

FABIO SANTIANI

**CARACTERIZAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA E PARASITOLÓGICA DA
COCCIDIOSE EM FRANGOS DE CORTE E SUA POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM
INFECÇÕES BACTERIANAS SECUNDÁRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Dra. Renata Assis Casagrande

LAGES, SC

2020

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Santiani, Fabio
CARACTERIZAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA E
PARASITOLÓGICA DA COCCIDIOSE EM FRANGOS DE
CORTE E SUA POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM INFECÇÕES
BACTERIANAS SECUNDÁRIAS / Fabio Santiani. -- 2020.
93 p.

Orientadora: Renata Assis Casagrande
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2020.

1. Avicultura. 2. Doença entérica. 3. Prejuízos. 4. Protozoário. I.
Assis Casagrande, Renata. II. Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

FABIO SANTIANI

**CARACTERIZAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA E PARASITOLÓGICA DA
COCCIDIOSE EM FRANGOS DE CORTE E SUA POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM
INFECÇÕES BACTERIANAS SECUNDÁRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora

Orientadora: Renata Assis Casagrande
Prof.^a Dr.^a Renata Assis Casagrande
Universidade do Estado de Santa Catarina– CAV/UDESC

Membro: Andreas Lazaros Chryssafidis
Prof.^o Dr. Andreas Lazaros Chryssafidis
Universidade do Estado de Santa Catarina – CAV/UDESC

Membro: Francielli Cordeiro Zimermann
Prof.^a Dr.^a Francielli Cordeiro Zimermann
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC/Curitibanos-SC

Aos meus pais, Nelson e Ivanilde, que me apoiaram em todos os momentos. Ao meu irmão Leonardo e, a minha namorada Cristiane, por fazerem parte desta jornada e tornarem os meus dias mais felizes e, a minha grande orientadora Dra. Renata Assis Casagrande por todo o apoio recebido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me presentear com as maravilhas da vida e seus encantos. À minha família, meus pais Nelson e Ivanilde e, ao meu irmão Leonardo pelo apoio em todos os momentos, de tristeza ou de alegria, sempre me apoiando e incentivando para seguir em frente.

Agradecer a minha orientadora, professora Renata Assis Casagrande, primeiramente por ter aceitado o convite para me orientar e, por todos os ensinamentos que me passou, não somente na pesquisa e ensino, mas também na vida cotidiana. Sou muito grato por todos os conselhos que recebi dessa pessoa que admiro muito, pela sua ética profissional, sua dedicação como professora e comprometimento como colaboradora da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC/CAV.

Agradecer a UDESC/CAV pela oportunidade de ingresso no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Ao Laboratório de Patologia Animal (LAPA), professores, colaboradores, pós-graduandos e alunos. Mas principalmente, agradecer ao Grupo de Patologia Veterinária, meus colegas Thierry, Giovanna, Patrícia, Leonardo, Jéssica, Sara e Aline. Aos bolsistas e estagiários, Leonardo H., Letícia, Gustavo, Tainah, Laura, David, Isadora, Taís, Leonardo, Júlia, Amanda, João, Marcela e, a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse trabalho.

Gostaria de agradecer ao professor Rodrigo Otávio Silveira Silva e a toda a equipe do Laboratório de Anaeróbios da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Agradecer a professora Sandra Maria Ferraz e a equipe do Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal – CEDIMA - UDESC/CAV. Ao professor Andreas Lazaros Chryssafidis e a equipe do Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias – UDESC/CAV. Também, ao professor Luiz Claudio Milette e a equipe do Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores – UDESC/CAV.

As empresas parceiras nesse projeto, Frangos Tais e Frangos Atalanta, gestores e todos os produtores integrados que nos receberam de braços abertos nas granjas para realização do projeto, somos muito gratos.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa e a todas as pessoas que direto ou indiretamente contribuíram de alguma forma na realização do sonho em me tornar mestre em Ciência Animal. Por fim, agradecer a minha namorada Cristiane por ter aguentado a distância, a saudades e as longas viagens para se visitar, e ainda assim estar comigo nessa jornada.

Muito obrigado a todos.

“Para ser vitorioso você precisa ver o que não está visível”
Sun Tzu

RESUMO

A coccidiose é uma das principais doenças que acometem as aves e causa grandes prejuízos à avicultura. Há sete espécies de *Eimeria* que acometem os frangos de corte, ocorrendo infecções mistas e por isso, torna-se fundamental realizar o diagnóstico de cada espécie corretamente. A coccidiose ainda pode predispor a infecções bacterianas como a enterite necrótica (EN), a salmonelose e a colibacilose. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de coccidiose associada a infecções bacterianas em lotes de frangos de corte. O estudo foi dividido em duas fases, sendo que na primeira fase, realizou-se um estudo transversal em 28 lotes, avaliando-se 10 aves por lote em dois momentos, sendo cinco aves entre os 21 e 28 dias de idade (coleta 1) e outras cinco entre os 35 e 42 dias (coleta 2), totalizando 280 amostras. Foi realizada análise macroscópica com atribuição de escore de lesão para coccidiose, avaliação histopatológica e, avaliação morfométrica e morfológica dos oocistos do conteúdo intestinal das aves e cama. Foi realizada pesquisa de *Salmonella* sp. através de suabe de arrasto da cama e de suabe de fezes. Além disso, órgãos com lesões macroscópicas foram submetidos a cultivo bacteriológico não seletivo. Na coleta 1, 82,14% dos lotes foram positivos para coccidiose e na coleta 2, 100% desses. A combinação mais encontrada foi *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*. O exame histopatológico apresentou diferença significativa e revelou aumento de 28,5% no número de aves que apresentavam lesões em comparação ao escore de lesão macroscópico. Observou-se ainda que o grau 1 foi o mais prevalente no escore de lesão macroscópica e histopatologia em ambas as coletas, porém, na coleta 2, houve aumento significativo de grau 3 de *E. tenella*. Nenhum lote foi positivo para *Salmonella* e as lesões extra intestinais não demonstraram relação com a coccidiose. Na segunda fase do estudo, foram avaliados 32 lotes oriundos de um abatedouro, cada um com oito aves, totalizando 256 amostras. Foi realizada avaliação macroscópica com atribuição de escore de lesão para coccidiose e EN, seguido de avaliação histopatológica, cultivo anaeróbico para *C. perfringens*, além de pesquisa do gene NetB de amostras bacteriológicas e, PCR de conteúdo intestinal para detecção de *Eimeria* sp. Foram encontrados 93,75% (30/32) dos lotes positivos para coccidiose. As lesões macroscópicas mais comuns foram compatíveis com *E. acervulina* grau 1 27,03% (70/256), repetindo-se na avaliação histopatológica no duodeno com grau 1 38,2% (98/256). Na PCR foram encontrados 34,37% (11/32) dos lotes positivos, sendo 21,87% (7/32) para *E. tenella*, 18,75% (6/32) *E. maxima* e 3,12% (1/32) *E. acervulina*. As lesões sugestivas de EN foram predominantemente grau 2 23,05% (59/256), porém, na histopatologia foi observado apenas hemorragia em mucosa e submucosa, além de *Eimeria* sp. Apenas 8,2% (21/256) das amostras apresentaram crescimento de *C. perfringens* Tipo A, sendo todas negativas para o gene NetB. As lesões observadas não caracterizaram EN, fundamentada pela histopatologia e ausência do gene NetB, podendo ser ocasionadas pela infecção por *Eimeria*. O diagnóstico da coccidiose deve ser realizado utilizando associação de métodos diagnósticos como o escore de lesão, histopatologia e avaliação parasitológica para a obtenção de resultados mais precisos. A coccidiose pode gerar lesões macroscópicas atípicas, por isso o escore de lesão deve ser utilizado associado a outro método para diagnóstico. A negatividade para *Salmonella* em todos os lotes pode ser devido ao alto nível de biosseguridade e controle sanitário das granjas.

Palavras-chave: Avicultura, doenças entéricas, prejuízos, protozoário.

ABSTRACT

Coccidiosis is one of the main diseases that affect poultry and causes a lot of losses to aviculture. Seven species of *Eimeria* affect broiler chickens, sometimes occurring mixed infections, which is why it is essential to do the diagnosis of each species correctly. Coccidiosis can also predispose bacterial infections such as necrotic enteritis (NE), salmonellosis and colibacillosis. The aim of this phase was to evaluate the occurrence of coccidiosis associated with bacterial infections in broiler flocks. The study was divided into two phases, with the first phase, a cross-sectional study was carried out on 28 flocks, evaluating 10 broilers per flock in two moments, with five broilers between 21 and 28 days of age (collection 1) and five broilers between 35 and 42 days (collection 2), totaling 280 samples. A macroscopic, histopathological score of lesions due to coccidiosis, morphometric and morphological evaluation of the oocysts in the intestinal content of broilers and of litter were performed. Research on *Salmonella* sp. through litter swab and intestinal contents. In addition, organs with macroscopic lesions were subjected to non-selective bacteriological culture. In collection 1, 82.14% of the flocks were positive for coccidiosis and in collection 2, 100% of these. The most frequently found combination was *E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella*. The histopathological examination showed a significant difference and revealed an increase of 28.5% of broilers that presented injuries in comparison to the macroscopic lesion score. It was observed that grade 1 was the most prevalent in the score of injury and histopathology in both collections, however, in collection 2, there was a significant increase in grade of *E. tenella*. *Salmonella* were not found in the flocks and the extra-intestinal lesions showed no relation with coccidiosis. In the second study, 32 flocks were evaluated, each with eight broilers, totaling 256 samples. A macroscopic lesion score was performed for coccidiosis and EN, followed by histopathological evaluation, anaerobic culture for *C. perfringens*, in addition to research of the NetB gene and PCR of feces for *Eimeria*. In this study, were found 93.75% (30/32) of the positive lots for coccidiosis. The most common macroscopic lesions were by *E. acervulina* grade 1, 27.03% (70/256), repeating in histopathological findings in the duodenum with grade 1, 38.2% (98/256). In the PCR, 34.37% (11/32) of the positive lots were found, being 21.87% (7/32) for *E. tenella*, 18.75% (6/32) *E. maxima* and 3.12% (1/32) *E. acervulina*. The lesions suggestive of EN were predominantly grade 2 23.05% (59/256), but in histopathology only hemorrhage was observed in the mucosa and submucosa, in addition to *Eimeria* sp. Only 8.2% (21/256) of the samples demonstrated growth of *C. perfringens* Type A, all of which were negative for the NetB gene. The lesions observed did not characterize EN, based on histopathology and the absence of the NetB gene, which could be caused by *Eimeria* infection. The diagnosis of coccidiosis should be performed using an association of diagnostic methods such as macroscopic score, histopathology, and parasitological evaluation to obtain more accurate results. Coccidiosis can present atypical macroscopic lesions, so this score should be used in conjunction with another method for diagnosis. The negativity for *Salmonella* in all lots may be due to the high level of biosecurity and sanitary control of farms.

Keywords: Poultry farming, enteric diseases, losses, protozoan.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Lesões macroscópicas de coccidiose em frangos de corte. A: Duodeno: estrias esbranquiçadas transversais na mucosa (seta), até cinco lesões por cm^2 (*E. acervulina* grau 1). B: Duodeno: mais que cinco estrias por cm^2 (*E. acervulina* grau 2). C: Jejuno: petéquias (seta) multifocais moderadas na serosa (*E. maxima* grau 1). D: Íleo: petéquias multifocais moderadas na mucosa e conteúdo intestinal com coágulos (seta) (*E. necatrix* grau 1). E: Ceco: petéquias (seta) multifocais discretas na mucosa (*E. tenella* grau 1). F: Ceco: conteúdo sanguinolento entremeado a coágulos (seta) difuso moderado (*E. tenella* grau 3)..... 49

Figura 2 - Lesões histológicas de coccidiose em frangos de corte. A: Duodeno: discreta quantidade de estruturas parasitárias contendo esquizontes (seta) na camada superficial da mucosa (*Eimeria* sp. grau 1). B: Duodeno: grande quantidade de estruturas parasitárias contendo macrogametócitos (seta) na camada superficial da mucosa (*Eimeria* sp. grau 3). C: Jejuno: discreta quantidade de esquizontes (cabeça de seta) e macrogametócitos (seta) na camada superficial da mucosa (*Eimeria* sp. grau 1). D: Íleo: discreta quantidade de macrogametócitos (setas) na camada superficial da mucosa (*Eimeria* sp. grau 1). E: Ceco: moderada quantidade de oocistos imaturos (cabeça de seta) e macrogametócitos (seta) (*Eimeria* sp. grau 1). F: Ceco: grande quantidade de esquizontes (cabeça de seta) e macrogametócitos (seta) (*Eimeria* sp. grau 3). (HE, 400x)..... 50

Figura 3 - Lesões extra intestinais em frangos de corte com coccidiose. A: Cavidade celomática: grande quantidade de material caseoso amarelado depositado sobre as vísceras (seta). B: Fígado: múltiplos pontos esbranquiçados de até 2mm (seta) distribuídos por todo o parênquima hepático..... 51

Figura 4 - Lesões macroscópicas e histopatológicas de coccidiose em frangos de corte. A: Duodeno: estrias transversais esbranquiçadas (setas) multifocais discretas (*E. acervulina* grau 1). B: Duodeno: discreta quantidade de estruturas parasitárias compreendendo esquizontes (seta) na mucosa no topo das vilosidades (grau 1) (HE, 400x). C: Jejuno: conteúdo intestinal mucoso alaranjado na mucosa, multifocal discreto (*E. maxima* grau 1). D: Jejuno: discreta quantidade de estruturas parasitárias contendo esquizontes (cabeça de seta), macrogametócitos (seta) e oocistos imaturos (asterisco) na submucosa (grau 1) (HE, 400x). E: Ceco: áreas avermelhadas (setas) multifocais discretas na mucosa (*E. tenella* grau 1). F: Ceco: discreta quantidade de estruturas parasitárias contendo macrogametócitos (seta) e oocistos imaturos (asterisco) na mucosa e submucosa (grau 1) (HE, 400x)..... 73

Figura 5 - Lesões macroscópicas sugestivas de enterite necrótica (EN) e lesões histopatológicas intestinais de frangos de corte. A: Duodeno: áreas avermelhadas na mucosa, medindo até 2mm de diâmetro (setas), multifocais discretas (grau 1). B: Duodeno: discreta quantidade de estruturas parasitárias contendo esquizontes (seta) no topo e região superficial das vilosidades, compatíveis com *Eimeria* sp. grau 1. (HE, 400x). C: Íleo: área avermelhada na serosa, medindo 5mm de diâmetro (seta), focal moderada (grau 2). D: Íleo: discreta quantidade de macrogametócitos (seta) e oocistos imaturos na região medial das vilosidades, compatíveis com *Eimeria* sp. grau 1 e hemorragia focal moderada (cabeça de seta) grau 2 (HE, 400x). E: Jejuno: área avermelhada com deposição de material fibrilar na superfície da mucosa (seta), focal

acentuada (grau 3). F: Jejuno: hemorragia difusa acentuada (seta) grau 3 (HE, 100x)..
..... 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados das análises univariada e multivariada na determinação de variáveis associadas a coccidiose em frangos de corte na coleta 1.....	45
Tabela 2 - Espécies de <i>Eimeria</i> identificadas através da avaliação morfológica e morfométrica dos oocistos em amostras de conteúdo intestinal e cama de aviário de lotes de frangos de corte na coleta 1 (21 a 28 dias de idade) e coleta 2 (35 a 42 dias de idade).	46
Tabela 3 - Escore de lesão macroscópica e histopatológica de coccidiose em frangos de corte, obtidos na coleta 1 (21 e 28 dias de idade) e na coleta 2 (35 e 42 dias de idade) (n: 280).	47
Tabela 4 - Lotes de frangos de corte que apresentaram coccidiose e lesões extraintestinais na coleta 1.....	48
Tabela 5 - Comparação entre macroscopia, histopatologia e parasitologia para o diagnóstico de <i>Eimeria</i> nas coletas 1 e 2 de frangos de corte em 28 lotes.	51
Tabela 6 - Análise de concordância de <i>Kappa</i> entre macroscopia, histopatologia e parasitologia de <i>Eimeria</i> em frangos de corte nas coletas 1 e 2 em 28 lotes.....	52
Tabela 7 - Escore de lesões macroscópicas e histopatológicas para coccidiose em frangos de corte (n: 256 amostras).	72
Tabela 8 - Alterações histopatológicas observadas em intestinos de frangos de corte com lesões macroscópicas sugestivas de enterite necrótica (EN).	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Escore de lesões macroscópicas de coccidiose em <i>Gallus gallus domesticus</i>	29
Quadro 2 - Características biológicas das espécies de <i>Eimeria</i> que acometem frangos de corte. Período pré-patente (PPP) e tempo mínimo para esporulação (TME) a 30°C.	31
Quadro 3 - Primers utilizados na técnica de PCR para a detecção de <i>E. acervulina</i> (ac), <i>E. brunetti</i> (br), <i>E. tenella</i> (tn), <i>E. mitis</i> (mt), <i>E. praecox</i> (pr), <i>E. maxima</i> (mx) e <i>E. necatrix</i> (nc).....	68
Quadro 4 - Primers utilizados para PCR Multiplex de <i>Clostridium perfringens</i>	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVOS GERAIS	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	26
4 DIFERENTES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA COCCIDIOSE EM FRANGOS DE CORTE E POSSÍVEIS LESÕES BACTERIANAS ASSOCIADAS	35
4.1 INTRODUÇÃO.....	37
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.2.1 População estudada	39
4.2.2 Variáveis epidemiológicas.....	39
4.2.3 Pesquisa de <i>Eimeria</i> sp.	40
4.2.4 Purificação e identificação dos oocistos	40
4.2.5 Caracterização macroscópica e histológica das lesões	41
4.2.6 Cultivo microbiológico	42
4.2.7 Análise estatística.....	43
4.3 RESULTADOS	44
4.3.1 Levantamento dos dados epidemiológicos.....	44
4.3.2 Exame parasitológico para <i>Eimeria</i> sp.	46
4.3.3 Caracterização macroscópica, histopatológica e microbiológica	46
4.3.4 Comparação entre macroscopia, histopatologia e parasitologia para o diagnóstico de coccidiose	51
4.4 DISCUSSÃO	52
4.5 CONCLUSÃO	57
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
5 AVALIAÇÃO DA COCCIDIOSE EM FRANGOS DE CORTE E SUA POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM ENTERITE NECRÓTICA SUBCLÍNICA	61
5.1 INTRODUÇÃO	63
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	64
5.2.1 Colheita das amostras	64
5.2.2 Caracterização macroscópica e microscópica das lesões intestinais.....	65

5.2.3 Exame parasitológico para <i>Eimeria</i> sp.....	66
5.2.4 Purificação, limpeza dos oocistos e extração de DNA.....	66
5.2.5 PCR para <i>Eimeria</i> sp.	68
5.2.6 Cultivo microbiológico para <i>C. perfringens</i>	69
5.2.7 Extração de DNA para pesquisa bacteriológica.....	69
5.2.8 PCR Multiplex para <i>C. perfringens</i>	70
5.2.9 PCR para o gene NetB	71
5.2.10 Análise estatística	71
5.3 RESULTADOS.....	71
5.3.1 Avaliação das lesões macroscópicas e microscópicas.....	71
5.3.2 Pesquisa de oocistos de <i>Eimeria</i> sp. através de PCR.....	76
5.3.3 Pesquisa do <i>C. perfringens</i> tipo A e gene NetB	76
5.4 DISCUSSÃO	76
5.5 CONCLUSÃO	80
5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
8 ANEXOS.....	91

1 INTRODUÇÃO

A atividade avícola no mundo vem crescendo continuamente e consigo traz a cada dia mais desafios sanitários e zootécnicos. O sistema intensivo de produção de frangos de corte, mesmo com uso de alto padrão tecnológico, não assegura que o ambiente de criação das aves esteja livre de patógenos. Quando presentes, os patógenos prejudicam a eficiência do aproveitamento dos nutrientes das rações, em decorrência do possível surgimento de desordens entéricas (RAMOS et al., 2011).

A coccidiose é uma das principais doenças que acometem as aves e causa grandes prejuízos ao setor. No Brasil, cerca de 17% do custo da produção é devido a profilaxia, tratamento preventivo e terapêutico (LUCHESE, 2007). Anualmente, o custo com medicação preventiva para a coccidiose pode ultrapassar os 2 bilhões de euros em todo o mundo (PEEK; LANDMAN, 2011).

A doença é causada por protozoários do gênero *Eimeria*, que possuem ciclo relativamente curto e, em condições favoráveis, se completa em três dias, sendo que os oocistos podem permanecer por até um ano no ambiente, em lugares úmidos e com sombra (ALBINO; TAVERNARI, 2012). A coccidiose pode apresentar-se de maneira clínica e subclínica, provocando prejuízos devido a quadros de diarreia, perda de desempenho, aumento da conversão alimentar e ainda pode causar mortalidade (MEIRELES, 2009).

O diagnóstico é baseado na avaliação macroscópica descrita por Johnson e Reid (1970), através da observação das lesões intestinais em duodeno, jejuno, íleo, cecos e cólon, posteriormente classificadas em graus de lesão. Porém, outros métodos laboratoriais podem ser empregados para melhor acurácia de diagnóstico, como o exame histopatológico e parasitológico.

Outra característica importante da coccidiose é a possibilidade de favorecer a instalação de doenças secundárias, como a enterite necrótica (EN), a salmonelose e outras doenças bacterianas. O dano causado ao epitélio intestinal por coccídeos e as modificação das funções gastrointestinais podem predispor ao aparecimento de clostridioses (GIL DE LOS SANTOS et al., 2008). Isso resultará na liberação de proteínas plasmáticas no lúmen do trato intestinal e bactérias como *Clostridium perfringens*, que causa a enterite necrótica nas aves, pode utilizar este material como substrato de crescimento (BOYD et al., 1948; PETIT et al., 1999). *C. perfringens* é um habitante comensal do trato gastrointestinal das aves, mas também encontrado no ambiente. Nas aves, é responsável por causar lesões intestinais em duodeno, jejuno, íleo e cecos. As lesões se apresentam de várias formas, desde distensão das alças com

conteúdo intestinal marrom escuro, até a formação de pseudomembranas diftéricas e áreas de necrose da mucosa (COOPER et al., 2013).

A descoberta de uma toxina, associada ao desenvolvimento da EN trouxe novos desafios para seu diagnóstico. A toxina NetB possui papel crítico e essencial na capacidade de isolados de *C. perfringens* de causar a doença (KEYBURN et al., 2008). Dessa forma, a toxina NetB se tornou o principal fator de virulência para o desenvolvimento da EN (SMYTH; MARTIN, 2010).

Da mesma forma, a invasividade do protozoário *Eimeria* no epitélio intestinal pode favorecer a instalação da infecção por *Salmonella* sp. no organismo da ave. Salmonelose é uma enfermidade de interesse mundial que preocupa as autoridades sanitárias e também como uma forte barreira ao comércio internacional de produtos avícolas devido ao seu potencial zoonótico (KOINARSK et al., 2005).

Quando detectado *Salmonella* sp. em uma granja avícola, o controle da infecção é muito difícil, trabalhoso e de resultados imprecisos, podendo ocorrer disseminação entre as aves e para o meio ambiente. Portanto, prioriza-se a prevenção dessa enfermidade nos lotes (GAMBIRAGI et al., 2003).

Assim, a importância da coccidiose, que por si só pode causar prejuízos a produção, é acrescida pelo risco de infecção por *Salmonella* sp. ou outras bactérias patogênicas que possam causar prejuízos à atividade (KOINARSK et al., 2005). Além disso, com a diminuição do uso de antibióticos e promotores de crescimento na avicultura, o ressurgimento de doenças como a enterite necrótica pode se tornar frequente (BEZERRA et al., 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência da coccidiose, sua intensidade e a possível associação com a salmonelose, a enterite necrótica e outras infecções bacterianas em frangos de corte, investigando os fatores epidemiológicos envolvidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as lesões macro e microscópicas da coccidiose e classificá-las em escore de acordo a intensidade;
- Realizar a pesquisa de oocistos de *Eimeria* sp. no conteúdo intestinal e na cama de aviário através da técnica de morfometria e morfologia de oocistos e, pela técnica de PCR;
- Comparar as lesões macroscópicas e histopatológicas da coccidiose com os achados da avaliação parasitológica e PCR, além de investigar os possíveis fatores epidemiológicos envolvidos;
- Realizar a pesquisa de *Salmonella* sp. através de suave de arrasto e suave de fezes e, cultivo bacteriano aeróbico de órgãos com lesões;
- Realizar a pesquisa de *Clostridium perfringens* portadores do gene NetB, em intestinos com lesões sugestivas de enterite necrótica, correlacionando com as lesões de coccidiose.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A coccidiose é causada por protozoários do gênero *Eimeria* pertencentes ao filo Apicomplexa e família *Eimeriidae* (KAWAZOE, 2009). Atualmente, sete principais espécies de *Eimeria* acometem os frangos de corte, sendo *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella* (MEIRELES, 2009).

O ciclo de vida se desenvolve em um único hospedeiro (monoxeno), com etapas que ocorrem dentro das células intestinais, composta por uma fase assexuada (merogonia ou esquizogonia) e outra fase sexuada (gametogonia) e, uma segunda etapa que ocorre no meio ambiente, chamada de esporogonia (KAWAZOE, 2000; ALLEN; FETTERER, 2002).

