

Flávio Márcio Santos Resende

**ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E VIRUCIDAS DA FERMENTAÇÃO COM
COBERTURA E SEM AMONTOAMENTO DA CAMA DE AVES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins

Co-orientador: Prof. Dr. José Sérgio de Resende

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2010

R433a Resende, Flávio Márcio Santos, 1970-

Análises físico-químicas e virucidas da fermentação com cobertura e sem amontoamento da cama de aves / Flávio Márcio Santos Resende. – 2010. 49 p. :il.

Orientador: Nelson da Silva Martins

Co-orientador: José Sérgio de Resende

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

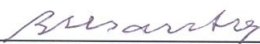
1. Frango de corte – Doenças – Teses. 2. Gumboro, Doença de – Teses. 3. Newcastle, Doença de – Teses. 4. Cama de galinha – Teses. I. Martins, Nelson Rodrigo da Silva. II. Resende, José Sérgio de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.508 96

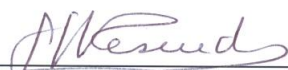
Dissertação defendida e aprovada em 14 de Setembro de 2010, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins
Orientador



Dr.ª Bernadete Miranda dos Santos



Prof. José Sérgio de Resende

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Universidade Federal de Minas Gerais e a Escola de Veterinária por me concederem a oportunidade para da realização desse trabalho de mestrado.

Agradeço à minha família, Fernanda, minha esposa, e aos meus filhos, Bernardo e Pedro, pelo amor incondicional, apoio e compreensão nos momentos de ausência. Também a minha mãe e irmãos por acreditarem sempre em mim e vovô Helano e vovó Luciana por cuidarem muito bem de meu filho durante as horas de dedicação a este trabalho.

Agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins, pelos ensinamentos, experiência, apoio, momentos de descontração, paciência e compreensão durante todo o tempo do mestrado.

Agradeço também ao meu co-orientador, Prof. Dr. José Sérgio de Resende, pelos ensinamentos, momentos filosóficos e pelas preciosas contribuições com idéias e sugestões durante a realização deste trabalho.

Agradeço aos professores Priscilla Rochele Barrios, Leonardo Lara, Dalton Fontes e Israel José da Silva pela paciência em me ouvirem e pelas sugestões para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas do Setor de Doença das Aves Daniele, Daniel, Alessandra, Francisco, Marcela, Anamaria, Cristiane, Cleiton pelos momentos de estudos e descontração e em especial a Sandra, Renata, Carolina e Alexis por contribuírem diretamente na realização desse trabalho. Sem eles tudo seria muito mais difícil. Não poderia esquecer a grande colaboração da Dra. Adriana Dias Gomes.

Agradeço aos demais colegas da pós-graduação, André, Lucas, Fernanda, Lucimara e dentre tantos outros (a lista é grande) pela agradável presença durante esse tempo.

Agradeço aos funcionários Cláudio Públio, Toninho (Labnutri), Anita, Grazielle por estarem sempre dispostos para ajudar. Também aos funcionários da Fazenda Experimental “Professor Hélio Barbosa”, Renato, Geraldo e às meninas da cozinha.

Agradeço a CAPES pela bolsa de estudos concedida.

SUMÁRIO

LISTA ABREVIATURAS	9
RESUMO	11
ABSTRAT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Aspectos da microbiota da cama de frango	14
2.2. Aspectos sanitários	16
2.3. Reutilização da cama de frango.....	18
2.3.1 Condicionadores químicos da cama	19
2.3.1.1. Uso de acidificantes	19
2.3.1.2. Uso de alcalinizantes	20
2.3.2. Método fermentativo	21
2.3.3. Inibição competitiva	23
2.4. Aspectos econômicos e ambientais sobre a reutilização de cama	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Experimentos-piloto	24
3.1.1. Local dos experimentos-piloto	24
3.1.2. Avaliação da atividade biológica dos vírus em extrato de cama por inoculação em embriões nos experimentos-piloto	26
3.2. Local do experimento de campo	26
3.3. Delineamento experimental	26
3.4. Análises físico-químicas	30
3.5. Titulação da vacina	30
3.6. Avaliação da atividade biológica do VDIB em extrato de cama por inoculação em embriões no experimento de campo	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Experimentos-piloto	33
4.2. Titulação do vírus VDIB na cama de frangos de corte em fermentação durante o experimento	34
4.3. Temperatura da cama de frangos de corte durante a fermentação	40
4.4. Umidade da cama de frangos de corte em fermentação	41
4.5. Variação de pH na cama de frangos de corte em fermentação	42
4.6. Amônia liberada pela cama de frangos de corte em fermentação	42
5. CONCLUSÃO	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE QUADROS		
Quadro 1	Grupos experimentais dos experimentos-piloto de acordo com os tratamentos da cama de aviário e tipo de vacina utilizada na mistura	25
Quadro 2	Grupos experimentais com cama de frangos de corte conforme o tratamento a ser utilizado	28

LISTA DE TABELAS		
Tabela 1	Titulação viral vacinal (DIE ₅₀) do VDIB em OEG/SPF	35
Tabela 2	Titulação viral ⁽¹⁾ (DIE ₅₀) do VDIB do extrato de cama de frangos de corte coberta no início do experimento (0 dia)	35
Tabela 3	Titulação viral ⁽¹⁾ (DIE ₅₀) do VDIB do extrato de cama de frangos de corte descoberta no início do experimento (0 dia)	36
Tabela 4	Titulação viral ⁽¹⁾ (DIE ₅₀) do VDIB do extrato de cama de frangos de corte coberta no final do experimento (12 dias)	36
Tabela 5	Titulação viral ⁽¹⁾ (DIE ₅₀) do VDIB do extrato de cama de frangos de corte descoberta no final do experimento (12 dias)	37
Tabela 6	Títulos (DIE ₅₀) iniciais (0 dia) e finais (12 dias), em log ₁₀ , do VDIB nos diferentes tratamentos	39
Tabela 7	Umidade da cama de frangos de corte nos tratamentos coberto e descoberto (controle) em quatro tempos ao longo do experimento de campo	41
Tabela 8	Médias dos valores de pH da cama de frangos de corte nos tratamentos coberto e controle (descoberto) em três tempos ao longo do experimento de campo	42
Tabela 9	Médias das concentrações de amônia (NH ₃), em mg%, em três tempos ao longo do experimento com cama de frangos de corte coberta e descoberta	42

LISTA DE FIGURAS		
Figura 1	Grupo experimental de cama de aviário SPF com tratamento coberto do experimento-piloto	25
Figura 2	Grupo experimental de cama de aviário SPF com tratamento descoberto do experimento-piloto	25
Figura 3	Tratamento da cama de frango coberta com lona plástica (T1)	27
Figura 4	Tratamento da cama de frango descoberta (T2)	27
Figura 5	Fluxograma das amostragens de cama de frangos de corte nos tratamentos coberto e descoberto e procedimentos seqüenciais para as análises físico-químicas e isolamentos viral	29
Figura 6	Avaliação da atividade biológica do VDIB em extrato de cama de frangos de corte por inoculação em OEG/SPF	32
Figura 7	Efeitos no embrião da inoculação de OEG/SPF com extratos de cama de frangos de corte. O embrião à direita apresenta-se hemorrágico e o da esquerda está normal (controle)	38
Figura 8	Efeitos no embrião da inoculação de OEG/SPF com extratos de cama de cama de frangos de corte. O embrião à esquerda está com o desenvolvimento retardado em relação ao embrião normal (controle) à direita	38
Figura 9	Efeitos no embrião da inoculação de OEG/SPF com extratos de cama de frangos de corte. O embrião da esquerda apresenta-se com palidez de baço (seta) e do da direita está normal (controle)	39

Figura 10	Efeitos no embrião da inoculação de OEG/SPF com extratos de cama de frangos de corte. A bolsa cloacal do embrião à esquerda apresenta-se pálida (seta) e a da direita normal (controle)	39
-----------	---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Médias das temperaturas das camas de aviário SPF nos diferentes tratamentos nos experimentos-piloto	33
Gráfico 2	Médias dos níveis de amônia (NH ₃) nas camas de aves SPF nos tratamentos coberto e descoberto, com vacina ou sem vírus (controle) nos experimentos-piloto	34
Gráfico 3	Temperaturas diárias, em °C, dos tratamentos de cama de frangos de corte coberto, descoberto (controle) e temperatura ambiente no experimento de campo	40

LISTA DE ABREVIATURAS

Aw	Atividade de água
cm	Centímetros
DIE ₅₀	Dose infectante para embrião 50%
DNA	Ácido desoxirribonucléico
g	Gramas
h	Altura
HA	Atividade hemaglutinante
H ₂ O dd	Água destilada e deionizada
IBD	<i>Infectious bursal disease</i> (doença infecciosa bursal)
LCA	Líquido cório-alantóide
log ₁₀	Logaritmo na base 10
m	Metros
m ²	Metros quadrados
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	milímetros
ND	<i>Newcastle disease</i> (doença de Newcastle)
NH ₃	Amônia
OEG	Ovos embrionados de galinha
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
rDNA	Ácido desoxirribonucléico ribossomal
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
SPF	<i>Specific pathogen free</i> (livre de patógenos específicos)
VDIB	Vírus da doença infecciosa bursal
VDN	Vírus da doença de Newcastle
µg	Microgramas
µl	Microlitros

RESUMO

A fermentação de cama de frangos de corte tem sido recomendada como método de viabilização da sua reutilização, por promover a diminuição da carga de microrganismos para lotes consecutivos. Um experimento-piloto foi conduzido para se avaliar condições controladas de fermentação e seus efeitos sobre a infecciosidade dos vírus da doença de Newcastle (VDN) e da doença de Gumboro (VDIB). Foi coletada cama de um lote de galinhas SPF, homogeneizada e distribuída em grupos experimentais. Desta forma, esses grupos experimentais foram divididos em dois subgrupos, de acordo com o tratamento de fermentação coberta com lona plástica ou não, sendo, assim, inoculados com VDN estirpe La Sota, a $10^{8,21}$ doses infectantes para 50% dos embriões (DIE_{50})/ kg de cama ou com VDIB estirpe Lukert, a $10^{2,69}$ DIE_{50} / kg de cama, em experimentos cronologicamente separados. A temperatura da cama foi mensurada diariamente, e, de amostras de cama coletadas aos dias 0, 4, 8, e 11, foram mensuradas os níveis de NH_3 volatilizada. Outro experimento a campo foi realizado de maneira similar, com dois grupos (coberto ou não) e amostras de camas de lotes de frangos, vacinados com VDIB, foram coletadas nos dias 0 e 12 de fermentação para avaliação da infecciosidade viral. Para essa avaliação, foram selecionados ovos embrionados de galinha SPF com 10 dias de incubação, inoculando-os com extratos obtidos da cama, depois de clarificados e tratados com solução de antibióticos, com seis repetições por grupo experimental. Amostras de cama foram coletadas aos dias 0, 4, 8 e 12 de fermentação para medições de umidade, pH e NH_3 e a temperatura da cama mensurada diariamente. O VDN foi completamente inativado em camas submetidas a 8 ou mais dias de fermentação, cobertas ou não. O VDIB não foi inativado em nenhum dos tratamentos que a cama foi submetida. A inativação de VDN pareceu ser mediada pela NH_3 ou por efeitos de outros fatores físico-químicos, mas não pela temperatura de fermentação, que não atingiu níveis suficientes de inativação. Os valores de umidade, pH e NH_3 apresentaram diferenças significativas na cama fermentada coberta. Conclui-se que, a reciclagem da cama para lotes subsequentes, pelo método da fermentação com cobertura por 12 dias, demonstrou ser segura para inativação do VDN. No entanto, cama em reuso pode não ser segura no que se refere ao VDIB.

Palavras-chave: Doença de Gumboro, doença de Newcastle, infecciosidade, cama de frangos de corte, fermentação, pH, amônia, umidade.

ABSTRACT

Broiler litter fermentation has been recommended for reuse of poultry bedding, ensuing the maturation of broiler litter, in order to reduce disease risk for consecutive flocks. A pilot experiment was set up for evaluating controlled fermentation conditions and their effects on the infectivity of Newcastle disease (NDV) or infectious bursal disease (IBDV) viruses. Litter was collected from a SPF chicken flock, homogenized and distributed into experimental groups. Groups were divided into two subgroups, according to fermentation with plastic covering or not, and infected with $10^{8.21}$ NDV La Sota embryo infective doses (EID₅₀)/kg litter or $10^{2.69}$ IBDV Lukert EID₅₀/kg litter, in chronologically separated experiments. Samples were collected at days zero, four, eight and 11 of fermentation for the measurement of NH₃ and for the evaluation of virus infectivity. Litter temperature was measured daily. A field study was similarly performed, with two groups (covered or not) and six repetitions of IBDV vaccinated broilers sampled at days zero and 12 of fermentation for the evaluation of virus infectivity. For the evaluation of virus infectivity, were selected 10-day incubating SPF chicken embryos and embryonic inoculations were performed with litter extracts, after clarification and treatment with antibiotic solution. Litter temperature was measured daily. Humidity, NH₃ and pH were measured by sampled at days zero, four, eight and 12 of fermentation. NDV was completely inactivated in litters subject to >8 or more days of fermentation, covered or not. IBDV was not inactivated in either fermentation litters subject to 12 days of fermentation. NDV inactivation appeared to be mediated by NH₃ or other chemical effect, but no temperature, which did not elevate to inactivating levels. Humidity, NH₃, and pH were significantly higher in covered fermentation. It was concluded that 12-day fermentation may be performed for inactivating NDV and recycling broiler litters. However, the recycled product may not be safe regarding IBDV.

Keywords: Chickens, broilers, litter, litter fermentation, Newcastle disease virus, infectious bursal disease virus, infectivity, fermentation, pH, ammonia, humidity.

1. INTRODUÇÃO

Em 2008, a avicultura brasileira apresentou um crescimento de aproximadamente 7,03% quando comparado a 2007. Com uma produção estimada em 5,176 bilhões de frangos de corte, foram originadas 10,966 milhões de toneladas de carne de frango, sendo que, deste total, 7,294 milhões de toneladas, aproximadamente, foram destinadas ao mercado interno e 3,646 milhões para o externo. Esses índices indicaram que houve um aumento de 4,80% na produção interna e de 10,91 % nas exportações sobre o mesmo período (Relatório..., 2008). Neste cenário, o Brasil permanece como um dos principais produtores mundiais de carne de frango ocupando o primeiro lugar no volume de exportação. O crescimento da produção ocorre, tanto pelo aumento no número de animais alojados nos investimentos em novas unidades de produção, como também na diminuição da ociosidade das unidades já existentes. O aumento no volume de produção tem associação direta com maior demanda por infraestrutura e insumos (transporte, ração, pinto de um dia, escoamento da produção, etc.) e também resulta em maior produção de resíduos da atividade, podendo ocasionar alguns tipos de impactos, sejam de natureza econômica, sanitária ou mesmo ambiental, principalmente nas regiões de maior produção avícola no país.

O resíduo de maior importância na avicultura de corte é a cama de frango. Por definição a cama é um subproduto derivado da criação industrial de frangos de corte, formada pelo resultado da mistura do substrato de forração do piso com todo material fecal, urina, secreções e descamações produzidos pelas aves durante o ciclo de criação e também por fungos e bactérias do ambiente. Por isso, uma microbiota bem diversificada se estabelece na cama. A criação de aves em confinamento só é possível pela utilização de cama, pois suas funções básicas é que garantem que as aves tenham um ambiente adequado ao desempenho de suas características produtivas aliados aos outros fatores de ambiência, nutrição, manejo e

sanidade. A cama de aviário tem as seguintes funções: a absorção da umidade eliminada pelas fezes e também da água dos equipamentos, sendo fundamental que o material que a compõe tenha boa capacidade de absorção dessa umidade e que esteja numa altura adequada; o isolamento térmico, pois a cama deve evitar que as aves, especialmente as jovens, tenham contato com superfície fria, preservando a perda de calor 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 (Paganini, 2002). Vários materiais têm sido utilizados como substrato para a cama de aviário, sendo que, a maravalha é a matéria-prima mais freqüentemente usada na avicultura brasileira. Entretanto, materiais alternativos, como casca de arroz, sabugo de milho triturado, capim cameron picado, palhada de soja picada, palhada de feijão, resto de cultura de milho triturada, serragem, bagaço de cana (Jorge et al., 1996; Ávila et al., 2007) e areia (Bilgili et al., 1999; Macklin et al., 2005) também podem ser utilizados com essa finalidade. A escolha de qualquer um deles depende de disponibilidade, qualidade, custo ou finalidade de utilização após o descarte do lote de aves.

