 1996.

SHANMUGASUNDARAM, R.; LILBURN, M. S.; SELVARAJ, R. K. Effect of recycled litter on immune cells in the cecal tonsils of chickens. **Poultry Science**, v. 91, n. 1, p. 95-100 2012.

SIMEPAR. Temperatura média de Curitiba em junho de 2013. **Sistema Meteorológico do Paraná**, 2013.

SMIRNOV, A.; SKLAN, D.; UNI, Z. Mucin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 4, p. 736-742 2004.

SONODA, L.; MOURA, D.; BUENO, L. et al. Broiler litter reutilization applying different composting concepts. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 14, p. 227-232 2012.

SOUZA, M. R.; MOREIRA, J. L.; BARBOSA, F. H. F. et al. Influence of intensive and extensive breeding on lactic acid bacteria isolated from *Gallus gallus domesticus* ceca. **Veterinary Microbiology**, v. 120, n. 1-2, p. 142-150 2007.

TERZICH, M.; POPE, M. J.; CHERRY, T. E. et al. Survey of pathogens in poultry litter in the United States. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 9, n. 3, p. 287-291 2000.

THAXTON, Y.; BALZLI, C. L.; TANKSON, J. D. Relationship of broiler flock numbers to litter microflora. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 12, n. 1, p. 81-84 2003.

TURNBULL, P. C. B.; SNOEYENBOS, G. H. The roles of ammonia, water activity, and pH in the salmonellacidal effect of long-used poultry litter. **Avian Diseases**, v. 17, n. 1, p. 72-86 1973.

WEAVER, W.; MEIJERHOF, R. The effect of different levels of relative humidity and air movement on litter conditions, ammonia levels, growth, and carcass quality for broiler chickens. **Poultry Science**, v. 70, n. 4, p. 746-755 1991.

WEI, S.; GUTEK, A.; LILBURN, M. et al. Abundance of pathogens in the gut and litter of broiler chickens as affected by bacitracin and litter management. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 3–4, p. 595-601 2013.

WILLIAMS, Z. T.; BLAKE, J. P.; MACKLIN, K. S. The effect of sodium bisulfate on *Salmonella* viability in broiler litter. **Poultry Science**, v. 91, n. 9, p. 2083-2088 2012.

YOON, S.-I.; KURNASOV, O.; NATARAJAN, V. et al. Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. **Science**, v. 335, n. 6070, p. 859-864 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cama de frango é um ambiente muito complexo, no qual habitam diversos tipos de microrganismos em uma íntima relação com as condições físicas e químicas deste habitat. Por isso, a cada dia que passa este nicho recobra mais importância, devido a seu potencial impacto no meio ambiente, na saúde pública, como na saúde e desempenho dos frangos de corte.

No futuro muitas pesquisas nesta área são necessárias para conhecer mais sobre este imenso ambiente. Pode citar, por exemplo: 1- estudos de sobrevivência de vírus de interesse avícola nas diferentes metodologias aplicadas para reutilizar as camas; 2- estudos de metagenômica com o objetivo de conhecer melhor as bactérias e fungos deste habitat, que não são facilmente identificadas por microbiologia tradicional; 3- estudos com transcriptômica com o intuito de conhecer melhor as vias metabólicas utilizadas por estas bactérias e fungos em condições de aerobiose como de anaerobiose.

Maior esclarecimento sobre estes aspectos poderia nos levar, talvez em um tempo não muito longo, a manipular as bactérias responsáveis pela emissão de gases como amônia, sulfeto de hidrogênio, ácidos graxos voláteis, entre outros, assim como a aperfeiçoar as metodologias empregadas para diminuir patógenos e a utilizar a cama como um regulador benéfico da microbiota intestinal dos frangos de corte.

Estas são apenas algumas ideias para futuras pesquisas, não sendo menos importantes que outras não citadas acima.

ANEXO

ANEXO I

ARCHIVES OF VETERINARY SCIENCE: APRESENTAÇÃO DOS ARTIGOS

Para agilizar a tramitação e publicação de seu artigo, recomendamos fortemente que as normas sejam obedecidas, inclusive para as referências

1. Digitação: O artigo com no máximo vinte e cinco páginas deverá ser digitado em folha com tamanho A4 210 x 297 mm, com margens laterais direita, esquerda, superior e inferior de 2,5 cm. As páginas deverão ser numeradas de forma progressiva no canto superior direito. Deverá ser utilizado fonte arial 12 em espaço duplo; em uma coluna. Tabelas e Figuras com legendas serão inseridas diretamente no texto e não em folhas separadas.