Incialmente a ave ingere os oocistos esporulados presentes na cama ou ambiente de criação. O oocisto esporulado possui quatro esporocistos, cada um com dois esporozoítos, que são rompidos pela ação mecânica e química do trato gastrointestinal, liberando os esporozoítos que penetrarão nos enterócitos. Após penetrar na célula intestinal, o esporozoíto inicia a fase de reprodução assexuada ou merogonia, dando origem a um grande número de novas formas conhecidas por merozoítos (CONWAY; MCKENZIE, 2007).

Dependendo da espécie de *Eimeria*, ocorrem de três a quatro merogonias, com ruptura das estruturas parasitárias e reinfecção das células adjacentes, resultando em grande dano ao epitélio. A última geração de merozoítos diferencia-se em macrogamontes e microgamontes que originam os gametas femininos e masculinos, respectivamente. Na fase sexuada ou gametogonia, ocorre a fertilização dos macrogametas pelos microgametas, dando origem ao zigoto e em seguida o oocisto imaturo, que é excretado junto com as fezes (KAWAZOE, 2009). No ambiente ocorre a esporulação ou esporogonia, onde o oocisto na presença de oxigênio, temperatura e umidade adequados torna-se infectante (FORTES, 2004).

Eimeria acervulina acomete principalmente a porção anterior do intestino delgado ao longo da alça duodenal, podendo, em infecções severas ser encontrada no jejuno. O parasita se instala na extremidade superior das vilosidades, formando aglomerados de estruturas parasitárias. Assim tornam-se visíveis à avaliação macroscópica, apresentando-se como pontos ou estrias esbranquiçadas transversais na mucosa (MCDOUGALD, 2003).

Os prejuízos causados por essa espécie às aves estão relacionados com a diminuição na absorção do alimento, com consequente redução no ganho de peso e aumento da taxa de conversão alimentar, refletindo diretamente no desempenho dos animais e no custo de produção (KAWAZOE, 2000).

Eimeria maxima é encontrada principalmente na região medial do intestino delgado, estendendo-se entre jejuno e íleo. As lesões, diferentemente de *E. acervulina*, são hemorrágicas que podem ser visualizadas na serosa e mucosa. Normalmente, observam-se petéquias na mucosa, associadas a deposição de conteúdo intestinal de coloração alaranjado ou avermelhado. Ainda, pode-se encontrar espessamento da mucosa e dilatações da parede intestinal na região acometida (CONWAY; MCKENZIE, 2007; MCDOUGALD, 2003).

A localização subepitelial de *E. maxima* contribui para o maior dano tecidual, pois na reprodução sexuada, possui oocistos grandes, que rompem estruturas adjacentes, causando hemorragias e perda de fluidos. Dessa forma, pode ocorrer aumento de mortalidade e aumento da taxa de conversão alimentar (SCHNITZLER; SHIRLEY, 1999; MCDOUGALD, 2003).

Eimeria tenella é a espécie mais conhecida por ser facilmente reconhecida pelas suas lesões e mortalidade que causa em frangos de corte, por isso é considerada altamente patogênica, causando prejuízos de grande impacto ao setor. O ceco das aves é o local mais afetado por *E. tenella*, podendo se estender até o cólon. As formas reprodutivas se desenvolvem na mucosa e submucosa, causando danos extensos principalmente durante a reprodução assexuada, pela segunda geração de grandes esquizontes contendo centenas de merozoítos (MCDOUGALD, 2003).

A principal característica da infecção por *E. tenella* é alta mortalidade das aves, fato não completamente elucidado. Porém, acredita-se que o parasita interfere no mecanismo de coagulação sanguínea devido a falhas no metabolismo da vitamina K, agravando o quadro hemorrágico, que por si só não é responsável pela morte das aves, mas provavelmente ocorra interação entre fatores tóxicos e bacterianos durante a infecção (KAWAZOE, 2000; MCDOUGALD, 2003).

Eimeria mitis e *E. praecox* não causam lesões macroscópicas significativas pois não formam colônias e localizam-se superficialmente no epitélio da mucosa do intestino delgado, entre duodeno e jejuno (COOPER et al., 2013). Dessa forma, o diagnóstico torna-se muito difícil através da avaliação macroscópica. As poucas alterações visíveis na infecção por *E. mitis* são intestino pálido e flácido e com espesso exsudato e, na infecção por *E. praecox* observa-se algumas petéquias na mucosa, com conteúdo intestinal aquoso com ou sem muco. Ainda assim, ambas são capazes de causar diminuição do ganho de peso, palidez de carcaça e piora na conversão alimentar (LONG; REID, 1982; MCDOUGALD, 2003).

Apesar da pouca importância dada a *E. praecox*, os prejuízos relacionados a diminuição do ganho de peso em pintinhos podem chegar a 25%, muito semelhante ao

observado na *E. mitis*, que chega a apresentar 21% de redução no ganho de peso diário em condições experimentais (WILLIAMS, 1998).

Eimeria necatrix desenvolve-se inicialmente no intestino delgado, especificamente em íleo, onde ocorrem duas merogonias e, em seguida, a terceira geração de esquizontes migra para o ceco, onde acontece a reprodução sexuada e a formação dos oocistos. Porém, as lesões ocorrem no intestino delgado, devido à formação dos esquizontes de segunda geração, que se localizam próximos à camada muscular, alcançando vasos sanguíneos. Na serosa do intestino são observadas placas brancas, resultado da aglomeração dos esquizontes, além de dilatação da parede intestinal e petéquias. Internamente o conteúdo intestinal apresenta traços de sangue e muco (MCDOUGALD, 2003).

Eimeria necatrix é altamente patogênica, causando alta mortalidade e queda de desempenho, embora seja pouco prolífera devido a competição com as outras espécies de *Eimeria*. Seu ciclo é mais longo, por isso os surtos de *E. necatrix* são tardios, por volta de nove a 14 semanas de vida, acometendo principalmente aves mais velhas, como matrizes. Apesar disso, já foram relatados casos em frangos de corte (KAWAZOE; FIGUEIREDO, 1990; MCDOUGALD, 2003).

Eimeria brunetti normalmente se inicia no intestino delgado e desce ao intestino grosso, mas pode se estender por todo o intestino em infecções massivas. Apesar de incomum, é altamente patogênica, promove lesões moderadas a graves devido à destruição causada pelos esquizontes, localizados na submucosa (MCDOUGALD, 2003). Ainda, ocorre aumento de mortalidade, diminuição no ganho de peso e aumento na taxa de conversão alimentar (MCDOUGALD, 2003).

A infecção por mais de uma espécie de *Eimeria* é comum. Assim o local e as características macroscópicas das lesões muitas vezes fornecem um indicativo da espécie envolvida (LONG; JOYNER, 1984; MORRIS et al., 2007). Essas lesões foram classificadas por Johnson e Reid (1970), conforme Quadro 1.

Eimeria acervulina, *E. maxima* e *E. tenella* causam lesões típicas no duodeno, jejuno e ceco, respectivamente. Estas são as espécies que têm maior ocorrência nos lotes de frangos de corte e, portanto, são mais constantemente monitoradas (CHAPMAN, 2014). As demais espécies, apesar de patogênicas, não causam lesões significativas tão facilmente visíveis na macroscopia, e dessa forma são diagnosticadas com menos frequência.

Quadro 1 - Escore de lesões macroscópicas de coccidiose em *Gallus gallus domesticus*.

Espécie	Localização	Escore 1	Escore 2	Escore 3	Escore 4
<i>E. acervulina</i>	Duodeno	Estrias transversais esbranquiçadas até 5 lesões por cm ²	Lesões próximas não coalescentes. Sem espessamento transmural	Lesões menores, abundantes e coalescentes, podendo se estender até jejuno proximal. Espessamento transmural e conteúdo intestinal aquoso	Lesões coalescentes acinzentadas, estendendo-se até jejuno. Mucosa com descamação celular e espessamento transmural
<i>E. maxima</i>	Jejuno	Petéquias multifocais discretas na serosa. Conteúdo intestinal mucoso alaranjando	Petéquias multifocais moderadas na serosa. Espessamento transmural e embalonamento discreto. Conteúdo intestinal mucoso alaranjado	Espessamento transmural e espessamento segmentar moderado. Mucosa de aspecto rugoso e conteúdo intestinal mucoso alaranjado com coágulos sanguíneos	Espessamento transmural e embalonamento difuso. Conteúdo intestinal com sangue digerido
<i>E. necatrix</i>	Jejuno	Áreas esbranquiçadas e petéquias multifocais discretas na serosa	Áreas esbranquiçadas e petéquias multifocais moderadas na serosa e embalonamento discreto	Áreas esbranquiçadas e petéquias multifocais difusas. Espessamento transmural e embalonamento multifocal moderado. Mucosa com áreas avermelhadas multifocais moderadas	Embalonamento difuso acentuado. Extensas áreas de hemorragia transmural. Conteúdo intestinal mucoso avermelhado ou marrom
<i>E. tenella</i>	Cecos	Petéquias multifocais discretas na mucosa	Petéquias multifocais moderadas na mucosa. Conteúdo intestinal sanguinolento. Espessamento transmural discreto	Conteúdo intestinal com coágulos de sangue. Espessamento transmural moderado e trabéculas disformes	Distensão transmural difusa acentuada. Conteúdo intestinal sanguinolento com coágulos de sangue. Áreas multifocais de necrose na mucosa. Ausência de conteúdo fecal
<i>E. brunetti</i>	Côlon	Parede intestinal acinzentada. Espessamento transmural focal discreto. Conteúdo intestinal alaranjado	Espessamento transmural moderado. Conteúdo intestinal catarral. Mucosa com estrias transversais avermelhadas. Hemorragias nas tonsilas cecais	Mucosa com áreas de necrose multifocais em côlon até tonsilas cecais, ileo e jejuno. Conteúdo intestinal com coágulos de sangue	

Adaptado de Johnson e Reid (1970).

As espécies de *Eimeria* presentes em um lote devem ser corretamente identificadas. Os estudos de ocorrência são importantes para o entendimento da doença, pois as espécies causam lesões e sinais clínicos diferentes, são imunologicamente distintas e podem responder de forma desigual aos anticoccidianos. Além disso, para se obter um diagnóstico confiável, é necessária uma combinação de exames laboratoriais que partem desde a necropsia, exame histopatológico, exame parasitológico e/ou métodos moleculares (CHAPMAN, 2014; GAZONI et al., 2015).

No campo, o diagnóstico da coccidiose é realizado pela análise de escore de lesões macroscópicas. Porém, já foi observado que, quando utilizado isoladamente, não reflete a

severidade da infecção por *Eimeria* nas aves (IDRIS et al., 1997). Dessa forma, a associação com o exame histopatológico e parasitológico é fundamental.

A avaliação histopatológica é pouco utilizada para fins de diagnóstico a campo, sendo mais comumente empregada na pesquisa. Entretanto, a observação das lesões causadas pela coccidiose, além da presença das estruturas parasitárias em diferentes estágios do ciclo, é muito importante para o entendimento da real condição da infecção (IDRIS et al., 1997).

A histopatologia pode auxiliar no diagnóstico precoce da coccidiose, pois é possível observar as estruturas parasitárias no epitélio intestinal nas fases de merogonia e gametogonia. Assim, é possível antecipar o tratamento ou medidas profiláticas (ZULPO et al., 2007).

Não existe na literatura uma classificação das lesões de coccidiose encontradas na histopatologia, talvez sendo esse o motivo do baixo uso dessa técnica como método diagnóstico. Porém, é possível identificar desde as estruturas parasitárias nas diferentes fases do ciclo evolutivo, infiltrado de células inflamatórias e atrofia de vilosidades e criptas (ZULPO et al., 2007).

A infecção concomitante por mais de uma espécie de *Eimeria* é muito comum nos quadros de coccidiose, tornando algumas lesões sobrepostas, podendo confundir o avaliador na classificação macroscópica (JONSON; REID, 1970; YOU, 2014; MORAES et al., 2015). Com o auxílio da avaliação histopatológica é possível diagnosticar até 30% mais casos de coccidiose que não apresentam lesões macroscópicas (IDRIS et al., 1997).

Associado à observação das lesões macroscópicas e histopatológicas, pode-se realizar a análise das fezes das aves para identificação dos oocistos de cada espécie de *Eimeria*. Assim, baseados na apresentação dos sinais clínicos, lesões anatomo-patológicas e exame parasitológico obtém-se um diagnóstico mais preciso da coccidiose nas aves (JONSON; REID, 1970; LONG; REID, 1982; IDRIS et al., 1997; MCDOUGALD, 2003).

Utilizando a morfologia e o tamanho dos oocistos, é possível chegar ao diagnóstico das espécies de *Eimeria*, visto que cada uma apresenta características individuais, possibilitando a diferenciação. Tipicamente o diagnóstico é realizado baseado na apresentação dos sinais clínicos, localização e tipo das lesões macroscópicas, período pré-patente, tempo médio de esporulação dos oocistos e avaliação da morfologia e morfometria dos oocistos (LONG; REID, 1982; MCDOUGALD, 2003).

No Quadro 2 são representados os tamanhos e formato dos oocistos, período pré-patente (PPP) e tempo mínimo para esporulação (TME) dos oocistos de cada espécie de *Eimeria* conforme descrito por Long e Reid (1982).

Quadro 2 - Características biológicas das espécies de *Eimeria* que acometem frangos de corte. Período pré-patente (PPP) e tempo mínimo para esporulação (TME) a 30°C.

Espécie	PPP (h)	TME (h)	Medidas (μm)	Formato do oocisto
<i>E. acervulina</i>	97	17	17,7 a 20,2 X 13,7 a 16,3	Ovoide
<i>E. maxima</i>	121	30	21,5 a 42,5 X 16,5 a 29,8	Ovoide
<i>E. tenella</i>	115	18	19,5 a 26,0 X 16,5 a 22,8	Ovoide
<i>E. mitis</i>	93	15	11,7 a 18,7 X 11,0 a 18,0	Subesférico
<i>E. praecox</i>	83	12	19,8 a 24,7 X 15,7 a 19,8	Ovoide
<i>E. necatrix</i>	138	18	13,2 a 22,7 X 11,3 a 18,3	Ovoide oblongo
<i>E. brunetti</i>	120	18	20,7 a 30,3 X 18,1 a 24,2	Ovoide

Fonte: Adaptado de Long e Reid (1982).

Desde 1990 são desenvolvidos métodos moleculares como o PCR para a identificação de espécies de *Eimeria*. Procuñier et al. (1993) geraram através da técnica de Amplificação aleatória de DNA polimórfico (*Random Amplified Polymorphic DNA* - RAPD), fragmentos de DNA espécie-específicos que poderiam ser utilizados na identificação desses organismos. Esses fragmentos posteriormente foram utilizados para o desenvolvimento de *primers* para o diagnóstico por PCR.

Molloy et al. (1998) padronizaram um *nested* PCR para *E. acervulina* com sensibilidade de detectar essa espécie em até 0,001% da população total de oocistos. No mesmo ano, Schnitzler et al. (1998), sequenciaram a região do espaçador transcrito interno 1 (ITS-1) do DNA ribossomal das sete espécies de *Eimeria*, identificando regiões únicas utilizadas no desenho dos *primers* específicos para essas espécies. A partir disso, vários trabalhos utilizaram a técnica de PCR para identificação das espécies de *Eimeria* a partir de fezes com oocistos (COSTA; PEDROSO-DE-PAIVA, 2009)

Fernandez et al. (2003), desenvolveram uma PCR múltipla para a identificação das sete espécies de *Eimeria* de galinhas em uma única reação. A Multiplex PCR possui uma sensibilidade de detecção de 2-8 oocistos esporulados, ou seja, é menos sensível que o PCR isolado, porém apesar da maior dificuldade na padronização da Multiplex PCR, devido a complexa interação molecular que pode alterar a eficiência de ligação dos “*primers*”, a técnica diminui a mão de obra e o tempo de execução dos diagnósticos (MORAES et al., 2015).

Carvalho et al. (2011) compararam o diagnóstico através das lesões e sinais clínicos com a Multiplex PCR para a identificação das sete espécies de *Eimeria*, sendo que todas as

espécies foram encontradas em 13,7% das granjas, enquanto utilizando a identificação morfológica, 60% foram positivas. Moraes et al. (2015) observaram que *E. maxima* foi a espécie mais frequente (63,7%), seguida por *E. acervulina* (63,3%), *E. tenella* (54,6%), *E. mitis* (38,6%), *E. praecox* (25,1%), *E. necatrix* (24,3%) e *E. brunetti* (13,1%) em granjas do sul do Estado de Santa Catarina através da técnica de Multiplex PCR.

O dano causado ao epitélio intestinal por coccídeos e as modificação das funções gastrointestinais podem predispor ao aparecimento de clostridioses (GIL DE LOS SANTOS et al., 2008). A enterite necrótica (EN) é causada pelo *Clostridium perfringens*, caracterizado como bastonete anaeróbio, Gram positivo, formador de esporo oval-subterminal, encapsulado e imóvel (COOPER et al., 2013) que apresenta cinco sorotipos (A, B, C, D e E), de acordo com as toxinas produzidas (LOVLAND; KALDHUSDAL, 2001).

A cocciose tem sido considerada como um importante fator predisponente para a EN. Acredita-se que existe uma resposta exacerbada da produção de muco quando os enterócitos são atacados pelos coccídeos e isso facilitaria a adesão e multiplicação de bactérias que conseguem utilizar o muco como substrato para sua sobrevivência. Dentre elas *C. perfringens* é a principal bactéria patogênica que pode usufruir dessa alteração para sua instalação (COLLIER et al., 2008).

A EN se desenvolve quando a bactéria se multiplica desenfreadamente no trato intestinal das aves, produzindo toxinas que levam à necrose. A principal toxina produzida por *C. perfringens* tipo A é a toxina alfa (CPA), considerada um importante fator de virulência (GHOLAMIANDEKHORDI et al., 2006). Porém, uma toxina chamada NetB foi identificada como tendo um papel importante na patogênese da doença. A toxina NetB tem similaridade com a toxina beta (CPB), fortemente necrosante e letal. Caracterizada pela produção de poros na membrana celular, a toxina NetB provou ser um importante fator de virulência para o surgimento da EN (KEYBURN et al., 2008).

Os surtos de EN são mais comuns entre duas e seis semanas de idade, porém, aves mais velhas também podem desenvolver a doença (COOPER et al., 2013). Aves com EN aguda tipicamente têm lesões macroscópicas restritas ao intestino delgado, sendo mais frequentes no jejuno e íleo. No entanto, as lesões também podem ocorrer no duodeno e no ceco (LONG et al., 1974; BROUSSARD et al., 1986). O intestino normalmente é preenchido por gás, a parede apresenta-se fina e com conteúdo intestinal líquido de coloração variando em tons escuros. Ainda, pode-se observar uma pseudomembrana diftérica amarelada sobre as áreas de necrose da mucosa. Já nos casos subagudos ou crônicos, as lesões são semelhantes, porém, a parede apresenta-se espessada (LONG et al., 1974).

Nos casos subclínicos, as lesões macroscópicas consistem em ulcerações na mucosa circulares ou irregulares, geralmente de 1 a 2 mm de diâmetro, mas ocasionalmente maiores, que apresentam hiperemia periférica, e são revestidas com material amarelo parcialmente aderido. Ainda, essas lesões podem ser vistas na serosa (KALDHUSDAL; HOFSHAGEN, 1992).

No exame histopatológico é possível observar extensas áreas de necrose que se iniciam no ápice das vilosidades, podendo se estender à submucosa e camada muscular. As lesões mais comuns são caracterizadas por necrose de coagulação, com uma faixa de acúmulo de células inflamatórias delimitando a área de necrose. Inicialmente, heterófilos são predominantes, que aos poucos recebem células mononucleares como macrófagos e linfócitos. Nas áreas de necrose é possível observar grandes bastonetes Gram-positivos, compatíveis com *C. perfringens* (COOPER et al., 2013).

O diagnóstico deve ser baseado em vários critérios. As lesões de necropsia e histopatológicas são sugestivas, porém não são patognomônicas para a EN. O isolamento de *C. perfringens* tipo A do trato intestinal também pode ser útil, porém, está presente em quase todas as aves saudáveis, não sendo suficiente para a conclusão de diagnóstico. Dessa forma, a detecção da toxina produzida pelo gene NetB é a melhor forma de diagnóstico, associada a necropsia, exame histopatológico e cultivo anaeróbico (KEYBURN et al., 2008; GHARAIBEH et al., 2010).

Salmonella sp. também pode ser favorecida quando há uma infecção por coccídeos, elevando os índices de mortalidade e de conversão alimentar. Isso é explicável devido à natureza invasiva dos protozoários no epitélio intestinal, permitindo fácil adesão, penetração e subsequente disseminação de *Salmonella* nos órgãos (KOINARSK et al., 2005). Nas aves, podemos encontrar a pulorose, causada pela *Salmonella* Pullorum, o tifo aviário, causado pela *Salmonella* Gallinarum e o paratifo aviário, causado por qualquer outro sorotipo (BERCHIERI JR; FREITAS NETO, 2009).

O tifo aviário comumente afeta aves adultas, com elevada mortalidade, podendo ultrapassar 80% do lote, com curso relativamente rápido, em torno de sete dias. Já a pulorose acomete aves jovens de até três semanas de vida. Normalmente a mortalidade inicia de cinco a sete dias após a infecção e pode alcançar até 100% do lote. Mas nos últimos anos, as infecções paratípicas tem sido priorizadas como de alto risco para a produção avícola nacional. Esse fato se deve principalmente a importância na saúde pública dos sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* presentes nas aves (ANDREATTI FILHO et al., 2009; BERCHIERI JR; FREITAS NETO, 2009).

Salmonella é conhecida mundialmente como o agente causador de toxinfecções alimentares em seres humanos (LAN et al., 2009). Com destaque para a *S. Enteritidis* que tem sido o sorovar mais comum nesses casos e normalmente veiculado através de produtos de origem animal (CARDOSO; TESSARI, 2013).

O diagnóstico das salmoneloses é baseado no isolamento e identificação do agente (BERCHIERI JR; FREITAS NETO, 2009). A pesquisa de *Salmonella* no aviário ou galpão é realizada através do uso de suabes de arrasto. O cultivo laboratorial é laborioso e demorado, necessitando-se realizar pré-enriquecimento, enriquecimento e cultivo seletivo. Além disso, o diagnóstico pode ser realizado com amostras de órgãos ou suabes de cloaca (CARDOSO et al., 2013).

Escherichia coli é uma importante bactéria que causa alta mortalidade em pintinhos e elevados índices de condenação de carcaça em abatedouros (BARNES et al., 2008). *E. coli* consegue colonizar e persistir eficientemente no trato intestinal, mas além disso, possui capacidade de translocação extra intestinal quando na presença de agentes que causam lesões ao epitélio intestinal (BARNES; GROSS, 1997).

Experimentalmente foi observado que pintinhos infectados com cepas de *E. coli* e inoculados com oocistos de *E. brunetti* apresentaram 100% de mortalidade, enquanto os grupos que receberam os patógenos isoladamente não apresentaram mortalidade, demonstrando uma ação sinérgica entre os dois agentes (NAGI; MATHEY, 1972). Semelhante ao observado na infecção por *E. coli* e *E. tenella* em aves, resultando em lesões septicêmicas graves quando associados os patógenos (NAKAMURA et al., 1990).

As lesões de colibacilose compreendem deposição de material caseoso na superfície de órgãos como fígado, baço e coração, além de espessamento e opacidade de sacos aéreos. No fígado é possível observar pontos esbranquiçados, firmes e multifocais. Na avaliação histopatológica observa-se principalmente hepatite fibrinonecrótica circundada por intenso infiltrado de heterofilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos, além de pericardite, aerossaculite e pneumonia fibrino-heterofílica (CASAGRANDE et al., 2017). O isolamento do agente tipicamente é realizado através de suabe de órgãos com lesões (BARNES et al., 2008).

4 DIFERENTES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA COCCIDIOSE EM FRANGOS DE CORTE E POSSÍVEIS LESÕES BACTERIANAS ASSOCIADAS

DIFFERENT COCCIDIOSIS DIAGNOSTIC METHODS IN BROILERS AND POSSIBLE BACTERIAL ASSOCIATED INJURIES

RESUMO

A coccidiose é uma das principais doenças entéricas que acometem as aves. É causada por protozoários do gênero *Eimeria* e são conhecidas sete espécies que causam lesões intestinais. Infecções mistas são comuns e difíceis de serem diagnosticadas devido à possibilidade de sobreposição de lesões. Além disso, o dano causado ao epitélio intestinal pelos coccídeos pode favorecer infecções bacterianas secundárias, como a salmonelose e a colibacilose. Diante disso, este trabalho objetivou avaliar a ocorrência de coccidiose, caracterizando as lesões anatomo-patológicas, identificação parasitológica e avaliar a associação com a infecção por bactérias patogênicas. Realizou-se um estudo transversal em 28 lotes, avaliando 10 aves por lote em dois momentos, sendo cinco aves entre os 21 e 28 dias de idade (coleta 1) e outras cinco entre os 35 e 42 dias (coleta 2), totalizando 280. As lesões foram graduadas em escore de lesão macroscópica e histopatológica para coccidiose, além de avaliação morfométrica e morfológica dos oocistos. Realizou-se pesquisa de *Salmonella* nas fezes e cama e, órgãos com lesões foram submetidos ao cultivo aeróbico não seletivo. Na coleta 1, 82,14% dos lotes foram positivos para coccidiose e na coleta 2, 100% desses. A combinação mais encontrada foi *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*. O exame histopatológico apresentou diferença significativa e revelou aumento de 28,5% no número de aves que apresentavam lesões em comparação ao escore de lesão macroscópico. Foi observado que grau 1 foi o mais prevalente no escore de lesão macroscópica e avaliação histopatológica em ambas as coletas, porém observou-se que na coleta 2 houve aumento significativo de grau 3 para *E. tenella*. Nenhum lote foi positivo para *Salmonella* e as lesões extra intestinais não demonstraram relação com a coccidiose. O diagnóstico da coccidiose deve ser realizado utilizando a associação de métodos diagnósticos como o escore de lesão macroscópica, histopatologia e avaliação parasitológica para a obtenção de resultados precisos. A negatividade para *Salmonella* em todos os lotes pode ser devido ao alto nível de biosseguridade e controle sanitário das granjas.