Ao se considerar que a produção média de cama é de 1,75 kg por ave alojada, na matéria natural com 20% de umidade (Santos et al., 2005), pode-se estimar que a produção de cama de frango no Brasil em 2008 foi de 9 bilhões de toneladas aproximadamente. Diante de tal volume de cama de frango, há uma preocupação crescente por parte dos produtores como também dos profissionais do setor de toda cadeia produtiva a respeito do correto manejo que se deve aplicar a esse resíduo. A cama de frango apresenta o potencial de tanto ser um recurso como também um poluente, dependendo de como é tratada a questão do aproveitamento ou mesmo reaproveitamento desse material. Suas características microbiológicas podem, ao mesmo tempo, estar associadas a um material potencialmente contaminante como também de grande utilidade quando se considera o ativo metabolismo microbiano que se instala pelo constante aporte de

matéria orgânica que a cama recebe ao longo do ciclo de criação das aves. Suas características intrínsecas a qualificam como uma excelente fonte de adubo orgânico, mas o aproveitamento dessa potencialidade depende da observação da capacidade suporte do solo em que será aplicado. As restrições comerciais impostas por países importadores relacionam-se com o destino correto que se dá aos resíduos em face das questões de segurança alimentar e de prevenção de possíveis eventos sanitários que poderiam ser veiculados por esses materiais. Além do mais, os gastos com materiais que irão compor a cama vêm representando um importante item na composição do custo na produção de frangos de corte. Algumas soluções são propostas a fim de contornar tais problemas, e uma delas diz respeito ao tratamento da cama de frango para posterior reutilização de forma segura, minimizando os possíveis efeitos de contaminação e fator poluidor ambiental.

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do método da fermentação com cobertura e sem amontoamento em cama de frangos de corte sobre a viabilidade dos vírus das doenças de Newcastle (VDN) e de Gumboro (VDIB). Para isso, foram realizados estudos preliminares de laboratório, nos quais camas de aves SPF (livres de patógenos específicos) foram inoculadas com vírus vacinais dessas doenças, e também um experimento de campo, utilizando o VDIB presente na cama oriundo do lote de aves criado sob a mesma como modelo experimental. As variáveis analisadas foram a temperatura de fermentação, o pH, a umidade e a amônia livre como fatores interferentes na inativação do vírus, além de se verificar o comportamento de títulos virais por inoculação em ovos embrionados de galinhas (OEG) SPF ao longo do período estudado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos da microbiota da cama de frango

A cama de frango constitui-se em um material rico em nutrientes orgânicos, pela grande quantidade de matéria fecal incorporada ao longo do ciclo de criação das aves. Associado a esse fato, as características físico-químicas de pH variando entre 6 e 9 (Jeffrey, 2001), atividade a água atingindo valores de 0,90 (Hayes et al., 2000) e temperatura usual no ambiente avícola (20-30°C) criam condições para o estabelecimento de um nicho propício à manutenção de uma grande quantidade de bactérias (Fiorentin, 2005). As bactérias presente na cama são, em grande parte, oriundas das excretas das aves e existe alguma similaridade entre a microbiota do trato intestinal das aves e da cama. As técnicas de detecção molecular de segmentos de DNA amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e de seqüenciamento para a região 16S do RNA ribossomal de alguns grupos de bactérias têm sido usada para estudo da ecologia da microflora intestinal das aves e da cama de frango. Amith-Romach et al. (2004) e Lu et al. (2003 a) demonstram a ocorrência do predomínio de bactérias Gram (+) na ecologia bacteriana no intestino de frangos de corte e que o gênero *Lactobacillus* é o mais abundante anaeróbico no intestino delgado. Em outro experimento, Lu et al. (2003 b) avaliaram a composição microbiológica da cama utilizando o isolamento e a caracterização molecular (rDNA codificador ou rRNA transcrito) de bactérias. Os autores identificaram no método de cultivo, selecionando alguns meios para grupos específicos de bactérias, que há o predomínio de bactérias aeróbias na cama, e dessas, a maioria foram do grupo dos estafilococos (13%), enquanto bactérias como enterococos (0,1%) e Gram (-) entéricas (0,11%) representaram a minoria nas amostras de cama. Pela técnica molecular, concluíram também que a microbiota bacteriana da cama é composta, predominantemente, de bactérias Gram (+) (87%) e os lactobacilos e o gênero *Salinococcus* formam os grupos mais

abundantes. A presença de bactérias potencialmente patogênicas, como *Salmonella* e *Campylobacter* podem também estar associadas à microflora intestinal das aves (Amith-Romach et al., 2004). Na microbiota da cama, Lu et al. (2003) não detectaram também a ocorrência desses gêneros de bactérias assim como a ausência de *Yersinia*, *Listeria* spp., genes de virulência associados a *E. coli* patogênica ou *Staphylococcus aureus*, fato esse, podendo estar relacionado à ocorrência esporádica na cama, ou mesmo ausência desses microrganismo, ou pela variação do limite de detecção de PCR, os quais variaram de 10^4 células a quantidades tão pequenas quanto 10 células, dependendo do "primer" utilizado. Mas várias seqüências dos grupos de clostrídios, outros estafilococos e *Bordetella* spp., bactérias também relacionadas a doenças, puderam ser identificadas. Outro ponto a ser considerado, é a presença de outras bactérias Gram (+) na cama, como *Arthrobacter*, *Brevibacterium* e *Cellulomonas* spp., organismos que podem estar envolvidos na decomposição da material orgânico, incluindo a madeira do substrato da cama.

Ivos et al. (1966) fizeram um estudo da dinâmica da microbiota da cama, analisando a estreita correlação entre o microclima nas instalações avícolas, a população microbiana, os componentes físico-químicos da cama e a sua qualidade sanitária geral. Observaram que ocorre um rápido crescimento da população de coliformes a partir de 17 dias após o alojamento, atingindo o pico no 24º dia, mantendo-se até o 40º, para então começar um decréscimo. Tal comportamento foi relacionado ao desenvolvimento da decomposição química da matéria orgânica e conseqüente estabelecimento do equilíbrio microbiológico na cama, condicionando o rápido decréscimo da população de microrganismos ao longo do tempo, por causa da limitação dos substratos do meio e liberação de produtos do seu metabolismo. Outros estudos também demonstraram dinâmica semelhante. A presença de coliformes também foi demonstrada em alguns tipos de cama de frango de primeiro

uso (Jorge et al., 1996) como também de cama em reutilização (Jorge et al., 1997). O comportamento da população de coliformes apresentou-se de forma quadrática, atingindo também seus maiores títulos entre 17 e 24 dias de idade e diminuindo progressivamente até o final do período de criação aos 45 dias. Lovett et al. (1971) observaram que o tempo de alojamento de frangos em camas, tanto novas como reutilizadas, afetavam a densidade de bactérias, atingindo o pico em aproximadamente um mês para então diminuir e permanecer constante com valores de 1 a $2 \log_{10}$ mais baixos.

Bacon e Burdick (1977) encontraram 18 espécies de fungos que foram capazes de crescer em camas durante o ciclo de produção de frangos de corte. A espécie *Scopulariopsis brevicaulis*, um fungo comumente encontrado em matéria orgânica em decomposição, foi caracterizada pela alta freqüência e densidade relativa em galpões sem histórico de problemas com micotoxicose. A baixa ocorrência dessa espécie em galpões com relato do problema pode estar associada à liberação de componentes inibitórios produzidos por outros fungos. Foram identificadas também várias espécies de fungos toxigênicos, entre elas algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* além de *Cladosporium*, *Trichoderma* e *Fusarium*. Lovett et al. (1971) isolaram 17 gêneros de fungos em camas de aviário e os dominantes foram *Penicillium*, *Scopulariopsis* e *Candida*. Jones e Hagler (1982) verificaram que existe diferença significativa maior na contagem de fungos em camas novas em relação às reutilizadas nas três primeiras semanas do ciclo de criação de frangos de corte. Atribuíram esse fato à sucessão da população de fungos que ocorre nas camas novas, ao contrário do equilíbrio da microbiota fúngica que se estabelece nas camas em reutilização, resultando em uma flora mais estável e menos susceptível às variações na população.

2.2. Aspectos sanitários

O ambiente de criação de frangos de corte oferece condições ótimas para a multiplicação de uma série de microrganismos, como bactérias, fungos, alguns parasitos, artrópodes e vírus, os quais podem causar danos à saúde das próprias aves como também a outras espécies animais e também aos humanos. O acúmulo de bactérias na cama de frango não representa necessariamente um inconveniente. Muitas bactérias presentes em grandes quantidades nas excretas das aves, como os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, são relacionadas ao grupo de bactérias benéficas, porém outras espécies são potencialmente patogênicas para humanos, como salmonelas e *Campylobacter* e além de espécies capazes de causar danos às próprias aves, como *E. coli* e *Clostridium* (Amit-Romach et al., 2004). Conseqüentemente, a cama de frango pode exercer grande importância na epidemiologia de algumas doenças, especialmente aquelas que têm as fezes como principal fonte de disseminação. Dentre essas enfermidades, pode-se destacar a doença de Gumboro (Lukert e Saif, 2003), a doença de Newcastle (Alexander, 2003), as coccidioses (McDougald, 2003) e enterobactérias com potencial zoonótico causadoras de toxinfecções alimentares, como as do gênero *Salmonella* (Berchieri Júnior, 2000), e de enterocolite em humanos, como as do gênero *Campylobacter* spp. (Ito et. al., 2004).

Daves e Wray (1996) detectaram a persistência de *Salmonella enteritidis* em condições experimentais por pelo menos um ano após a retirada de aves naturalmente infectadas com a bactéria do local de alojamento. Em unidades de criação comercial de aves, encontraram também a bactéria em pequenas porções de cama que permaneceram do lado de fora dos galpões e que não sofreram qualquer tipo de desinfecção após o despovoamento e higienização dos aviários. Hayes et al. (2000) verificaram a distribuição dispersa de *Salmonella* na cama de frango, estando diretamente relacionada com a atividade de

água (A_w) e a umidade que se formam em vários nichos dentro do galpão. Esses autores propuseram que a população de *Salmonella* pode ser controlada em condições de criação comercial de frango ao manter a cama com A_w abaixo de 0,84 e umidade entre 20 e 25%, utilizando, para isso, a ventilação da cama dentre outros meios. Concluíram que métodos de intervenção que mantêm valores mais baixos de A_w tem também o objetivo de controlar populações de outros patógenos presentes na cama, como *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* e *Listeria* spp.

Schrader et al. (2004) confirmaram que a cama exerce um importante reservatório para *E. coli* associadas à celulite em frangos de corte. De acordo com os autores, ao se limitar do número de lotes criados sobre a mesma cama e aumentar o período de intervalo entre lotes, ocorre uma diminuição significativa da taxa de celulites nas aves, contudo não houve associação significativa entre a concentração de *E. coli* no final do período de crescimento, assim como de outras bactérias Gram (-) e a reutilização da cama. Isso significa que a contagem de *E. coli* e Gram (-) na cama é essencialmente a mesma entre a cama de primeiro lote e aquela que é usada pela sexta vez. O estudo também sugere que ocorre uma maturação qualitativa na cama, com a seleção de população de *E. coli* menos patogênica e mais adaptada ao ambiente da cama, uma vez que o aumento nos dias do período de intervalo entre lotes não reduz a concentração da bactéria como era esperado.

Lu et al. (2003 b) detectaram a presença de *Staphylococcus aureus* em cama de frango por similaridade de seqüências de RNA ribossomal, embora não conseguissem encontrar a prevalência de estirpes patogênicas enterotoxigênicas. Embora algumas estirpes não apresentem patogenicidade, o *S. aureus* está associado a quadros clínicos de dermatite gangrenosa (Fallavena, 2000) e infecções articulares e sistêmicas (Zhu et al., 2001). Em frangos de corte as dermatites resultam da ocorrência de injúrias teciduais na pele, associadas a situações em que há comprometimento do

sistema imunológico, especialmente em infecções pelos vírus da doença de Gumboro, anemia infecciosa, reticuloendoteliose e adenovirose (Fallavena, 2000).

Bates et al. (2004) relacionaram a presença de *Campylobacter* em instalações avícolas ao *Alphitobius diaperinus*, um vetor artrópode (Ordem Coleoptera) amplamente distribuído em camas de aviário. Os autores comentaram sobre a importância dessa enterobactéria como um importante agente causador de gastroenterite em humanos e está muitas vezes associada ao consumo de carne de frango, e que, apesar dos esforços nos procedimentos de limpeza e desinfecção das instalações, existe grande dificuldade no controle desse inseto, representando, então, uma importante fonte de reservatório do patógeno no ambiente avícola.

Trovó (2006) avaliou a presença constante de *Clostridium perfringens* em camas de granjas comerciais de frangos de corte. A concentração dessa bactéria teve relação com os números de vezes da utilização da cama, sendo que houve diferença significativa, para a menor contagem de esporos, quando a cama foi reutilizada duas vezes e apresentando somente diferença numérica entre as camas nova e reutilizada somente uma vez. O autor sugeriu que a menor concentração de *C. perfringens* teve relação com a maior alcalinidade de camas em reutilização, variando o pH de 8,2 a 8,58, o que dificultaria a germinação dos esporos da bactéria.

A literatura científica também traz referências à viabilidade de vírus em camas. Chaloupka et al. (1968) observaram o efeito da reutilização da cama de frango sobre a incidência da doença de Marek e afirmaram que essa prática poderia ser vantajosa na redução de condenações devidas à doença. Bankowski e Reynolds (1975) observaram que, em camas resultantes de aves que foram infectadas com o vírus da doença de Newcastle (VDN) velogênico viscerotrópico, não houve evidência de infecção em galinhas susceptíveis alojadas de 10 a 14 dias mais tarde nestas mesmas camas. No

entanto, os autores consideraram que as condições do experimento permitiram alto controle de fatores que influenciam a permanência do agente no ambiente, como a presença de roedores, insetos (moscas) e outros artrópodes. No estudo realizado por Velayudhan et al. (2003), foi verificada a sobrevivência de pneumovírus aviário em camas de perus reutilizadas e o vírus foi reisolado aos 3, 7 e 14 dias em camas mantidas nas temperaturas do ambiente da sala (20 a 25°C), 8°C e -12°C, respectivamente, mas observou-se um maior tempo de sobrevivência desse vírus nestas mesmas circunstâncias em amostra de cama autoclavada. Os achados sugerem que a viabilidade desse vírus depende de fatores da cama como a presença de outros microrganismos, tais como *Escherichia coli* que sintetizam ribozimas ou RNase com o potencial de degradação viral, e também pela presença de matéria orgânica. Kelley et al. (1994) detectaram a presença de vírus entéricos no início do empilhamento de algumas amostras de cama, através da análise de varredura microscópica de elétrons, e, após o período de estocagem por aproximadamente cinco meses, não foi mais evidenciada a presença de coronavírus e rotavírus.

A presença constante do vírus da doença de Gumboro (VDIB) na avicultura tem gerado grande preocupação para a indústria. Segundo Bernardino e Leffer (2009), essa enfermidade apresenta uma distribuição geográfica cosmopolita, e, portanto, está presente na maioria dos plantéis comerciais, causando grandes prejuízos e constantes revisões nos programas de vacinação principalmente por causa do surgimento de mutações e variações antigênicas do vírus nas últimas duas décadas. O vírus pertence à família *Birnaviridae*, gênero *Birnavirus* e seu genoma consiste de duas moléculas de RNA fita dupla, não possui envelope, o que confere ao vírus maior estabilidade. É capaz de sobreviver em instalações contaminadas por até 100 dias, e a alta resistência do vírus aos diferentes compostos químicos, resulta em longa viabilidade nas instalações, mesmo quando se aplicam rigorosas medidas de limpeza e

desinfecção. Em alimentos contaminados e fezes, o VDIB é capaz de permanecer viável por mais de 60 dias. Pode resistir a temperaturas de 60°C por 30 minutos, mas é destruído a 70°C pelo mesmo período. É um vírus bastante estável e não é afetado por pH 2.

