

**PATRÍCIA WARZENSAKY GOTTARDO BALESTRIN**

**PREVALÊNCIA DE *Eimeria* sp. EM AVIÁRIOS DE FRANGOS DE CORTE COM  
PRESSÃO POSITIVA E PRESSÃO NEGATIVA, NO ESTADO DE SANTA  
CATARINA**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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)**

Balestrin, Patricia Warzensaky Gottardo

Prevalência de *Eimeria* sp. em aviários de frangos de corte com  
pressão positiva e pressão negativa, no estado de Santa Catarina /  
Patricia Warzensaky Gottardo Balestrin. -- 2020.

82 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. Coccidiose. 2. Oocistos. 3. Diagnóstico. 4. Aves. 5. Doença  
entérica. I. Casagrande, Renata Assis. II. Universidade do Estado  
de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa  
de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

**PATRÍCIA WARZENSAKY GOTTARDO BALESTRIN**

**PREVALÊNCIA DE *Eimeria* sp. EM AVIÁRIOS DE FRANGOS DE CORTE  
COM PRESSÃO POSITIVA E PRESSÃO NEGATIVA, NO ESTADO DE SANTA  
CATARINA**

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

**Banca Examinadora**

Renata Assis Casagrande

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Assis Casagrande

Orientadora

Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

**Membros:**

Cláudia Pies Biffi

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Pies Biffi  
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Francielli Cordeiro Zimermann

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Francielli Cordeiro Zimermann  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

**Lages - SC, 28 de fevereiro de 2020**



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela força concedida para seguir meus sonhos e a serenidade para concluir este trabalho.

À minha mãe Zenilda e aos meus avós Pedro (em memória) e Estefânia, os quais não mediram esforços para ajudar-me em todas as etapas da minha vida. O amor que sinto por vocês é imensurável. E, a todas as pessoas da minha família e aos amigos pelas orações e pelo carinho.

Ao Eder, meu marido, obrigada por sempre estar ao meu lado nos momentos de alegria e dificuldades, pelo companheirismo e pelo incentivo para eu concluir este objetivo. Amo você!

Agradeço a minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Assis Casagrande, pela oportunidade de participar do programa de pós-graduação. Seus ensinamentos contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu amadurecimento profissional. Obrigada por me acolher de forma tão carinhosa, por toda a atenção e paciência nestes anos.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Ciência Animal – UDESC por dividirem seus conhecimentos e, em especial ao Prof.<sup>o</sup> Dr. Anderson Barbosa de Moura, pelo apoio e confiança.

Agradeço a ajuda de todos os graduandos e pós-graduandos do Laboratório de Patologia Animal. Mesmo com toda a distância, conseguimos finalizar este trabalho. O auxílio de vocês foi fundamental.

Agradeço profundamente a cada um que de alguma forma colaborou para a realização desta conquista. Muito obrigada!



## RESUMO

A coccidiose é uma doença entérica causada por protozoários do gênero *Eimeria* e de grande importância econômica na avicultura industrial. O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de *Eimeria* sp. em aviários de frangos de corte com diferentes tipos de climatização e caracterizar as lesões de *Eimeria* através da avaliação macroscópica, histopatológica e molecular e também comparar a eficácia destas técnicas. Realizou-se um estudo transversal em 32 aviários com ventilação por pressão positiva (sistema 1) e 32 aviários por pressão negativa (sistema 2) em frangos de corte com 29 dias, provenientes de um abatedouro sob Serviço de Inspeção Federal na Mesorregião Oeste de Santa Catarina. Em cada lote foram retirados aleatoriamente oito frangos da linha de abate, totalizando 512. Realizou-se a avaliação dos intestinos, os quais foram classificados na macroscopia e histopatologia em grau de 0 a 4, sendo grau 0 ausência de lesões e grau 4 lesões mais acentuadas e, no conteúdo intestinal pesquisou-se por reação em cadeia da polimerase (PCR) as sete espécies de *Eimeria*. Cada lote avaliado foi considerado positivo para *Eimeria* sp. quando houve a visualização do parasita na histologia em qualquer segmento intestinal e/ou PCR positivo. A prevalência de *Eimeria* sp. foi de 90,63% (58/64) (95% IC: 97,77-83,49) com 93,75% (95% IC: 100-85,36) para o sistema 1 e com 87,50% (95% IC: 98,96-76,04) para o sistema 2. Na combinação de espécies, a mais prevalente foi *Eimeria acervulina* associada com *E. maxima* e *E. tenella*, onde o sistema 1 obteve maior positividade. O teste de concordância entre a macroscopia e histologia se demonstrou com fraca correlação. Da mesma forma, as correlações das lesões macroscópicas e histopatológicas foram baixas com a PCR. Na comparação dos graus de macroscopia e histopatologia, foram encontradas diferenças significativas entre o grau 0 e 1 e não houve diferença significativa no grau 2, já para o grau 3 houve diferença em duodeno, jejuno e cecos. Conclui-se que *Eimeria* sp. possui alta prevalência em ambos os sistemas de ambientes, com predomínio de infecções mistas. O diagnóstico macroscópico e a PCR do conteúdo intestinal podem gerar uma grande quantidade de falsos negativos e o exame histopatológico se demonstrou mais eficaz, tornando fundamental a associação de diferentes técnicas para o correto diagnóstico de *Eimeria* sp. em frangos de corte.