Palavras-chave: Avicultura, doença entérica, perdas econômicas, protozoário.

ABSTRACT

Coccidiosis is one of the main enteric diseases affecting broilers. It is caused by protozoans of the genus *Eimeria* and seven species are known to cause lesions in different regions of the intestine. Mixed infections are common and difficult to diagnose as there are overlapping lesions. Besides, the damage caused to the intestinal epithelium by coccids can facilitate secondary bacterial infections such as salmonellosis and colibacillosis. Therefore, this study aimed to evaluate the occurrence of coccidiosis characterizing the anatomopathological lesions, parasitological identification, and to evaluate the association with a bacterial infection. A cross-sectional study was carried out in 28 flocks, evaluating 10 chickens per flock at two moments, five broilers between 21 and 28 days of age (collection 1) and another five between 35 and 42 days (collection 2), totaling 280 samples. A macroscopic lesion score for coccidiosis, histopathological, morphometric and morphological evaluation of oocysts was performed. A swab of the intestinal contents and litter were submitted to microbiological culture for *Salmonella* and organs with lesions for aerobic microbial isolation. In the collection 1, 82.14% of the flocks were positive for coccidiosis and in collection 2, 100% of these. The combination most commonly found was *E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella*. The histopathological examination showed a significant difference and revealed an increase of 28.5% of broilers with lesions compared to the score of macroscopic lesions. It was observed that grade 1 was the most prevalent in the macroscopic lesion score and histopathological evaluation in both collections, except in the collection 2 where grade 3 of *E. tenella* was predominant. *Salmonella* not found in the flocks and the extra-intestinal lesions showed no relation to coccidiosis. The diagnosis of coccidiosis should be performed using an association of diagnostic methods such as macroscopic lesion score, histopathology, and parasitological evaluation to obtain accurate results. The negativity for *Salmonella* in all lots may be due to the high level of biosecurity and sanitary control of farms.

Keywords: Poultry farming, enteric disease, economic losses, protozoan.

4.1 INTRODUÇÃO

A atividade avícola no mundo vem crescendo continuamente e consigo traz a cada dia mais desafios sanitários e zootécnicos. O sistema intensivo de produção de frangos de corte, mesmo com uso de alto padrão tecnológico, não assegura que o ambiente de criação das aves esteja livre de patógenos. Quando presentes, prejudicam a eficiência do aproveitamento dos nutrientes das rações, em decorrência do possível surgimento de desordens entéricas (RAMOS et al., 2011).

A coccidiose é uma das principais doenças que acometem as aves e causa grandes prejuízos ao setor avícola. No Brasil, estima-se que 17% do custo da produção é devido a profilaxia, tratamento preventivo e terapêutico (LUCHESE, 2007). Estima-se que o custo anual com medicação preventiva para a coccidiose possa ultrapassar os 2 bilhões de euros em todo o mundo (PEEK; LANDMAN, 2011).

Essa doença é causada por protozoários intracelulares do gênero *Eimeria*, que possui ciclo monoxeno, com duas fases do seu ciclo no hospedeiro (assexuada e sexuada) e uma no ambiente (esporulação). O período pré-patente varia de quatro a cinco dias, podendo chegar de seis a nove dias (ALLEN; FETTERER, 2002). Já no ambiente, a esporulação sob condições favoráveis, ocorre rapidamente e os oocistos podem permanecer por até um ano, em lugares úmidos e sombreados (ALBINO; TAVERNARI, 2012).

As principais espécies de *Eimeria* em frangos de corte são *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. brunetti*, *E. praecox*, *E. necatrix* e *E. mitis* (MCDOUGALD, 2003). Dessa forma, infecções concomitantes ocorrem frequentemente e podem dificultar o diagnóstico correto dessa doença (YOU, 2014). A sua ocorrência pode ser aleatória durante o lote, no entanto, foram observadas maiores contagens de oocistos na cama a partir dos 28 dias de idade, sendo que as lesões por *E. acervulina* são mais proeminentes após os 28 dias, enquanto que *E. tenella* apresenta lesões entre 35 e 42 dias de idade (COSTA; ÁVILA, 1996).

A coccidiose pode apresentar-se de maneira clínica e subclínica, provocando prejuízos econômicos importantes devido à quadros de diarreia, perda de desempenho, aumento da conversão alimentar e alta mortalidade (MEIRELES, 2009).

O diagnóstico é baseado na técnica de avaliação macroscópica descrita por Johnson e Reid (1970), através da observação das lesões intestinais em duodeno, jejuno, íleo, cecos e cólon, classificadas em graus de lesão. Porém, quando utilizada isoladamente, pode mascarar a severidade e extensão da infecção por coccídeos. Dessa forma, associar outros métodos de diagnóstico tornou-se fundamental e a histopatologia pode ser uma boa ferramenta, embora

sua utilização seja voltada basicamente para a pesquisa e, muito escassa para fins de diagnóstico (IDRIS et al., 1997; CONWAY et al., 1999; ZULPO et al., 2007).

O diagnóstico da coccidiose pode ser realizado através da identificação dos oocistos obtidos das fezes das aves ou do ambiente de produção. Já existem técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para a identificação das sete principais espécies que acometem frangos de corte (MORAES et al., 2015). Porém, apesar de trabalhosa, a técnica de avaliação morfológica e morfométrica dos oocistos apresenta resultados confiáveis e é utilizada até os dias atuais como uma técnica de baixo custo (LONG; REID, 1972; HAUG et al., 2008).

Outra característica importante da coccidiose é a possibilidade de favorecer a instalação de doenças secundárias. A salmonelose é uma enfermidade de importância mundial que representa uma barreira ao comércio internacional de produtos avícolas devido seu potencial zoonótico. A ampla distribuição de *Salmonella* sp. entre os animais e sua capacidade de sobreviver por longos períodos no meio ambiente contribuem para seu destacado papel em saúde pública (BUTAYE et al., 2003).

Salmonella sp. é uma bactéria de grande importância na avicultura industrial, podendo acarretar significativas perdas econômicas. Quando é detectada em uma granja avícola, o controle da infecção é muito difícil, trabalhoso e de resultados imprecisos, podendo ocorrer disseminação entre as aves e no meio ambiente (GAMBIRAGI et al., 2003).

A invasividade do protozoário *Eimeria* no epitélio intestinal favorece a adesão, a penetração e a disseminação de *Salmonella* sp. no organismo da ave (KOINARSK et al., 2005). Além disso, as lesões de *Eimeria* podem aumentar o substrato para bactérias patogênicas, ocorrendo um desequilíbrio microbiano e consequente migração de bactérias para a circulação sanguínea (PEDROSO et al., 2012).

Diante desse cenário, o objetivo deste trabalho foi classificar as lesões intestinais em frangos de corte com desafio natural e espontâneo de coccidiose, através da avaliação macroscópica, histopatológica e parasitológica, correlacionando com infecções bacterianas secundárias.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 População estudada

Um estudo transversal foi realizado com frangos de corte provenientes da região do Alto Vale do Itajaí no estado de Santa Catarina em aviários com sistema de ventilação positiva, destinados principalmente ao mercado interno. Foram avaliados 28 lotes mistos (machos e fêmeas), compostos por linhagem Cobb 500TM, alimentados com ração comercial ausente de qualquer produto antimicrobiano ou promotor de crescimento. Foram avaliadas 10 aves por lote em dois momentos, sendo cinco aves entre os 21 e 28 dias de idade (coleta 1) e outras cinco entre os 35 e 42 dias (coleta 2), totalizando 280 aves.

O tamanho amostral para o presente estudo foi calculado utilizando Software R *Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria (Package Epi Calc) (THRUSFIELD, 2007), através da fórmula $n = \frac{Z \times Z[P(1-P)]}{D^2}$, de amostragem aleatória simples para populações infinitas, em que Z se refere ao multiplicador (1,645) obtido por meio do intervalo de confiança desejado (90%), com base na distribuição normal, sendo P a prevalência esperada de 50% e D o erro máximo aceitável na estimativa (0,05). O número mínimo de animais amostrados de forma randômica sistemática foi de 271 aves.

Para a inclusão do lote neste estudo um "Termo de consentimento livre e esclarecido" (Anexo 1) foi assinado pelo produtor e um questionário (Anexo 2) foi respondido, com o objetivo de encontrar fatores associados a doença. Dados epidemiológicos referentes a propriedade, bem como ao lote em andamento e lotes anteriores foram obtidos através da consulta da ficha de acompanhamento e questionamentos ao produtor.

4.2.2 Variáveis epidemiológicas

Foram avaliadas as seguintes variáveis: idade das aves, linhagem, sexo, densidade de alojamento, tamanho dos aviários, números de pessoas que trabalham no aviário, percentual de mortalidade, presença de animais ou veículos no pátio da granja, portões de acesso fechados ou abertos, portaria contendo escritório e banheiro, aberturas do galpão contendo telas anti-pássaros, lonas externas integrais ou danificadas, registros de controles de roedores, insetos e de visitantes na granja, preenchimento correto da ficha de acompanhamento lote, presença de outra atividade econômica na propriedade, utilização de calçado específico para entrada na granja, origem da água utilizada na granja (poço artesiano ou fonte), uso de cloro

na água, histórico de doenças, lotes anteriores doentes, lotes apresentando sinais clínicos de diarreia, aumento de mortalidade ou desuniformidade, tipo de tratamento de cama utilizado no intervalo de lotes (nenhum, aplicação de cal e revolvimento da cama, enlonamento da cama), lavação e desinfecção no intervalo de lotes, limpeza de silo e composteira, presença de cascudinhos (*Alphitobius diaperinus*) e fezes de roedores na granja, tipo de comedouros e bebedouros, avaliação visual da cama e do manejo de composteira.

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o nº 9977130319.

4.2.3 Pesquisa de *Eimeria* sp.

A pesquisa de oocistos de *Eimeria* sp. foi realizada através da colheita de fezes dos intestinos das aves durante a avaliação macroscópica e, através de uma amostra de cama do aviário. Um *pool* do conteúdo intestinal das cinco aves de cada lote nas coletas 1 e 2, foram coletados e adicionou-se 50 mL de solução de dicromato de potássio a 2,5%. Adicionalmente, uma amostra de cama foi coletada em três pontos dentro do galpão correspondendo a porção inicial, média e final, totalizando aproximadamente 500 g. No laboratório, uma alíquota de 50 g foi transferida para um frasco adicionando 100 mL de solução de dicromato de potássio a 2,5%. As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente até o momento da purificação dos oocistos.

4.2.4 Purificação e identificação dos oocistos

A purificação dos oocistos foi adaptada de Moraes et al. (2015). As amostras foram homogeneizadas e filtradas com tecido de *voil*. O material resultante da filtragem foi colocado em tubo com capacidade para 50mL e centrifugado a 1.000g, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e, em seguida completou-se o volume adicionando água destilada ao sedimento, homogeneizando e centrifugando o conteúdo. Este processo foi repetido até se obter um sobrenadante límpido. Para separar os oocistos do sedimento, foi adicionado uma solução saturada de cloreto de sódio, homogeneizado e centrifugado a 200g, por 10 minutos. Com uma pipeta de Pasteur (5mL), os oocistos foram removidos da superfície da solução e transferidos para um tubo cônico de 50 mL. Após a coleta, todo processo de homogeneização, centrifugação e coleta dos oocistos foi repetido por mais quatro vezes.

Para retirar o cloreto de sódio, foi adicionado 50 mL de água destilada ao tubo, homogeneizado e centrifugado a 1.000g por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. O sedimento resultante recebeu uma solução de dicromato de potássio a 2,5% até completar um volume final de 10 mL e, foi armazenado a temperatura de 5 a 7°C, até a avaliação morfométrica e morfológica dos oocistos

Para realizar a avaliação morfométrica e morfológica dos oocistos, as amostras foram mantidas em estufa a 40°C durante 48 horas para esporulação. Em seguida, o volume do tubo de 50 mL foi completado com água destilada, centrifugado a 200g por 5 minutos para concentração dos oocistos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspêndido em 1 mL de água destilada.

Foi utilizado um microscópio Nikon Eclipse 6000 com ocular micrometrada e calibrado com lâmina de calibragem de 1mm/100 barras para a avaliação dos oocistos. Uma lâmina de vidro contendo 25 µL da amostra foi pipetada e coberta com lamínula de 24x32 mm para a avaliação. A identificação dos oocistos de *Eimeria* sp. foi realizada através da mensuração do comprimento *versus* largura do oocisto esporulado em aumento de 400X, segundo a classificação de Long e Reid (1982), em pelo menos 100 oocistos.

4.2.5 Caracterização macroscópica e histológica das lesões

As aves foram selecionadas aleatoriamente dentro do galpão, retiradas para uma área externa e eutanasiadas pelo método de deslocamento cervical, conforme consta no “Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais”, Lei nº 5.517, de 23 de outubro de 1968, Resolução CFMV nº 1000/2012 (GUIA BRASILEIRO DE BOAS PRÁTICAS EM EUTANÁSIA EM ANIMAIS, 2012). Foi realizada a necropsia das aves, avaliando-se todos os órgãos e anotando-se todas as alterações encontradas. Os intestinos foram avaliados quanto à presença de lesões características de coccidiose. As lesões macroscópicas de coccidiose foram graduadas utilizando-se a metodologia adaptada descrita por Johnson e Reid (1970).

Fragmentos de aproximadamente dois centímetros foram colhidos de duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon acondicionados em frascos separadamente, fixados em formalina tamponada a 10%, processados rotineiramente para histopatologia e corados por hematoxilina e eosina. Adicionalmente, fragmentos de todos os órgãos também foram submetidos à histopatologia.

As alterações de coccidiose encontradas na histopatologia receberam um escore de lesão, sendo: Grau 0: ausência de alterações; Grau 1: discreta quantidade de estruturas

parasitárias (esquizontes, micro e macrogametas e oocistos) compatíveis com *Eimeria* sp. na camada superficial do topo e na região medial em menos de 10 vilosidades ou criptas; Grau 2: moderada a grande quantidade de estruturas parasitárias (esquizontes, micro e macrogametas e oocistos) compatíveis com *Eimeria* sp. na camada superficial do topo e na região medial em menos de 10 vilosidades ou criptas; Grau 3: moderada a grande quantidade de estruturas parasitárias (esquizontes, micro e macrogametas e oocistos) compatíveis com *Eimeria* sp. na camada superficial do topo e na região medial em mais de 10 vilosidades ou criptas e, Grau 4: 80% ou mais das vilosidades ou criptas acometidas por estruturas parasitárias (esquizontes, micro e macrogametas e oocistos) compatíveis com *Eimeria* sp.

4.2.6 Cultivo microbiológico

Um suabe de arrasto da cama do aviário e um *pool* de fezes das cinco aves foram obtidos em cada coleta e encaminhados para cultivo microbiano seletivo para *Salmonella* sp. conforme descrito por Cardoso et al. (2013). Para a realização do suabe de arrasto da cama, foram utilizados propés de *TNT*, que foram previamente autoclavados a 120°C por 30 minutos. Na propriedade, foi realizada higienização das mãos com água e sabão, descontaminação com álcool 70%, calçado um propé plástico e luvas na entrada do aviário e, em seguida calçado o propé de *TNT* para realização do suabe de arrasto, caminhando por 10 minutos em toda a extensão do galpão. Após o suabe de arrasto foi armazenado em saco plástico e refrigerado até a chegada ao laboratório.

O *pool* de fezes foi obtido durante a necropsia das aves, através da abertura de cecos e cólon, com auxílio de um suabe plástico estéril, sendo coletadas aproximadamente 1,5 gramas de fezes em microtubo estéril para cada ave. Os microtubos foram armazenados sob refrigeração. No laboratório, uma alíquota de cada tudo foi transferida para uma placa de petri totalizando 1 g de fezes.

As amostras foram submetidas a um pré-enriquecimento, onde o suabe de arrasto recebeu 225 mL de água peptonada 1% e as fezes transferidas a um tubo contendo 9ml de água peptonada 1%. Ambas permaneceram incubadas por 24 horas a 37°C.

Em seguida, as amostras foram submetidas ao enriquecimento com caldo Tetratrationato e Rappaport Vassiliadis, incubadas por 24 horas a 37°C e 42°C, respectivamente. Posteriormente, foi realizado cultivo seletivo em ágar sólido Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Verde Brilhante (VB), incubadas por 48 horas a 37°C.

As placas que presentaram crescimento de colônias sugestivas foram submetidas a uma bateria de provas bioquímicas, incluindo: Ureia, Citrato, Difenilalanina, Arginina, Ágar Lisina-Ferro (LIA), Tríplice Açúcar-Ferro (TSI), Motilidade, Indol e Ornitina (MIO), Vermelho de metila e Voges Proskauer. Amostras que apresentaram perfil bioquímico compatível com *Salmonella* foram submetidas ao teste com antígeno somático anti-*Salmonella* para confirmação.

Adicionalmente, 32 fragmentos de fígado ou baço que apresentavam alterações macroscópicas foram coletados em saco plástico, mantidos em refrigeração e cultivados em meio sólido não seletivo, utilizando-se Ágar Sangue e Ágar MacConkey, para pesquisa de bactérias patogênicas. Todas as amostras que obtiveram crescimento de colônias foram submetidas a identificação através de provas bioquímicas conforme utilizado para *Salmonella*.

4.2.7 Análise estatística

Para análise dos dados, foram desenvolvidas planilhas no programa Microsoft *Excel*™ e analisadas por meio de estatística descritiva e inferencial. Todos os resultados foram separados conforme o momento da coleta em coleta 1 e coleta 2. O número de lotes positivos foi calculado com base na positividade da avaliação histopatológica e/ou parasitológica das fezes, considerando o número total de lotes avaliados, sendo expressos em porcentagem.

Para a comparação entre os resultados do escore de lesão macroscópica e histopatológica de coccidiose, foi utilizado o teste de Wilcoxon com nível de significância $\alpha = 0,05$. Lotes que apresentaram lesões extra intestinais e coccidiose foram testados pelo teste de Qui-quadrado a um nível de significância de 5% para identificar a relação entre os lotes.

A comparação entre os diferentes métodos de diagnóstico de coccidiose (escore de lesão macroscópico, histopatologia e parasitologia) foram submetidos ao teste de concordância de *Kappa Cohen*. O valor do coeficiente de concordância de *Kappa* varia de 0 até 1, sendo que quanto mais próximo de 1 for seu valor maior é o indicativo de que existe concordância entre as avaliações. Sendo assim: valores entre 0 e 0,2 indicam concordância fraca; entre 0,21 e 0,4 indicam concordância razoável; entre 0,41 e 0,6 indicam concordância moderada; entre 0,61 e 0,8 indicam forte concordância e entre 0,81 e 1 indicam concordância quase perfeita. Além disso, se os valores encontrados forem zero ou negativos, a concordância encontrada foi menor que a esperada pelo acaso.

Foram construídos dois modelos individuais de análise estatística para testar a hipótese de associação entre resultados positivos para coccidiose e informações específicas dos lotes.

Utilizou-se uma abordagem de regressão logística não condicional. As variáveis independentes submetidas à análise univariada, utilizando o status lote positivo para coccidiose (0 = negativo; 1 = positivo) como variável dependente, foram: presença de animais ou veículos no pátio, portões de acesso fechados, portaria contendo escritório e banheiro, aberturas teladas, lonas íntegras, controle de roedores, insetos e visitantes, preenchimento correto da ficha de acompanhamento do lote, outra atividade econômica na propriedade, utilização de calçado específico para entrada na granja, origem da água utilizada na granja, uso de cloro na água, histórico de doenças, lotes anteriores doentes, lotes apresentando sinais clínicos de diarreia, aumento de mortalidade ou desuniformidade, tipo de tratamento de cama utilizado no intervalo de lotes, lavagem e desinfecção no intervalo de lotes, limpeza de silo e composteira, presença de cascudinhos e de fezes de roedores na granja, tipo de comedouros e bebedouros, avaliação visual da cama e do manejo de composteira.

Para testar as variáveis independentes, utilizou-se o teste de qui-quadrado, onde todas as variáveis independentes com $p < 0,20$ na análise univariada foram consideradas para análise multivariada. Os dados gerados eram analisados no software estatístico Sigma Plot, versão 12.0.

As variáveis paramétricas como idade, densidade de alojamento, tamanho de aviário (m^3), altura de cama (cm) e número de pessoas que trabalhavam no aviário foram expressas de forma descritiva e em porcentagem.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Levantamento dos dados epidemiológicos

A coleta 1 foi realizada em frangos de corte com idade entre 21 e 28 dias ($\bar{x}: 24,5$ dias) apresentando 82,14% (23/28) dos lotes positivos para coccidiose. Na coleta 2 as aves apresentavam idade entre 35 e 42 dias ($\bar{x}: 38$ dias) sendo que 100% (28/28) dos lotes foram positivos para *Eimeria* sp.

A produção das aves era basicamente familiar, sendo que uma a duas pessoas trabalhavam nos aviários ($\bar{x}: 1,4$ pessoas). As granjas apresentavam geralmente um único aviário, sendo que somente uma granja apresentava dois aviários e uma granja com quatro aviários. Todas as granjas apresentavam sistema de ventilação positiva, haviam sido construídas entre os anos de 1982 e 2018 e, apresentavam tamanho entre 480 m^2 e 1200 m^2 ($\bar{x}: 984$ m^2).

O período de vazio sanitário no intervalo entre lotes variou de três até 90 dias (\bar{x} : 26,5 dias) e, a cama do aviário era utilizada para um a cinco lotes (\bar{x} : 1,8 lotes). Todos os lotes eram mistos (machos e fêmeas), com densidade de alojamento que variou de 6,66 a 15,83 aves/m² (\bar{x} : 10,17 aves/m²). A mortalidade até o momento da coleta 1 variou de 0,52% até 10,8% (\bar{x} : 2,52%), já na coleta 2 variou de 0,74% a 13,89% (\bar{x} : 3,36%). Entre a coleta 1 e 2 foi observada uma redução na altura de cama, sendo que na coleta 1 a cama apresentava altura entre 5cm e 18cm (\bar{x} : 9,53cm) e na coleta 2, entre 5cm e 14cm (\bar{x} : 8,53cm).

Os resultados da análise estatística para as variáveis associadas a ocorrência de coccidiose e possíveis infecções bacterianas em frangos de corte na coleta 1 estão representados na Tabela 1. Através da análise de regressão logística univariada e multivariada, foi observado que não houve diferença significativa entre as variáveis ($p>0,050$).

Tabela 1 - Resultados das análises univariada e multivariada na determinação de variáveis associadas a coccidiose em frangos de corte na coleta 1.

Variável	Univariada		Multivariada	
	Valor de <i>p</i>	OR (95% CI)	Valor de <i>p</i>	OR (95% CI)
Desuniformidade	0,12	0,18 (0,02 - 1,43)	0,28	-
Histórico de doenças	0,20	0,22 (0,02 - 1,95)	0,39	-
Higienização de intervalo entre lotes	0,14	0	0,99	-
Manejo de intervalo entre lotes	0,28	-	-	-
Limpeza de silo	0,55	-	-	-
Limpeza de composteira	0,29	-	-	-
Presença de cascudinhos	0,45	-	-	-
Tipo de bebedouro	0,14	0	0,99	-
Tipo de tratamento de cama	0,78	-	-	-
Qualidade de cama	0,75	-	-	-
Manejo de composteira	0,31	-	-	-

OR: Razão de Chance (*Odds Ratio*); CI: Intervalo de Confiança.

Na coleta 2, 100% dos lotes avaliados foram positivos para coccidiose. Dessa forma, não foi possível determinar quais variáveis poderiam ou não influenciar na ocorrência de coccidiose.

4.3.2 Exame parasitológico para *Eimeria* sp.

Na tabela 2 estão representadas as espécies de *Eimeria* identificadas em cada lote, individuais ou combinadas. Não foi encontrada *E. praecox* nas amostras analisadas.

Tabela 2 - Espécies de *Eimeria* identificadas através da avaliação morfológica e morfométrica dos oocistos em amostras de conteúdo intestinal e cama de aviário de lotes de frangos de corte na coleta 1 (21 a 28 dias de idade) e coleta 2 (35 a 42 dias de idade).