A doença de Newcastle (ND) faz parte da lista de doenças emergenciais do código zoossanitário internacional da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e a notificação dos focos da doença é compulsória quando causada por vírus, cuja patogenicidade intracerebral em pintos de um dia de galinhas SPF, seja maior que 0,7 (Newcastle disease, 2009). Segundo Paulillo e Doretto Júnior (2009), a enfermidade é de grande relevância, tendo sérias consequências sócio-econômicas e/ou de saúde pública, de importância significativa para o comércio internacional de animais e seus subprodutos. Esses autores descrevem, ainda, o vírus da doença de Newcastle (VDN) como pertencente à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, do gênero *Avulavirus* e do sorotipo Paramyxovírus aviário tipo 1. Seu genoma é constituído de RNA fita simples, que tem como importante característica a presença de um envelope formado por membrana celular modificada, sendo sensível à luz solar, luz ultravioleta, aquecimento, oxidação, pH e a maioria dos agentes químicos. Algumas estirpes são inativadas a 56°C em 5 minutos, porém outras levam até 6 horas para serem destruídas. A temperatura de 100°C pode inativá-lo em poucos segundos e a temperatura de cozimento a 80°C destrói o vírion em produtos cárneos. O vírus permanece viável por até 87 dias em penugens de pintos conservadas a 37°C, e por até 126 dias em superfície de ovos. Em aviários, o VDN permanece ativo por até 235 dias e pode morrer rapidamente se exposto à luz solar direta. Pode suportar extremos de pH entre 2 e 10 por algumas horas.

2.3. Reutilização da cama de frango

A presença de bactérias em cama de frango é inerente a produção, pois o ambiente de

criação das aves propicia a multiplicação da microbiota fisiológica, tanto de bactérias Gram (+) benéficas quanto de bactérias indesejáveis, sendo algumas com potencial zoonótico (Fiorentin, 2005). Entretanto, em camas ricas em resíduos fecais e umidade, sob ativo metabolismo microbiano, os agentes potencialmente zoonóticos ocorrem em títulos mais baixos do que em camas secas e pulverulentas (Jorge et al., 1996). E, desta forma, considerar camas usadas como contaminadas e, portanto, inadequadas para a reutilização, poderia representar rejeição de material potencialmente útil (Jorge et al., 1997). Para viabilizar a reutilização da cama de forma segura é preciso que se faça uma redução da sua carga microbiana, a fim de minimizar a possibilidade de veiculação de agentes patogênicos para os lotes seguintes (Fiorentin, 2005).

Estudos revisados por El-Ahraf et al. (1984) focavam a presença de nutrientes de grande valor para a alimentação animal em camas de aviário, indicando que essa prática poderia ser usada com sucesso sem nenhum efeito deletério para os rebanhos, embora outros estudos alertassem para o risco da presença de substâncias potencialmente danosas (contaminantes industriais, pesticidas, toxinas, antibióticos, dentre outros) como também de microorganismos. Mas ao se contextualizar a utilização de cama de frango na alimentação de bovinos para os dias atuais, tal prática sofre fortes restrições por parte de legislação brasileira de acordo com a regulamentação legal do uso da cama de aviário. A Instrução Normativa n.8 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2004) determina a proibição, em todo território nacional, da produção, da comercialização e da utilização da cama de aviário para a alimentação de ruminantes, considerando a epidemiologia da encefalopatia espongiforme bovina e pela necessidade de manutenção da situação sanitária do Brasil em relação a essa doença. O agente etiológico dessa grave doença, também conhecida como “doença da vaca louca”, é uma partícula protéica denominada prion, sendo extremamente resistente ao calor (1

hora a 360°C de calor seco), radiação ultravioleta e substâncias químicas. Os episódios dessa doença foram associados ao consumo de proteínas de origem animal por ruminantes, como a cama de frango, já que nas formulações de ração para aves utilizam-se farinhas de carne e ossos que são susceptíveis à contaminação por esse agente (Barros e Marques, 2003).

2.3.1. Condicionadores químicos da cama

Diversos produtos têm sido utilizados como condicionadores químicos em camas de frango. Esses produtos têm propriedades acidificantes, como o bissulfato de sódio (Pope e Cherry, 2000; Line e Bailey, 2006), sulfato de alumínio, superfosfato simples (Oliveira et al., 2004), ácido sulfúrico (Vicente et al., 2007), lignossulfato de sódio com ácidos fórmico e propiônico (Garrido et al., 2004), como também alcalinizantes como a cal hidratada (Oliveira et al., 2003; Oliveira et al., 2004; Silva et al., 2007). Outros produtos alteram o teor de umidade na cama, como o gesso agrícola (Oliveira et al., 2004).

2.3.1.1. 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 de patógenos humanos associados às aves, especialmente, *Campylobacter* e *Salmonella* (Line e Bailey, 2006). Substâncias acidificantes, pela redução do pH abaixo de 7,0, também podem interferir na volatilização de amônia para o ambiente (Line, 2002; Oliveira et al., 2003), deslocando o equilíbrio da relação de NH₃ (amônia volátil) e NH₄ (amônio não-volátil).

Pope e Cherry (2000) trataram a cama de frango com bissulfato de sódio e tiveram médias significativamente menores nas camas tratadas em relação aos valores de pH, concentração de amônia, contagem de bactérias totais e *Escherichia coli* em relação às não tratadas, mas não encontraram diferenças na contagem de

Salmonella, *E. coli* e *Campylobacter* nas carcaças.

Line (2002) afirmou que o tratamento de acidificação da cama pode ser usado como recurso para o controle *Campylobacter* por reduzir a transmissão horizontal de patógenos em frangos de corte. No seu estudo houve redução significativa da frequência da colonização e população dessa bactéria no ceco de aves sob camas tratadas com diferentes doses de sulfato de alumínio e bissulfato de sódio onde, previamente, foram alojadas aves inoculadas com a bactéria. A redução da população de patógenos na cama poderia, conseqüentemente, limitar a transmissão horizontal desses agentes entre os lotes e como resultado diminuir a frequência a colonização intestinal e o número de bactérias que poderiam entrar nas plantas de processamento.

Line e Bailey (2006) também utilizaram sulfato de alumínio e bissulfato de sódio, porém nas condições de granjas comerciais. Tiveram como resultado uma leve queda da colonização de *Campylobacter* 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 acidificantes em cama de frango em reutilização, na medida em que o produto reduziu significativamente o pH da cama ao final de 42 dias de criação em relação a outros tratamentos com gesso agrícola, cal hidratada e superfosfato simples.

O benefício da cama acidificada com uma mistura de lignossulfato de sódio, ácido fórmico e ácido propiônico, foi avaliado no balanço da flora intestinal de frangos (Garrido et al., 2004). O estudo mostrou que aves expostas à cama acidificada com a mistura apresentaram número mais baixo de bactérias intestinais, como *Clostridium perfringens* no íleo e no ceco e *Enterococcus* spp. no íleo. Entretanto, encontraram maiores níveis de *Lactobacillus* spp. no íleo, e melhor desempenho ao abate, porém sem diferenças em relação ao pH e umidade da cama tratada, sugerindo que o estabelecimento precoce de um

balanço ótimo da flora intestinal normal parece ser benéfico para a saúde e desenvolvimento de frangos.

Vicente et al. (2007) avaliaram outro acidificante à base de ácido sulfúrico demonstrando que ocorreu a diminuição da transmissão horizontal de *Salmonella* na medida em que houve redução do isolamento do agente aos 11 dias de idade mas não aos 21 em relação à cama controle. Afirmaram que a acidificação não pode por si só eliminar completamente a contaminação, talvez devido ao mecanismo de tolerância à acidez desenvolvido por algumas bactérias do gênero.

Oliveira et al. (2003) avaliaram a utilização de vários aditivos à cama de frango e conseguiram verificar que gesso agrícola (sulfato de cálcio) influenciou significativamente na diminuição do pH para 6,97, sendo até mesmo menor que a adição de sulfato de alumínio, o qual não determinou a acidificação da cama em relação ao tratamento com cal hidratada, por causa da sua baixa inclusão à cama. A acidificação da cama com gesso foi atribuída a sua grande quantidade incorporada à cama (40% do peso da cama) e a sua alta capacidade de absorver umidade, diminuindo assim a atividade de bactérias produtoras de amônia e por consequência o pH da cama também reduz. Entretanto, em outro estudo, Oliveira et al. (2004) verificaram que sulfato de alumínio foi eficiente na acidificação da cama, e, com o uso gesso agrícola na mesma incorporação, os valores de pH foram semelhantes à cama não tratada.

O uso de acidificantes em cama tem demonstrado relativo sucesso em controlar a emissão de amônia atmosférica (Nagaraj et al., 2007; Pope e Cherry, 2000; Terzich et al., 1998). O desempenho produtivo de frangos alojados em camas tratadas com acidificantes pode se igualar (Garrido et al., 2004; Nagaraj et al., 2007) ou mesmo ser superior (Terzich et al., 1998; Vicente et al., 2007) em relação às camas não acidificadas. A duração efeito residual na diminuição do pH da cama tratada com acidificantes pode ser de curta duração por

causa da possibilidade de hidrolisação dessas substâncias em condições adversas de temperaturas e umidade relativa do ar mais alta, sendo então, necessárias maiores concentrações na aplicação ou mesmo reaplicação do produto durante o ciclo de criação das aves (Line e Bailey, 2006). Conseqüentemente, a utilização de tais aditivos incrementa os custos de produção (Fiorentin, 2006).

2.3.1.2. Uso de alcalinizantes

A utilização da cal nas suas diferentes apresentações tem sido avaliada com o principal objetivo de manter o pH da cama elevado. Ruiz et al. (2008) submetem cama que foi utilizada previamente por dois lotes de frangos ao tratamento com óxido de cálcio (CaO – cal virgem) na proporção de 10 e 15% em relação ao seu peso, comparando-as com a mesma cama porém sem adição da cal e também à cama com maravalha nova. Os tratamentos foram submetidos ao empilhamento, individualmente, que 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 nova e usada. Os autores observaram também a diminuição considerável na contagem total de bactérias aeróbias, embora alertassem para a não avaliação da contagem de bactérias patogênicas no estudo.

Segundo Oliveira et al. (2004), o uso da cal hidratada [Ca(OH)₂] promove valor de pH da cama significante 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 subseqüentes de criação. Oliveira et al. (2003), em estudo anterior, também não observaram a alcalinização da cama em reutilização com a adição da cal hidratada.

Silva et al. (2007) também obtiveram resultados semelhantes, encontrando

valores de pH das camas novas e reutilizadas semelhantes com a adição de cal hidratada ao material, não conseguindo também evidenciar diminuição significativa na contagem de enterobactérias e mesófilos totais em relação à cama controle.

2.3.2. Método fermentativo

O tratamento da cama de frango por fermentação pode ter várias denominações por diferentes autores: compostagem dentro do galpão "*in-house composting*" (Macklin et al., 2006), compostagem dentro do galpão em leiras "*in-house windrow composting*" (Macklin et al., 2008), amontoamento profundo "*deepstacking*" (Kwak et al., 2005), cama de frango amontoada "*stacked poultry litter*" (Jeffrey, 2001), pasteurização dentro do galpão "*in-house pasteurization*" (Lavergne et al., 2006), fermentação em leira e fermentação com lona em todo aviário (Silva et al., 2007). Em todos os estudos, o método acontece no intervalo entre lotes, variando de 5 a 17 dias, fazendo-se valer da produção espontânea de calor por causa de metabolismo microbiológico que se instala na cama. No processo tradicional de compostagem ocorre degradação aeróbica do resíduo orgânico, durante 4 a 6 semanas, e, ao final do período, o material se encontra estabilizado (Kelleher et al., 2002). No método da fermentação o tempo em que a cama fica em compostagem é bem menor, não ocorrendo a estabilização da matéria, porém esse manejo da cama pode ser considerado como um método efetivo de redução da quantidade de bactérias em aviários no intervalo entre lotes (Macklin et al., 2006), considerando a relação do binômio tempo versus temperatura na inativação de patógenos (Lavergne et al., 2006).

Estudos sobre os resíduos animais foram revisados por Haapapuro et al. (1997), os quais alertaram que o enleiramento da cama não é um processo seguro para eliminar bactérias como *Salmonella* spp. e *E. coli*, devido às variações de temperatura de fermentação nas leiras em diferentes profundidades, que podem variar de 43 a 60°C, sendo necessárias temperaturas entre

71 a 77°C para a inativação de bactérias patogênicas. Jeffrey (2001) constatou que pilhas de camas enleiradas em diferentes empresas avícolas nos EUA, não viradas e não arejadas, não permitem a sobrevivência de bactérias patogênicas *Campylobacter*, *E. coli* ou *Salmonella* por mais do que alguns dias. Embora a aferição das temperaturas realizadas pelo autor sofresse alterações de acordo com altura e profundidade na leira, outros parâmetros físicos foram atribuídos como determinantes da temperatura nas leiras, como o pH (mais baixos podem inibir a leira de esquentar) e, principalmente, a atividade de água (*Aw*) como o parâmetro que mais influenciou o perfil de temperatura, visto que leiras com baixos valores de *Aw* apresentaram-se mais frias.

Kwak et al. (2005) simularam o processo de empilhamento de cama de frango em escala reduzida, avaliando os efeitos dos métodos de aeração ou não dessas camas estocadas por 17 dias sobre a sobrevivência das enterobactérias. Os autores obtiveram temperaturas máximas (62°C) no interior da pilha de cama aos 6 dias, e aerar a cama após este pico, faz a temperatura decrescer em 10°C em 2 dias em relação às camas não-aeradas. Os resultados desse estudo indicaram que isolados de *Salmonella* sorovar *Enteritidis*, *E. coli* e *Shigella sonnei* intencionalmente inoculadas foram eliminadas em 4 dias e não mais detectadas, mesmo com temperatura 20°C mais baixas nas camas aeradas até os 16 dias de experimento. Nas camas não-empilhadas (mantidas em camadas não profundas), e que conseqüentemente não tiveram a produção espontânea de calor, o tempo para a eliminação desses patógenos ficou entre 4 e 8 dias. Os achados indicam que a eliminação de bactérias patogênicas na cama pode ocorrer não somente pelo calor gerado no empilhamento, mas também por outros fenômenos como o efeito tóxico da amônia exalada da cama e a competição microbiana exercidas pela microflora natural da cama.

Macklin et al. (2006) demonstraram que a compostagem (empilhamento) da cama de frango, feita no intervalo entre lotes, pode ser um manejo prático para ser executado

em granjas comerciais. Os resultados do estudo demonstraram que, em compostagem em leiras de aproximadamente 0,9m de altura e comprimento variando de 1,5 a 1,0m com largura de 0,7 a 0,5m, a temperatura interna atingia 50°C ou mais com 32 a 42h e se mantinham por pelo menos 12h. A adição de água à cama promoveu um incremento na temperatura somente nos tratamentos cobertos com lona, mesmo em camas não-empilhadas, nas quais a temperatura ficou entre 5 e 10°C acima da temperatura ambiente ao longo do período. A cobertura da cama auxiliou na manutenção da umidade não demonstrando diferenças estatísticas significativas na maioria dos tratamentos com lona entre o início e final do período avaliado. Na avaliação microbiológica da cama, a maioria dos tratamentos cobertos apresentou diferença significativa na diminuição da contagem de bactérias aeróbicas e todos os tratamentos diminuíram significativamente a contagem de bactérias anaeróbicas. As conclusões dos autores foram que a compostagem de cama entre lotes, quando efetuada no galpão, constitui-se em um método efetivo de redução dos níveis de bactérias, sendo que esse número decresce significativamente em 7 dias. Nas opinião dos autores, a cobertura da cama com lona é recomendada para reduzir a carga bacteriana, embora a adição de umidade à cama em tratamento possa promover temperaturas mais elevadas. Contudo, na prática, não parece interferir na redução do número de bactérias. Em adição à temperatura gerada nos tratamentos de cama empilhada, foi salientado o efeito da amônia produzida no material em decomposição para redução da carga bacteriana, com teores mantidos em concentrações mais elevadas nas condições de barreira impermeável criada pela utilização de lona.