2. Identificação dos autores e instituições (máximo 6 autores por artigo): Todos os dados referentes a autores devem ser inseridos exclusivamente nos metadados no momento da submissão online. Não deve haver nenhuma identificação dos autores no corpo do artigo enviado para a revista. Os autores devem inclusive remover a identificação de autoria do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista.

3. Tabelas: Devem ser numeradas em algarismo arábico seguido de hífen. O título será inserido na parte superior da tabela em caixa baixa (espaço simples) com ponto final. O recuo da segunda linha deverá ocorrer sob a primeira letra do título. (Ex.: Tabela 1 – Título.). As abreviações devem ser descritas em notas no rodapé da tabela. Estas serão referenciadas por números sobrescritos (1,2,3). Quando couber, os cabeçalhos das colunas deverão possuir as unidades de medida. Tanto o título quanto as notas de rodapé devem fazer parte da tabela, inseridos em "linhas de tabela".

4. Figuras: Devem ser numeradas em algarismo arábico seguido de hífen. O título será inserido na parte inferior da figura em caixa baixa (espaço simples) com ponto final. O recuo da segunda linha deverá ocorrer sob a primeira letra do título (Ex.: Figura 1 – Título). As designações das variáveis X e Y devem ter iniciais maiúsculas e unidades entre parênteses. São admitidas apenas figuras em preto-e-branco. Figuras coloridas terão as despesas de clicheria e impressão a cores pagas pelo autor. Nesse caso deverá ser solicitada ao Editor (via ofício) a impressão a cores.

NORMAS EDITORIAIS

Artigo completo - Deverá ser inédito, escrito em idioma português (nomenclatura oficial) ou em inglês. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimento(s) (quando houver); Nota informando aprovação por Comitê de Ética (quando houver); Referências.

Artigo de Revisão - Os artigos de revisão deverão ser digitados seguindo a mesma norma do artigo científico e conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Agradecimento(s) (quando houver); Referências. A publicação de artigos de revisão fica condicionada à relevância do tema, mérito científico dos autores e disponibilidade da Revista para publicação de artigos de Revisão.

ESTRUTURA DO ARTIGO

TÍTULO - em português, centralizado na página, e com letras maiúsculas. Logo abaixo, título em inglês, entre parêntesis e centralizado na página, com letras minúsculas e itálicas. Não deve ser precedido do termo título.

RESUMO - no máximo 1800 caracteres incluindo os espaços, em língua portuguesa. As informações devem ser precisas e sumarizar objetivos, material e métodos, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço duplo. Deve ser precedido do termo "Resumo" em caixa alta e negrito.

PALAVRAS-CHAVE – inseridas abaixo do resumo. Máximo de cinco palavras em letras minúsculas, separadas por ponto-e-vírgula, em ordem alfabética, retiradas exclusivamente do artigo, não devem fazer parte do título, e alinhado a esquerda. Não deve conter ponto final. Deve ser precedido do termo “Palavras-chave” em caixa baixa e negrito.

ABSTRACT - deve ser redigido em inglês, refletindo fielmente o resumo e com no máximo 1800 caracteres. O texto deve ser justificado e digitado em espaço duplo, em parágrafo único. Deve ser precedido do termo “Abstract” em caixa alta e negrito.

KEY WORDS - inseridas abaixo do abstract. Máximo de cinco palavras em letras minúsculas, separadas por ponto-e-vírgula, em ordem alfabética, retiradas exclusivamente do artigo, não devem fazer parte do título em inglês, e alinhado a esquerda. Não precisam ser traduções exatas das palavras-chave e não deve conter ponto final. Deve ser precedido do termo “Key words” em caixa baixa e negrito.

INTRODUÇÃO – abrange também uma breve revisão de literatura e, ao final, os objetivos. O texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Introdução” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda.

MATERIAL E MÉTODOS - o autor deverá ser preciso na descrição de novas metodologias e adaptações realizadas nas metodologias já consagradas na experimentação animal. Fornecer referência específica original para todos os procedimentos utilizados. Não usar nomes comerciais de produtos. O texto deverá iniciar sob a primeira letra do termo “Material e Métodos” (escrito em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda.