**Palavras-chaves:** coccidiose, oocistos, diagnóstico, aves, doença entérica.



## ABSTRACT

Coccidiosis is an enteric disease caused by protozoa of the *Eimeria* genus. It is a disease of great economic relevance in industrial aviculture. The goal of this project was to determine the prevalence of *Eimeria* sp. in broiler houses with different climatization equipment, and to characterize the *Eimeria* lesions through macroscopic, histologic and molecular evaluations. The efficacy of these techniques was also compared. A transversal study was performed in 32 poultry houses with positive pressure ventilation (system 1) and in 32 houses with negative pressure ventilation (system 2). Broilers were 29 days old at the time of evaluation. All samples were derived from a slaughterhouse that is inspected by the Federal Service, at the Western mesoregion of the Brazilian state of Santa Catarina. Eight broilers from each house were randomly removed from the slaughter line, in a total of 512 samples. Intestines were macro and microscopically classified into grades 0 (absence of lesions) to 4 (severe lesions). Oocysts from seven species of *Eimeria* were researched in intestinal contents by polymerase chain reaction (PCR). Flocks were considered positive for *Eimeria* sp. when the parasite could be visualized in histology and/or when the PCR was positive. The total prevalence of *Eimeria* sp. was of 90.63% (58/64) (95% CI: 97.77-83.49). Prevalence for system 1 was of 93.75% (95% CI: 100-85.36) and for system 2 was of 87.50% (95% CI: 98.96-76.04). The most prevalent species were *Eimeria acervulina* associated with *E. maxima* and *E. tenella*. System 1 had the highest positivity for these species. The tests of macroscopy and histology were poorly correlated. Accordingly, macroscopic lesion analysis and histology were poorly correlated with PCR. In the comparison between macroscopy and histology, there were significative differences between grades 0 and 1 and there were no differences on grade 2. For grade 3, there were significative differences in duodenum, jejunum and cecum. It can be concluded that *Eimeria* sp. is highly prevalent with both ventilation systems, with predominance of mixed infections. The macroscopic diagnostic and PCR of intestinal contents may yield high numbers of false negatives. The histopathology analysis proved to be the most efficacious method. This work demonstrates the importance of the association of different methods for the correct diagnosis of *Eimeria* sp. infection in broilers.

**Keywords:** coccidiosis, oocysts, diagnostics, poultry, enteric disease.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Avaliação macroscópica de *Eimeria* sp. em frangos de corte: (A) *E. acervulina* grau 1 em duodeno com estrias brancas dispersas na mucosa. (B) *E. acervulina* grau 2, mucosa com estrias brancas não coalescentes. (C) *E. acervulina* grau 3 com parede intestinal engrossada, estrias brancas abundantes e coalescentes. (D) *E. maxima* grau 1 em jejuno com petéquias dispersas na serosa. (E) *E. maxima* grau 2 com espessamento da parede intestinal e muco alaranjado. (F) *E. maxima* grau 3, parede intestinal com embalonamento e espessamento, com petéquias em grande quantidade na serosa e conteúdo intestinal avermelhado no lúmen. (G) *E. tenella* grau 1 em ceco com petéquias dispersas na mucosa. (H) *E. brunetti* grau 1 em cólon com áreas avermelhadas na mucosa.....64
- Figura 2 - Caracterização histopatológica de *Eimeria* sp. no intestino delgado em frangos de corte: (A) Lesão grau 1 em duodeno com discreta quantidade de parasitos em menos de 10 vilosidades (cabeça de seta). No destaque observa-se oocisto imaturo (cabeça de seta amarela) e macrogameta (seta). (B) Lesão grau 2 em duodeno com moderada quantidade de oocistos imaturos em mais de 10 vilosidades (cabeça de seta amarela). (C) Lesão grau 1 em jejuno demonstrando um macrogameta (cabeça de seta). (D) Lesão grau 2 em jejuno com moderada quantidade de oocistos imaturos em menos de 10 vilosidades (cabeças de setas amarelas). Hematoxilina e eosina (HE).....65
- Figura 3 - Caracterização histopatológica de *Eimeria* sp. no ceco de frangos de corte: (A) Lesão grau 1 com discreta quantidade de parasitos (cabeça de seta preta) em menos de 10 criptas. No destaque observa-se oocistos imaturos (cabeça de seta amarela) e um esquizonte (seta). (B) Lesão grau 2 com moderada quantidade de oocistos imaturos em menos de 10 criptas (cabeça de seta). (C) Lesão grau 3 com grande quantidade de parasitos (cabeça de seta preta) em mais de 10 criptas. No destaque observa-se oocistos imaturos (cabeça de seta amarela). (D) Lesão grau 4 com mais de 80% das criptas repletas de microgametas (cabeça de seta preta), macrogametas (seta) e oocistos imaturos (cabeça de seta amarela). Hematoxilina e eosina (HE).....66