Em outro estudo, Macklin et al. (2008) avaliaram a viabilidade de patógenos *Campylobacter*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella*, associados ao ambiente avícola. Esses patógenos foram inoculados intencionalmente em cama submetidas à compostagem em leiras ou não. Os autores

usaram cama, com material à base de aparas de madeiras de pinho, utilizada anteriormente por 3 lotes consecutivos em uma densidade de 10 aves por m², e simularam as condições comerciais de compostagem em leiras no intervalo entre lotes, criando pilhas de camas de dimensões de 1 x 1 x 1 m e também camas não-compostadas (mantidas com 8 cm de camada). Depois de 7 dias, eles verificaram que a *Salmonella* foi completamente eliminada das amostras compostadas, entretanto, foi ainda recuperada de amostras não-compostadas. Os autores verificaram, também, que não houve isolamento de *Campylobacter* em nenhuma amostras de ambos os tratamentos da cama. Já a presença de *Clostridium perfringens* foi associada a sua maior resistência em condições adversas pela formação de esporos. A redução dessa bactéria, tanto em condições de compostagem ou não, mostrou-se estatisticamente semelhante, embora o seu decréscimo total possa ser economicamente importante em relação aos níveis iniciais. Em adição, houve diminuição significativa na contagem de bactérias aeróbicas e anaeróbicas nas amostras compostadas aos 7 dias em relação ao início, sendo que esse tratamento apresentou contagens mais baixas de anaeróbios e bactérias entéricas comparados ao tratamento de não-compostagem. Os pesquisadores salientaram que as temperaturas internas de 50°C nas pilhas de compostagem e sua manutenção por 1 a 2 dias é importante não somente para inativar bactérias, mas também porque em tal condição muitos vírus, fungos e ovos de vermes são eliminados. O sistema de compostagem em galpões, tipicamente de 5 a 7 dias, pode não produzir destruição mais apurada de bactérias como na compostagem tradicional, mas ainda sim se constitui um método eficiente de redução no número de bactérias no intervalo entre lotes. Sugeriu-se também, que a geração de amônia a partir da cama pode ser um dos fatores de eliminação de bactérias na superfície das camas empilhadas, onde a temperatura apresentou-se somente 5 a 10°C mais alta que a do ambiente.

Silva et al. (2007) avaliaram três métodos de intervenção sobre a carga bacteriana de camas reutilizadas em aviários para a criação de frango de corte em seis lotes consecutivos: fermentação em leira com cobertura, fermentação com cobertura de lona (sem enleiramento) em todo galpão e aplicação de cal. As conclusões dos autores foram de que, apesar de ter havido a redução da carga de bactérias mesófilas e enterobactérias em todos os tratamentos, o método que demonstrou ser mais eficiente em relação à redução de enterobactérias foi o de fermentação com lona em todo aviário, sendo que este foi seguido pela fermentação em leira na eficiência para redução de bactérias mesófilas totais.

Costa e Ávila (1996) estudaram o efeito da idade dos frangos, reutilização da cama por 4 lotes consecutivos e do seu manejo sobre a coccidiose em frangos de corte. Eles observaram que houve interação entre reutilização e tratamento da cama, sendo que o aumento da contagem de oocistos associado à reutilização foi retardado nos tratamentos com amontoamento da cama por 6 dias.

Jeffrey et al. (1998) avaliaram o processo de compostagem de cama de frango para *Salmonella* spp., *E. coli* O 157 e *Campylobacter*. Os resultados do estudo demonstraram que a cama, quando submetida ao adequado processo de compostagem, não é considerada como fonte de transmissão para esses patógenos. Esses pesquisadores encontraram temperaturas internas de pilhas cobertas excedendo 54,4° C e de 40,2 a 46,3°C nas descobertas, e não detectaram a presença dos patógenos avaliados, verificando, apenas, uma frequência muito baixa de outras linhagens de *E. coli* em pilhas com 2 a 4 semanas de compostagem.

Kelley et al. (1994) conduziram um estudo avaliando a redução de patógenos e coliformes fecais na cama de frango estocada e observaram que a maioria das amostras de camas empilhadas reduziu significativamente a concentração microbiana após 4 meses e em muitos casos abaixo do nível detectável. Em outro

estudo, Hartel et al. (2000) encontraram um tempo para a redução do número de coliformes fecais consideravelmente menor, sendo que a sobrevivência desses microrganismos em camas empilhadas ficou abaixo do limite de detecção em 8 dias. Eles relacionaram esse fato à alta temperatura atingida no interior da pilha. Esses dois últimos autores salientaram a importância da eliminação de coliformes com o intuito de evitar o escoamento superficial de microrganismos em solos fertilizados com cama de frango.

2.3.3. Inibição competitiva

Outro método de tratamento de cama para diminuir a carga microbiológica consiste no princípio da inibição competitiva. Em um estudo realizado por Roll et al. (2008), matrizes de frango de corte com 58 semanas de idade tiveram a cama trocada por nova para então receber a aplicação de um produto formulado com cepas de *Bacillus subtilis* em dois níveis de dosagem, 2,5g/m² de cama (subdosagem) e 5,0g/m² (dosagem recomendada), comparado com a cama controle na qualidade microbiológica de enterobactérias. Evidenciou-se melhor qualidade microbiológica da cama, ao final de quatro semanas de utilização da cama, devido à menor contagem logarítmica de enterobactérias, apresentando redução de 13% comparando a dosagem recomendada com a cama controle (2,89 versus 3,31log₁₀ UFC, respectivamente). As bactérias inoculadas aceleraram o processo de degradação dos dejetos e sua atividade inibiu a sobrevivência e multiplicação de bactérias patogênicas. O efeito de inativação de vírus tem sido atribuída ao efeito químico de liberação de enzimas proteolíticas (Guan et al., 2009) e nucleases (Velayudhan et al., 2003), que são produzidas pela atividade microbiológica que se instala em materiais como cama de frango.

2.4. Aspectos econômicos e ambientais sobre a reutilização de cama

Segundo Palhares (2005), as características intrínsecas da cama de frango em relação ao teor de minerais, em especial o

nitrogênio e o fósforo, qualificam-na como um ótimo biofertilizante, mas um manejo incorreto desse recurso pode caracterizá-la como um importante resíduo poluente da água, do solo e do ar. A disposição no solo pode representar um manejo adequado e correto do esterco animal, mas o excesso de adubação do solo acarreta o acúmulo de nutrientes, maior do que a capacidade de absorção do ciclo biológico natural. Substâncias como nitrato e fosfato (uma das formas na natureza do nitrogênio e do fósforo, respectivamente) podem se tornar fonte de poluição ambiental, causando grande impacto negativo quando esses resíduos atingem mananciais subterrâneos e superficiais. Esse autor ainda menciona que, na avicultura de corte, a cama de frango pode encerrar dois tipos de poluição segundo a classificação de suas fontes. Este resíduo da produção será uma fonte pontual quando for disposto nas águas superficiais, sem prévio tratamento, ou poderá ser uma fonte difusa quando odores de gases como amônia, metano, gás sulfídrico e partículas de poeira forem sentidos em locais distantes por causa de deslocamentos de massas atmosféricas, ou mesmo quando a fertilização excessiva provocar a contaminação das águas subterrâneas e superficiais, a partir dos processos de escoamento superficial, erosão e percolação.

Marcolin (2005) pontuou alguns aspectos importantes dos custos na troca da cama de frango na avicultura brasileira. Foram comparadas as trocas de cama a cada lote de aves e troca somente a cada seis lotes sobre a mesma cama. Foram avaliados os aspectos de custo ambiental, que inclui itens de quantidade de lenha para a produção de maravalha, maravalha por ano, necessidade de terra para eucalipto, além dos custos na produção avícola, englobando custos variáveis (maravalha, mão-de-obra, desinfecção, energia elétrica e outros) e fixos (depreciação dos aviários e equipamentos). A conclusão foi que, para o avicultor, a troca da cama a cada lote representa um aumento do custo do lote de 66%, sem considerar o custo da mão-de-

obra para efetuar a troca da cama a cada lote.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Experimentos-piloto

3.1.1. Local dos experimentos-piloto

Experimentos-piloto foram estabelecidos no Setor de Doenças das Aves, Escola de Veterinária da UFMG, com vistas à avaliação dos materiais e metodologias escolhidas, as dimensões de amostragem, medições físico-químicas de temperatura, pH, amônia e extratos para a avaliação da atividade viral. Dois experimentos-piloto independentes foram desenvolvidos, separados cronologicamente, para a avaliação dos efeitos da fermentação da cama de frangos sobre a atividade biológica dos vírus de doença de Newcastle (VDN) e da doença infecciosa bursal (VDIB). Duas repetições de cada parcela foram estabelecidas.

As camas de aviário utilizadas nos experimentos-piloto foram obtidas de plantéis de reprodutoras SPF mantidas em cama com maravalha. Amostras de cama de aproximadamente 3,5kg foram acondicionadas em bandejas plásticas de dimensões de 60 cm de comprimento x 30 cm de largura x 10 cm de altura e submetidas a ensaios de fermentação com cobertura ou sem (controle de não fermentação), ambos os tratamentos sem enleiramento, mantidas a uma altura média de 6 cm. Em cada repetição para os ensaios de fermentação coberta (Figura 1) ou cama descoberta (Figura 2) (controle de não fermentação), distribuiu-se dois tratamentos, com e sem vacina inoculada, conforme o quadro 1. Duas vacinas com frascos de 1000 doses, uma contra a o VDN (estipe La Sota) contendo $10^{7,45}$ doses infectantes para embrião 50% (DIE_{50}) por ml e outra contra a VDIB (estipe Lukert) contendo 10^2 DIE_{50} /ml foram utilizadas. Uma alíquota de 100 doses (0,3 ml) de cada vacina foi diluída em 100 ml de água destilada deionizada (H_2O dd) e misturada à cama do respectivo grupo com mais 100 de H_2O dd.

Quadro 1 - Grupos experimentais dos experimentos-piloto de acordo com os tratamentos da cama de aviário e tipo de vacina utilizada na mistura.

Grupos experimentais	Vacina	Tratamento
T1	VDN	Coberta
T2	VDN	Descoberta
T3	VDIB	Coberta
T4	VDIB	Descoberta
T5	Sem vírus	Coberta
T6	Sem vírus	Descoberta



Figura 1 - Grupo experimental de cama de aviário SPF com tratamento coberto do experimento-piloto.



Figura 2 - Grupo experimental de cama de aviário SPF com tratamento descoberto do experimento-piloto

O objetivo de se adicionar umidade a cama (100 ml com mais 100 ml do veículo para a vacina) foi de deixar deixá-la menos pulverulenta. Dessa forma, obteve-se, no volume de cama, 100 DIE₅₀ de vacina contra o VDN ou 100 DIE₅₀ resultaram em doses inoculadas de 10^{8,21} e de 10^{2,96} DIE₅₀ por kg de cama. Após a inoculação, as repetições dos tratamentos com cobertura foram imediatamente forrados com lona plástica, constituindo os grupos T1 e T3 para VDN e VDIB, respectivamente. Nos grupos de camas não cobertas (cama controle sem intervenção), procedeu-se da mesma maneira para as inoculações de vacinas, sem o uso da lona, constituindo o grupo T2 inoculado com VDN vacinal e T4 inoculado com VDIB vacinal. Os restantes dos grupos foram T5 e T6 para as camas controle sem vírus coberta e descoberta, respectivamente, as quais receberam somente 200 ml de H₂O dd.

As temperaturas das camas foram registradas diariamente durante todo o período dos experimentos-piloto, utilizando-se dois termo-higrômetros com sondas externas (Equitherm, Brasil; Jprolab, Brasil). A amônia (NH₃) liberada pelas camas foi mensurada por kit comercial (Hexasystems, Brasil) analisador do nível de amônia em aviários baseado no método colorimétrico.

3.1.2. Avaliação da atividade biológica dos vírus em extrato de cama por inoculação em embriões nos experimentos-piloto

Extratos de cama foram preparados para a recuperação de VDN e VDIB pelo isolamento viral em ovos embrionados de galinhas SPF (OEG/SPF). Para a preparação dos inóculos, 100 g de cama de cada repetição foram retirados no início de cada experimento-piloto, aos 7 dias para VDN e aos 4, 8 e 11 dias para VDIB, adicionando de 200 ml de água destilada e homogeneizados. Uma alíquota de 20 ml foi recolhida e clarificada em 1.000xg/5min. O sobrenadante foi tratado com penicilina G potássica 10 000 unidades/ml, sulfato de estreptomicina 10mg/ml e gentamicina 280

µg/ml (Brasil, 2002) por 30 minutos e 0,2ml foram inoculados na cavidade cório-alantóide de OEG/SPF com 10 dias de incubação (+37,5°C). Os embriões foram avaliados por ovoscopia diária por 5 dias e os mortos conservados em geladeira até a avaliação final conjunta. Para a detecção da presença do VDN, os líquidos cório-alantóides (LCA) foram testados para pesquisar a atividade hemaglutinante (HA) frente a uma suspensão de hemácias de galinha SPF a 5%. A presença da atividade HA foi considerada indicativa de VDN. Os embriões do experimento com VDIB também foram avaliados para a presença da atividade HA, entretanto o escore de hemorragia, edema e mortalidade embrionária foram usados como indicativos de infecção por esse vírus.

3.2. Local do experimento de campo

A primeira fase do experimento foi realizada na Fazenda Experimental Hélio Barbosa, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/ UFMG), para avaliação dos tratamentos de fermentação da cama de frango. Foi utilizado um galpão experimental dividido em boxes, dispostos em duas fileiras ao longo do comprimento do galpão, com a estrutura semelhante àquela de galpões comerciais, com cabeceira em alvenaria, laterais com muretas e telas de arame, telhado em amianto, piso cimentado e equipado com cortinas de lonas laterais, comedouros tubulares manuais e bebedouros do tipo pendular. A segunda fase foi realizada no Setor de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV/ UFMG para a avaliação da viabilidade viral, e no laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da EV/UFMG para a análise físico-química de umidade, pH e teor de amônia livre da cama.

3.3. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido com dois grupos experimentais, mantendo-se a cama em sua origem, sem enleiramento. A

maravalha de madeira foi utilizada como substrato para cama em todos os boxes e somente um lote de frangos de corte foi criado sobre a mesma. Optou-se pelo não enleiramento da cama (não amontoamento em pilhas ao longo do galpão), por ser um método previamente descrito na literatura científica (Silva et al., 2007) e que exige menor mão-de-obra nas granjas. No tratamento 1 (T1) as camas foram cobertas em toda extensão com lonas plásticas pretas (Figura 3), com contrapesos nas laterais para a fixação e para minimizar as trocas gasosas. No tratamento 2 (T2) as camas foram mantidas de modo semelhante ao T1, no entanto, não se utilizou cobertura com lona (Figura 4), sendo considerado um método sem intervenção (cama controle).

As camas em ambos os tratamentos foram previamente revolvidas com auxílio de uma enxada a fim de deixá-las homogêneas, sem placas de material emplastado, e mantidas na altura média de 4 cm. Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente ao acaso em arranjo 2 x 2 em parcelas subdivididas, para a avaliação da infecciosidade do VDIB, dois tratamentos (coberto e não coberto) com duas coletas, uma no dia zero e outra aos 12 dias após o início do experimento. Para as análises físico-químicas utilizou-se o arranjo 2 x 4, tratamento coberto ou não em parcelas subdivididas com coletas aos dias 0, 4, 8, 12 de fermentação. Seis repetições foram usadas em cada tratamento. O arranjo dos tratamentos está resumido no quadro 2.



Figura 3 - Tratamento da cama de frango coberta com lona plástica (T1)



Figura 4 - Tratamento da cama de frango descoberta (T2)

Quadro 2 - Grupos experimentais com cama de frangos de corte conforme o tratamento a ser utilizado

Box	Tratamento	Cobertura ⁽¹⁾
24 26 28 53 55 57	T1	Sim
23 25 27 54 56 58	T2	Não

⁽¹⁾ Cobertura com lona plástica

Um lote de frangos de corte foi criado sobre a cama estudada no experimento e vacinado com uma vacina viva do vírus da IBD de estirpe com atenuação intermediária do vírus, com aproximadamente 10^2 DIE₅₀/dose.

Os frangos de corte foram criados até os 44 dias de idade, numa densidade média de 7 aves por m², e logo após serem retirados, as camas provenientes de doze boxes foram mantidas e utilizadas para realização do experimento, sendo seis de um lado da fileira de boxes e outros seis localizados paralelamente na outra fileira. Em cada fileira de seis boxes, três foram designados para o T1 e três para T2, cada box definido individualmente como a unidade experimental para cada tratamento. A área média de cama em cada box foi de 2,5 x 1,83 m (Figuras 3 e 4), onde os tratamentos foram avaliados conforme o delineamento experimental. Esta etapa do estudo teve a duração de 12 dias de tratamento da cama, a fim de se fazer uma avaliação por um tempo compatível de intervalo entre lotes

com várias amostragens de cama em tempos regulares. O fluxograma de amostragem está esquematizado conforme a figura 5.