Espécie	Coleta 1		Coleta 2	
	Fezes	Cama	Fezes	Cama
<i>E. acervulina</i>	7,14%(2)	0	0	0
<i>E. maxima</i>	0	3,57%(1)	0	0
<i>E. tenella</i>	0	0	3,57%(1)	0
<i>E. acervulina</i> + <i>E. maxima</i>	21,42% (6)	7,14%(2)	0	7,14%(2)
<i>E. acervulina</i> + <i>E. tenella</i>	10,71% (3)	3,57%(1)	21,42%(6)	3,57%(1)
<i>E. maxima</i> + <i>E. tenella</i>	0	14,28%(4)	3,57%(1)	10,71%(3)
<i>E. tenella</i> + <i>E. brunetti</i>	0	0	3,57%(1)	0
<i>E. acervulina</i> + <i>E. maxima</i> + <i>E. tenella</i>	14,28%(4)	46,42%(13)	39,28%(11)	67,85%(19)
<i>E. acervulina</i> + <i>E. tenella</i> + <i>E. brunetti</i>	3,57%(1)	0	0	0
<i>E. maxima</i> + <i>E. tenella</i> + <i>E. mitis</i>	0	0	7,14%(2)	0
<i>E. acervulina</i> + <i>E. maxima</i> + <i>E. tenella</i> + <i>E. mitis</i>	14,28%(4)	7,14%(2)	14,28%(4)	7,14%(2)
<i>E. acervulina</i> + <i>E. maxima</i> + <i>E. tenella</i> + <i>E. brunetti</i>	0	3,57%(1)	7,14%(2)	0
<i>E. acervulina</i> + <i>E. maxima</i> + <i>E. tenella</i> + <i>E. mitis</i> + <i>E. necatrix</i>	3,57%(1)	0	0	0
<i>E. acervulina</i> + <i>E. maxima</i> + <i>E. tenella</i> + <i>E. mitis</i> + <i>E. brunetti</i>	7,14%(2)	0	0	0
Negativo	17,85%(5)	14,28%(4)	0	3,57%(1)
Total	28	28	28	28

4.3.3 Caracterização macroscópica, histopatológica e microbiológica

As lesões macroscópicas e histopatológicas intestinais graduadas em escore de lesão estão estratificadas em coleta 1 e 2 e, os resultados encontrados estão descritos na Tabela 3. Na Figura 1A-F estão representadas as lesões de coccidiose mais frequentemente observadas na avaliação macroscópica. Na Figura 2A-F estão representadas as diferentes espécies de *Eimeria* observadas na histopatologia em diferentes secções de intestino.

Tabela 3 - Escore de lesão macroscópica e histopatológica de coccidiose em frangos de corte, obtidos na coleta 1 (21 e 28 dias de idade) e na coleta 2 (35 e 42 dias de idade) (n: 280).

Graus	Lesões macroscópicas					Lesões histopatológicas					
	Duodeno	Jejuno	Íleo	Ceco	Cólon	Duodeno	Jejuno	Íleo	Ceco	Cólon	
Coleta 1	G0	82,86% (116)a	74,29% (104)a	100% (140)a	79,29% (111)a	94,29% (132)a	74,29% (104)b	70,71% (99)a	92,14% (129)b	89,29% (125)b	99,29% (139)a
	G1	14,29% (20)a	21,43% (30)a	0% (0)a	15,71% (22)a	5% (7)a	17,86% (25)a	21,43% (30)a	7,14% (10)b	5% (7)b	0,71% (1)a
	G2	1,43% (2)a	3,57% (5)a	0	4,29% (6)a	0	7,14% (10)b	1,43% (2)a	0,71% (1)a	0,71% (1)a	0
	G3	1,43% (2)a	0,71% (1)a	0	0,71% (1)a	0,71% (1)a	0,71% (1)a	5% (7)a	0	4,29% (6)a	0
	G4	0	0	0	0	0	0	1,43% (2)a	0	0,71% (1)a	0
Coleta 2	G0	93,57% (131)a	78,57% (110)a	97,14% (136)a	71,43% (100)a	94,29% (132)a	65% (91)b	60,71% (85)b	98,57% (138)a	59,29% (83)b	97,14% (136)a
	G1	4,29% (6)a	20,71% (29)a	2,86% (4)a	20,71% (29)a	5,71% (8)a	30% (42)b	25,71% (36)a	1,43% (2)a	10,71% (15)b	2,14% (3)a
	G2	2,14% (3)a	0,71% (1)a	0	4,29% (6)a	0	2,14% (3)a	6,43% (9)b	0	5% (7)a	0
	G3	0	0	0	3,57% (5)a	0	2,86% (4)a	7,14% (10)b	0	20% (28)b	0,71% (1)a
	G4	0	0	0	0	0	0	0	0	5% (7)a	0

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e coluna correspondente indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre a avaliação do escore de lesão macroscópica e histopatológica através do Teste de Wilcoxon.

Duodeno: *E. acervulina*, *E. mitis* e *E. praecox*; Jejuno: *E. maxima*; Íleo: *E. necatrix*, Ceco: *E. tenella*; Cólon: *E. brunetti*.

Além das lesões intestinais observou-se na cavidade celomática exsudação fibrinosa e deposição de cáseos na superfície das vísceras e sacos aéreos (Figura 3A) (15/280). As alterações em fígado e baço foram as mais comumente observadas. Focos esbranquiçados de

até 2 mm de diâmetro (Figura 3B) foram encontrados isoladamente ou associados a exsudação fibrinosa na superfície hepática e esplênica. Estes, com auxílio do exame histopatológico revelaram hepatite (27/280), peri-hepatite (10/280) e esplenite (11/280) fibrinonecrótica heterofílica multifocal variando de discreta a acentuada, por vezes contendo agregados de bactérias intralesionais.

Foram observados ainda, espessamento e opacidade dos sacos aéreos e do saco pericárdico, revelando na histopatologia aerossaculite (16/280) e pericardite (11/280) fibrino-heterofílicas difusas discretas. Dentre as aves que apresentaram lesões hepáticas e esplênicas, foi observado que 21/280 apresentavam lesões de coccidiose em duodeno, jejun e ceco.

Quanto ao cultivo microbiológico, foi possível isolar *Escherichia coli* (3/32) e *Staphylococcus* coagulase negativa (2/32). Dentre as aves que apresentaram crescimento de *E. coli*, duas apresentavam quadro de sepse, caracterizada por aerossaculite, peri-hepatite, pericardite e esplenite fibrinoheterofílicas e uma apresentava peri-hepatite fibrino-heterofílica. As aves em que houve crescimento de *Staphylococcus* coagulase negativa apresentaram hepatite fibrino-heterofílica e peri-hepatite e pericardite linfoplasmocitária.

A partir do suabe de arrasto da cama e *pool* de fezes não foi possível isolar *Salmonella* em nenhum lote avaliado.

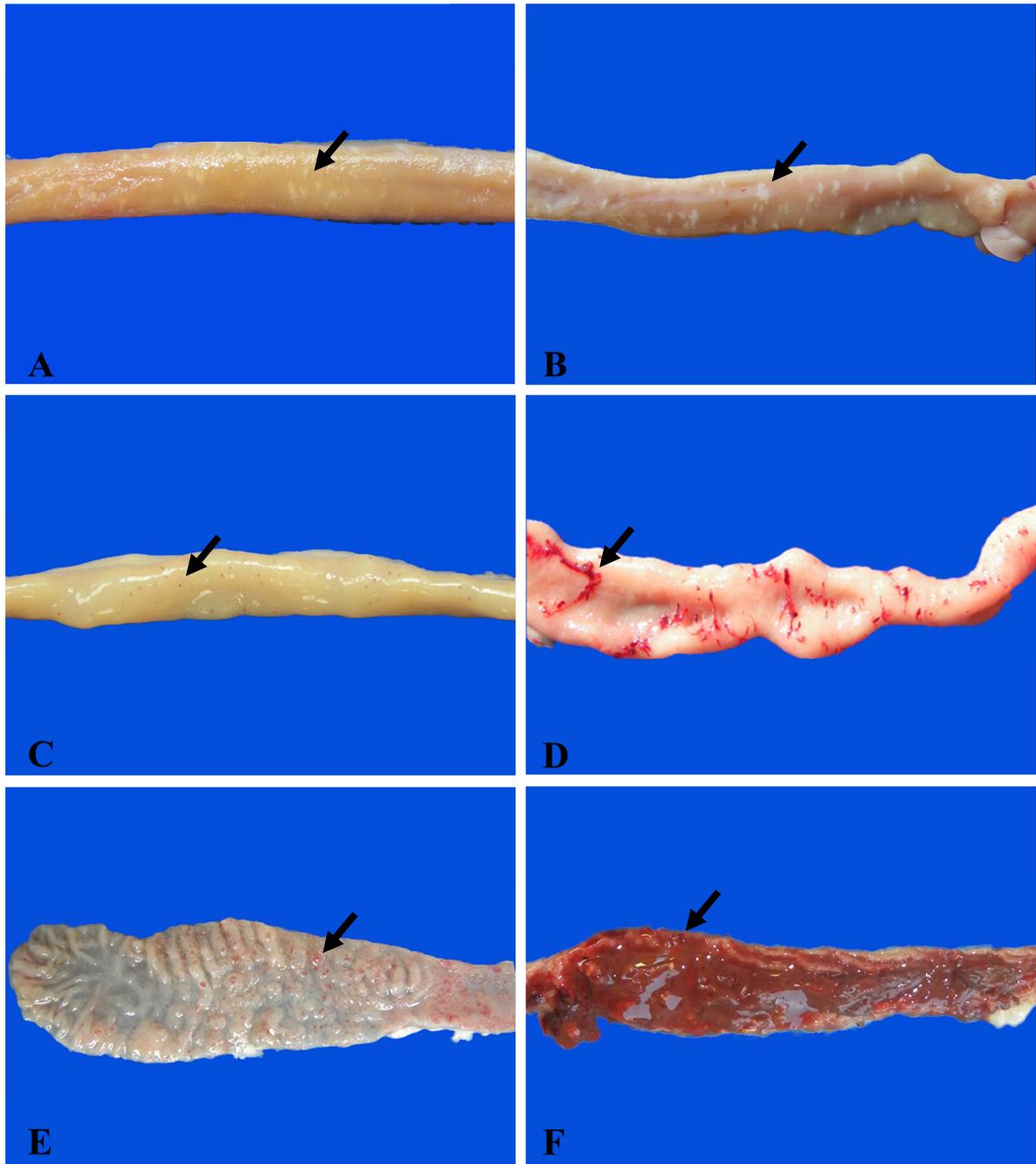
Na tabela 4 estão representados os lotes que apresentaram lesões extraintestinais na coleta 1. Não houve diferença significativa entre os lotes que apresentaram coccidiose e lesões extra intestinais ($p>0,05$) pelo teste de Qui-quadrado. Na coleta 2 todos os lotes foram positivos para coccidiose, impossibilitando a análise estatística.

Tabela 4 - Lotes de frangos de corte que apresentaram coccidiose e lesões extraintestinais na coleta 1.

Lesões extraintestinais	Coccidiose		
	Presença	Ausência	Total
Presença	20a	3a	23
Ausência	3a	2a	5
Total	23	5	28

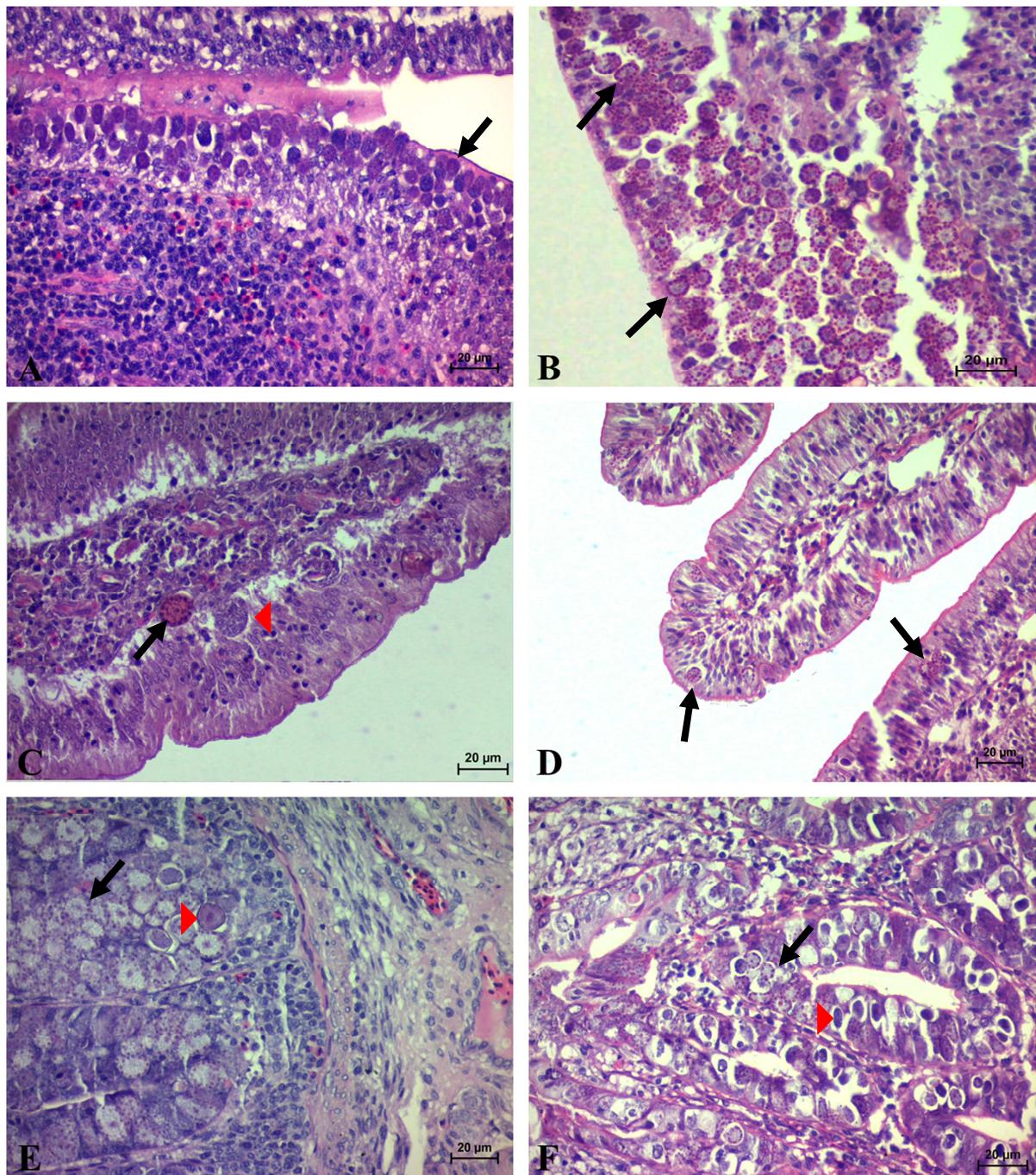
Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que não houve diferença significativa ($p> 0,05$) através do Teste Qui-quadrado.

Figura 1 - Lesões macroscópicas de coccidiose em frangos de corte. **A:** Duodeno: estrias esbranquiçadas transversais na mucosa (seta), até cinco lesões por cm^2 (*E. acervulina* grau 1). **B:** Duodeno: mais que cinco estrias por cm^2 (*E. acervulina* grau 2). **C:** Jejuno: petéquias (seta) multifocais moderadas na serosa (*E. maxima* grau 1). **D:** Íleo: petéquias multifocais moderadas na mucosa e conteúdo intestinal com coágulos (seta) (*E. necatrix* grau 1). **E:** Ceco: petéquias (seta) multifocais discretas na mucosa (*E. tenella* grau 1). **F:** Ceco: conteúdo sanguinolento entremeado a coágulos (seta) difuso moderado (*E. tenella* grau 3).



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Figura 2 - Lesões histológicas de coccidiose em frangos de corte. **A:** Duodeno: discreta quantidade de estruturas parasitárias contendo esquizontes (seta) na camada superficial da mucosa (*Eimeria* sp. grau 1). **B:** Duodeno: grande quantidade de estruturas parasitárias contendo macrogametócitos (seta) na camada superficial da mucosa (*Eimeria* sp. grau 3). **C:** Jejuno: discreta quantidade de esquizontes (cabeça de seta) e macrogametócitos (seta) na camada superficial da mucosa (*Eimeria* sp. grau 1). **D:** Íleo: discreta quantidade de macrogametócitos (setas) na camada superficial da mucosa (*Eimeria* sp. grau 1). **E:** Ceco: moderada quantidade de oocistos imaturos (cabeça de seta) e macrogametócitos (seta) (*Eimeria* sp. grau 1). **F:** Ceco: grande quantidade de esquizontes (cabeça de seta) e macrogametócitos (seta) (*Eimeria* sp. grau 3). (HE, 400x).



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Figura 3 - Lesões extra intestinais em frangos de corte com coccidiose. **A:** Cavidade celomática: grande quantidade de material caseoso amarelado depositado sobre as vísceras (seta). **B:** Fígado: múltiplos pontos esbranquiçados de até 2mm (seta) distribuídos por todo o parênquima hepático.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

4.3.4 Comparação entre macroscopia, histopatologia e parasitologia para o diagnóstico de coccidiose

A Tabela 5 representa a porcentagem de lotes positivos para coccidiose de acordo com os três métodos de diagnóstico, sendo escore de lesão macroscópico, avaliação histopatológica e identificação dos oocistos através da avaliação microscópica de morfometria e morfologia nas fezes.

Tabela 5 - Comparação entre macroscopia, histopatologia e parasitologia para o diagnóstico de *Eimeria* nas coletas 1 e 2 de frangos de corte em 28 lotes.

Segmento intestinal	Macroscopia		Histopatologia		Parasitologia	
	Coletas		1	2	1	2
	1	2	1	2	1	2
Duodeno*	46,4% (13)	32,1% (9)	64,2% (18)	78,5% (22)	82,1% (23)	89,2% (25)
Jejuno	67,8% (19)	60,7% (17)	64,2% (18)	82,1% (23)	60,7% (17)	71,4% (20)
Íleo	0	10,7% (3)	25% (7)	7,1% (2)	3,5% (1)	0
Ceco	64,2% (18)	71,4% (20)	35,7% (10)	89,2% (25)	53,5% (15)	100% (28)
Colon	10,7% (3)	17,8% (5)	3,5% (1)	14,2% (4)	10,7% (3)	10,7% (3)

**E. acervulina* e *E. mitis* foram incluídas ao duodeno.

Os resultados do teste de concordância *Kappa* entre os diferentes métodos de diagnóstico de coccidiose estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Análise de concordância de *Kappa* entre macroscopia, histopatologia e parasitologia de *Eimeria* em frangos de corte nas coletas 1 e 2 em 28 lotes.

Segmento intestinal	Histopatologia / Parasitologia		Macroscopia / Histopatologia		Macroscopia / Parasitologia	
			Coletas			
	1	2	1	2	1	2
Duodeno	0,56	0,35	0,37	0,23	0,18	0,11
Jejuno	0,62	0,11	-0,19	-0,16	-0,24	0,45
Íleo	0,2	0*	0*	-0,09*	0*	0*
Ceco	0,23	0**	0,08	0,25	0,2	0**
Colon	-0,06*	-0,14*	-0,06*	-0,19*	-0,12*	0,13

* Nenhum lote positivo em ambos os testes; **Nenhum lote negativo em ambos os testes.

4.4 DISCUSSÃO

Foi observado que na coleta 1, 82,14% dos lotes foram positivos para coccidiose, principalmente, devido à infecção por *E. acervulina* que foi encontrada em 23 lotes. Tipicamente, *E. acervulina* é a espécie mais encontrada nos lotes, chegando a até 100% dos casos (HAUG, et al., 2008). Em estudo prévio no estado de Santa Catarina, 63,3% dos lotes apresentavam oocistos desta espécie nas fezes colhidas de aviários (MORAES, et al., 2015).

Já na coleta 2, os lotes apresentavam idade média de 38 dias, onde se observou positividade de 100%, sendo que *E. tenella* foi a única espécie encontrada em todos os lotes. A ocorrência de *E. tenella* é típica em aves com idade entre 35 e 42 dias, onde são observadas lesões no ceco e nessa fase que ocorre a maior liberação de oocistos nas fezes (COSTA; ÁVILA, 1996).

Essa espécie possui período pré-patente (PPP) maior, por isso as lesões e sinais clínicos são observados mais tarde no lote (ZULPO et al., 2007). Além disso, acredita-se que fatores imunossupressores como micotoxinas, infecções virais, nutrição e estresse, podem contribuir para a infecção por coccídeos. Experimentalmente, foi observado que a imunossupressão causada pela administração de dexametasona em aves naturalmente desafiadas aos 35 dias de idade, causou sinais clínicos e lesões de *E. tenella* (GALHA et al., 2010).

A infecção mista foi encontrada em ambas as coletas, sendo que na coleta 1 observou-se que *E. acervulina* e *E. maxima* foram as mais encontradas. Já na coleta 2, a combinação entre *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella* foi prevalente. Haug et al. (2008) encontraram cerca de 80% dos lotes apresentando infecções mistas aos 32 dias de idade média, onde a combinação mais frequente foi por *E. acervulina* e *E. maxima*, seguida pela combinação entre

E. acervulina, *E. maxima* e *E. tenella*. Toledo et al. (2011) observaram 63,1% dos lotes infectados por *Eimeria*, sendo todos apresentaram a combinação entre *E. maxima*, *E. acervulina*, *E. mitis* e *E. tenella*. Porém, a combinação entre *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*, tende a ser a mais comum nos lotes de frangos de corte (SANTOS et al., 2003; LUCHESE et al., 2007).

Na cama do aviário, em ambas as coletas foi possível observar que a combinação entre *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella* foi a mais encontrada, muito similar ao observado na avaliação do conteúdo intestinal. Porém, a avaliação da cama de aviário não foi tão eficaz, visto que a frequência de lotes positivos para coccidiose foi inferior ao observado na avaliação do conteúdo intestinal.

O pico de eliminação de oocistos na cama ocorre próximo aos 28 dias de idade das aves (COSTA; ÁVILA, 2003). No presente trabalho, foi observado um aumento no número de camas positivas para *Eimeria* na coleta 2. Além disso, todos os lotes foram positivos para coccidiose através da análise do conteúdo intestinal das aves na coleta 2, onde as aves apresentavam idade entre 35 e 42 dias de idade. Tratamentos fermentativos da cama auxiliam na redução da quantidade de oocistos infectantes, porém, as granjas avaliadas não realizavam tratamento ou a aplicação de cal virgem durante o intervalo de lote (COSTA; ÁVILA, 2003; ASSIS et al., 2013).

A reutilização da cama de aviário pode trazer benefícios. Os pintinhos ao entrarem em contato com a cama, são expostos aos oocistos ali presentes, oriundos dos lotes anteriores. Dessa forma, há um estímulo para o desenvolvimento da imunidade e consequentemente menor chance de desenvolvimento da forma clínica da doença ou apresentando uma forma branda de coccidiose (FIORENTIN, 2006). Foi observado que as lesões macroscópicas e histopatológicas, foram predominantemente classificadas como grau 1 em ambas as coletas, sugerindo uma infecção branda, a qual pode estar relacionado com o desenvolvimento da imunidade das aves ao entrarem em contato com cama de aviário reutilizada.

Porém, na coleta 2, *E. tenella* apresentou grau 3 mais frequentemente, demonstrando sua capacidade de causar lesões mais severas (ZULPO et al., 2007). Essa espécie é considerada a mais patogênica, podendo causar lesões graves no intestino das aves. Experimentalmente foi observado que *E. tenella* exibiu maior número de aves com escore de lesão entre dois e quatro (CONWAY et al., 1993). Zulpo et al. (2007) observaram que as lesões causadas por *E. tenella* foram acentuadas, enquanto *E. maxima* causou lesões moderadas e *E. acervulina* lesões discretas.

Através do escore de lesão, já foi observado que 23,3% das granjas foram positivas para *E. tenella*, porém, na análise morfológica dos oocistos, 100% eram positivas (CARVALHO et al., 2011; TOLEDO et al., 2011). Giorke et al. (2009) encontraram 61% lotes positivos para *E. tenella* através da técnica de PCR, sendo essa espécie a segunda mais prevalente. Apesar de *E. tenella* produzir lesões facilmente identificáveis na necropsia, utilizar somente um exame para seu diagnóstico pode gerar resultados falsos negativos, mascarando a condição da infecção.

Quando se compara o escore de lesão macroscópico com a avaliação histopatológica, observa-se que houve diferença significativa, pois a macroscopia utilizada isoladamente não reflete a condição real da infecção por *Eimeria* (IDRIS et al., 1997). A avaliação macroscópica descrita por Johnson e Reid (1970) é utilizada até os dias atuais, porém, graus de lesão menores ou espécies de *Eimeria* que produzem lesões brandas, apresentam diagnóstico incerto quando não há associação de outras técnicas.

O exame histopatológico apresentou diferença significativa e revelou aumento de 28,5% no número de aves que apresentavam lesões em comparação ao escore de lesão macroscópico. Dessa forma, o uso da histopatologia mostrou-se capaz de identificar casos de coccidiose negligenciados pelo escore de lesão macroscópico (IDRIS et al., 1997). Além disso, Goodwin et al. (1998) observaram que a avaliação histopatológica foi superior ao escore de contagem de oocistos e do escore de lesão macroscópica. Porém, o uso da histopatologia ainda é muito restrito a pesquisa, utilizada para diferenciar fases do ciclo de *Eimeria* sp. (KAWAZOE et al., 2009).

Eimeria acervulina apresenta lesões facilmente identificadas na macroscopia (JONSON e REID, 1970), porém, as lesões de *E. maxima* apresentam-se de forma discreta no jejuno, tornando-se difícil o seu diagnóstico (ZULPO et al., 2007). Fato que foi observado na coleta 2, onde a avaliação histopatológica demonstrou aumento significativo do número de aves com lesões histológicas em jejuno em comparação com o escore de lesão macroscópico.

Eimeria necatrix foi observada em um lote na coleta 1. Tipicamente, essa espécie se apresenta em aves de ciclo longo, como matrizes, porém sua ocorrência já foi relatada em frangos de corte (KAWAZOE; FIGUEIREDO, 1990). As lesões são observadas no íleo, caracterizadas por conteúdo intestinal repleto por sangue e muco (MCDOUGALD, 2003). A observação dos oocistos de *E. necatrix* na coleta 1 e as lesões na coleta 2, demonstram que o diagnóstico não pode ser realizado, baseado em apenas um método. Durante a avaliação dos oocistos não é descartada a hipótese de que a ave tenha ingerido oocistos e ainda não tenha desenvolvido lesões. Já o escore de lesão demonstrou que já existia infecção no intestino.