RESULTADOS (O item Resultados e o item Discussão podem ser apresentados juntos, na forma RESULTADOS e DISCUSSÃO, ou em itens separados)

o texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Resultados” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda. Símbolos e unidades devem ser listados conforme os exemplos: Usar 36%, e não 36 % (não usar espaço entre o no e %); Usar 88 kg, e não 88Kg (com espaço entre o no e kg, que deve vir em minúsculo); Usar 42 mL, e não 42 ml (litro deve vir em L maiúsculo, conforme padronização internacional); Usar 25oC, e não 25 oC (sem espaço entre o no e oC); Usar ($P < 0,05$) e não ($p < 0,05$); Usar $r^2 = 0,89$ e não $r^2=0,89$; Nas tabelas inserir o valor da probabilidade como “valor de P”; Nas tabelas e texto utilizar média \pm desvio padrão ($15,0 \pm 0,5$). Devem ser evitadas abreviações não-consagradas, como por exemplo: “o T3 foi maior que o T4, que não diferiu do T5 e do T6”. Este tipo de redação é muito cômodo para o autor, mas é de difícil compreensão para o leitor. Escreva os resultados e apresente suporte com dados. Não seja redundante incluindo os mesmos dados ou resultados em tabelas ou figuras.

DISCUSSÃO - o texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Discussão” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda. Apresente a sua interpretação dos seus dados. Mostre a relação entre fatos ou generalizações reveladas pelos seus resultados. Aponte exceções ou aspectos ainda não resolvidos. Mostre como os seus resultados ou interpretações concordam com trabalhos previamente publicados ou discordam deles, mas apresente apenas trabalhos originais, evitando citações de terceiros. Discuta os aspectos teóricos e/ou práticos do seu trabalho. Pequenas especulações podem ser interessantes, porém devem manter relação factual com os seus resultados. Afirmações tais como: "Atualmente nós estamos tentando resolver este problema..." não são aceitas. Referências a "dados não publicados" não são aceitas. Conclua sua discussão com uma curta afirmação sobre a significância dos seus resultados.

CONCLUSÕES - preferencialmente redigir a conclusão em parágrafo único, baseada nos objetivos. Devem se apresentar de forma clara e sem abreviações. O texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Conclusão” (escrita em caixa alta e negrito), com recuo da primeira linha do parágrafo a 1,0 cm da margem esquerda.

AGRADECIMENTOS - os agradecimentos pelo apoio à pesquisa serão incluídos nesta seção. Seja breve nos seus agradecimentos. Não deve haver agradecimento a autores do trabalho. O texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra “Agradecimento” (escrita em caixa baixa).

NOTAS INFORMATIVAS - quando for o caso, antes das referências, deverá ser incluído parágrafo com informações e número de protocolo de aprovação da pesquisa pela Comissão de Ética e ou Biossegurança. (quando a Comissão de Ética pertencer à própria instituição onde a pesquisa foi realizada, deverá constar apenas o número do protocolo).

REFERÊNCIAS - o texto deverá iniciar sob a primeira letra da palavra "Referências" (escrita em caixa alta e negrito). Omitir a palavra bibliográficas. Alinhada somente à esquerda. Usar como base as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (NBR 10520 (NB 896) - 08/2002). Devem ser redigidas em página separada e ordenadas alfabeticamente pelo(s) sobrenome(s) do(s) autor(es). Os destaques deverão ser em NEGRITO e os nomes científicos, em ITÁLICO. NÃO ABREVIAR O TÍTULO DOS PERIÓDICOS. Indica-se o(s) autor(es) com entrada pelo último sobrenome seguido do(s) prenome(s) abreviado (s), exceto para nomes de origem espanhola, em que entram os dois últimos sobrenomes. Mencionam-se os autores separados por ponto e vírgula. Digitá-las em espaço simples e formatá-las segundo as seguintes instruções: no menu FORMATAR, escolha a opção PARÁGRAFO... ESPAÇAMENTO...ANTES...6 pts.Exemplo de como referenciar:

ARTIGOS DE PERIÓDICOS:

(citar os 3 primeiros autores seguido de "et al.")

JOCHLE, W.; LAMOND, D.R.; ANDERSEN, A.C. et al. Mestranol as an abortifacient in the bitch. *Theriogenology*, v.4, n.1, p.1-9, 1975.

Livros e capítulos de livro. Os elementos essenciais são: autor(es), título e subtítulo (se houver), seguidos da expressão "In:", e da referência completa como um todo. No final da referência, deve-se informar a paginação. Quando a editora não é identificada, deve-se indicar a expressão *sine nomine*, abreviada, entre colchetes [s.n.]. Quando o editor e local não puderem ser indicados na publicação, utilizam-se ambas as expressões, abreviadas, e entre colchetes [S.l.: s.n.].

REFERÊNCIA DE LIVROS (*in totum*):

BICHARD, S.J.; SHERDING, R.G. *Small animal practice*. Philadelphia : W.B. Saunders, 1997. 1467 p.