Foram realizadas quatro coletas de amostras de 4 em 4 dias em cada grupo experimental, dia zero (início do experimento), aos 4, aos 8 e aos 12 dias de fermentação. Em todas as atividades utilizaram-se luvas de procedimentos e máscaras descartáveis. Pontos de coletas em cada box foram escolhidos, eqüidistantes entre si, formando um quadrado em que cada vértice foi um ponto de amostragem mais o ponto central, totalizando 5 pontos de amostragem (Figura 5), utilizando-se para isso, um segmento de tubo PVC de 100mm de diâmetro, como ferramenta de corte da amostra de secção perpendicular de cama, para a padronização da amostra. Toda extensão da cama que estava dentro do tubo foi coletada. Para uma melhor representatividade de cada box experimental, 100g de cama foram obtidos

de cada um dos cinco pontos de amostragem, acondicionados em saco plástico, totalizando aproximadamente 500g, sendo esse *pool* devidamente homogeneizado por agitação manual. O *pool* de cada box foi imediatamente resfriado dentro de caixa isopor com gelo e

todos foram transportados para o laboratório, sendo, então, congelados a -20°C , para processamento subsequente visando a avaliação de VDIB ativo (vivo), por inoculação em embriões e para alguns aspectos físico-químicos, como umidade, pH e amônia (NH_3).

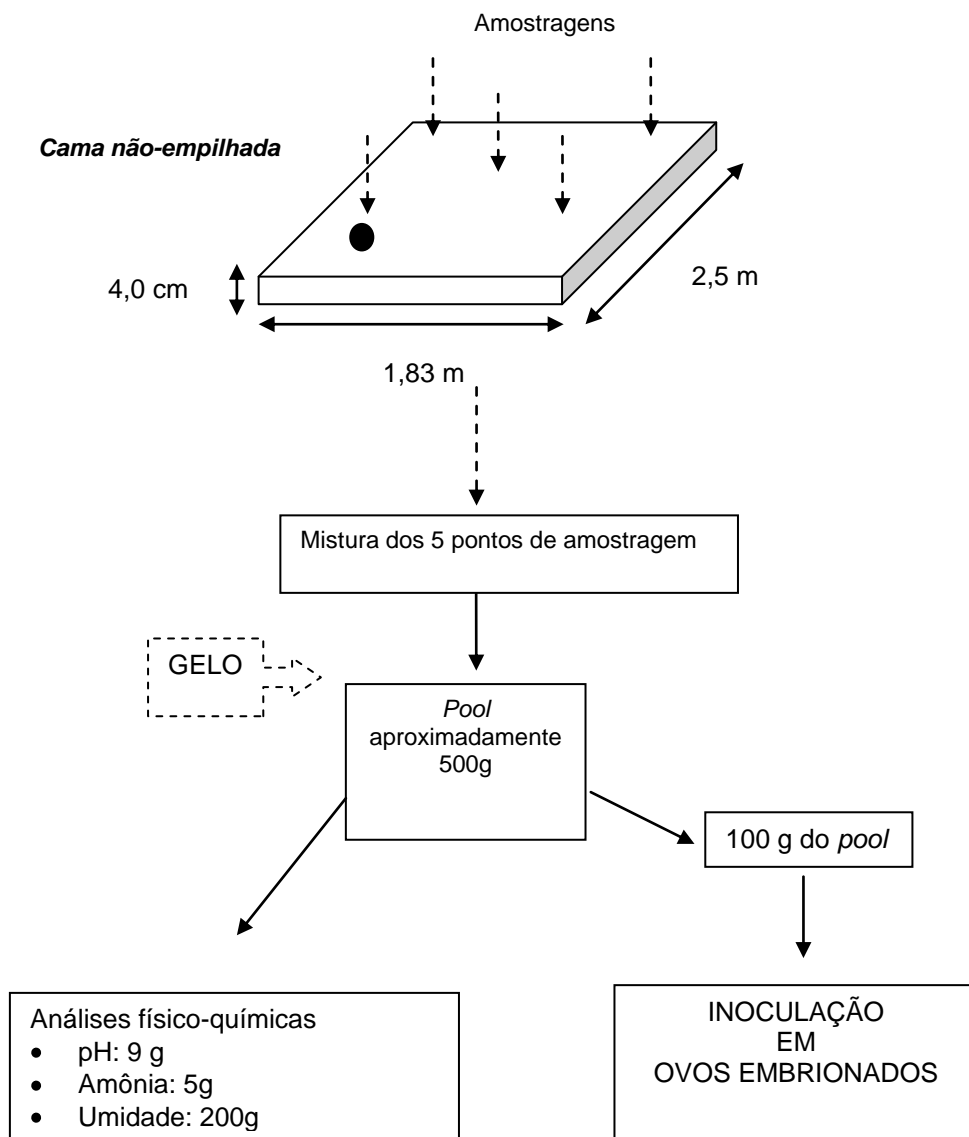


Figura 5: Fluxograma das amostragens de cama de frangos de corte nos tratamentos coberto e descoberto e procedimentos seqüenciais para as análises físico-químicas e isolamentos viral

3.4. Análises físico-químicas

As temperaturas da cama foram registradas diariamente durante todo o período do experimento, utilizando-se dois termohigrômetros com sondas externas (Equitherm, Brasil; Jprolab, Brasil). Dentro do galpão, colocou-se um termômetro de máxima e mínima (Jprolab, Brasil) anotando-se as temperaturas ambiental, máxima e mínima a cada de 24 horas. Para as medidas de temperaturas das camas do experimento, um termômetro com sonda foi introduzido na metade da profundidade da cama, em três pontos distintos formando uma linha central perpendicular à lateral do box, extraindo a média dessas temperaturas.

Para as demais análises físico-químicas, as amostras de cama foram transportadas ao laboratório e congeladas. As alíquotas foram descongeladas e o pH foi medido utilizando um peagâmetro de mesa (Hanna Instruments, EUA), pesando-se 9g do *pool* de cama de cada box, suspenso em 60ml de H₂O dd. Após agitação e repouso por 30 min, a leitura foi aferida. A umidade da cama de cada tratamento foi estimada em aproximadamente 200g de amostra, pelo método indireto descrito por Silva e Queiroz (2004) pela determinação da matéria seca, admitindo-se que a perda de peso corresponda ao peso da água perdida. Para a liberação de NH₃ pelas camas utilizou-se a determinação do nitrogênio amoniacal pelo método do óxido de magnésio (Kane, 1995). Todas as amostras foram processadas em duplicatas.

3.5. Titulação da vacina

A titulação da vacina (Gumborvet, Biovet) aplicada nos frangos de corte, foi realizada utilizando-se um frasco de 1000 doses reconstituído em 30ml de solução salina 0,85% estéril. Da vacina reconstituída, retirou-se uma alíquota de 0,2 ml, que foi diluída em 1,8 ml (1:10) de solução salina 0,85% estéril, obtendo a diluição 10⁻¹. Após homogeneização por 6 vezes, retirou-se 0,2 ml da diluição transferindo para outro frasco

com 1,8 ml (1:100) de solução salina 0,85% estéril para obtenção da diluição 10⁻² e assim, sucessivamente, até 10⁻⁴, trocando-se as ponteiras entre cada transferência. Procedeu-se a inoculação de 0,2ml por diluição em cinco OEG/SPF, com 10 dias de incubação (+37,5°C) via saco da gema. Os embriões inoculados foram examinados diariamente por ovoscopia durante 8 dias, resfriando os que foram morrendo ao longo do período. Ao final desse período, os embriões que ainda estavam vivos foram devidamente sacrificados por refrigeração (16 h a +4°C), e posteriormente foi realizada a necrópsia, observando lesões sugestivas para VDIB, como mortalidade, congestão, hemorragias, edema, palidez e outras lesões de órgãos e nanismo. Os dados de mortalidade foram usados para o cálculo da DIE₅₀, segundo o método de Spearman-Kärber (Rabies, 2007).

3.6. Avaliação da atividade biológica do VDIB em extrato de cama por inoculação em embriões no experimento de campo

Extratos de cama foram preparados para a recuperação do VDIB em ovos embrionados. Para a preparação dos inóculos, foram usados 10g de amostra de cada grupo experimental, coletados no dia zero e aos 12 dias após início do experimento. Cada amostra (10g) foi submetida à suspensão em 50ml de solução salina estéril, deixando decantar por 90 minutos. O sobrenadante foi colhido em tubo de rosca estéril e centrifugado em 1000xg/5 min, o qual foi transferido para frasco de vidro estéril. Uma alíquota de 0,2 ml foi transferida, e após a troca da ponteira, misturada a 0,8ml de salina estéril, resultando em diluição 1:10, repetindo-se a seqüência de diluições seriadas até 10⁻⁴, conforme descrito na titulação da vacina. Esse sobrenadante foi tratado com os antibióticos penicilina G potássica 10 000 unidades/ml, sulfato de estreptomicina 10mg/ml e gentamicina 280 µg/ml (Brasil, 2002), durante 30 min. Para cada diluição, foram usados cinco OEG/SPF, com 10 dias de incubação, inoculando-se 0,2 ml por embrião pela via LCA. Para cada

inoculação, um grupo de cinco embriões controles inoculados com salina e antibióticos e não inoculados com extrato de cama foram mantidos. Desta forma, dispunham-se de cinco embriões para cada diluição x quatro diluições x seis repetições/tratamento x dois grupos experimentais (tratamentos), mais 5 embriões-controle por repetição (5 x 6), totalizando 270 OEG/SPF utilizados. A ovoscopia dos embriões inoculados foi diária durante 8 dias, resfriando-se a +4°C os embriões mortos ao longo do período. Ao final desse período, todos os embriões restantes foram sacrificados por refrigeração (16 h a +4°C), e posteriormente foi realizada a necrópsia, observando lesões sugestivas para VDIB, como mortalidade, congestão, hemorragias, edema, palidez,

lesão renal e outros órgãos e retardo no crescimento (nanismo). Os dados de mortalidade foram usados para o cálculo da DIE_{50} , segundo o método Spearman-Kärber (Rabies, 2007), para permitir as comparações entre os tratamentos. A inoculação em OEG/SPF foi executada conforme esquema na figura.6.

Fórmula Spearman-Kärber (Rabies, 2007)

$$\log_{10}(\text{diluição final}) = x_0 - \frac{d}{2} + d \sum \frac{r_i}{n_i}$$

x_0 = (\log_{10} da diluição mais baixa com positividade), d = \log_{10} do passo da diluição, 1 neste caso, n_i = número de repetições, quatro neste caso, r_i = número de positivos

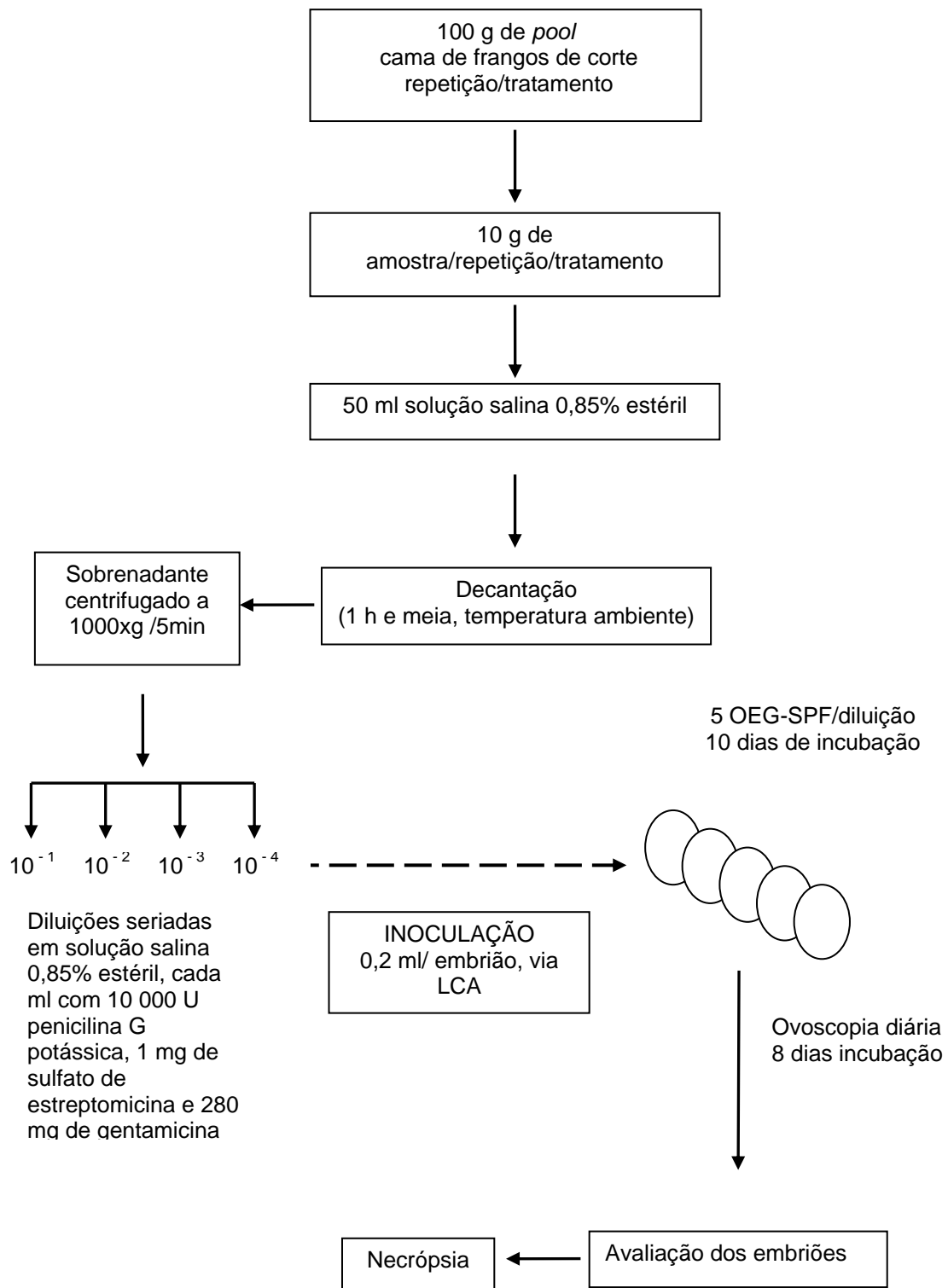


Figura 6: Avaliação da atividade biológica do VDIB em extrato de cama de frangos de corte por inoculação em OEG/SPF.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Normalmente, numa granja comercial de frangos de corte, um ciclo de produção dura em média 60 dias, podendo ocorrer variações de acordo com o que se estabelece de volume de produção mensal, idade média das aves, disponibilidade de pessoal, dentre outros fatores. Para uma idade média das aves de 42 dias, o intervalo entre lotes (período entre a retirada de um lote e a chegada do próximo) dura 18 dias, momento em que todos os procedimentos de limpeza e desinfecção são feitos e para assim se obter um vazio sanitário (galpão limpo e desinfetado) de 10 dias, conforme se preconiza como norma de biossegurança (Silva et al., 2007). Partindo dessa premissa, o experimento teve a duração de 12 dias de tratamento da cama, a fim de se fazer uma avaliação por um tempo compatível de intervalo entre lotes com várias amostragens de cama em tempos regulares.

4.1. Experimentos-piloto

Os experimentos-piloto permitiram fazer avaliações preliminares a respeito da dinâmica de parâmetros físico-químicos, da viabilidade viral no método de fermentação da cama e definir alguns aspectos metodológicos do experimento. O gráfico 1 está representada as médias das temperaturas das camas cobertas com (T1 e T3) e sem vírus (T5) e as médias das descobertas com (T2 e T4) e sem vírus (T6). Evidenciou-se que a barreira impermeável formada pela cobertura da cama com lona plástica resultou em retenção de temperatura, e os tratamentos cobertos tiveram temperaturas mais elevadas até por volta do 4º ao 5º dia e que o pico de temperatura foi atingido entre o 2º e o 3º dia, podendo atingir valores 8°C acima das temperaturas do ambiente e das camas descobertas. Camas descobertas tiveram temperaturas muito parecidas com a ambiental.