Dessa forma, a associação de diferentes formas de diagnóstico complementares auxilia na detecção de lotes positivos (CHAPMAN, 2014).

Oocistos de *E. mitis* foram observados no conteúdo intestinal de 12 lotes. Já *E. praecox* não foi identificada em nenhuma amostra. Espécies consideradas menos patogênicas, são menos comumente relacionadas a casos clínicos, porém, podem aumentar a conversão alimentar e reduzir o ganho de peso diário das aves (WILLIAMS, 1998). Além disso, sua observação no intestino é dificultada pelo fato de causarem lesões macroscópicas discretas e se localizarem no duodeno, confundindo-se com a infecção por *E. acervulina* (MCDOUGALD, 2003).

Eimeria brunetti foi detectada no conteúdo intestinal em oito lotes e um lote na cama de aviário. Na avaliação macroscópica as principais alterações são petéquias na mucosa e, na avaliação histopatológica são observados gametócitos e oocistos imaturos superficialmente na mucosa do cólon, semelhante ao presente estudo (MATTIELLO et al., 2000). A ocorrência de *E. brunetti* parece ser mais comum em aves de ciclo de vida longo, assim como *E. necatrix*, porém já relatada em frangos de corte (CHAPMAN, 2014; MORAES et al., 2015).

A avaliação morfométrica e morfológica demonstrou ser eficaz na identificação dos oocistos de *Eimeria*, sendo identificadas seis espécies. A avaliação dos oocistos foi proposta por Long e Reid, (1972) e foi utilizada durante muitos anos como a única forma de avaliação dos oocistos. Quando comparada ao PCR, observou-se que os resultados são similares, e as discrepâncias estão relacionadas a pequenas diferenças de tamanho entre oocistos, porém dentro da faixa relatada para cada espécie (HAUG et al., 2008).

A concordância entre os testes diagnósticos demonstrou ser baixa. Na coleta 1, a concordância entre parasitologia e histopatologia no jejuno foi forte, já no duodeno houve concordância moderada e no ceco, razoável. Na coleta 2, no duodeno observou-se concordância razoável, porém em jejuno foi fraca e no ceco, onde não houve lotes negativos em ambos os testes, a concordância foi inexistente. Íleo e colón apresentaram concordância fraca ou inexistente em ambas as coletas e a maioria delas não apresentou lotes positivos em ambos os testes.

Na avaliação entre macroscopia e histopatologia foi observada concordância razoável no ceco na coleta 2 e no duodeno em ambas as coletas. As demais foram fracas ou inexistentes. Na macroscopia e parasitologia destaca-se o jejuno que apresentou concordância moderada na coleta 2, já os demais segmentos do intestino apresentaram fraca ou inexistente concordância entre as avaliações.

Alguns lotes apresentaram todos os segmentos intestinais negativos ou todos positivos e isso pode ter prejudicado o resultado da avaliação do teste Kappa, uma vez que esse teste se baseia no número de lotes concordantes, mais precisamente, no número de lotes cujo resultado é o mesmo entre as avaliações realizadas (SILVA; PERREIRA 1998). Na coleta 2 todos os lotes foram positivos para *E. tenella* localizado no ceco, dessa forma a análise de concordância foi afetada.

Não foram encontrados lotes positivos para *Salmonella* nas granjas avaliadas. Porém, aves que estão infectadas com *Eimeria* primariamente, tem maior chance de desenvolverem infecção por *Salmonella* (KOINARSK et al., 2005). No entanto, o escore de lesão macroscópico e histopatológico demonstrou predominantemente grau 1. Isso pode ter contribuído para que não houvesse a infecção por *Salmonella* nas aves, visto que o dano causado ao epitélio intestinal nesse caso é discreto e experimentalmente evidenciou-se que a infecção por *Eimeria* nos primeiros dias de vida resulta em resistência à colonização por *Salmonella* (TELLEZ et al., 1994; VOLKOVA et al., 2011).

No Brasil os resultados com *Salmonella* são variáveis, porém apresentam baixos índices de positividade ou até mesmo negatividade. Ravagnani et al. (2012) obtiveram resultados negativos em dez lotes amostrados para pesquisa de *Salmonella* sp. em suave de cloaca, suave de arrasto e *pool* de fragmentos de órgãos e, isso demonstrou que as medidas de biosseguridade das granjas, importante barreira contra diversos patógenos, inclusive *Salmonella*, foram aplicadas e conferem segurança à produção avícola. Em outro estudo, Gambiragi et al. (2003) avaliaram a presença de *Salmonella* sp. em pintos de um dia de vida e observaram que nenhuma das 300 amostras apresentou crescimento da bactéria, atribuído as boas condições higiênico-sanitárias do incubatório. Já no estado do Mato Grosso do Sul foi observada ocorrência de 11,28% de *Salmonella* sp. em suave de arrasto de cama de aviário de frangos de corte, possivelmente devido à intensa produção avícola na região onde alguns lotes podem se infectar mesmo com as rigorosas medidas de biosseguridade (BONI et al., 2011).

No presente estudo observou-se aves com infecções bacterianas, no entanto sem correlação direta com a coccidiose. Macdonald et al. (2017) observaram que a infecção por *E. tenella* em frangos de corte teve associação com o aumento no número de bactérias pertencentes a ordem Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *E. fergusonii*, *Shigella flexneri*) e diminuição de Bacilos e Lactobacilos (*Lactobacillus reuteri* e *L.pontis*), reforçando o efeito que causa sobre o microbioma cecal e sua importância como fator associado a disbiose intestinal.

4.5 CONCLUSÃO

Observou-se que a ocorrência de coccidiose nos lotes avaliados foi alta, acometendo 100% dos lotes na fase final da produção. *E. tenella* foi a única espécie encontrada em todos os lotes na segunda coleta, porém, na primeira coleta *E. acervulina* foi a espécie mais comum.

A ocorrência de infecção mista também foi observada, representada pela combinação entre *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella* que foi a mais frequente. Através da identificação dos oocistos pela avaliação morfométrica e morfológica foi possível identificar seis espécies de *Eimeria*, porém, a cama de aviário não demonstrou ser um bom indicador para a avaliação da coccidiose.

As lesões mais frequentes foram classificadas como grau 1 para a avaliação histopatológica e escore de lesão na coleta 1, porém, foi observado que na coleta 2, as lesões causadas por *E. tenella* foram acentuadas e classificadas como grau 3.

A avaliação histopatológica demonstrou-se mais eficaz para a avaliação de coccidiose em frangos de corte, assim, foi possível identificar maior número de aves infectadas em relação ao escore de lesão macroscópico.

Não foram encontrados lotes positivos para *Salmonella*. Houve infecção bacteriana causando lesões extraintestinais como peritonite, aerossaculite, hepatite e peri-hepatite, porém não foi observada relação com lotes positivos para coccidiose.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINO, L. F. T.; TAVERNARI, F. C. **Produção e Manejo de Frangos de Corte**. Minas Gerais: UFV, 2012.

ALLEN P. C.; FETTERER R. H. Recent advances in biology of *Eimeria* species and diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p.58-65, 2002.

ANDREATTI FILHO, R. L. et al. Pesquisa de *Salmonella* spp. em suabes de arrasto provenientes de granjas avícolas. **Veterinária e Zootecnia**, v. 116, p. 190-194, 2009.

ASSIS, R. C. L.; CURY, M. C.; LUNS, F. D. Desinfecção com amônia quaternária associada à fermentação não potencializa o controle de coccidiose em cama de frango. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1459-1463, 2013.

BARROW, P. A. *Salmonella* - present, past and future. **Avian Pathology**, v. 22, p. 651- 699, 1993.

BERCHIERI JUNIOR, A; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JUNIOR, A; SILVA, E. N; FÁBIO, E. D. I; SESTI, L; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. 2º. ed. Campinas-SP: FACTA. p. 837-855, 2009.

BONI, H. F. K.; CARRIJO, A. S.; FASCINA, V. B. Ocorrência de " *Salmonella*" spp. em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 1, 2011.

BRITO, L. et al. Experimental infection with sporulated oocysts of *Eimeria maxima* (Apicomplexa: *Eimeriidae*) in broiler. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

BUTAYE P., DEVRIESE L. A.; HAESEBROUCK F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on Gram-positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 175-188, 2003.

CARDOSO, A. N. S. P. et al. Sorovares de *Salmonella* spp. Isolados através de suabes de arrasto provenientes de aves reprodutoras comerciais durante o período de 2006 a 2010. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 1-27, 2013.

CARDOSO, A. N. S. P.; TESSARI, E. N. C. *Salmonella Enteritidis* em aves e na saúde pública: Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 1-27, 2013.

CARVALHO, F. S. et al. Diagnosis of *Eimeria* species using traditional and molecular methods in field studies. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 2-3, p. 95-100, 2011.

CONWAY, D. P. et al. Effects of different levels of oocyst inocula of *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, and *E. maxima* on plasma constituents, packed cell volume, lesion scores, and performance in chickens. **Avian Diseases**, v. 37, n. 1, p. 118-123, 1993.

CONWAY, D. P.; DAYTON, A. D.; MCKENZIE, M. E. Comparative testing of anticoccidials in broiler chickens: the role of coccidial lesion scores. **Poultry Science**, v. 78, n. 4, p. 529-535, 1999.

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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 48, p. 403-413, 1996.

GALHA, V. et al. Coccidiose clínica em frangos de corte infectados naturalmente e imunossuprimidos com dexametasona. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.1, p.25-31, 2010.

GAMBIRAGE, A. P. O. M. et al. *Salmonella* sp. em frangos de corte de um dia de idade na região metropolitana de Fortaleza-CE. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 3, p. 149-153, 2003.

GAMBIRAGI, A. P. O. M. et al. *Salmonella* sp. em frangos de corte de um dia de idade na região metropolitana de Fortaleza - CE. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 149 -153, 2003.

GIL DE LOS SANTOS, J. R., CONCEIÇÃO, F. R., GIL-TURNES, C. Enterite necrótica aviária. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 2076-2082, 2008.

GOODWIN, M. A.; BROWN, J.; BOUNOUS, D. Use of microscopic lesion scores, gross lesion scores and oocyst count scores to detect *Eimeria maxima* in chickens. **Avian Pathology**, v. 27, n. 4, p. 405-408, 1998.

GUIA BRASILEIRO DE BOAS PRÁTICAS EM EUTANÁSIA EM ANIMAIS - **Conceitos e Procedimentos Recomendados**. Brasília, v. 1: 62 p. 2012. Disponível em: <<http://portal.cfmv.gov.br/uploads/files/Guia%20de%20Boas%20Pr%C3%A1ticas%20para%20Eutanasia.pdf.pdf>>. Acesso em: 6 fev. 2019.

IDRIS, A. B. et al. Lack of correlation between microscopic lesion scores and gross lesion scores in commercially grown broilers examined for small intestinal *Eimeria* spp. coccidiosis. **Avian Diseases**, v. 41, p. 388-391, 1997.

JOHNSON, J.; REID, W. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. **Experimental Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 30-36, 1970.

KAWAZOE, U. Coccidiose. In: BERCHIERI JUNIOR, A; SILVA, E. N; FÁBIO, E. D. I; SESTI, L; ZUANAZE, M. A. F. (Eds). **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: FACTA, 2009. p. 837-855.

KAWAZOE, U.; FIGUEIREDO, A. C. Levantamento de coccidiose aviária em três granjas de frangos de corte da região de Campinas - São Paulo - Brasil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 42, p. 317-336, 1990.

KOINARSKI, V; LYUTSKANOV, M; URUMOVA, V. Effect of an experimental *Eimeria tenella* invasion upon an artificial *Salmonella* Typhimurium infection in broiler-chickens. **Veterinarski Arhiv**, v. 75, p. 349-357, 2005.

LONG, P. L.; REID, W. M. **A guide for the diagnosis of coccidiosis in chickens**. Georgia, 1982. p.17.

LUCHESE, F.C. et al. Prevalência de espécies de *Eimeria* em frangos de criação industrial e alternativa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 2, p. 81-86, 2007.

MACDONALD, S. E. et al. Effects of *Eimeria tenella* infection on chicken caecal microbiome diversity, exploring variation associated with severity of pathology. **PLoS One**, v. 12, n. 9, 2017.

MATTIELLO, R.; BOVIEZ, J. D.; MCDOUGALD, L. R. *Eimeria brunetti* and *Eimeria necatrix* in chickens of Argentina and confirmation of seven species of *Eimeria*. **Avian Diseases**, v. 44, n. 3, p. 711, 2000.

MCDOUGALD, L. R. Coccidiosis. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. (Eds). **Diseases of Poultry**. 11. ed. Ames: Iowa State Press, 2003. p. 974-985.

MCDOUGALD, L. R., FULLER, L.; SOLIS, J. Drug-sensitivity of 99 isolates of coccidia from broiler farms. **Avian Disease**, v. 30, p. 690-694, 1986.

MEIRELES, M.V. Coccidiose aviária. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. (Eds). **Patologia Aviária**, 2009. p. 310-318.

MORAES, J. C. et al. Prevalence of *Eimeria* spp. in broilers by Multiplex PCR in the southern region of Brazil on two hundred and fifty farms. **Avian Diseases**, v. 59, p. 277–281, 2015.

NAKAZATO, G. et al. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 479-486, 2009.

PEDROSO, A. A. et al. Informal nutrition symposium remodeling the intestinal ecosystem toward better performance and intestinal health. **The Journal of Applied Poultry Research**, v.21, n. 2, p. 432–443, 2010.

PEEK, H. W.; LANDMAN, W. J. M. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. **Veterinary Quarterly**, v. 31, n. 3, p. 143-146, 2011.

RAMOS, L. S. N.; LOPES, J. B.; SILVA, S. M. M. S. Desempenho e histomorfometria intestinal de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade recebendo melhoradores de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 8, p. 1738-1744, 2011.

RAVAGNANI, L. K. et al. Pesquisa de *Salmonella* spp. em frangos de corte criados em galpões climatizados de uma integração na região Oeste do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2327-2336, 2012.

SILVA, E. F.; PEREIRA, M. G. Avaliação das estruturas de concordância e discordância nos estudos de confiabilidade. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 4, p. 383 – 93, 1998.

TELLEZ, G. I.; KOGUT, M. H.; HARGIS, B. M. *Eimeria tenella* or *Eimeria adenoeides*: induction of morphological changes and increased resistance to *Salmonella Enteritidis* infection in Leghorn chicks. **Poultry Science**, v. 73, p. 396–401, 1994.

THRUSFIELD, M. Inqueritos. In_____, M. Epidemiologia veterinária, São Paulo: Rocca, 2004. p. 229-230.

TOLEDO, G. A.; ALMEIDA, J. D.; ALMEIDA, K. S.; FREITAS, F. L. Coccidiosis in broiler chickens raised in the Araguaína region, State of Tocantins, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 249-252, 2011.

VOLKOVA, V. V. et al. Associations between vaccination sagainst protozoal and viral infections and *Salmonella* in broiler flocks. **Epidemiology & Infection**, v. 139, n. 2, p. 206-215, 2011.

YOU, M. J. Detection of four important *Eimeria* species by multiplex PCR in a single assay. **Parasitology International**, v. 63, n. 3, p. 527-532, 2014.

ZULPO, D. L. et al. Pathogenicity and histopathological observations of commercial broiler chicks experimentally infected with isolates of *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *E. maxima*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 97-104, 2007.

5 AVALIAÇÃO DA COCCIDIOSE EM FRANGOS DE CORTE E SUA POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM ENTERITE NECRÓTICA SUBCLÍNICA

EVALUATION OF COCCIDIOSIS IN BROILERS AND POSSIBLE ASSOCIATION WITH SUBCLINICAL NECROTIC ENTERITIS

RESUMO

A coccidiose é uma das principais doenças entéricas nas aves, causando baixo desempenho, aumento da conversão alimentar e da mortalidade, além de gerar dano intestinal que pode predispor a infecções bacterianas secundárias. Objetivou-se avaliar a ocorrência da coccidiose em frangos de corte associada ao desenvolvimento da enterite necrótica subclínica. Foram avaliados 32 lotes, sendo 8 aves de cada lote, totalizando 256 amostras. As lesões macroscópicas receberam escore para coccidiose e enterite necrótica. Fragmentos intestinais foram coletados para os exames histopatológico, cultivo anaeróbico seletivo para *Clostridium perfringens*, seguido de PCR e identificação do gene NetB e pesquisa de *Eimeria* sp. por PCR do conteúdo intestinal. Foram encontrados 93,75% (30/32) de lotes positivos para coccidiose. As lesões macroscópicas de coccidiose encontradas foram: *E. acervulina* grau 1 27,03% (70/256); grau 2 7,03% (18/256) e grau 3 1,56% (4/256); *E. maxima* grau 1 8,98% (23/256) e grau 2 0,39% (1/256); *E. tenella* grau 1 9,76% (25/256); *E. brunetti* grau 1 0,78% (2/256). Na avaliação histopatológica foram encontradas no duodeno grau 1 em 38,2% (98/256); grau 2 8,9% (23/256) e grau 3 7,0% (18/256); jejunum grau 1 em 21,4% (55/256); grau 2 5,4% (14/256) e grau 3 10,5% (27/256); íleo grau 1 em 5,0% (13/256); grau 2 0,7% (2/256) e grau 3 1,1% (3/256); ceco grau 1 em 9,3% (24/256); grau 2 1,5% (4/256) e grau 3 5% (13/256). Na PCR para *Eimeria* sp. 34,37% (11/32) dos lotes foram positivos, sendo 21,87% (7/32) para *E. tenella*, 18,75% (6/32) *E. maxima* e 3,12% (1/32) *E. acervulina*. As lesões macroscópicas de enterite necrótica foram classificadas como grau 0 em 50% (128/256); grau 1 16,02% (41/256); grau 2 23,05% (59/256) e grau 3 10,93% (28/256), sendo que na histopatologia foram observadas somente hemorragia em mucosa e submucosa, além de *Eimeria* sp. Quanto a pesquisa de *C. perfringens* Tipo A, 8,2% (21/256) das amostras foram positivas e todas negativas para o gene NetB. Portanto, lesões macroscópicas observadas não caracterizaram enterite necrótica, fundamentada pela histopatologia e ausência do gene NetB. Porém, houve alta infecção por *Eimeria* sp. nos lotes, sugerindo que essas lesões atípicas possam ser causadas pela coccidiose.

Palavras-chave: *Eimeria*; *Clostridium perfringens*; gene NetB; doença intestinal.

ABSTRACT

Coccidiosis is an important enteric disease in broilers that can lead to intestinal damage and predispose to secondary bacterial infections, causing increased feed conversion and mortality. The aim of this study was to evaluate the occurrence of coccidiosis in broilers associated with the development of subclinical necrotic enteritis. Thirty-two flocks, eight broilers from each flock were evaluated, totaling 256 samples. Macroscopic lesions were graduate for coccidiosis and necrotic enteritis. Intestinal fragments were collected for histopathological examinations, selective anaerobic culture for *Clostridium perfringens*, followed by PCR and identification of the NetB gene and *Eimeria* sp. intestinal content was investigated by PCR. Positive flocks for coccidioses were in 93,75%. (30/32). The macroscopic lesions of coccidiosis found were: *E. acervulina* grade 1 27.03% (70/256); grade 2 7.03% (18/256) and grade 3 1.56% (4/256); *E. maxima* grade 1 8.98% (23/256) and grade 2 0.39% (1/256); *E. tenella* grade 1 9.76% (25/256); *E. brunetti* grade 1 0.78% (2/256). In the histopathological evaluation, grade 1 was found in the duodenum in 38.2% (98/256); grade 2 8.9% (23/256) and grade 3 7.0% (18/256); jejunum grade 1 in 21.4% (55/256); grade 2 5.4% (14/256) and grade 3 10.5% (27/256); ileum grade 1 in 5.0% (13/256); grade 2 0.7% (2/256) and grade 3 1.1% (3/256); cecum grade 1 in 9.3% (24/256); grade 2 1.5% (4/256) and grade 3 5% (13/256). In the PCR for *Eimeria*, 34.37% (11/32) of the lots were positive, 21.87% (7/32) for *E. tenella*, 18.75% (6/32) for *E. maxima* and 3.12% (1/32) for *E. acervulina*. Macroscopic lesions of necrotic enteritis were classified as grade 0 in 50% (128/256); grade 1 16.02% (41/256); grade 2 23.05% (59/256) and grade 3 10.93% (28/256), and in histopathology only hemorrhage in mucosa and submucosa were observed, besides *Eimeria* sp. Regarding the *C. perfringens* Type A test, 8.2% (21/256) of the samples were positive and all negative for the NetB gene. The observation of macroscopic lesions did not characterize necrotic enteritis, based on histopathology and negativity of the NetB gene. However, there was a high infection by *Eimeria* sp. in the flocks, suggesting that these atypical lesions were caused by coccidiosis.

Keywords: *Eimeria*; *Clostridium perfringens*; gene NetB; intestinal disease.

5.1 INTRODUÇÃO

A coccidiose é uma doença causada por protozoários do gênero *Eimeria*, sendo que as principais espécies causadoras da coccidiose no frango de corte são: *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. brunetti*, *E. praecox*, *E. necatrix* e *E. mitis* (CHAPMAN, 2014). A ocorrência da coccidiose nos lotes de frangos de corte é aleatória, onde é comum se observar infecções mistas (LEE et al., 2010). O local e as características macroscópicas das lesões muitas vezes fornecem um indicativo da espécie envolvida (LONG; JOYNER, 1984; MORRIS et al., 2007). A doença pode se apresentar de maneira clínica e subclínica, provocando prejuízos econômicos devido à quadros de diarreia, perda de desempenho, aumento da conversão alimentar, baixa produção de ovos e ainda pode causar mortalidade (MEIRELES, 2009).

Eimeria acervulina, *E. maxima* e *E. tenella* causam lesões típicas no duodeno, jejuno e ceco, respectivamente. Estas são as espécies que têm maior ocorrência nos lotes de frangos de corte e são as mais monitoradas (CHAPMAN, 2014). O diagnóstico da coccidiose baseia-se na técnica de avaliação macroscópica do intestino e classificação em escores de lesão, descrita por Johnson e Reid (1970), porém, não reflete a condição real da infecção (IDRIS et al., 1997).

A coccidiose possibilita a instalação de doenças secundárias, onde o dano causado ao epitélio intestinal por coccídeos e as modificações das funções gastrointestinais podem predispor o aparecimento de clostridiose (GIL DE LOS SANTOS et al., 2008). Existe uma resposta exacerbada da produção de muco quando os enterócitos são atacados pelos coccídeos e isso facilitaria a adesão e multiplicação de bactérias que conseguem utilizar o muco como substrato para sua sobrevivência. *Clostridium perfringens* possui atividade acidomucolítica substancial e é a principal bactéria patogênica que pode usufruir dessa alteração para sua instalação (DEPLANCKE et al., 2002; COLLIER et al., 2008).

Clostridium perfringens é uma bactéria anaeróbia, Gram positiva e formadora de esporos. É um habitante comensal do trato gastrointestinal das aves, mas também é responsável por causar a enterite necrótica (EN) que causa lesões intestinais em duodeno, jejuno, íleo e cecos (COOPER et al., 2013). Na forma aguda da doença, pode-se encontrar o intestino delgado com parede friável e repleto por conteúdo avermelhado ou marrom escuro. Conforme ocorre a progressão das lesões, formam-se pseudomembranas diftéricas amareladas sobre as áreas de erosão da mucosa, além de espessamento transmural (SHOJADOST et al., 2012).

Quando as lesões se tornam crônicas, observa-se úlceras multifocais a coalescentes na mucosa, recobertas por pseudomembranas (COOPER et al., 2013). A forma subclínica apresenta pequenas erosões na mucosa, medindo de 1 a 2 mm, com hiperemia periférica e com deposição de material amarelado friável sobre as erosões (GHOLAMIANDEHKORDI et al., 2007). Estima-se que a EN possa causar perdas da ordem de até 33% nos plantéis avícolas devido aos gastos com medicamentos, redução no ganho de peso e aumento da conversão alimentar (LOVLAND; KALDHUSDAL, 2001).

A descoberta de uma toxina, associada ao desenvolvimento da EN trouxe novos desafios para seu diagnóstico. A toxina NetB possui papel crítico e essencial na capacidade de isolados de *C. perfringens* causarem a doença nas aves (KEYBURN et al., 2008; SMYTH; MARTIN, 2010).

O diagnóstico deve ser baseado em vários critérios. As lesões macroscópicas e histopatológicas são sugestivas, porém necessita-se da caracterização do agente para descartar outras doenças que causam lesões similares como a coccidiose (BARNES, 2008; UZAL et al., 2016; COLLIER et al., 2008). O isolamento de *C. perfringens* tipo A do trato intestinal também pode ser útil no diagnóstico de EN, porém, essa bactéria pode estar presente em aves saudáveis, não sendo suficiente para a conclusão de diagnóstico. Dessa forma, a detecção da toxina produzida pelo gene NetB através da técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) é a melhor forma de diagnóstico, associada aos exames primários já descritos (KEYBURN et al., 2008; GHARAIBEH et al., 2010).