REFERÊNCIA DE PARTES DE LIVROS: (Capítulo com autoria)

SMITH, M. Anestrus, pseudopregnancy and cystic follicles. In: MORROW, D.A. *Current Therapy in Theriogenology*. 2.ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1986, Cap.x, p.585-586.

REFERÊNCIA DE PARTES DE LIVROS: (Capítulo sem autoria)

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In____. *Sampling techniques*. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4., p.72-90.

OBRAS DE RESPONSABILIDADE DE UMA ENTIDADE COLETIVA: A entidade é tida como autora e deve ser escrita por extenso, acompanhada por sua respectiva abreviatura. No texto, é citada somente a abreviatura correspondente. Quando a editora é a mesma instituição responsável pela autoria e já tiver sido mencionada, não é indicada.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. *Official methods of analysis*. 16.ed. Arlington: AOAC International, 1995. 1025p.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. *Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG*. Versão 8.0. Viçosa, MG, 2000. 142p.

REFERÊNCIA DE TESE/DISSERTAÇÃO/MONOGRAFIA:

BACILA, M. *Contribuição ao estudo do metabolismo glicídico em eritrócitos de animais domésticos*. 1989. Curitiba, 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

REFERÊNCIA DE PUBLICAÇÕES EM CONGRESSOS:

KOZICKI, L.E.; SHIBATA, F.K. Perfil de progesterona em vacas leiteiras no período do puerpério, determinado pelo radioimunoensaio (RIA). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA

VETERINÁRIA, XXIV., 1996, Goiânia. Anais... Goiânia: Sociedade Goiana de Veterinária, 1996, p. 106-107.

RESTLE, J.; SOUZA, E.V.T.; NUCCI, E.P.D. et al. Performance of cattle and buffalo fed with different sources of roughage. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4., 1994, São Paulo. Proceedings... São Paulo: Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos, 1994. p.301-303.

REFERÊNCIA DE ARTIGOS DE PERIÓDICOS ELETRÔNICOS: Quando se tratar de obras consultadas *on-line*, são essenciais as informações sobre o endereço eletrônico, apresentado entre os sinais < >, precedido da expressão “Disponível em: xx/xx/xxxx” e a data de acesso do documento, precedida da expressão “Acesso em: xx/xx/xxxx.”

PRADA, F.; MENDONÇA Jr., C. X.; CARCIOFI, A. C. [1998]. Concentração de cobre e molibdênio em algumas plantas forrageiras do Estado do Mato Grosso do Sul. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.35, n.6, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/> Acesso em: 05/09/2000.

MÜELLER, Suzana Pinheiro Machado. A comunicação científica e o movimento de acesso livre ao conhecimento. *Ciência da Informação*, Brasília, v. 35, n. 2, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-19652006000200004&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 13/05/2007.

REBOLLAR, P.G.; BLAS, C. [2002]. Digestión de la soja integral em ruminantes. Disponível em: http://www.ussoymeal.org/ruminant_s.pdf. Acesso em: 12/10/2002.

SILVA, R.N.; OLIVEIRA, R. [1996]. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URPe, 4., 1996, Recife. Anais eletrônico... Recife: Universidade Federal do Pernambuco, 1996. Disponível em: <http://www.propesq.ufpe.br/anais/anais.htm>> Acesso em: 21/01/1997.

CITAÇÃO DE TRABALHOS PUBLICADOS EM CD ROM: Na citação de material bibliográfico publicado em CD ROM, o autor deve proceder como o exemplo abaixo:

EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; OLIVEIRA, M.P. Avaliação de cultivares de *Panicum maximum* em pastejo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. Anais... São Paulo: Gmosis, 1999, 17par. CD-ROM. Forragicultura. Avaliação com animais. FOR-020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE INFORMAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA. Bases de dados em Ciência e Tecnologia. Brasília, n. 1, 1996. CD-ROM.

E.mail Autor, < e-mail do autor. “Assunto”, Data de postagem, e-mail pessoal, (data da leitura)

Web Site Autor [se conhecido], “Título”(título principal, se aplicável), última data da revisão [se conhecida], < URL (data que foi acessado)

FTP Autor [se conhecido] “Título do documento”(Data da publicação) [se disponível], Endereço FTP (data que foi acessado)

CITAÇÕES NO TEXTO: As citações no texto deverão ser feitas em caixa baixa. Quando se tratar de dois autores, ambos devem ser citados, seguido apenas do ano da publicação; três ou mais autores, citar o sobrenome do primeiro autor seguido de et al. obedecendo aos exemplos abaixo:

Silva e Oliveira (1999)

Schmidt et al. (1999)

(Silva et al., 2000)