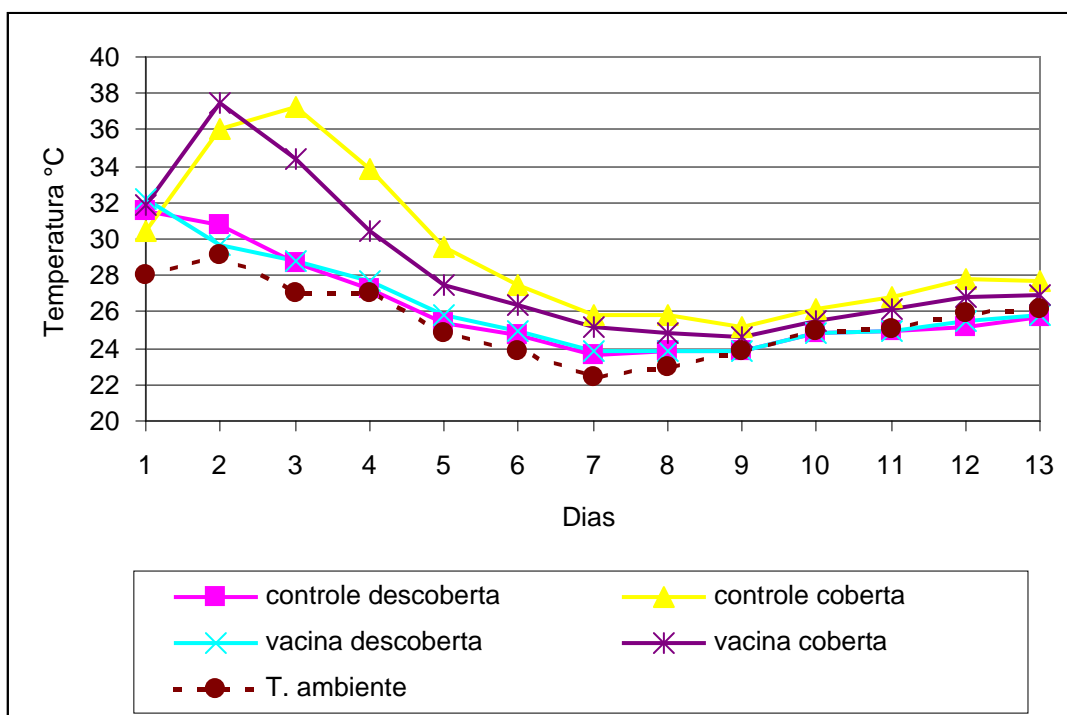


Gráfico 1 - Médias das temperaturas das camas de aviário SPF nos diferentes tratamentos nos experimentos-piloto.

As camas cobertas apresentaram concentrações médias ao longo do experimentos-piloto de NH₃ mais elevadas

como mostra o gráfico 2. O uso de lona para a cobertura da cama foi um fator decisivo nos níveis mais elevados.

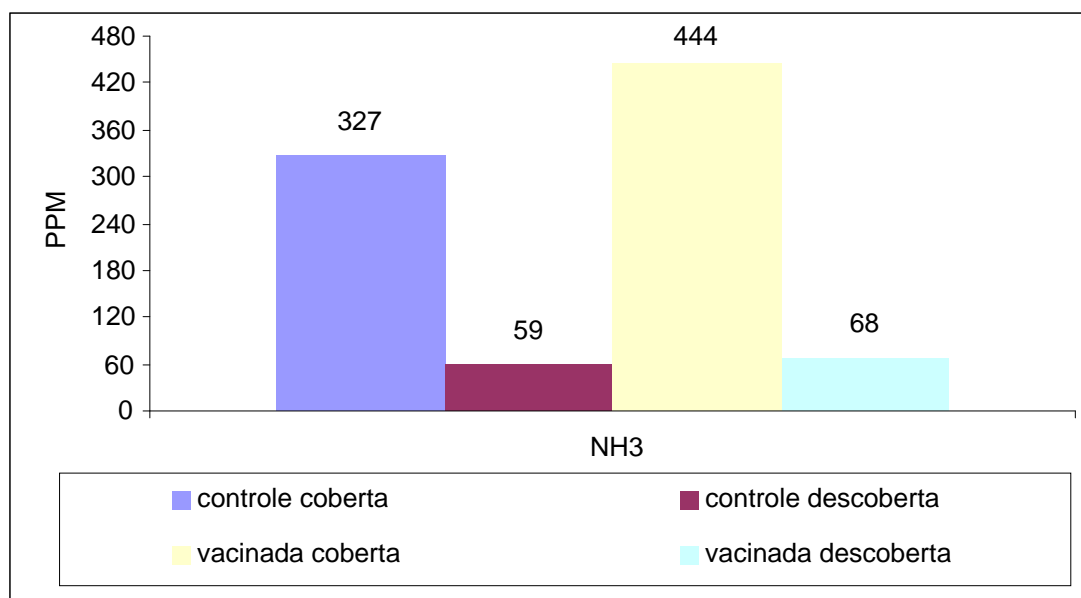


Gráfico 2 - Médias dos níveis de amônia (NH₃) nas camas de aves SPF nos tratamentos coberto e descoberto, com vacina ou sem vírus (controle) nos experimentos-piloto

No experimento-piloto com VDN vacinal, em ambos os tratamentos, coberto e descoberto, houve a inativação do vírus, não sendo detectada atividade hemaglutinante no LCA de OEG/SPF inoculados após 7 dias de experimento. Entretanto, no piloto com VDIB vacinal, houve infecciosidade do vírus em ambos os tratamentos, detectada por mortalidade, hemorragia, congestão e nanismo em embriões inoculados com o extrato de cama. Deve-se enfatizar que as lesões e a mortalidade de embriões diminuíram com o tempo de fermentação. Devido ao VDIB apresentar maior resistência à fermentação

no modelo piloto com cama de aves SPF em escala reduzida, optou-se por esse vírus no experimento em escala semelhante às condições comerciais de criação de frangos de corte.

4.2. Titulação do vírus VDIB na cama de frangos de corte em fermentação durante o experimento

O título da vacina do VDIB empregada para a vacinação dos frangos de corte encontra-se representado na tabela 1. O título presente na dose aplicada foi de 10^{3,3} DIE₅₀ por ave criada na cama.

Tabela 1 - Titulação viral vacinal (DIE₅₀) do VDIB em OEG/SPF.

Diluição	Dias pós-inoculação						Total	Escores
	1º	2º	3º	4º	5º	6º		
-1	0	0	3	0	1	0	4/5	0,8
-2	0	0	5	-	-	-	5/5	1,0
-3	0	1	4	-	-	-	5/5	1,0
-4	0	0	0	0	0	0	0/5	0
Soma de escores								2,8
DIE ₅₀								10 ^{3,3}

Nota: Método de Spearman & Kärber para cálculo do título. Diluições de -1 a -4 e inoculação em 5 OEG/SPF por diluição.

Os resultados da titulação viral do VDIB realizada em OEG/SPF estão representados nas tabelas 2 (0 dia) e 4 (12 dias), para os tratamentos cobertos e nas

tabelas 3 (0 dia) e 5 (12 dias), para os descobertos. Cada box representa as respectivas repetições dos tratamentos.

Tabela 2 - Titulação viral⁽¹⁾ (DIE₅₀) do VDIB do extrato de cama de frangos de corte coberta no início do experimento (0 dias).

Diluição	Boxes						Controle	
	24	26	28	53	55	57		
-1	0 (0) ⁽²⁾	0 (0)	1 (0,20)	0 (0)	1 (0,25)	0 (0)	0	
-2	0(0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	
-3	1 (0,20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,20)	0	
-4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0	
Soma dos escores		0,20	0	0,20	0	0,25	0,20	0
DIE ₅₀ / Box		0,70	0	0,70	0	0,75	0,70	0
DIE ₅₀ tratamento		10 ^{0,475}						

⁽¹⁾ Método de Spearman & Kärber.

⁽²⁾ O valor entre parênteses representa o escore calculado na mortalidade embrionária sobre o número de embriões inoculados. Desconsideraram-se os embriões mortos nas primeiras 24 horas pós-inoculação para a quantidade de embriões inoculados. Diluições de -1 a -4 log₁₀ de cada repetição (boxes) e inoculação em 5 OEG/SPF por diluição.

Tabela 3 - Titulação viral⁽¹⁾ (DIE₅₀) do VDIB do extrato de cama de frangos de corte descoberta no início do experimento (0 dias).

Diluição	Boxes						Controle
	23	25	27	54	56	57	
-1	0 (0) ⁽²⁾	0 (0)	0 (0)	1 (0,20)	0 (0)	0 (0)	0
-2	1(0,20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0,40)	1 (0,25)	0
-3	0 (0)	0 (0)	1 (0,20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
-4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,33)	0
Soma dos escores	0,20	0	0,20	0,20	0,40	0,58	0
DIE ₅₀ / Box	0,70	0	0,70	0,70	0,90	1,08	0
DIE ₅₀ tratamento	10 ^{0,68}						

⁽¹⁾ Método de Spearman & Kärber.

⁽²⁾ O valor entre parênteses representa o escore calculado na mortalidade embrionária sobre o número de embriões inoculados. Desconsideraram-se os embriões mortos nas primeiras 24 horas pós-inoculação para a quantidade de embriões inoculados. Diluições de -1 a -4 log₁₀ de cada repetição (boxes) e inoculação em 5 OEG/SPF por diluição.

Tabela 4 - Titulação viral⁽¹⁾ (DIE₅₀) do VDIB do extrato de cama de frangos de corte coberta no final do experimento (12 dias).

Diluição	Boxes						Controle
	24	26	28	53	55	57	
-1	3 (0,60) ⁽²⁾	0 (0)	1 (0,20)	1 (0,20)	0 (0)	0 (0)	0
-2	1 (0,20)	1 (0,20)	0 (0)	0 (0)	1 (0,20)	2 (0,40)	0
-3	1 (0,20)	1 (0,20)	0 (0)	2 (0,50)	0 (0)	1 (0,20)	0
-4	3 (0,75)	2 (0,40)	0 (0)	1 (0,20)	0 (0)	0 (0)	0
Soma dos escores	1,75	0,80	0,20	0,90	0,20	0,60	0
DIE ₅₀ / Box	2,25	1,30	0,70	01,40	0,70	1,10	0
DIE ₅₀ tratamento	10 ^{1,158}						

⁽¹⁾ Método de Spearman & Kärber.

⁽²⁾ O valor entre parênteses representa o escore calculado na mortalidade embrionária sobre o número de embriões inoculados. Desconsideraram-se os embriões mortos nas primeiras 24 horas pós-inoculação para a quantidade de embriões inoculados. Diluições de -1 a -4 de cada repetição (boxes) e inoculação em 5 OEG/SPF por diluição.

Tabela 5 - Titulação viral⁽¹⁾ (DIE₅₀) do VDIB do extrato de cama de frangos de corte descoberta no final do experimento (12 dias).

Diluição	Boxes						Controle
	23	25	27	54	56	58	
-1	2 (0,40) ⁽²⁾	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,33)	0
-2	1 (0,80)	2 (0,50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
-3	1 (0,20)	3 (0,60)	0 (0)	0 (0)	1 (0,20)	0 (0)	0
-4	0 (0)	0 (0)	2 (0,40)	0 (0)	0 (0)	1 (0,20)	0
Soma dos escores	1,40	1,10	0,40	0	0,20	0,53	0
DIE ₅₀ / Box	1,90	1,60	0,90	0	0,70	1,03	0
DIE ₅₀ tratamento	10 ^{0,988}						

⁽¹⁾ Método de Spearman & Kärber.

⁽²⁾ O valor entre parênteses representa o escore calculado na mortalidade embrionária sobre o número de embriões inoculados. Desconsideraram-se os embriões mortos nas primeiras 24 horas pós-inoculação para a quantidade de embriões inoculados. Diluições de -1 a -4 de cada repetição (boxes) e inoculação em 5 OEG/SPF por diluição.

Na necropsia, foram avaliados o aspecto macroscópico geral dos embriões e de suas vísceras, incluindo fígado, baço, rins e bolsa cloacal dentre outros órgãos que apresentassem alguma lesão digna de consideração. Na titulação da vacina do VDIB (Tabela 1), as lesões de embriões foram percebidas nas diluições de inóculo vacinal intermediárias, evidenciando-se lesões mais intensas de hemorragia generalizadas e no saco da gema na diluição 10⁻² e hemorragia no saco amniótico dos embriões na diluição 10⁻³, sendo que todos os embriões morreram até o terceiro dia pós-inoculação. Embora tenha ocorrido a mortalidade quase total de embriões (80%) na diluição 10⁻¹, as lesões foram pouco significativas. Já na diluição 10⁻⁴, não houve mortalidade dos embriões inoculados e nenhuma alteração digna de nota foi observada. Estes achados evidenciam lesões compatíveis com a presença do VDIB após inoculação da vacina, sendo possível estimar o título vacinal através da técnica utilizada. A colheita do LCA dos OEG/SPF inoculados

mostrou-se negativa frente ao teste de atividade de HA em todas as amostras.

Nos grupos experimentais, as lesões macroscópicas encontradas nos embriões necropsiados foram menos intensas no início do experimento em ambos os grupos. Não houve diferenças estatísticas (p > 0,05) entre os títulos virais nos extratos de cama de ambos os grupos experimentais, e apenas numericamente menores no dia 0 na comparação entre tratamentos conforme a tabela 6. As alterações de congestão e hemorragia generalizada (Figura 7) estiveram associadas aos embriões que morreram antes do final do período de avaliação pós-inoculação e ocorreram indistintamente nas diferentes diluições utilizadas, seja na cama coberta ou descoberta. Nos embriões sacrificados ao final da primeira avaliação, poucos se apresentaram diminuídos de tamanho (Figura 8) e desses apenas um havia morrido. Os inóculos das camas do 12º dia, ao final do experimento, tiveram títulos maiores, embora apenas numericamente na comparação entre tratamentos (Tabela 6), e

as lesões encontradas foram congestão e hemorragias (Figura 7) variaram de leve a severa, a mortalidade esteve associada à presença de baço e bolsa pálidos (Figuras 9 e 10) e diminuídos de tamanho, alguns com fígado com áreas branco-amareladas, embriões com tamanho reduzido e também congestão de rins. Alguns desses achados de necrópsia apresentam similaridade com os encontrados por Barrios (2005), que avaliou a patogenicidade de vírus da doença de Gumboro de amostras de tecidos de aves que apresentaram sinais clínicos compatíveis com a doença além de amostras de vírus vacinais, descrevendo as alterações provocadas em embriões após inoculação com inóculos destes materiais. As lesões de hemorragia são provocadas pelas injúrias de endotélio causadas pelo

VDIB em diferentes tecidos, e associadas às alterações na bolsa cloacal são sugestivas para o diagnóstico *post mortem*. As paredes das veias são mais susceptíveis à lesão endotelial devido à sua natureza mais frágil que as artérias, e a estase sanguínea, provocada pelo comprometimento do retorno venoso, resulta em congestão em diferentes órgãos como fígado, baço e rins. Lesões vasculares também diminuem o aporte sanguíneo aos órgãos podendo explicar porque o fígado, os rins e o baço de muitos embriões apresentam-se pálidos. O subdesenvolvimento dos embriões pode ser resultante das mudanças na homeostasia corporal provocada por injúrias teciduais, devidas aos processos de lesão vascular e congestão durante a infecção.



Figura 7 - Efeitos no embrião da inoculação de OEG/SPF com extratos de cama de frangos de corte. O embrião à direita apresenta-se hemorrágico e o da esquerda está normal (controle).



Figura 8 - Efeitos no embrião da inoculação de OEG/SPF com extratos de cama de frangos de corte. O embrião à esquerda está com o desenvolvimento retardado em relação ao embrião normal (controle) à direita.

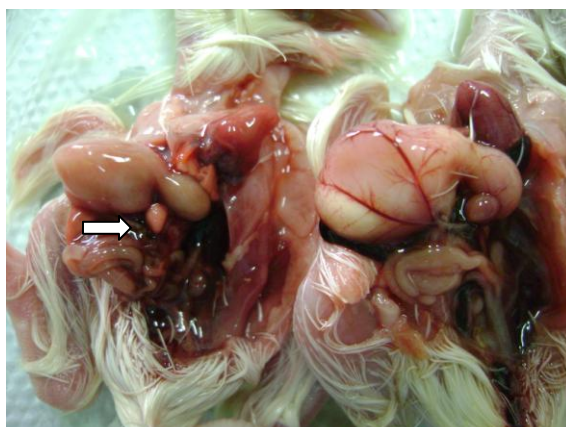


Figura 9 - Efeitos no embrião da inoculação de OEG/SPF com extratos de cama de frangos de corte. O embrião da esquerda apresenta-se com palidez de baço (seta) e do da direita está normal (controle).



Figura 10 - Efeitos no embrião da inoculação de OEG/SPF com extratos de cama de frangos de corte. A bolsa cloacal do embrião à esquerda apresenta-se pálida (seta) e a da direita normal (controle).

A tabela 6 mostra os títulos iniciais e finais do VDIB nos diferentes tratamentos. Demonstra-se que os títulos de vírus não diferiram entre si ($p > 0,05$), quando se

avaliaram os tratamentos individualmente e também na comparação entre tratamentos nos tempos analisados.

Tabela 6 - Títulos (DIE_{50}) iniciais (0 dia) e finais (12 dias), em \log_{10} , do VIDB nos diferentes tratamentos.

Dias	Título $\log_{10} DIE_{50}$	
	Descoberto	Coberto
0	0,680 A a	0,475 A a
12	0,988 A a	1,158 A a

Médias seguidas de letras desiguais minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem entre si ($p < 0,05$) no teste t de Student.