Objetivou-se com esse trabalho avaliar a ocorrência de coccidiose associada ao desenvolvimento de EN subclínica, caracterizar as lesões encontradas e identificar o gene NetB em amostras positivas para *C. perfringens* em frangos de corte naturalmente desafiados.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Colheita das amostras

Durante os meses de janeiro a junho de 2018, foram avaliados 32 lotes de frangos de corte da linhagem Cobb 500TM, fêmeas, com idade média de 29 dias, oriundos de um abatedouro no estado de Santa Catarina. As amostras eram obtidas na linha de abate sendo constituídas pelo conjunto de vísceras de cada frango de corte. Para cada lote foram avaliadas oito aves, sendo quatro aves sem alterações macroscópicas intestinais visíveis na linha de abate e outras quatro apresentando lesões em intestino, totalizando 256 amostras.

5.2.2 Caracterização macroscópica e microscópica das lesões intestinais

Os intestinos foram avaliados quanto à presença de lesões características de coccidiose, que foram graduadas utilizando-se a metodologia adaptada de Johnson e Reid (1970). Quanto à EN, a análise macroscópica dos intestinos foi classificada de acordo com o escore de lesões baseado no método de classificação adaptado de Truscott Al-Sheikhly (1977), sendo Grau 0: ausência de lesões; Grau 1: áreas circulares, deprimidas, avermelhadas com 1 a 2 mm de diâmetro, transmurais, podendo estar recobertas por material fibrilar, irregular e amarelado, principalmente em jejuno e íleo; Grau 2: áreas circulares, deprimidas, avermelhadas a enegrecidas e ulcerações com halo hiperêmico, de 2 a 5 mm de diâmetro transmurais, recobertas por material fibrilar, irregular e amarelado, principalmente em jejuno e íleo; Grau 3: áreas maiores que 5 mm avermelhadas ou arroxeadas transmurais com deposição de material fibrilar, irregular e amarelado, principalmente em jejuno e íleo, predominantemente sobre placas de Peyer.

Fragments de intestino medindo aproximadamente 3 cm foram fixados em formalina tamponada a 10%, processados rotineiramente para histopatologia e corados por hematoxilina e eosina (HE). Para a avaliação da coccidiose, os fragmentos de intestino das oito aves foram divididos em duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon, e colhidos em frascos separadamente. Já para a EN, um fragmento correspondente ao local das lesões macroscópicas foi colhido de forma individual. Da mesma forma, das aves sem alterações macroscópicas, um fragmento de jejuno foi colhido.

As alterações de coccidiose encontradas na histopatologia receberam um escore de lesão, sendo: Grau 0: ausência de alterações; Grau 1: discreta quantidade de estruturas parasitárias (esquizontes, micro e macrogametas e oocistos) compatíveis com *Eimeria* sp. na camada superficial do topo e na região medial em menos de 10 vilosidades ou criptas; Grau 2: moderada a grande quantidade de estruturas parasitárias (esquizontes, micro e macrogametas e oocistos) compatíveis com *Eimeria* sp. na camada superficial do topo e na região medial em menos de 10 vilosidades ou criptas; Grau 3: moderada a grande quantidade de estruturas parasitárias (esquizontes, micro e macrogametas e oocistos) compatíveis com *Eimeria* sp. na camada superficial do topo e na região medial em mais de 10 vilosidades ou criptas e, Grau 4: 80% ou mais das vilosidades ou criptas acometidas por estruturas parasitárias (esquizontes, micro e macrogametas e oocistos) compatíveis com *Eimeria* sp.

Foi realizada a descrição de todas das alterações histológicas observadas nos cortes de fragmentos intestinais, tanto dos intestinos que continham lesões macroscópicas sugestivas de EN, quanto dos intestinos sem lesões. Foi atribuído o G0 para os intestinos sem alterações histológicas. Nos cortes onde foi observado hemorragia, esta foi graduada de 1 a 3, sendo grau 1: hemorragia multifocal discreta a moderada, grau 2: hemorragia multifocal acentuada e grau 3: hemorragia difusa moderada a acentuada.

5.2.3 Exame parasitológico para *Eimeria* sp.

A pesquisa de oocistos de *Eimeria* sp. foi realizada através da colheita de conteúdo intestinal das aves durante a avaliação macroscópica. Para a pesquisa de oocistos nas fezes, foi utilizada a metodologia adaptada, descrita por Moraes et al. (2015), que consistiu em uma etapa de purificação e limpeza dos oocistos, seguida de extração do DNA e PCR para as sete espécies de *Eimeria*.

Um *pool* do conteúdo intestinal das oito aves de cada lote foi coletado em frasco com tampa de rosca e adicionou-se 50 mL de solução de dicromato de potássio a 2,5% e armazenadas em temperatura ambiente até a purificação dos oocistos.

5.2.4 Purificação, limpeza dos oocistos e extração de DNA

A purificação dos oocistos foi realizada conforme descrito anteriormente (página 38). Os oocistos mantidos na solução de dicromato de potássio passaram por limpeza, adicionando-se água destilada a amostra e centrifugando a 2.000g, descartando o sobrenadante. Este processo foi repetido três vezes para a completa remoção do dicromato de potássio. Os 3 mL restantes das amostras foram divididos em dois microtubos de 2mL. Uma alíquota (1,5mL) foi utilizada para a extração e a outra recebeu 500 μ L de solução de dicromato de potássio a 10% e foi armazenada a uma temperatura de 5 a 7°C como amostra reserva.

Na extração de DNA adicionou-se 150 μ L de uma solução de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) a 20% e homogeneizou-se por inversão. Em seguida a amostra foi centrifugada a 2.500g por 5 minutos para a retirada do SDS. O sobrenadante pipetado e adicionou-se ao sedimento água Milli-Q® até completar o volume final de 2mL. O conteúdo do tubo foi novamente homogeneizado por inversão, submetido à centrifugação (2.500g/5 min.) e o

sobrenadante descartado com auxílio de uma micropipeta de 1mL. O procedimento para a limpeza das amostras foi repetido por duas vezes.

Para a ruptura dos oocistos, o sedimento originado do procedimento de limpeza foi ressuspendido em 500µL de tampão de lise (10mM de Tris-HCl pH 8,0; 50mM de EDTA pH 8,0; 200mM de NaCl), adicionado de 2,5µl de RNase A (10µg/µL) e 0,5g de esferas de vidro de 210 a 300µm de diâmetro (Sigma-Aldrich®). O microtubo foi homogeneizado em um agitador tipo vórtex, na velocidade máxima, por 10 minutos.

Após a ruptura mecânica dos oocistos, o tubo foi colocado em um bloco seco a 37°C durante 15 minutos para a ação da RNase, em seguida foi centrifugado a 10.000g por 5 minutos e o sobrenadante transferido para um microtubo de 1,5mL. Em seguida, foram adicionados 12,5µL de uma solução de SDS a 20% e 2,5µL de proteinase K (20µg/µL) ao microtubo de 1,5mL e este foi homogeneizado e incubado a 50°C em bloco seco durante 30 minutos, para a ação da proteinase K.

Na próxima etapa, foram adicionados 500µL de fenol ao microtubo, homogeneizado e centrifugado a 3.500g durante 5 minutos. A proteína foi desnaturada e separou-se o DNA que permaneceu na fase superior da solução, este foi pipetado e transferido a outro microtubo de 1,5mL, contendo 250µL de fenol e 250µL de clorofórmio. Essa solução foi homogeneizada e centrifugada a 3.500g durante 5 minutos e a fase superior foi retirada e transferida a outro microtubo de 1,5ml contendo 460µL de clorofórmio. O conteúdo foi novamente homogeneizado e centrifugado a 3.500g durante 5 minutos e a fase superior da solução contendo o DNA foi retirada e colocada em outro microtubo de 1,5mL.

Para a precipitação do DNA foram acrescentados à solução originada da etapa anterior, 500µl de isopropanol (100%) gelado e 100µl de acetato de sódio 3M (pH 5,5). A solução foi homogeneizada e armazenada a -20°C por 24 horas. No dia seguinte, a solução foi centrifugada a 10.000g por 15 minutos a uma temperatura de 4°C, o sobrenadante foi removido e descartado com auxílio de uma micropipeta de 1mL. Depois, foi adicionado ao microtubo 1mL de etanol (70%) gelado e a solução no tubo foi homogeneizada por inversão. O tubo foi novamente centrifugado a 10.000g, durante 5 minutos a 4°C e o sobrenadante removido com uma micropipeta de 1mL. O microtubo foi colocado em um bloco seco a 50 °C por 15 minutos ou até o etanol evaporar totalmente e ao final, 40µL de água Milli-Q® estéril foi adicionada ao tubo contendo o DNA precipitado. A curva de DNA foi medida com auxílio do NanoDrop 2000® (Thermo Scientific) e a amostra foi estocada a -20°C para a posterior utilização na técnica da PCR.

5.2.5 PCR para *Eimeria* sp.

Para identificar as sete espécies de *Eimeria* que parasitam frangos de corte foi utilizada a técnica de PCR adaptada de Moraes et al., (2015). As designações e sequências dos primers que foram utilizados e o tamanho dos amplicons das sete espécies de *Eimeria* estão no Quadro 3.

Quadro 3 - Primers utilizados na técnica de PCR para a detecção de *E. acervulina* (ac), *E. brunetti* (br), *E. tenella* (tn), *E. mitis* (mt), *E. praecox* (pr), *E. maxima* (mx) e *E. necatrix* (nc).

Designação	Sequência	Tamanho do fragmento
ac-A03-F ac-A03-R	AGTCAGCCACACCAATAATGGCAAACATG AGTCAGCCACAGCAGAAAGACGTATGTG	811 pb
br-J18-F br-J18-R	TGGTCGAGAACCTACAGGGCTGT TGGTCGAGACGTATATTAGGGGTCTG	626 pb
tn-K04-F tn-K04-R	CCGCCCAAACCAGGTGTCACG CCGCCCAAACATGCAAGATGGC	539 pb
mt-A03-F mt-A03-R	AGTCAGCCACCAGTAGAGCCAATATT AGTCAGCCACAAACAAATTCAAACCTAC	460 pb
pr-A03-F pr-A03-R	AGTCAGCCACCACCAAATAGAACCTTGG GCCTGCTTACTACAAACTTGCAAGCCCT	354 pb
mx-A09-F mx-A09-R	GGGTAACGCCAACTGCCGGGTATG AGCAAACCGTAAAGGCCGAAGTCCTAGA	272 pb
nc-A18-F nc-ENec-R	TTCATTTCGCTTAACAATATTGGCCTCA ACAACGCCTCATAACCCCAAGAAATTG	200 pb

Adaptado de Moraes et al. (2015).

Todas as reações foram realizadas com o uso do Mastermix comercial GeneAmp® Fast PCR Master Mix (2X) (AppliedBiosystems Inc., Norwalk, CT, USA), com cada reação consistindo de 20 mL, incluindo 0,4 mL de cada primer Forward e Reverse (10 μ M cada), 2 mL do DNA extraído, 7,2 mL de água ultra pura (Invitrogen, USA) e 10 mL de Mastermix 2X GeneAmp® Fast PCR (Applied Biosystems Inc., Norwalk, CT, USA). A amplificação foi realizada em termociclador Veriti (Applied Biosystems Inc., Norwalk, CT, USA) com as seguintes condições: uma etapa de desnaturação a 95°C por 10 segundos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 0 segundos, anelamento dos primers e extensão do DNA a 65°C por 25 segundos, seguido de etapa final de extensão a 72°C por 10 segundos.

Os produtos da PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 2%, adicionado de Brometo de Etídio para visualização das bandas. Para efeito de escala, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb e controles negativo e positivo para cada

espécie de *Eimeria*. Depois de terminada a corrida, o gel foi observado sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

5.2.6 Cultivo microbiológico para *C. perfringens*

Um fragmento de intestino medindo entre 2 e 3 cm, de cada ave que apresentava lesões macroscópicas foi ligado com barbante de algodão, seccionadas as extremidades da alça e acondicionados em sacos plásticos de forma individual. Das quatro aves que não apresentaram lesões intestinais um fragmento intestinal de jejuno também foi coletado da mesma forma. Todos os fragmentos de intestinos foram congelados a -20°C para posterior análise microbiológica.

As amostras foram mantidas sob congelamento até o processamento microbiológico no Laboratório de Anaeróbios da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) onde foram submetidas ao enriquecimento e cultivo seletivo.

Para realizar o enriquecimento, com uma alça estéril foi transferida uma alíquota de fezes dos fragmentos intestinais para tubos contendo 10 mL de caldo BHI - Infusão de Cérebro e Coração (OXOID®). Os tubos foram incubados em câmara de anaerobiose (*Forma Anaerobic System*, Thermo Scientific®) com atmosfera controlada obtida com uma mistura de gases composta por 10% de Dióxido de Carbono, 10% de Hidrogênio e 80% de Nitrogênio, à 38°C por 24 horas.

Em seguida as amostras foram plaqueadas em ágar SFP – Shahidi Ferguson Perfringens (DIFCO™) acrescido de suplemento seletivo para *C. perfringens*–Perfringens Seletive Supplement SR0093E (OXOID®), composto por Sulfato de Canamicina (6.0 mg) e Sulfato de Polimixina B (15,000 UI). Uma alçada do conteúdo do tubo BHI foi transferida para a placa pelo método de esgotamento, em seguida as placas foram incubadas nas mesmas condições em que foi realizado o enriquecimento, porém, por 48 horas.

5.2.7 Extração de DNA para pesquisa bacteriológica

As amostras que obtiveram crescimento de colônias sulfito redutoras sugestivas de *C. perfringens* foram submetidas a extração de DNA para PCR. Com uma alça esterilizada, 3 a 5 colônias foram raspadas da placa SFP e transferidas para tubo contendo 400 µl de água ultra pura Milli-Q® (Sistema de ultra purificação de água - Milli-Q, Milipore Indústria e Comércio

LTDA). Os tubos foram identificados e levados ao termobloco por 20 minutos à temperatura de 98°C, seguidos de centrifugação por 10 minutos a 1.000g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido a outro tubo, o qual foi armazenado a 4°C.

5.2.8 PCR Multiplex para *C. perfringens*

O PCR Multiplex para tipificação de *C. perfringens* foi realizado a partir da extração de DNA de amostras que apresentaram crescimento de colônias sugestivas. No Quadro 4 estão expressas as designações dos genes e sequências dos primers (*cpa*, *cpb*, *cpe*, *ext*, *iota*, *cpb2*) utilizados no PCR multiplex para tipificação de *C. perfringens*.

Quadro 4 - Primers utilizados para PCR Multiplex de *Clostridium perfringens*.

Genes	Sequência	Temperatura de anelamento	Tamanho do fragmento
Alfa (Cpa)	5'GCTAATGTTACTGCCGTTGA 3' (senso) 5'CCTCTGATACATCGTGTAAAG 3' (anti-senso)	55°C	324 pb
Beta (Cpb)	5'GCGAATATGCTGAATCATCTA 3' (senso) 5'GCAGGAACATTAGTATATCTTC 3' (anti-senso)	55°C	196 pb
Epsilon (Etx)	5'GCGGTGATATCCATCTATTTC 3' (senso) 5'CCACTTACTTGTCTACTAAC 3' (anti-senso)	55°C	655 pb
Iota (iA)	5'TTTTAACTAGTTCATTCCTAGTTA 3' (senso) 5'TTTTGTATTCTTTCTCTAGATT 3' (anti-senso)	48°C	298 pb
Enterotoxina (Cpe)	5'GGAGATGGTGGATATTAGG 3' (senso) 5' GGACCAGCAGTTGTAGATA 3' (anti-senso)	55°C	233 pb
Beta 2 (Cpb2)	5'GAAAGGTAATGGAGAA 3' (senso) 5' GCAGAACAGGATTAA 3' (anti-senso)	48°C	573 pb

Adaptado de Vieira et al. (2006).

Os segmentos de gene foram amplificados na PCR multiplex utilizando-se um termociclador (Vereti – 96 Well Thermal Cycler – Applied Biosystems) com os seguintes ciclos: 1 ciclo de 2 minutos a 95°C, 40 ciclos com 3 etapas sendo: desnaturação por 1 minuto a 95°C, anelamento por 1 minuto a 48°C e extensão por 1 minuto a 72°C. Ao final, um ciclo de 8 minutos a 72°C para concluir a extensão da amplificação seguido de resfriamento a 4°C.

A eletroforese foi realizada utilizando-se gel de agarose com concentração de 2%, adicionado de 1,0 µL de Brometo de Etídeo (C₂ H₂₀Br N - 10 mg/mL - E1510 Sigma).

Utilizou-se controle positivo para cada primer, um controle negativo e um marcador de peso molecular de 100 pares de base (K9-100L – KASVI).

5.2.9 PCR para o gene NetB

As amostras que se confirmaram como *C. perfringens* tipo A através da PCR Multiplex foram destinadas a detecção do gene NetB, através de um PCR convencional. Para isso foram utilizados os seguintes primers: *NetB-F* 5'-GCT GGT GCT GGA ATA AAT GC-3' e *NetB-R* 5'-TCG CCA TTG AGT AGT TTC CC-3', que resultaram em uma banda de 384 pares de base.

Os segmentos de gene também foram amplificados utilizando-se um termociclador (Vereti – 96 Well Thermal Cycler – Applied Biosystems) com os seguintes ciclos: 1 ciclo inicial de desnaturação de 2 minutos a 95°C, 40 ciclos com 3 etapas sendo: desnaturação por 30 segundos a 95°C, anelamento por 30 segundos a 49°C e extensão por 30 segundos a 72°C. Ao final, um ciclo de 10 minutos a 72°C para concluir a extensão da amplificação seguido de resfriamento a 4°C.

A eletroforese foi realizada utilizando-se a mesma concentração para o gel de agarose (2%), adicionado de Brometo de Etídio, além de um controle positivo, controle negativo e um marcador de peso molecular de 100 pares de base.

5.2.10 Análise estatística

Para análise dos dados, foram feitas planilhas no *Excel* e analisadas por meio de estatística descritiva e inferencial. Para a comparação entre os graus de lesão macroscópica e histopatológica foi utilizada a análise estatística através do teste de Wilcoxon a um nível de significância de 0,05%. Para a análise estatística foi utilizado o programa Sigma Plot versão 12.0.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Avaliação das lesões macroscópicas e microscópicas

Dentre os lotes avaliados, foram observados 93,75% (30/32) positivos para coccidiose. As lesões macroscópicas e histopatológicas estão representadas na Tabela 7. Não foram

observadas lesões compatíveis com *E. necatrix* em ambas avaliações e na histopatologia não havia lesões em cólon. As lesões macroscópicas das diferentes secções de intestino e as das diferentes espécies de *Eimeria* observadas na histopatologia estão representadas nas Figuras 4A-F.

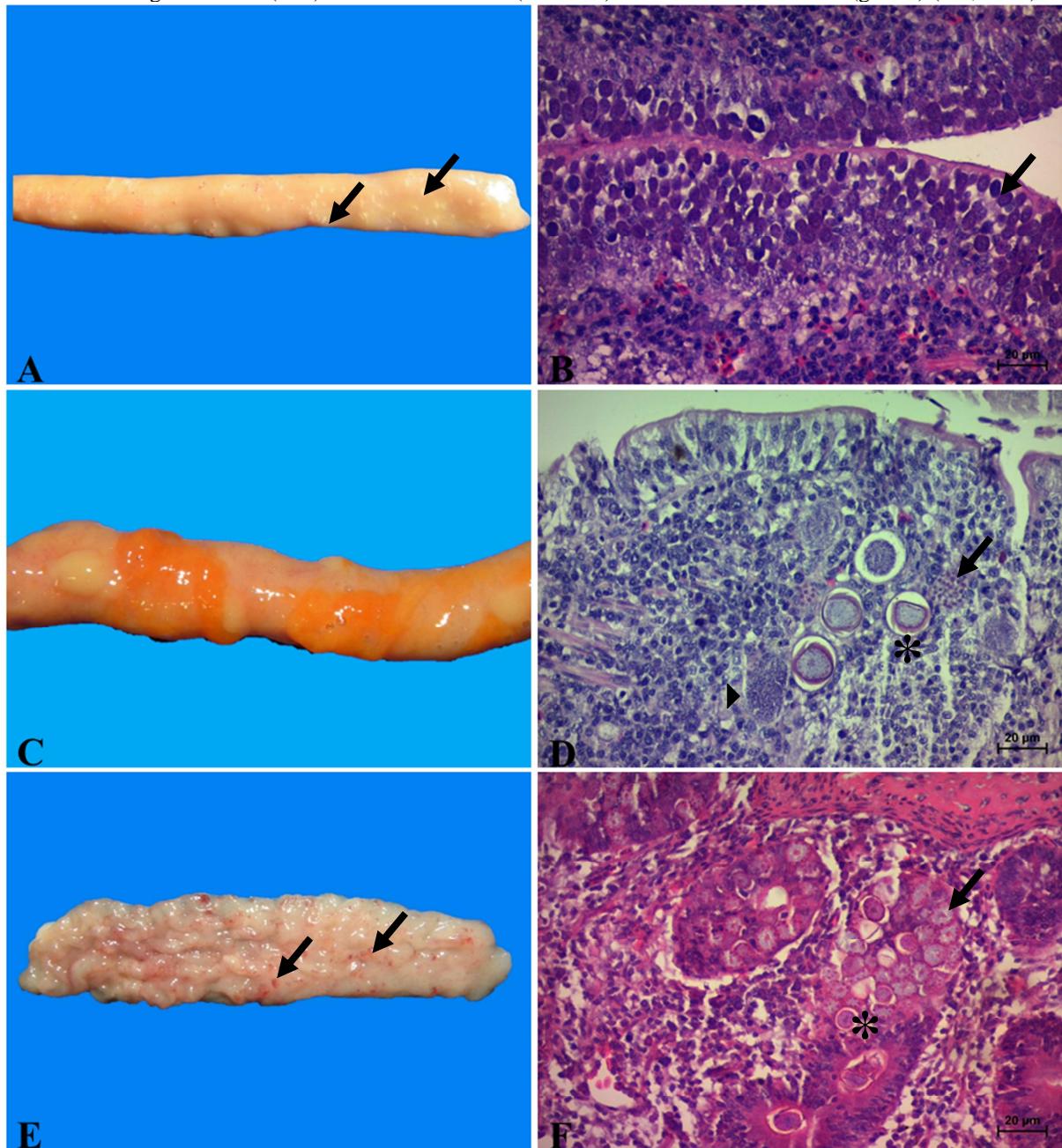
Tabela 7 - Escore de lesões macroscópicas e histopatológicas para coccidiose em frangos de corte (n: 256 amostras).

Graus	Lesões macroscópicas					Lesões histopatológicas				
	Duodeno	Jejuno	Íleo	Ceco	Cólon	Duodeno	Jejuno	Íleo	Ceco	Cólon
G0	64% (164)a	90,6% (232)a	100% (256)a	90,2% (231)a	99,2% (254)a	45,7% (117)b	62,5% (160)b	92,9% (238)b	83,9% (215)a	99,7% (255)a
G1	27% (70)a	8,9% (23)a	0	9,7% (25)a	0,7% (2)a	38,2% (98)b	21,4% (55)b	5% (13)b	9,3% (24)a	0,3% (1)a
G2	7% (18)a	0,3% (1)a	0	0	0	8,9% (23)a	5,4% (14)b	0,7% (2)a	1,5% (4)a	0
G3	1,5% (4)a	0	0	0	0	7% (18)b	10,5% (27)b	1,1% (3)a	5% (13)a	0
G4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Letras diferentes na mesma linha e coluna correspondente indicam diferença significativa ($p<0,05$) através do teste de Wilcoxon.

Duodeno: *E. acervulina*, *E. mitis* e *E. praecox*; Jejuno: *E. maxima*; Íleo: *E. necatrix*, Ceco: *E. tenella*; Cólon: *E. brunetti*.

Figura 4 - Lesões macroscópicas e histopatológicas de coccidiose em frangos de corte. **A:** Duodeno: estrias transversais esbranquiçadas (setas) multifocais discretas (*E. acervulina* grau 1). **B:** Duodeno: discreta quantidade de estruturas parasitárias compreendendo esquizontes (seta) na mucosa no topo das vilosidades (grau 1) (HE, 400x). **C:** Jejuno: conteúdo intestinal mucoso alaranjado na mucosa, multifocal discreto (*E. maxima* grau 1). **D:** Jejuno: discreta quantidade de estruturas parasitárias contendo esquizontes (cabeça de seta), macrogametócitos (seta) e oocistos imaturos (asterisco) na submucosa (grau 1) (HE, 400x). **E:** Ceco: áreas avermelhadas (setas) multifocais discretas na mucosa (*E. tenella* grau 1). **F:** Ceco: discreta quantidade de estruturas parasitárias contendo macrogametócitos (seta) e oocistos imaturos (asterisco) na mucosa e submucosa (grau 1) (HE, 400x).



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Na avaliação das 256 amostras de intestino, 50% (128/256) não apresentaram lesões macroscópicas de EN (grau 0). Em 16,02% (41/256) foi encontrado grau 1, já o grau 2 correspondeu a 23,05% (59/256) e o grau 3 a 10,93% (28/256).