4.3. Temperatura da cama de frangos de corte durante a fermentação

As temperaturas diárias dos tratamentos e ambientais encontram-se no gráfico 3.

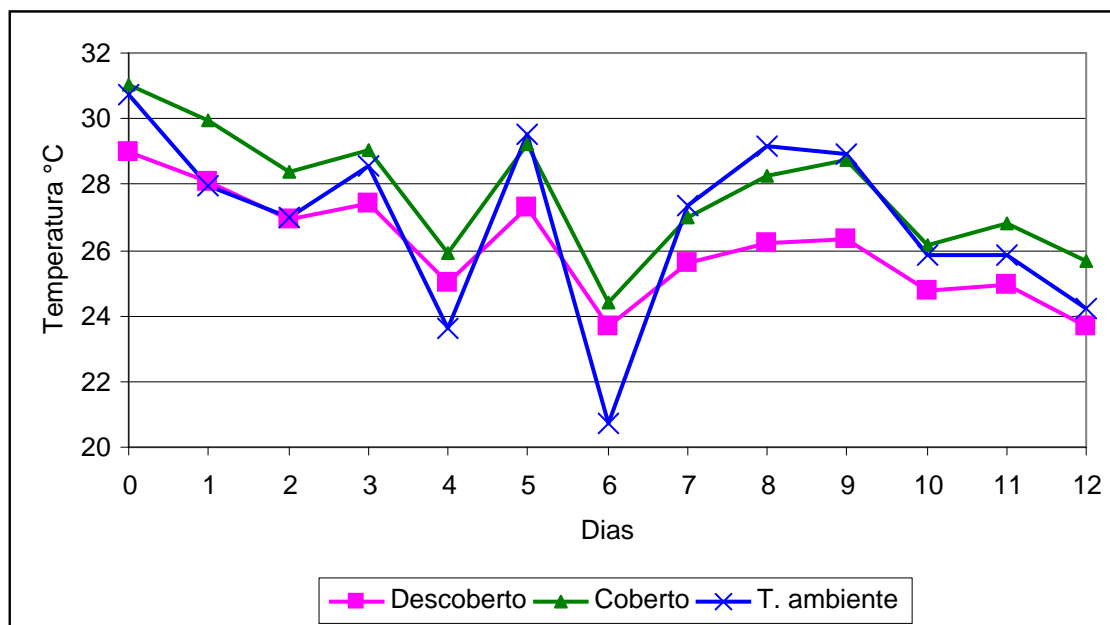


Gráfico 3 - Temperaturas diárias, em °C, dos tratamentos de cama de frangos de corte coberto, descoberto (controle) e temperatura ambiente no experimento de campo.

No tratamento da cama coberta, as temperaturas variaram de 23,8 a 32,1°C e, no tratamento controle (descoberto) variaram de 22,1 a 29,9°C. Apesar da amplitude das temperaturas nos tratamentos terem sido pequenas, as temperaturas médias diárias do tratamento da cama coberta com lona foram maiores do que as temperaturas do tratamento controle durante todo o período do experimento sendo significativamente diferentes entre os tratamentos ($p < 0,05$). As variações da variável temperatura da cama foram influenciadas pela temperatura do ambiente (correlação positiva forte, $r = 0,723$). Na análise do gráfico 3, percebe-se que as oscilações das temperaturas da cama de ambos os tratamentos foram muito semelhantes às oscilações da temperatura ambiental. As perdas evaporativas da umidade podem explicar o fato de a temperatura da cama descoberta ser inferior à do ambiente durante quase todo o período do experimento, às exceções no 4° e 6° dias

quando as umidades relativas do ar estavam mais altas, variando entre 75 e 90%, por causa do dia chuvoso. Nestes dias a temperatura do ambiente esteve mais baixa e as perdas evaporativas podem ter sido mais lentas por causa da alta umidade relativa, o que reflete na menor perda de calor da cama descoberta para o ambiente. Ao contrário de estudos que demonstram que a geração de calor em camas amontoadas é marcante, as temperaturas de ambos os tratamentos sem enleiramento não passou de 4°C acima da temperatura ambiente, muito abaixo das temperaturas de 50 a 60°C que o interior da leira pode atingir (Jeffrey et al., 1998; Kwak et al., 2005; Macklin et al., 2006; Macklin et al., 2008). Os resultados do presente estudo assemelham-se aos encontrados por Macklin et al. (2006) que também detectaram variações semelhantes entre camas não amontoadas em pilhas e a temperatura ambiente, seja em cama coberta ou descoberta, a exceção, da cama,

no estudo dos referidos autores, que foi submetida à umidade extra, a qual permaneceu com temperatura mais elevada na faixa de 5 a 10°C acima da temperatura ambiente no tratamento coberto.

4.4. Umidade das camas de frangos de corte em fermentação

O resultado da avaliação de umidade da cama nos diferentes tratamentos está sumarizado na tabela 7.

Tabela 7 - Umidade da cama de frangos de corte nos tratamentos coberto e descoberto (controle) em quatro tempos ao longo do experimento de campo.

Dias	Umidade da cama (%)		Umidade relativa do ar (%)
	Descoberto	Coberto	
0	44,547 A a	48,225 A a	42,8
4	25,553 B b	41,913 B a	78,2
8	27,252 B b	48,372 A a	54,8
12	28,235 B b	48,758 A a	66,7

Médias seguidas de letras desiguais minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem entre si ($p < 0,05$) nos testes t de Student e Tukey, respectivamente.

No tratamento descoberto a umidade caiu rapidamente aos 4 dias de experimento sendo significativamente menor ($p < 0,05$) em comparação ao início do período, e se manteve em níveis semelhantes até o final. A cama do tratamento coberto não apresentou diferenças ($p < 0,05$) entre a umidade inicial e final do experimento. Na comparação entre tratamentos, a umidade da cama foi semelhante ($p > 0,05$) nos dois grupos no início do período. Nas avaliações seguintes, os valores se diferenciaram entre os tratamentos, sendo que, na cama coberta a umidade ficou bem superior ($p < 0,05$) aos valores da cama controle. Estes achados indicam tendência semelhante aos resultados obtidos por Silva et al. (2007) que observaram valores de umidade maiores no tratamento coberto com lona sem enleiramento e menores na cama sem intervenção (sem cobertura e sem amontoamento). No entanto, os autores demonstraram que as umidades das camas entre os dois tratamentos tiveram comportamentos inversos ao longo da reutilização de cama por seis lotes

consecutivos, sendo que os valores de umidade decresceram e cresceram linearmente nas camas coberta e sem intervenção, respectivamente, chegando a valores muito semelhantes ao final de período do 6ª lote criado sobre as mesmas camas.

O propósito de utilização de cobertura da cama com lona impermeável no processo de compostagem é de que haja uma barreira de retenção de calor e água pela pilha de cama, o que deve induzir temperaturas mais altas pela maior umidade resultante (Macklin et al., 2006). Os resultados do presente estudo confirmam esse argumento, pois o uso de lona plástica interferiu diretamente nos níveis de umidade final do tratamento coberto, e as temperaturas desse mesmo tratamento permaneceram consistentemente maiores que a cama descoberta. Esses resultados assemelham-se aos encontrados por Macklin et al. (2006), que obtiveram também temperaturas maiores em camas cobertas,

as quais não tiveram perdas significativas de umidade ao longo do experimento.

4.5. Variação de pH na cama de frangos de corte em fermentação

As médias dos valores de pH da cama durante o processo de fermentação estão representadas na tabela 8.

Tabela 8 - Médias dos valores de pH da cama de frangos de corte nos tratamentos coberto e controle (descoberto) em três tempos ao longo do experimento de campo.

Dias	pH	
	Descoberto	Coberto
0	8,807 A a	8,928 B a
4	8,588 B b	8,772 C a
12	8,685 AB b	9,160 A a

Médias seguidas de letras desiguais minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem entre si ($p < 0,05$) nos testes t de Student e Tukey, respectivamente.

O pH final do tratamento coberto foi significativamente mais alto ($p < 0,05$) em relação ao início do período, apesar de ter ocorrido uma redução na segunda avaliação. No tratamento controle, os valores tiveram tendência a decrescerem, apresentando queda estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no 4º dia para depois se manter em nível intermediário no final. Comparando os tratamentos, o pH não foi diferente ($p > 0,05$) somente no início do experimento, com os valores no tratamento coberto significativamente mais elevados nas avaliações subsequentes. O uso da lona impermeável na cobertura da cama

condicionou valores de pH mais elevados, e a maior umidade retida pela lona favorece a instalação do metabolismo bacteriano, evidenciado pelas maiores temperatura e atividade sobre a conversão do ácido úrico em amônia, o que causa a alcalinização do meio.

4.6. Amônia liberada pela cama de frangos de corte em fermentação

Os valores das médias da quantidade de amônia obtidas nos dois tratamentos são apresentados na tabela 9.

Tabela 9 Médias das concentrações de amônia (NH_3), em mg%, em três tempos ao longo do experimento com cama de frangos de corte coberta e descoberta.

Dias	NH_3 (mg%)	
	Descoberto	Coberto
0	208,012 A a	222,768 C a
4	149,463 B b	285,125 B a
12	133,757 B b	322,727 A a

Médias seguidas de letras desiguais minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem entre si ($p < 0,05$) nos testes t de Student e Tukey, respectivamente.

Os dados na tabela 9 mostram que as quantidades de NH_3 liberadas pelas camas, de acordo com os tratamentos, tiveram padrões bem distintos. As concentrações de NH_3 do tratamento com cama coberta revelaram um aumento progressivo no seu teor ao longo das três medições, sendo significativamente distintos ($p < 0,05$) em todas as avaliações. No tratamento descoberto, as concentrações de NH_3 seguem um padrão inverso, com diminuição significativa ($p < 0,05$) do teor inicial para o 4º dia, mantendo-se em níveis semelhantes ao final do período. Quando comparados os tratamentos, as concentrações iniciais de NH_3 foram semelhantes para ambos e passaram a ser diferentes ($p < 0,05$) na segunda e na avaliação final.

O metabolismo microbiano que se instala em cama de aviário caracteriza-se por ser de natureza bastante complexa, sendo que a interação das variáveis existentes é que vão determinar a dinâmica dessa microbiota e conseqüentemente a sobrevivência de agentes patogênicos neste nicho específico. Para o melhor entendimento do assunto, faz-se necessária uma avaliação mais ampla das inter-relações das variáveis estudadas neste experimento ao invés de tentar explicá-las individualmente.

Em ambos os tratamentos, as camas atingiram temperaturas máximas entre 30 e 32°C, não sendo suficientes para que ocorra a inativação do VDIB, o qual pode suportar temperaturas de até 70°C durante 30 minutos. Alguns vírus, quando submetidos a temperaturas semelhantes às do atual estudo, podem sobreviver por um tempo maior do que quando expostos a temperaturas mais elevadas como no caso do processo de compostagem. Guan et al. (2009) demonstraram que os vírus da influenza aviária e VDN foram rapidamente destruídos até o 3º dia de compostagem quando a temperatura da massa alcançou os 40 a 50°C. Essa inativação viral dependeu da maneira em que o inóculo foi preparado, sendo que no esterco de aves inoculado com VDN, o vírus foi ainda detectado, embora em níveis muito baixos,

no período avaliado, ao contrário de outros materiais como cama usada (mistura de esterco decomposto, palhada de aveia e maravalha) isenta do vírus a partir desse dia. Esses autores verificaram que sobrevivência desses vírus prolongou-se por mais tempo quando os inóculos, preparados da mesma forma, foram submetidos a temperaturas de ambiente entre 13 e 28°C, sendo inativados no período de 3 e 21 dias. Estes achados podem explicar a sobrevivência do VDIB no presente estudo, visto que o vírus foi submetido a temperaturas semelhantes (entre 22 e 32°C) nas camas de ambos os tratamentos, salvo as diferentes características de resistência desse vírus em relação aos vírus que foram trabalhados pelos referidos autores.

Apesar de a temperatura ser um fator importante na sanitização de camas em fermentação ou em compostagem, os outros fatores avaliados podem ser considerados também de relevância na inativação de vírus. A liberação de NH_3 é um processo inerente da cama de aviário produzida pela ação do metabolismo de bactérias ureolíticas sobre o ácido úrico presente nas excreções das aves. Vários trabalhos relatam sua importância na inativação de microrganismos patogênicos, como enterobactérias e clostrídios (Kwak et al., 2005; Macklin et al., 2006; Macklin et al., 2008) e vírus (Burge et al., 1983; Ward e Ashley, 1977). No estudo em questão, os valores de NH_3 liberados tiveram relação com os diferentes tratamentos que a cama sofreu. O fato de cobrir a cama com lona resultou em maiores valores de umidade, favorecendo, dessa forma, a atividade microbiológica na massa desse material. A maior atividade pode ser demonstrada pela maior liberação de NH_3 e pelo aumento do pH do meio em razão da característica alcalina dessa substância. As maiores temperaturas registradas nesse tratamento também reforçam essa afirmação.

A associação entre temperatura e NH_3 também pode interferir na sobrevivência de vírus. Burge et al. (1983) demonstraram que

existe uma relação linear dependente na taxa de inativação dos vírus fago f2 e poliovírus, evidenciado pela queda da sobrevivência viral na medida em que a temperatura foi aumentando numa amplitude de 40 para 60°C com concentração de 300 mg/l de NH₃ livre na solução de cloreto de amônio em pH 8. Embora os autores observassem também essa mesma relação quando a temperatura aumentou de 10 para 30°C, as condições desse estudo foram realizadas sob temperatura constante em todo o período avaliado, ao contrário do presente estudo no qual os tratamentos apresentaram temperaturas oscilantes ao longo do processo de fermentação, e na cama com tratamento coberto, mesmo atingindo valores mais pronunciados de NH₃ (322 mg% aos 12 dias), não ocorreu a inativação do VDIB mesmo na temperatura máxima de 32°C.

A natureza do material genético está associada à resistência viral em condições adversas do meio. Ward e Ashely (1977) relataram a NH₃ como um dos agentes viricidas mais importantes presentes em água de esgoto, tanto na forma bruta como em material de digestão anaeróbica, sobre várias estirpes de vírus entéricos, entre eles o poliovírus e reovírus. A atividade viricida da NH₃ foi influenciada pela variação do pH, pois com o aumento progressivo do pH de 7 para condições alcalinas até 10, ocorre maior conversão da NH₃ da forma iônica (estado carregado) para a forma livre (sem carga), sendo esta extremamente ativa na inativação de vírus principalmente para o poliovírus utilizado no estudo desses autores. No entanto, os resultados encontrados para o reovírus revelaram sua relativa resistência a essas condições de NH₃ livre. Tal fato sugere que vírus com genoma RNA fita dupla, como no caso do reovírus, demonstram maior resistência do que vírus RNA fita simples, como o poliovírus (Burge et al., 1983). O VDIB avaliado no presente estudo trata-se também de um vírus RNA fita dupla, demonstrando resistência ao processo de fermentação, mesmo em condições de pH francamente alcalino (8 a 9) encontrados no tratamento da cama coberta.

Estes resultados estão de acordo com Resende et al. (2010) que avaliaram, num estudo preliminar em escala reduzida, a resistência dos VDIB e VDN em cama de aves SPF. Foram realizados tratamentos com camas mantidas numa altura média de 6 cm inoculadas com os vírus separadamente e submetidas à cobertura ou não com lona. O VDN demonstrou-se ser bastante sensível, tanto à fermentação coberta quanto a não intervenção na cama (tratamento inoculado sem cobertura), não sendo mais detectável no final do período de 12 dias. Entretanto o VDIB foi bastante resistente ao processo podendo ser detectado em OEG/SPF pelas lesões produzidas nos embriões, embora indicasse diminuição da carga viral no tratamento coberto pela menor intensidade das lesões ao final do período. A maior concentração de NH₃ produzida na cama coberta foi atribuída como um importante fator de interferência sobre a diminuição da carga viral do VDIB, visto que a temperatura não atingiu níveis suficientes para inativação. Pela hipótese levantada anteriormente, a natureza do material genético pode ter determinado a diferença de sensibilidade no estudo dos autores, pois o VDN, com genoma RNA fita simples, foi rapidamente eliminado, ao contrário do VDIB que é um vírus RNA fita dupla.

5. CONCLUSÕES

O tratamento da cama de frango pelo método de fermentação sem amontoamento, com cobertura ou não, demonstrou ser seguro para a inativação do VDN para reciclagem da cama para reuso em lotes subsequentes. No entanto, o método foi ineficiente para a inativação do VDIB ao final de doze dias de fermentação. A utilização da cobertura com lona plástica mostrou ser útil quando se pretende intensificar os fatores que interagem para a inativação de vírus em cama de frangos de corte, como temperatura, umidade, pH e NH₃. Os fatores físico-químicos na cama têm natureza bastante complexa. O entendimento da associação dessas variáveis, como metodologia sanitária num processo de fermentação de cama de frango para a reutilização, pode ser uma

valiosa ferramenta para a compreensão dos mecanismos de inativação de microrganismos neste material, objetivando reduzir a contaminação para reutilização por lotes consecutivos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, D. J. Viral diseases: Newcastle disease, others avian paramyxoviruses and pneumovirus infections. In: SAIF, Y. M. *Diseases of Poultry*. 11. ed. Ames: Iowa State, 2003. Cap. 2, p. 63-99. Versão CD-ROM.

AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poult. Sci.*, v. 63, p. 1093 – 1098, 2004.

ÁVILA, V. S.; COSTA, C. A. F.; FIGUEIREDO, E. A. P. et al. Materiais alternativos, em substituição à maravalha como cama de frangos. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2007. Disponível em: < http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_n4v84n9g.pdf > Acesso em: 23 maio. 2008.

BACON, C.W.; BURDICK, D. Growth of fungi in broiler houses. *Poult. Sci.*, v. 56, p. 653 - 661, 1977.

BANKOWSKI, R. A.; REYNOLDS, B. Persistence of velogenic viscerotropic Newcastle disease virus in litter. *Avian Dis.*, v. 19, n. 3, p. 612-616, 1975.

BARRIOS, P. R. *Comparação patogênica e molecular de isolados do vírus da doença infecciosa bursal*. 2005. 40 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BARROS, C. S. L.; MARQUES, G.H.F. *Procedimentos para diagnóstico das doenças do sistema nervoso central de bovinos*. Brasília: MAPA/DAS/DDA, 2003, 50 p. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/PROGRAMAS/AREA_ANIMAL/CRHE/EEB/MANUAL%20EEB%20PORTUGUES.PDF > Acesso em: 30 de out. 2008.

BATES, C.; HIETT, K.L.; STERN, N.J. Relationship of campylobacter isolated from poultry and from darkling beetles in New Zealand. *Avian Dis.*, v. 48, p. 138 – 147, 2004.

BERCHIERI JÚNIOR, A. Enfermidades bacterianas: Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. *Doenças das Aves*. Campinas: Facta, 2000. Cap. 4, p. 185-195.

BERNARDINO, A.; LEFFER, E. Doença infecciosa da bolsa de Fabrício. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J. et al. *Doenças das Aves*. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. Cap. 5.5, p. 651-673.

BILGILI, S. E; MONTENEGRO G. I.; HESS, J. B. et al. Sand as litter for rearing broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 8, p. 345-351, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 32, de 13 de maio de 2002. Aprova as normas técnicas de vigilância para a doença de Newcastle e influenza aviária, e de controle e erradicação para a doença de Newcastle. *Diário Oficial da União*, Brasília, 14 maio de 2002. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/acton/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal> > Acesso em: 30 de out. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 8, 25 de mar. 2004. *Diário Oficial da União*, Brasília, 26 de mar. 2004. Seção 1, p. 5. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/acton/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal> > Acesso em: 30 de out. 2008.

BURGE, W. D.; CRAMER, W. N.; KAWATA, K. Effect of heat on virus inactivation by ammonia. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 46, n. 2, p. 446 - 451, 1983.

- CHALOUPKA, G. W.; LLOYD, R. W.; GORDY, J. F. et al. Observations on the effect of the re-use of broiler litter on the incidence of Marek's disease. *Poult. Sci.*, v. 47, n.5, p. 1660, 1968.
- COSTA, C. A. F.; ÁVILA, V. S. Efeito da idade das aves e da reutilização e manejo da cama do aviário sobre a coccidiose em frangos de corte. *Arq. Bras. Vet. Zootec.*, v. 48, n. 4, p. 403 - 413, 1996.
- DAVES, R.H.; WRAY,C. Persistence of *Salmonella enteritidis* in poultry units and poultry food. *British Poult. Sci.*, v. 37, p. 589 - 596, 1996.
- DIAS, P. G. O.; MONTEIRO, J. M. L.; SANTOS; M. W. et al. Reutilização de materiais regionais usados para cama de frangos de corte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 11, 1989, Brasília. *Anais...*Brasília: União Brasileira de Avicultura, 1989. p. 22.
- EL-AHRAF, A.; WILLIS, W.V.; SALEH, R. Animal waste problems and management techniques – a review and bibliography. *Dairy and Food Sanitation*, v. 4, n. 5, p. 168 - 173, 1984.
- FALLAVENA, L. B. Anamnese, diagnóstico clínico e anatomopatológico: enfermidades da pele e das penas. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. *Doenças das Aves*. Campinas: Facta, 2000. Cap. 2, p. 37 - 45.
- FIORENTIN, L. Aspectos bacteriológicos da reutilização da cama de aviário. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS, 5, 2006, Florianópolis. *Anais...* Itu: Gessulli Agribusiness, 2006. p. 133-122. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_3x34t6d.pdf> acesso em: 15 abr. 2008.
- FIORENTIN, L. Reutilização das camas de frango de as implicações de ordem bacteriológica na saúde humana e animal. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_r5s96v1o.pdf> Acesso em: 23 maio. 2008.
- GARRIDO, M. N.; SKJERVHEIM, M.; OPPEGAARD, H. et al. Acidified litter benefits the intestinal flora balance of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, n. 9, p. 5208-5213, 2004.
- GUAN, J.; CHAN, M.; GRENIER, C. et al. Survival of avian influenza and Newcastle diseases viruses in compost and at ambient temperatures based on virus isolation and real-time reverse transcriptase PCR. *Avian Dis.*, v. 53, p. 26 - 33, 2009.
- HAAPAPURO, E.R.; BERNARD, N.D.; SIMON, M. Review – animal waste used as livestock feed: dangers to human health. *Prev. Med. V.* 26, p. 599 - 602, 1997.
- HARTEL, P. G.; SEGARS, W. I.; SUMMER, J. D. et al. Survival of fecal coliforms in fresh and stacked broiler litter. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 9, p. 505-512, 2000.
- HAYES, J.R.; CARR, L.E.; MALLINSON, E.T. Characterization of the contribution of water activity and moisture content to the population distribution of *Salmonella* spp. in commercial poultry houses. *Poult. Sci.*, v. 79, p. 1557 - 1561, 2000.
- ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; LIMA, E. A. et al. Saúde gastrointestinal, manejo e medidas para controlar as enfermidades gastrointestinais. In: MENDES, A. A.; NÄÄS, I. A.; MACARI, M. *Produção de frangos de corte*. Campinas: Facta, 2004. Cap. 13, p. 205-260.

- IVOS, J.; ASAJ, A.; MARJANOVIC, LJ; MADZIROV, Z. A contribution to the hygiene of deep litter in the chicken house. *Poult. Sci.*, v. 45, n. 4, p. 676 – 683, 1966.
- JEFFREY, J.S. Inactivation of bacteria in stacked poultry litter. Davis: University of California, 2001, 8 p. (USPEA Final Report).
- JEFFREY, J.S.; KIRK, J.H.; ATWILL, E. R. et al. prevalence of selected pathogens in processed poultry waste used as dairy cattle feed. *Poult. Sci.*, v. 77, p. 808 – 811, 1998.
- JONES, F.T.; HAGLER, W.M. Observations on new and reused litter for growing broilers. *Poult. Sci.*, v. 62, p. 175 – 179, 1982.
- JORGE, M. A.; MOUCHEREK, E.; CARNEIRO, M. I. F. et. al. Coliformes em cinco tipos de cama de frango em reutilização. *Arq. Bras. Vet. Zootec.*, v. 49, n. 5, p. 523-530, 1997.
- JORGE, M. A.; MOUCHEREK, E.; CARNEIRO, M. I. F. et. al. Presença de coliformes em cinco tipos de cama-de-frango. *Arq. Bras. Vet. Zootec.*, v. 48, n. 4, p. 387-395, 1996.
- KANE, F. Fertilizers: nitrogen. In: CUNNIFF, P. *Official methods of analysis of AOAC international*. 16.ed. Arlington: AOAC International, 1995. v. 1, cap. 2, p 15.
- KELLEHER, B.P.; LEAHY, J.J.; HENIHAN, A.M. et al. Advances in poultry litter disposal technology – a review. *Bioresour. Technol.*, v. 83, p. 27 – 36, 2002.
- KELLEY, T.R.; PACORBO, O.C.; MERKA, W.C. et. al. Fate of select bacterial pathogens and indicators in fractionated poultry litter during storage. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 3, p. 279–288, 1994.
- 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. *Bioresour. Technol.*, v. 96, p. 1529 – 1536, 2005.
- LAVERGNE, T.K.; STEPHENS, M.F.; SCHIELLINGER, D. In-house pasteurization of broiler litter. [Louisiana]: Louisiana State University Agricultural Center, 2006. 16p. Disponível em: <<http://www.lsuagcenter.com/en/communications/publications/Publications+Catalog/Crops+and+Livestock/Poultry/InHouse+Pasteurization+of+Broiler+Litter.htm>>. Acesso em: 2 fev. 2009.
- LINE, J. E. *Campylobacter* and *Salmonella* populations associated with chickens raised on acidified litter. *Poult. Sci.*, v. 81, 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. *Poult. Sci.*, v. 85, p.1529-1534, 2006.
- LOVETT, J.; MESSER, J.W.; READ, JR. R. B. The microflora of Southern Ohio poultry litter. *Poult. Sci.*, v. 50, p.746 – 751, 1971.
- LU, J.; IDRIS, U.; HARMON, B. et al. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the mature broiler chicken. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 69, n. 2, p. 901-908, 2003 a.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 69, n. 11, p. 6816 - 6824, 2003 b.
- LUKERT, P. D.; SAIF, Y. M. Viral diseases: infectious bursal disease. In: ____ *Diseases of Poultry*. 11. ed. Ames: Iowa State Press, 2003. cap. 6, p. 161-179. Versão CD-ROM
- MACKLIN, K. S.; HESS J. B.; BILGILI S. F. et al. Bacterial levels of pine shavings and sand used as poultry litter. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 14, 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. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 15, p. 531–537, 2006.
- MACKLIN, K. S.; HESS, J. B.; BILGILI, S. F. In-house windrow composting and its effects on foodborne pathogens. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 17, p. 121–127, 2008.
- MARCOLIN, S. D. Implicação da reutilização da cama de frango (na reprodução). In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS, 4, 2005, Florianópolis. *Anais... Concórdia: Embrapa Suínos e Aves*, 2005. p. 42-46.
- MARTIN, S. A.; MCCANN, M. A. Microbiological survey of Georgia poultry litter. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 7, p. 90-98, 1998.
- MCDUGALD, L. R. Coccidiosis. In: Y. M. SAIF. *Diseases of Poultry*. 11. ed. Ames: Iowa State Press, 2003. cap. 29, p. 974-991.
- NAGARAJ, M.; WILSON, C. A. P.; SAENMAHAYAK, B. et al. Efficacy of a litter amendment to reduce pododermatitis in broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 16, p. 255-261, 2007.
- NEME R.; SAKOMURA K. N.; OLIVEIRA, M. D. S. 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, n.4, p.687-692, 2000.
- NEWCASTLE DISEASE. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Paris: OIE, 2009. Parte 2, seção 2.3, cap. 2.3.14. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf
Acesso em: 14 out. 2009.
- OLIVEIRA, M.C.; ALMEIDA, C.V., ANDRADE; RODRIGUES, S.M.M. Teor de matéria seca, pH e amônia volatilizada da cama de frango tratada ou não com diferentes aditivos. *R. Bras. Zootec.*, v. 32, n. 4, p. 951 – 954, 2003.
- OLIVEIRA, M.C.; FERREIRA, H. A.; CANCHERINI, L.C. Efeitos de condicionadores químicos sobre a qualidade da cama de frango. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 56, n. 4, p. 536 – 541, 2004.
- PAGANINI, F. J. Manejo da cama. In: MENDES, A. A.; NÄÄS, I. A.; MACARI, M. *Produção de frangos de corte*. Campinas: Facta, 2004. Cap. 7, p. 107-116.
- PAGANINI, F. J. Reutilização de cama na produção de frangos de corte: por que, quando e como fazer. In: CONFERÊNCIA APINCO 2002 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2002, Campinas. *Anais... Campinas: Facta*, 2002. p. 193-206.
- PALHARES, J.,C.,P. Impacto ambiental causado pela produção de corte e aproveitamento racional de camas. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos. *Anais ... Campinas: Facta*, 2005. p. 43 – 59.
- PAULILLO, A. C.; DORETTO JÚNIOR, L. Doença de Newcastle. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N; DI FÁBIO, J. et al. *Doenças das Aves*. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. Cap. 5.2, p. 587-608.
- POPE. M. J.; CHERRY, T. E. An evaluation of presence of pathogens on broilers raised on Poultry Litter Treatment ® - treated litter. *Poult. Sci.*, v. 79, p. 1351-1355, 2000.
- RABIES. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Paris: OIE, 2007. Parte 2, seção 2.2, cap. 2.2.5. Disponível em: < http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00044.htm > . Acesso em: 4 jul. 2009.
- RELATÓRIO ANUAL 2008. Brasília: UBA, 2008, 84 p. Disponível em: < http://www.abef.com.br/portal/_clientes/abef/cat/anuario_uba_2008_port_site.pdf >
Acesso em: 27 set. 2009.

- RESENDE, F.M.S.; GALVÃO, C.Z.; RIOS, R.L. et al. Efeito da fermentação da cama de aviário sobre a infecciosidade dos vírus das doenças de Newcastle e Gumboro. In: CONFERÊNCIA APINCO 2010 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2010, Santos. *Anais Trabalhos de Pesquisa José Maria Lamas da Silva*. Campinas: Facta, 2010 (CD-ROM).
- ROLL, V. F. B.; LOPES, L. L.; GONÇALVES, F. M. et al. Condição microbiológica de cama tratada com Impact P® em matrizes de frangos de corte. *Ciência Rural*, v.38, n.9, p.2650-2653, 2008.
- RUIZ, V.; RUIZ, D.; GERNAT, A.G. et al. The effect of quicklime (Cao) on litter condition and broiler performance. *Poult. Sci.*, v. 87, p. 823 - 827, 2008.
- SANTOS, T. M. B; LUCAS, J.R.; SAKOMURA, N.K. Efeitos de densidade populacional e da reutilização da cama sobre o desempenho de frangos de corte e produção de cama. *Rev. Port. Ciênc. Vet.*, v. 100, n. 553-554, p. 45 – 52, 2005.
- SCHRADER, J.S.; SINGER, R.S.; ATWILL, E.R. A prospective study of management and litter variables associated with cellulites in California broiler flocks. *Avian Dis.*, v. 48, p. 522 – 530, 2004.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. Conceitos gerais sobre análise de alimentos e determinação da matéria seca. In: _____. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. Viçosa: Editora UFV, 2004. cap. 1. p. 15 – 37.
- SILVA, V. S.; VOSS, D.; COLDEBELLA A. et al. Efeito de tratamentos sobre a carga bacteriana de cama de aviário reutilizada em frango de corte. Concórdia: Embrapa Suínos e aves, 2007. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_k1b2010q.pdf> Acesso em: 9 maio. 2008.
- TERZICH, M.; QUARLES, C.; GOODWIN, M.A. et al. Effect of poultry litter treatment (PLT) on the development of respiratory tract lesions in broilers. *Avian Pathol.*, v. 27, p. 566 – 569, 1998.
- TROVÓ, K. V. P. *Clostridium perfringens e Salmonella spp. em camas de frango, novas e reutilizadas, e seus efeitos sobre o desempenho zootécnico*. 2006. 51 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- VELAYUDHAN, B. T.; LOPES, V. C.; NOLL, S. L. et al. Avian pneumovirus and its survival in poultry litter. *Avian Dis.*, v.47, p. 764 – 768, 2003.
- 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. *Intern. J. Poult. Sci.*, v. 6, n.5, p. 314-317, 2007.
- WARD, R. L.; ASHLEY, C. S. Identification virucidal agent in wastewater sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 33, n. 4, p. 860 - 864, 1977.
- ZHU, X.Y.; WU, C.C.; HESTER, P.Y. Systemic distribution of *Staphylococcus aureus* following intradermal footpad challenge of broilers. *Poult. Sci.*, v. 80, p. 145 - 150, 2001.