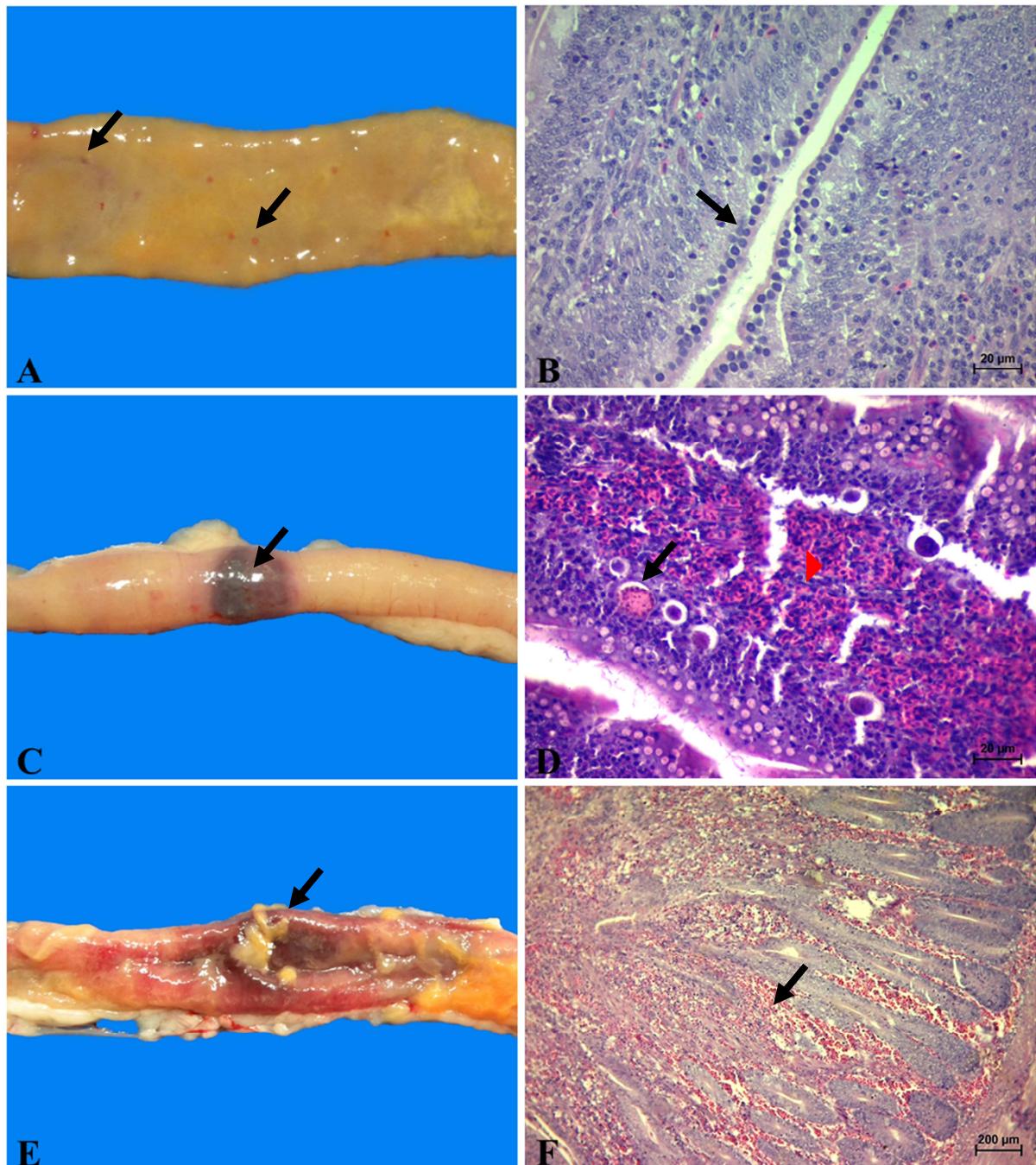
As lesões macroscópicas sugestivas com EN avaliadas no exame histopatológico estão representadas na Tabela 8 (Figura 5A-F). Na avaliação histopatológica as principais alterações encontradas foram hemorragias na mucosa e submucosa e estruturas parasitárias compatíveis com *Eimeria* sp.

Tabela 8 - Alterações histopatológicas observadas em intestinos de frangos de corte com lesões macroscópicas sugestivas de enterite necrótica (EN).

Lesões macroscópicas			Lesões histológicas						
			Hemorragia			<i>Eimeria</i> sp.			
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
Duodeno	3,90% (10)	0	0,39% (1)	1,56% (4)	0	0,39% (1)	0,39% (1)	0	0,78% (2)
Jejuno	8,20% (21)	16,79% (43)	9,76% (25)	23,43% (60)	0,39% (1)	5,85% (15)	7,42% (19)	0	3,51% (9)
Íleo	3,90% (10)	6,25% (16)	0,78% (2)	6,25% (16)	0,78% (2)	0,39% (1)	0,78% (2)	0,39% (1)	0
Total	16,02% (41)	23,05% (59)	10,93% (28)	32,03% (80)	1,17% (3)	6,64% (17)	8,59% (22)	0,39% (1)	4,29% (11)

A avaliação histopatológica dos intestinos que receberam grau 0 para EN, apresentaram 14,45% (37/256) com estruturas parasitárias de *E. maxima* em jejuno, sendo grau 1 em 7,81% (20/256), grau 2 em 3,51% (9/256) e grau 3 em 3,12% (8/256).

Figura 5 - Lesões macroscópicas sugestivas de enterite necrótica (EN) e lesões histopatológicas intestinais de frangos de corte. **A:** Duodeno: áreas avermelhadas na mucosa, medindo até 2mm de diâmetro (setas), multifocais discretas (grau 1). **B:** Duodeno: discreta quantidade de estruturas parasitárias contendo esquizontes (seta) no topo e região superficial das vilosidades, compatíveis com *Eimeria* sp. grau 1. (HE, 400x). **C:** Íleo: área avermelhada na serosa, medindo 5mm de diâmetro (seta), focal moderada (grau 2). **D:** Íleo: discreta quantidade de macrogametócitos (seta) e oocistos imaturos na região medial das vilosidades, compatíveis com *Eimeria* sp. grau 1 e hemorragia focal moderada (cabeça de seta) grau 2 (HE, 400x). **E:** Jejuno: área avermelhada com deposição de material fibrilar na superfície da mucosa (seta), focal acentuada (grau 3). **F:** Jejuno: hemorragia difusa acentuada (seta) grau 3 (HE, 100x).



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

5.3.2 Pesquisa de oocistos de *Eimeria* sp. através de PCR

Na PCR foi possível identificar *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella* no conteúdo intestinal das aves em 34,3% (11/32) dos lotes, sendo *E. tenella* com 21,9% (7/32), *E. maxima* em 18,8% (6/32) e *E. acervulina* em 3,1% (1/32).

A infecção mista por mais de uma espécie de *Eimeria* foi observada em três lotes, sendo que dois apresentaram a combinação entre *E. maxima* e *E. tenella* e um *E. acervulina* e *E. tenella*.

5.3.3 Pesquisa do *C. perfringens* tipo A e gene NetB

Das 256 amostras de intestinos submetidas ao crescimento seletivo em ambiente de anaerobiose, 16,40% (42/256) obtiveram crescimento de colônias sugestivas de *C. perfringens*. Estas foram submetidas ao PCR Multiplex para tipificação obtendo 21 amostras confirmadas como *C. perfringens* Tipo A, sendo que todas foram negativas para o gene NetB.

Dentre as 21 amostras positivas, 11 apresentavam lesões macroscópicas sugestivas de EN, sendo cinco amostras como grau 1, cinco amostras como grau 2 e uma com grau 3. Na avaliação histopatológica observou-se hemorragia na mucosa e submucosa em 10 amostras, sendo que três destas, estavam acompanhadas de estruturas parasitárias de *Eimeria* sp. e uma amostra não apresentou alterações histológicas.

As 10 amostras restantes, não havia lesões macroscópicas compatíveis com EN (grau 0), porém, quando avaliadas no exame histopatológico, foi observado que quatro amostras continham estruturas parasitárias compatíveis com *Eimeria* sp. e as demais sem alterações.

5.4 DISCUSSÃO

Eimeria acervulina, *E. maxima* e *E. tenella* foram as espécies mais encontradas no presente trabalho. Foi possível observar que na avaliação macroscópica de coccidiose o grau 1 foi o mais presente, sendo que *E. acervulina* foi a mais prevalente seguida por *E. tenella* e *E. maxima*. Quando se comparou o escore de lesão macroscópica com a histopatologia houve um aumento significativo no número de aves que apresentavam lesões de coccidiose em duodeno, jejuno e ceco.

Atualmente, a associação de diferentes técnicas para diagnósticos da coccidiose é extremamente importante, porém há escassez de trabalhos que utilizam a avaliação histopatológica para o diagnóstico da coccidiose e, quando utilizado, não existe uma

classificação padronizada. A histopatologia é muito utilizada para fins didáticos ou de pesquisa, onde é possível distinguir as diferentes fases do ciclo da *Eimeria* sp. em cada momento da doença (KAWAZOE et al., 2009).

O escore de lesão macroscópica quando utilizado isoladamente não é a melhor forma para se diagnosticar a coccidiose (CONWAY et al., 1999; GOODWIN et al., 1999). Em condições experimentais ou não, raramente reflete a severidade e a extensão das lesões, mascarando a verdadeira condição da infecção (IDRIS et al., 1997).

Já no cólon, nenhuma ave apresentou coccidiose na histopatologia, porém na macroscopia, 0,7% dos intestinos continham alterações sugestivas. O diagnóstico de *E. brunetti* apenas através do escore de lesão é impreciso. Durante a avaliação macroscópica do cólon, rotineiramente são observadas estrias avermelhadas na mucosa, organizadas longitudinalmente e paralelamente, devido à contração do músculo liso após a morte da ave. Essa alteração não tem importância patológica, sendo caracterizada como não-lesão ou alteração pós mortal (ABBAS et al., 2008).

Nesse estudo a PCR teve uma sensibilidade mais baixa que a macroscopia e histopatologia. Na amplificação do PCR necessita-se de ao menos 0,4 oocistos por espécie de *Eimeria*, correspondendo a 3,2 esporocistos. A quantidade de oocistos esporulados na amostra é variável e isso pode interferir na quantidade de DNA presente e consequentemente na sensibilidade desse teste (HAUG et al., 2007). As amostras de fezes utilizadas foram obtidas através de um raspado do conteúdo intestinal de oito aves. Porém, essas aves foram submetidas ao jejum pré-abate para que no momento do processamento, não ocorra rompimento de vísceras e consequente contaminação de carcaças. Isso pode ter interferido na quantidade de oocistos presentes na amostra.

Em relação às lesões sugestivas de EN, foi possível observar que variam de acordo com curso e grau. Nos casos agudos, o lúmen do intestino é preenchido com exsudato de coloração marrom escuro, assemelhando-se a sangue misturado a fezes e, normalmente, com aspecto viscoso. Já nos casos subagudos, a mucosa é recoberta por uma pseudomembrana diftérica amarelada. Sob essa membrana há áreas de necrose focalmente extensas. Nos casos crônicos, também há um espessamento transmural com redução do lúmen intestinal (OLKOWSKI et al., 2006; COOPER et al., 2013).

Em casos subclínicos, as lesões consistem em pequenas ulcerações na mucosa, medindo entre 1 a 2 mm até 2 a 5 mm de diâmetro, com hiperemia periférica e material amarelado parcialmente aderido sobre a mucosa (TRUSCOTT; AL-SHEIKHLY, 1977; GHOLAMIANDEHKORDI et al., 2007; COOPER et al., 2013). Essa forma da doença é

similar às lesões encontradas no presente estudo, onde 16% das amostras apresentaram-se semelhantes (grau 1). Hemorragia em placas de Peyer também podem estar associadas (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 2009). Já os casos classificados como grau 2, 23% e grau 3, 10,9% apresentaram alterações semelhantes aos casos descritos como subagudos.

Na avaliação histopatológica, as principais alterações consistiram em hemorragias e estruturas parasitárias compatíveis com *Eimeria* sp. As lesões microscópicas de EN são tipicamente caracterizadas por necrose da mucosa. Normalmente, restritas às vilosidades, caracterizadas por necrose de coagulação e descamação de células epiteliais. Conforme progride, ocorre infiltração de células inflamatórias delimitando a área necrótica, sendo que heterofilos e macrófagos são as células predominantes. No lúmen, pode-se encontrar restos celulares, bacilos e deposição de fibrina (COOPER et al., 2013). Apesar da similaridade entre as lesões macroscópicas encontradas no estudo e das descritas na literatura, a avaliação histopatológica não evidenciou lesões compatíveis com EN (OLKOWSKI et al., 2006; SCHOCKEN-ITURRINO et al., 2009).

Em aves experimentalmente infectadas com *C. perfringens* que apresentaram hemorragias em mucosa e placas de Peyer, no exame histopatológico demonstraram apenas hemorragias multifocais na lâmina própria e discreto infiltrado de linfócitos, heterofilos e macrófagos, não caracterizando as lesões da EN clínica (OLKOWSKI et al., 2006).

Alguns autores propuseram adotar o termo EN subclínica após realizarem diversos experimentos com *C. perfringens* e falhando ao reproduzir os sinais clínicos e lesões clássicos da EN. No entanto, possivelmente, as cepas utilizadas no passado não apresentavam o gene NetB, ainda não descrito como o principal fator de virulência dessa doença (TRUSCOTT; AL-SHEIKHLY, 1977; PRESCOTT et al., 1978; HAMDY et al., 1983; KALDHUSDAL; HOFSHAGEN, 1992). Porém ficou evidenciado que o diagnóstico da EN não deve ser baseado somente na observação das lesões macroscópicas e deve contar com o auxílio do exame histopatológico (OLKOWSKI et al., 2006).

Através da multiplex PCR para *C. perfringens* apenas 8,2% dos intestinos foram positivos para *C. perfringens* tipo A. Diversos estudos têm encontrado *C. perfringens* tipo A (*cpa*) como predominante nas aves domésticas (MEER; SONGER, 1997, YOO et al., 1997, GOMES et al., 2008). Na Europa, observou-se que *C. perfringens* tipo A foi encontrado tanto em aves sadias, quanto em aves apresentando EN (GHOLAMIANDEKHORDI et al., 2006).

A toxina alfa, produzida por *C. perfringens* tipo A foi considerada durante muitos anos como a principal causadora da EN em aves domésticas, mas seu papel foi questionado, visto que uma nova toxina foi encontrada (KEYBURN et al., 2008; COOPER et al., 2013). Em

2008, foi criado um mutante nulo da toxina alfa a partir de um isolado de EN virulento, e este ainda causou a doença (KEYBURN et al., 2008). Dessa forma, através do sequenciamento genômico desse mutante nulo foi designada como toxina NetB (*Necrotic Enteritis Toxin B-like*) (KEYBURN et al., 2008).

Diversos estudos foram realizados em busca de evidências e foi observado que cepas de *C. perfringens* de galinhas que sofrem de EN produzem a toxina NetB. Além disso, experimentalmente essas cepas foram capazes de expressar NetB *in vitro*, fornecendo evidências suficientes de que o NetB é um fator de virulência essencial na patogênese da EN (MARTIN; SMYTH 2009; KEYBURN et al., 2010; ALLAART et al., 2012; ENGSTRÖM et al., 2012; LI et al., 2017).

Não foi possível encontrar a toxina NetB nas amostras analisadas no presente estudo. No Brasil, ainda não existem relatos sobre a presença de NetB nos isolados de *C. perfringens* em frangos de corte. Acredita-se que muitos casos de EN sejam diagnosticados erroneamente baseados apenas na observação de alterações macroscópicas, que podem ser confundidas com diversas doenças entéricas (COOPER et al., 2013).

Há uma grande variedade de doenças, tanto bacterianas, virais ou parasitárias, que podem se assemelhar na apresentação dos sinais clínicos e lesões, causando assim confusão e dificuldade em seu diagnóstico. Dessa forma, a diferenciação entre *C. perfringens* e outras doenças entéricas são fundamentais para diagnosticar, diferenciar, prevenir e tratar a enfermidade (COOPER et al., 2013).

Infecções por outras espécies de *Clostridium* também podem se assemelhar a EN, por exemplo, a enterite ulcerativa (EU) causada pelo *C. colinum* e a infecção por *C. sordelli* que podem causar uma doença semelhante à EN em frangos de corte (COOPER et al., 2013; RIMOLDI et al., 2015). Outras infecções bacterianas como a salmonelose, pasteurelose e a infecção por *Brachyspira* sp. levam à tifite fibrino-necrótica, porém o conjunto de sinais clínicos e lesões os distinguem da EN (SHIVAPRASAD; DUHAMEL 2005; NEMES et al., 2006; GLISSON et al., 2013; UZAL et al., 2016).

A Doença de Newcastle causada pelo Paramixovírus aviário tipo I (APMV-1) é uma doença viral que pode causar hemorragias e ulcerações nas placas de Peyer e tonsilas cecais (MILLER; KOCH, 2013). Já a histomoníase, causada pelo protozoário *Histomonas meleagridis* é uma doença parasitária que acomete uma série de galináceas, mas é mais importante em perus e faisões. As lesões são caracterizadas por tifite fibrinonecrótica ou hemorrágica, mas é facilmente diferenciada através do exame histopatológico (SENTÍES-CUÉ et al., 2009; MCDOUGALD, 2005).

A coccidiose é a doença mais importante como diagnóstico diferencial da EN subclínica. Muitos estudos levam em consideração o papel crucial da *Eimeria* sp. no desenvolvimento da EN, de forma isolada ou multifatorial (GHOLAMIANDEHKORDI et al., 2007; COLLIER et al., 2008; LEE et al., 2011; BONA et al., 2012; COOPER et al., 2013; PRESCOTT et al., 2016; UZAL et al., 2016).

Experimentalmente, mostrou-se que bactérias mucolíticas estão em maior abundância quando grupos infectados com *E. acervulina*, *E. maxima* e *C. perfringens*. Além disso, as contagens de *C. perfringens* produtores de alfa toxina, também foram maiores nesses grupos em comparação ao grupo controle e ao grupo que recebeu narasina (COOLIER et al., 2008). Dessa forma, a positividade de 30/32 lotes para coccidiose no presente estudo poderia ser um fator desencadeante da EN, no entanto a avaliação histopatológica e a negatividade para o gene NetB, excluíram a EN como causadora das lesões intestinas observadas.

As lesões sugestivas de EN foram encontradas principalmente no jejuno, onde classicamente é possível observar lesões hemorrágicas devido a infecção por *E. maxima* e *E. necatrix*. Nesse segmento intestinal, o maior dano tecidual pela *E. maxima* ocorre no momento da reprodução sexuada, onde a formação de macrogametócitos de localização subepitelial, próximo a vasos sanguíneos com consequentes hemorragias e perdas de fluidos no local (MCDOUGALD, 2003).

A coccidiose apresentou predominantemente grau 1 de lesão, tanto na macroscopia, quanto na histopatologia e isso pode corroborar com a não ocorrência da EN, visto que existe a necessidade de extensas lesões na mucosa intestinal, para que se desenvolva uma resposta exacerbada de produção de muco, facilitando assim a multiplicação de *C. Perfringens* (COLLIER et al., 2008; LEE et al., 2011; COOPER et al., 2013).

Dessa forma as lesões encontradas no intestino delgado, podem ser derivadas de lesões macroscópicas atípicas de coccidiose, que não estão presentes no escore de lesão macroscópica utilizado até os dias atuais e também, subjetiva quanto ao grau de patogenicidade, visto que não foram observadas lesões compatíveis com outras doenças.

5.5 CONCLUSÃO

Foram encontrados 93,75% (30/32) lotes positivos para coccidiose, sendo as lesões observadas, classificadas predominantemente como grau 1, tanto no escore de lesão macroscópico quanto na avaliação histopatológica.

A avaliação histopatológica foi relevante para a confirmação diagnóstica da coccidiose em frangos de corte. O método tradicional de avaliação de lesões macroscópicas mostrou-se desatualizado, demonstrando elevada variação entre o escore de lesão macroscópico e microscópico.

Já o diagnóstico molecular (PCR) para identificação das espécies de *Eimeria* não se mostrou eficaz, evidenciando uma positividade muito inferior ao esperado, quando comparado à histologia, sugerindo uma baixa sensibilidade do teste. Além disso, a coleta do conteúdo intestinal no abatedouro com as aves em jejum resultou em baixo volume de amostra e oocistos. Dessa forma, evidencia-se a importância da associação de diferentes métodos de diagnóstico para se obter resultados diagnósticos confiáveis.

As lesões macroscópicas observadas não caracterizaram EN. No entanto, as lesões atípicas encontradas podem ser decorrentes da alta infecção por *Eimeria* sp. nos lotes, visto que na avaliação histopatológica, não foram encontradas áreas de necrose da mucosa, quadro característico da EN e, ausência do gene NetB de amostras de *C. perfringens*.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., et al. **Robbins Patologia Básica**. Elsevier Brasil, 2008.

ALLAART, J. G. et al. NetB-producing and beta2-producing *Clostridium perfringens* associated with subclinical necrotic enteritis in laying hens in the Netherlands. **Avian Pathology**, v. 41, n. 6, p. 541-546, 2012.

BONA, T. D. M. M. et al. Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de *Salmonella*, *Eimeria* e *Clostridium* em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 5, p. 411-418, 2012.

CHAPMAN, H. D. Milestones in avian coccidiosis research: a review. **Poultry Science**, v. 93, n. 3, p. 501-511, 2014.

COLLIER, C. T. et al. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 122, n. 1-2, p. 104-115, 2008.

CONWAY, D. P. et al. Effects of different levels of oocyst inocula of *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, and *E. maxima* on plasma constituents, packed cell volume, lesion scores, and performance in chickens. **Avian Diseases**, v. 37, n. 1, p. 118-123, 1993.

CONWAY, D. P.; DAYTON, A. D.; MCKENZIE, M. E. Comparative testing of anticoccidials in broiler chickens: the role of coccidial lesion scores. **Poultry Science**, v. 78, n. 4, p. 529-535, 1999.

CONWAY, D. P; MCKENZIE, E. M. **Poultry coccidiosis**: diagnostic and testing procedures. 3 ed. Iowa: Blackwell Publishing Professional, 2007. 168 p.

COOPER, K. K.; SONGER, J. G.; UZAL, F. A. Diagnosing clostridial enteric disease in poultry. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 3, p. 314–327, 2013.

DEPLANCKE, B. et al. Selective growth of mucolytic bacteria including *Clostridium perfringens* in a neonatal piglet model of total parenteral nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 5, p. 1117-1125, 2002.

ENGSTRÖM, B. E. et al. Genetic relatedness and netB prevalence among environmental *Clostridium perfringens* strains associated with a broiler flock affected by mild necrotic enteritis. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 1-2, p. 260-264, 2012.

GHARAIBEH, S.; AL-RIFAI, R.; AL-MAJALI, A. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from broiler chickens. **Anaerobe**, v. 16, p. 586–589, 2010.

GHOLAMIANDEHKORDI, A. R. et al. Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. **Avian Pathology**, v. 36, p. 375-382, 2007.

GIL DE LOS SANTOS, J. R.; CONCEIÇÃO, F. R.; GIL-TURNES, C. Enterite necrótica aviária. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 2076-2082, 2008.

GLISSON, J. R.; HOFACRE, C. L.; CHRISTENSEN, J. P. Fowl cholera. In: SWAYNE, D. E.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SUAREZ, D. L.; NAIR, V. (Eds). **Diseases of Poultry**. 13th ed. Ames: Wiley- Blackwell, 2013. p. 807–823.

GOODWIN, M. A. et al. Clinical application of a light microscopic scoring method to make decisions regarding the pharmacotherapy of an *Eimeria maxima* abatement programme. **Avian Pathology**, v. 28, n. 3, p. 305-308, 1999.

GYÖRKE, A. et al. The economic impact of infection with *Eimeria* spp. in broiler farms from Romania. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, n. 5, p. 273-280, 2016.

HAMDY, A. H. et al. Therapeutic effect of optimal lincomycin concentration in drinking water on necrotic enteritis in broilers. **Poultry Science**, v. 62, n. 4, p. 589-591, 1983.

HAUG, A. et al. Coccidial infections in commercial broilers: epidemiological aspects and comparison of *Eimeria* species identification by morphometric and polymerase chain reaction techniques. **Avian Pathology**, v. 37, n. 2, p. 161-170, 2008.

IDRIS, A. B. et al. Lack of correlation between microscopic lesion scores and gross lesion scores in commercially grown broilers examined for small intestinal *Eimeria* spp. coccidiosis. **Avian Diseases**, v. 41, p. 388-391, 1997.

JOHNSON, J.; REID, W. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. **Experimental Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 30-36, 1970.

KALDHUSDAL, M.; HOFSHAGEN, M. Barley inclusion and avoparcin supplementation in broiler diets. 2. Clinical, pathological, and bacteriological findings in a mild form of necrotic enteritis. **Poultry Science**, v. 71, p. 1145-1153, 1992.

KAWAZOE, U. Coccidiose. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, E. D. I.; SESTI, L; ZUANAZE, M. A. F. (Eds). **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: FACTA, 2009. p. 837-855.

KAWAZOE, U. et al. Characterisation and histopathological observations of a selected Brazilian precocious line of *Eimeria acervulina*. **Veterinary Parasitology**, v. 131, n. 1-2, p. 5-14, 2005.

KEYBURN, A. L. et al. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6496-6500, 2006.

KEYBURN, A. L. et al. Association between avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* strains expressing NetB toxin. **Veterinary Research**, v. 41, n. 2, p. 1-8, 2010.

KEYBURN, A. L.; BOYCE, J. D.; VAZ, P. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. **PLoS Pathogens**, v. 4, p. 26, 2008.

LEE, K. W. et al. Avian necrotic enteritis: experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. **Poultry Science**, v. 90, n. 7, p. 1381-1390, 2011.

LONG, J. R.; PETTIT, J. R.; BARNUM, D. A. Necrotic enteritis in broiler chickens. II. Pathology and proposed pathogenesis. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 38, p. 467-474, 1974.

LONG, P. L. et al. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. **Folia Veterinaria Latina**, v. 6, n. 3, p. 201 – 217, 1976.

LONG, P. L.; JOYNER, L. P. Problems in the identification of species of *Eimeria*. **Journal of Protozoology**, v. 31, n. 4, p. 535-541, 1984.

LONG, P. L.; REID, W. M. A guide for the diagnosis of coccidiosis in chickens. Georgia, 1982. 17 p.

LOVLAND, A.; KALDHUSDAL, M. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens*-associated hepatitis. **Avian Pathology**, v. 30, p. 73-81, 2001.

LUCHESE, F.C. et al. Prevalência de espécies de *Eimeria* em frangos de criação industrial e alternativa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 2, p. 81-86, 2007.

MARTIN, T. G.; SMYTH, J. A. Prevalence of netB among some clinical isolates of *Clostridium perfringens* from animals in the United States. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 202-205, 2009.

MCDougald, L. Blackhead disease (histomoniasis) in: Poultry: a critical review. **Avian Diseases**, v. 49, n. 4, p. 462-476, 2005.

MCDougald, L. R. Protozoal infections. In: SAIF Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDougald, L. R.; SWAYNE, D. E. (Eds). **Disease of Poultry**. 11 ed. Iowa: Iowa State University Press, 2003. p. 973-1023.

MEER, R. R.; SONGER, J. G. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, p. 702-705, 1997.

MEIRELES, M.V. Coccidiose aviária. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. (Eds). **Patologia Aviária**. p. 310-318. 2009.

MILLER, P. J.; KOCH, G. Newcastle disease. In: SWAYNE, D. E.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SUAREZ, D. L.; NAIR, V. (Eds). **Diseases of Poultry**. 13th ed. Ames: Wiley- Blackwell, 2013. p. 89–107.

MORAES, J. C. et al. Prevalence of *Eimeria* spp. in broilers by Multiplex PCR in the Southern Region of Brazil on Two Hundred and Fifty Farms. **Avian Diseases**, v. 59, p. 277–281, 2015.

MORRIS, G. M. et al. The application of a polymerase chain reaction (PCR)-based capillary electrophoretic technique provides detailed insights into *Eimeria* populations in intensive poultry establishments. **Molecular and Cellular Probes**, v. 21, p. 288-294, 2007.

NEMES, C. S. et al. Typhlocolitis associated with spirochaetes in goose flocks. **Avian Pathology**, v. 35, n. 1, p. 4-11, 2006.

OLKOWSKI, A. A. et al. Responses of broiler chickens orally challenged with *Clostridium perfringens* isolated from field cases of necrotic enteritis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 99–108, 2006.

PRESCOTT, J. F. et al. The pathogenesis of necrotic enteritis in chickens: what we know and what we need to know: a review. **Avian Pathology**, v. 45, n. 3, p. 288-294, 2016.

PRESCOTT, J. F.; SIVENDRA, R.; BARNUM, D. A. The use of bacitracin in the prevention and treatment of experimentally-induced necrotic enteritis in the chicken. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 19, n. 7, p. 181, 1978.

RIMOLDI, G. et al. Necrotic enteritis in chickens associated with *Clostridium sordellii*. **Avian Diseases**, v. 59, n. 3, p. 447-451, 2015.

SENTÍES-CUÉ, G; CHIN, R. P.; SHIVAPRASAD, H. L. Systemic histomoniasis associated with high mortality and unusual lesions in the bursa of Fabricius, kidneys, and lungs in commercial turkeys. **Avian Diseases**, v. 53, n. 2, p. 231-238, 2009.

SHIVAPRASAD, H. L.; DUHAMEL, G. E. Cecal spirochetosis caused by *Brachyspira pilosicoli* in commercial turkeys. **Avian Diseases**, v. 49, n. 4, p. 609-613, 2005.

SMYTH, J. A.; MARTIN, T. G. Disease producing capability of netB positive isolates of *C. perfringens* recovered from normal chickens and a cow, and netB positive and negative isolates from chickens with necrotic enteritis. **Veterinary Microbiology**, v. 146, p. 76–84, 2010.

TRUSCOTT, R.B.; AL-SHEIKHLY, F. Reproduction and treatment of necrotic enteritis in broilers. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, p. 857–861, 1977.

UZAL, F. A. et al. Non-*Clostridium perfringens* infectious agents producing necrotic enteritis-like lesions in poultry. **Avian Pathology**, v. 45, n. 3, p. 326-333, 2016.

VIEIRA, A. A. S. **Padronização e aplicação da PCR Multiplex na tipificação de *Clostridium perfringens* isolados de suínos diarréicos.** 2006. 34 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Área: Medicina Veterinária Preventiva) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

YOO, H. S. et al. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 228-232, 1997.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da realização desses dois estudos foi possível concluir que a coccidiose é uma doença comum nos lotes de frangos de corte, apresentando alta ocorrência em diferentes idades das aves. No primeiro estudo observou-se que a ocorrência de coccidiose em 100% (28/28) dos lotes na fase final da produção e no estudo 2 em 93,75% (30/32).

Eimeria acervulina demonstrou ser mais comum em aves jovens, com idade entre três e quatro semanas de vida. Já *E. tenella* apresentou lesões acentuadas na fase final de produção do frango de corte, com idade próxima a cinco semanas. Isso demonstra a importância de se realizar monitorias sanitárias em diferentes momentos da vida do lote. Só assim será possível identificar corretamente as espécies envolvidas e escolher um melhor plano de prevenção e tratamento.

A avaliação histopatológica demonstrou-se melhor para a avaliação de coccidiose em frangos de corte, possibilitando identificar maior número de aves infectadas em relação ao escore de lesão macroscópico. Este se mostrou desatualizado e insuficiente para o diagnóstico da coccidiose, visto que foram observadas lesões atípicas que inicialmente não foram classificadas.

O PCR realizado para a identificação das espécies de *Eimeria* não foi satisfatório, pois apresentou resultados inferiores aos observados na avaliação macroscópica e histopatológica. Já a identificação dos oocistos através da avaliação morfológica e morfométrica demonstraram-se eficaz, apresentando resultados satisfatórios, que são coerentes com os demais exames.

O conteúdo intestinal demonstrou-se eficaz para a busca de oocistos de *Eimeria*, possibilitando a identificação de seis espécies de *Eimeria* presentes nos lotes de frangos de corte avaliados. Porém, a cama de aviário apresentou resultados inferiores, dessa forma, não é indicada para a avaliação da coccidiose nos lotes.

Não foram encontrados lotes positivos para *Salmonella*, possivelmente devido as boas condições de biosseguridade encontradas nas granjas e o bom manejo sanitário. Foi observado infecção bacteriana causando lesões extra intestinais como peritonite, aerossaculite, hepatite e peri-hepatite, porém não foi houve relação com a positividade de coccidiose.

As lesões macroscópicas observadas no estudo 2 não caracterizaram EN subclínica, pela ausência do gene netB, importante fator de virulência para o desenvolvimento da doença e, pelas lesões histopatológicas incompatíveis. No entanto, essas lesões atípicas encontradas podem ser decorrentes da infecção por *Eimeria* sp.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINO, L. F. T.; TAVERNARI, F. C. **Produção e Manejo de Frangos de Corte**. Minas Gerais: Editora UFV, 2012.

ALLEN P. C.; FETTERER R. H. Recent advances in biology of *Eimeria* species and diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p.58-65, 2002.

ANDREATTI FILHO, R. L. et al. Pesquisa de *Salmonella* spp. em suabes de arrasto provenientes de granjas avícolas. **Veterinária e Zootecnia**, v. 116, p. 190-194, 2009.

BARNES, H. J.; GROSS, W. B. Colibacilosis. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; MCDOUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. **Diseases of Poultry**, 10 Edição, Editora Ames, Iowa, p. 131 – 141, 1997.

BARROW, P. A. *Salmonella* - present, past and future. **Avian Pathology**, v. 22, p. 651- 699, 1993.

BERCHIERI JUNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, E. D. I.; SESTI, L; ZUANAZE, M. A. F. Doenças das aves. 2º. ed. Campinas-SP: FACTA. p. 837-855, 2009.

BEZERRA, W. G. A. et al. Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre a resistência microbiana. **Archives de Zootecnia**, v. 66, n. 254, p. 301-307, 2017.

BOYD, M. G.; LOGAN, M. A.; TYTELL, A. A. The growth requirements of *Clostridium perfringens* (welchii) BP6K. **Journal of Biological Chemistry**, v. 174, p. 1013–1025, 1948.

BROUSSARD, C. T. et al. Necrotic enteritis in cage-reared commercial layer pullets. **Avian Disease**, v. 30, n. 3, p. 617-619, 1986.

BUTAYE P.; DEVRIESE L. A.; HAESEBROUCK F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on Gram-positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 175-188, 2003.

CARDOSO, A. N. S. P. et al. Sorovares de *Salmonella* spp. isolados através de suabes de arrasto provenientes de aves reprodutoras comerciais durante o período de 2006 a 2010. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 1-27, 2013.

CARDOSO, A. N. S. P.; TESSARI, E. N. C. *Salmonella* Enteritidis em aves e na saúde pública: Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 1-27, 2013.

CARVALHO, F. S. et al. Diagnosis of *Eimeria* species using traditional and molecular methods in field studies. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 2-3, p. 95-100, 2011.

CASAGRANDE, R. A. et al. Caracterização anatomo-patológica e bacteriológica em frangos de corte condenados totalmente por colibacilose sob Serviço de Inspeção Federal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 9, p. 949-957, 2017.

CHAPMAN, H.D. Milestones in avian coccidiosis research: a review. **Poultry Science**, v. 93, n. 3, p. 501-511, 2014.

COLLIER, C. T. et al. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 122, n. 1-2, p. 104-115, 2008.

CONWAY, D. P.; MCKENZIE, E. M. **Poultry coccidiosis: diagnostic and testing procedures**. 3rd ed. Iowa, EUA: Blackwell Publishing Professional, 2007. 168 p.

COOPER, K. K.; GLENN SONGER, J.; UZAL, F. A. Diagnosing clostridial enteric disease in poultry. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 3, p. 314-327, 2013.

COSTA, C. A. F.; PEDROSO-DE-PAIVA, D. **Cultivo in vivo, in vitro e diagnóstico específico de *Eimeria* spp. de *Gallus gallus***. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2009. 219 p.

FERNANDEZ, S. et al. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven *Eimeria* species that infect domestic fowl. **Parasitology**, v. 127, p. 317-325, 2003.

FORTES, E. Protozoologia. In: **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. Rev. Ícone. São Paulo. cap. 2, 2004.

GAMBIRAGI, A. P. O. M. et al. *Salmonella* sp. em frangos de corte de um dia de idade na região metropolitana de Fortaleza - CE. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 149 -153, 2003.

GAZONI, F. L. et al. Coccidiosis prevalence and correlation with intestinal health of broilers in Brazilian agricultural industries between the years 2012 and 2014. **International Journal of Poultry Science**, v. 14, n. 9, p. 511, 2015.

GHARAIBEH, S.; AL-RIFAI, R.; AL-MAJALI, A. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from broiler chickens. **Anaerobe**, v. 16, p. 586-589, 2010.

GHOLAMIANDEKHORDI, A. R.; DUCATELLE, R.; HEYNDRICKX, M. Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. **Veterinary Microbiology**, v. 113, p. 143-152, 2006.

SANTOS, J. R.; CONCEIÇÃO, F. R.; GIL-TURNES, C. Enterite necrótica aviária. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 2076-2082, 2008.

HAUG, A. et al. Coccidial infections in commercial broilers: epidemiological aspects and comparison of *Eimeria* species identification by morphometric and polymerase chain reaction techniques. **Avian Pathology**, v. 37, n. 2, p. 161-170, 2008.

IDRIS, A. B. et al. Lack of correlation between microscopic lesion scores and gross lesion scores in commercially grown broilers examined for small intestinal *Eimeria* spp. coccidiosis. **Avian Diseases**, v. 41, p. 388-391, 1997.

JOHNSON, J.; REID, W. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. **Experimental Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 30-36, 1970.

KAWAZOE, U. Coccidiose. In: BERCHIERI JU. A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, E. D. I.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F (Eds). **Doenças das aves**. 2º. ed. Campinas-SP: FACTA. 2009. p. 837-855.

KAWAZOE, U.; FIGUEIREDO, A. C. Levantamento de coccidiose aviária em três granjas de frangos de corte da região de Campinas - São Paulo - Brasil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 42, p. 317-336, 1990.

KEYBURN, A. L.; BOYCE, J. D.; VAZ, P. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. **PLoS Pathog**, v. 4, p. 26, 2008.

KOINARSKI, V.; LYUTSKANOV, M.; URUMOVA, V. Effect of an experimental *Eimeria tenella* invasion upon an artificial *Salmonella* Typhimurium infection in broiler-chickens. **Veterinarski Arhiv**, v. 75, p. 349-357, 2005.

LAN, R.; REEVES, P. R.; OCTAVIA, S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. **Infection Genetics and Evolution**, v. 5, n. 9, p. 996-1005, 2009.

LONG, J. R.; PETTIT, J. R.; BARNUM, D. A. Necrotic enteritis in broiler chickens. II. Pathology and proposed pathogenesis. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 38, p. 467-474, 1974.

LONG, P. L.; REID, W. M. A guide for the diagnosis of coccidiosis in chickens. Georgia, 1982. p.17.

LONG, P. L; JOYNER, L. P. Problems in the identification of species of *Eimeria*. **Journal of Protozoology**, v. 31, n. 4, p. 535-541, 1984.

LOVLAND, A.; KALDHUSDAL, M. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens*-associated hepatitis. **Avian Pathology**, v. 30, p. 73-81, 2001.

LUCHESE, F.C. et al. Prevalência de espécies de *Eimeria* em frangos de criação industrial e alternativa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 2, p. 81-86, 2007.

MCDOUGALD, L. R. Protozoal infections. In: SAIF Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. (Eds). **Disease of Poultry**. 11 ed. Iowa: Iowa State University Press, 2003. p. 973-1023.

MEIRELES, M. V. Coccidiose aviária. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. (Eds). **Patologia Aviária**. 2009. p. 310-318.

MOLLOY, J. B. et al. Detection of *Eimeria acervulina* using the polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, v. 42, n. 1, p. 119-123, 1998.

MORAES, J. C. et al. Prevalence of *Eimeria* spp. in broilers by Multiplex PCR in the southern region of Brazil on two hundred and fifty farms. **Avian Diseases**, v. 59, p. 277-281, 2015.

MORRIS, G. M. et al. The application of a polymerase chain reaction (PCR)-based capillary electrophoretic technique provides detailed insights into *Eimeria* populations in intensive poultry establishments. **Molecular and Cellular Probes**, v. 21, p. 288-294, 2007.

NAGI, M.; MATHEY, W. Interaction of *Escherichia coli* and *Eimeria brunetti* in Chickens. **Avian Diseases**, v. 16, n. 4, p. 864-873, 1972.

NAKAMURA, K.; ISOBE, T.; NARITA, M. Dual infections of *Eimeria tenella* and *Escherichia coli* in chickens. **Research in Veterinary Science**, v. 49, n. 1, p. 125-126, 1990.

PEEK, H. W.; LANDMAN, W. J. M. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. **Veterinary Quarterly**, v. 31, n. 3, p. 143-146, 2011.

PETIT, L.; GILBERT, M.; POPOFF, M. R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. **Trends in Microbiology**, v. 7, p. 104-110, 1999.

PROCUNIER, J. D. et al. Species and strain differentiation of *Eimeria* spp. of the domestic fowl using DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers. **Parasitology Research**, v. 79, p. 98-102, 1993.

RAMOS, L. S. N.; LOPES, J. B.; SILVA, S. M. M. S. Desempenho e histomorfometria intestinal de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade recebendo melhoradores de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 8, p. 1738-1744, 2011.

SCHNITZLER, B. E.; SHIRLEY, M. W. Immunological aspects of infections with *Eimeria maxima*: a short review. **Avian Pathology**, v. 28, p. 537-543, 1999.

SCHNITZLER, B. E. et al. Development of a diagnostic PCR assay for the detection and discrimination of four pathogenic *Eimeria* species of the chicken. **Avian Pathology**, v. 27, n. 5, p. 490-497, 1998

SMYTH, J. A.; MARTIN, T. G. Disease producing capability of netB positive isolates of *C. perfringens* recovered from normal chickens and a cow, and netB positive and negative isolates from chickens with necrotic enteritis. **Veterinary Microbiology**, v. 146, p. 76-84, 2010.

VAN IMMERSEEL, F. et al. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian Pathology**, v. 33, n. 6, p. 537-549, 2004.

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

YOU, M. J. Detection of four important *Eimeria* species by multiplex PCR in a single assay. **Parasitology International**, v. 63, n. 3, p. 527-532, 2014.

ZULPO, D. L. et al. Pathogenicity and histopathological observations of commercial broiler chicks experimentally infected with isolates of *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *E. maxima*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 97-104, 2007.

8 ANEXOS

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Eu, _____ declaro que concordo em participar como colaborador no fornecimento de animais para as atividades previstas no projeto "Avaliação da coccidiose em frangos de corte e sua possível associação com infecções bacterianas secundárias". Afirmo que fui informado (a) de maneira clara e detalhada sobre os objetivos e metodologia do projeto proposto e esclareci minhas dúvidas, estando ciente que a qualquer momento, poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão sobre esta colaboração, se assim o desejar. Neste termo, fica acordado que: todos os dados deste projeto serão tornados de meu conhecimento: minha participação não acarretará em custos além do fornecimento de animais na condição supracitada, e que não receberei nenhuma compensação financeira em caso de haver óbito, invalidez temporária ou permanente do(s) animal(ais) em estudo, seja por parte da professora responsável, do grupo de pesquisa a que pertence ou da própria Universidade de Estado de Santa Catarina. Também estou ciente que será necessário a eutanásia e necropsia dos animais cedidos. Assim sendo, declaro que concordo em participar desse projeto permitindo que meus animais sejam utilizados, conforme quantidade e características descritas a seguir:

Espécie: *Gallus gallus domesticus*

Finalidade: Frango de corte

Idade: entre 21 dias e 42 dias.

Quantidade: 10 aves

Local:

Data:

Nome: _____

Assinatura do Participante: _____

Nome: Renata Assis Casagrande

Assinatura do Pesquisador: _____

ANEXO B – QUESTIONÁRIO



Avaliação da coccidiose em frangos de corte e sua possível associação com infecções secundárias.

Lote: _____ Coleta: _____

Data: ____ / ____ / ____

1. Identificação do avicultor

• Nome completo:
• Localidade:
• Município:
• Telefone para contato: () _____ - _____
• Email:
• Empresa: 0 - verde () 1 - amarela ()

2. Dados do aviário

Número de aviários:
Ano de construção do galpão:
Quantos m ² por aviário:
Possui cercado externo: 0 - Não () 1 - Sim ()
Há animais em torno no galpão: 0 - Não () 1 - Sim ()
Quais:
Portões fechados: 0 - Não () 1 - Sim ()
Existem veículos no pátio: 0 - Não () 1 - Sim ()
Possui arco de desinfecção: 0 - Não () 1 - Sim ()
O arco de desinfecção funciona: 0 - Não () 1 - Sim ()
Possui escritório: 0 - Não () 1 - Sim ()
Possui banheiro: 0 - Não () 1 - Sim ()
Aberturas possuem tela: 0 - Não () 1 - Sim ()
Possui tela anti-passaros: 0 - Não () 1 - Sim ()
Possui lonas externas integras: 0 - Não () 1 - Sim ()
Possui silo metálico: 0 - Não () 1 - Sim ()
Possui controle de roedores: 0 - Não () 1 - Sim ()
Possui controle de cascudinhos: 0 - Não () 1 - Sim ()
Possui controle visitas: 0 - Não () 1 - Sim ()
Possui composteira: 0 - Não () 1 - Sim ()
Possui cloro na água: 0 - Não () 1 - Sim ()
Origem da água: 0 - Poço artesiano () 1 - fonte () 2 - fonte protegida () 3 - cisterna ().
Quantas pessoas trabalham no aviário:
Há calçado específico: 0 - Não () 1 - Sim ()
Outra atividade econômica na propriedade: 0 - Não () 1 - Sim (). Qual:
Tipo de comedouro: 0 - Automático () 1 - Manual ().

Tipo de bebedouro: 0 - Nipple () 1 - Pendular ()

A ficha de acompanhamento do lote está preenchida
corretamente: 0 - Não () 1 - Sim ()

3. Dados do lote de aves

Idade do lote:
Data alojamento:
Densidade de alojamento: _____ m ²
Matriz origem:
Linhagem:
Sexo: () Macho () Fêmea () Misto
Número total de aves alojadas:
Número de aves por instalação:
Mortalidade semanal do lote:
07 dias: _____ 14 dias: _____
21 dias: _____ 28 dias: _____
35 dias: _____ 42 dias: _____
49 dias: _____ Total: _____
Histórico de doenças no lote: 0 - Não () 1 - Sim () Qual?
Lote apresentou diarréia? 0 - Não () 1 - Sim ()
Se sim, com qual idade do lote:
Algum tratamento realizado:
Houve melhora no quadro:
O lote apresentou aumento da mortalidade 0 - Não () 1 - Sim ().
Qual o diagnóstico:
Apresentou desuniformidade ou queda no desempenho: 0 - Não () 1 - Sim ().
Qual o diagnóstico:
O lote foi medicado para outra doença? 0 - Não () 1 - Sim ().
Em qual idade:
Qual medicação, dose e dias:
Lotes anteriores já apresentaram esses problemas citados acima? 0 - Não () 1 - Sim ().
Qual o diagnóstico?
Realizado tratamento de cama no intervalo entre lotes? 0 - Não () 1 - Sim ().
Qual:
Qual destino da cama 0 - Adubo (); 1 - Venda (); 2 - Outro (), qual?
Onde é comprada a maravilha:

Avaliação da coccidiose em frangos de corte e sua possível associação com infecções secundárias.

Qual a altura da cama, em cm?	49 dias: _____ Total: _____
Quantos lotes na mesma cama?	Histórico de doenças após a primeira coleta: 0 - Não (); 1 - Sim ().
Período de vazio sanitário (dias):	Qual: Lote apresentou diarreia: 0 - Não (); 1 - Sim ().
Avaliação visual da qualidade da cama: 0-Ruim (); 1-Regular (); 2-Boa ().	Apresentou passagem de alimento nas fezes: 0 - Não (); 1 - Sim ().
No intervalo de lote é realizada lavação: 0 - Não (); 1 - Sim ().	Apresentou diarreia com sangue: 0 - Não (); 1 - Sim ().
No intervalo de lote é realizada desinfecção: 0 - Não (); 1 - Sim ().	Se sim, com qual idade do lote:
Limpeza de silo: 0 - Não () 1 - Sim ()	Algum tratamento realizado:
Limpeza de composteira: 0 - Não () 1 - Sim ()	Aumento da mortalidade após a 1ª coleta: 0 - Não (); 1 - Sim ().
Roedores: Intensidade de fezes no entorno do aviário: 0 - Ausência (); 1 - baixa (); 2 - Moderada (); 3 - Acentuada ().	Se sim, qual diagnóstico:
Roedores: Presença de iscas: 0 - Ausência (); 1 - Presente ().	Desuniformidade ou queda no desempenho após a primeira coleta: 0 - Não (); 1 - Sim ().
Roedores: Situação das iscas: 0 - Integras (); 1 - Consumidas ().	Se sim, qual diagnóstico:
Cascudinhos: Intensidade de cascudinhos na cama: 0 - Ausência (); 1 - baixa (); 2 - Moderada (); 3 - Acentuada ().	O lote foi medicado após a 1º coleta: 0 - Não (); 1 - Sim ().
Composteira: Qualidade do manejo: 0 - Ruim (); 1- Regular (); 2 -Boa ().	Se sim, qual idade:
Lote: _____ Coleta: _____	Qual medicação, dose e dias de tratamento:
Data: _____ / _____ / _____	Qual a altura da cama, em cm:
A ficha de acompanhamento do lote está preenchida corretamente: 0 - Não () 1 - Sim ().	Avaliação visual da qualidade da cama: 0-Ruim (); 1-Regular (); 2-Boa ().
Aberturas possuem tela: 0 - Não () 1 - Sim ()	Roedores: Intensidade de fezes no entorno do aviário: 0 - Ausência (); 1 - baixa (); 2 - Moderada (); 3 - Acentuada ().
Portões fechados: 0 - Não () 1 - Sim ()	Roedores: Presença de iscas: 0 - Ausência (); 1 - Presente ().
Existem veículos no pátio: 0 - Não () 1 - Sim ()	Roedores: Situação das iscas: 0 - Integras (); 1 - Consumidas ().
O arco de desinfecção funciona: 0 - Não () 1 - Sim ()	Cascudinhos: Intensidade de cascudinhos na cama: 0 - Ausência (); 1 - baixa (); 2 - Moderada (); 3 - Acentuada ().
Há animais em torno no galpão: 0 - Não () 1 - Sim ()	Composteira: Qualidade do manejo: 0 - Ruim (); 1- Regular (); 2 -Boa ().
Quais:	Alterações vistas na segunda visita:
Há outras pessoas no pátio ou no aviário, que não sejam os proprietários: 0 - Não () 1 - Sim ()	_____
4. Dados do lote de aves	
Idade do lote	_____
Há cloro na água	_____
Mortalidade semanal do lote:	_____
07 dias: _____ 14 dias: _____	_____
21 dias: _____ 28 dias: _____	_____
35 dias: _____ 42 dias: _____	_____