Quadro 1 - Descrição dos escores de lesões intestinais causadas por <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. necatrix</i> , <i>E. tenella</i> e <i>E. brunetti</i> em frangos de corte .....	30
Quadro 2 - “Primers Forward (F) e Reverse (R)”, 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), <i>E. necatrix</i> (nc) e o tamanho dos amplicons (TA).....	49



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalência das espécies de <i>Eimeria</i> em frangos de corte em aviários com ventilação por pressão positiva (sistema 1) e por pressão negativa (sistema 2) .....	52
Tabela 2 - Associação das diferentes espécies de <i>Eimeria</i> em frangos de corte em aviários com ventilação por pressão positiva (sistema 1) e por pressão negativa (sistema 2).....	52
Tabela 3 - Valores médios com desvio padrão e correlação entre aviários com ventilação por pressão positiva (sistema 1) e por pressão negativa (sistema 2) para <i>Eimeria</i> sp. em frangos de corte.....	53
Tabela 4 - Resultado das análises univariada e multivariada na determinação de fatores associados a <i>Eimeria</i> sp., tratamento de cama e sistema de ambiência em frangos de corte.....	54
Tabela 5 - Frequências das lesões macroscópicas e histopatológicas para cada segmento intestinal nos diferentes graus de lesão por <i>Eimeria</i> sp. em frangos de corte.....	67
Tabela 6 - Concordância entre macroscopia, histologia e PCR de <i>Eimeria</i> sp. para cada segmento intestinal em frangos de corte.....	67



## **LISTA DE ABREVIAÇÕES**

$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
DNA	Ácido desoxirribonucleico
$g$	Força da gravidade
$g$	Gramas
GPD	Ganho de peso diário
HE	Hematoxilina e eosina
IC	Intervalo de confiança
IEL	Intervalo entre lotes
mL	Militro
%M	Percentual de mortalidade
NC	Número de lotes alojados na mesma cama
OOPG	Oocistos por grama de fezes
OR	Razão de possibilidade
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PM	Peso médio final
qPCR	PCR em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Enzima ribonuclease
S1	Sistema 1
S2	Sistema 2
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIF	Serviço de Inspeção Federal
TA	Tamanho dos <i>amplicons</i>
T1	Tratamento 1
T2	Tratamento 2
T3	Tratamento 3
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	21
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	23
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	24
3.1	ETIOLOGIA E CICLO BIOLÓGICO DE <i>EIMERIA</i> SP.....	24
3.2	MORFOLOGIA E PATOGENIA DE <i>Eimeria</i> sp.....	25
3.3	IMUNIDADE PARA COCCIDIOSE EM FRANGOS DE CORTE.....	27
3.4	DIAGNÓSTICO DE COCCIDIOSE.....	28
<b>3.4.1</b>	<b>Métodos tradicionais para o diagnóstico de coccidiose.....</b>	28
<b>3.4.2</b>	<b>Avaliação macroscópica de <i>Eimeria</i> sp.....</b>	29
<b>3.4.3</b>	<b>Exame histopatológico de <i>Eimeria</i> sp.....</b>	30
<b>3.4.4</b>	<b>Diagnóstico molecular para identificação das espécies de <i>Eimeria</i>.....</b>	31
3.5	INSTALAÇÕES DE FRANGOS DE CORTE.....	32
3.6.	PREVENÇÃO E CONTROLE DE COCCIDIOSE.....	33
<b>3.6.1</b>	<b>Anticoccidianos para frangos de corte.....</b>	33
<b>3.6.2</b>	<b>Vacinas anticoccidianas para frangos de corte.....</b>	35
<b>3.6.3</b>	<b>Manejo sanitário para controle de coccidiose.....</b>	36
3.7	PREVALÊNCIA DE COCCIDIOSE.....	39
<b>4</b>	<b>PREVALÊNCIA DE <i>Eimeria</i> sp. EM AVIÁRIOS DE FRANGOS DE CORTE COM VENTILAÇÃO POR PRESSÃO POSITIVA E NEGATIVA, NO ESTADO DE SANTA CATARINA.....</b>	43
4.1	INTRODUÇÃO .....	45
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
<b>4.2.1</b>	<b>Cálculo para definição de amostra.....</b>	46
<b>4.2.2</b>	<b>Local de pesquisa e coleta das amostras.....</b>	46
<b>4.2.3</b>	<b>Coleta de dados dos lotes avaliados.....</b>	46
<b>4.2.4</b>	<b>Analise macroscópica e histopatológica dos intestinos.....</b>	47
<b>4.2.5</b>	<b>Pesquisa de <i>Eimeria</i> sp. no conteúdo intestinal.....</b>	47
<b>4.2.6</b>	<b>Identificação das espécies de <i>Eimeria</i> pela técnica de PCR.....</b>	48
<b>4.2.6.1</b>	<b>Limpeza dos oocistos.....</b>	49
<b>4.2.6.2</b>	<b>Purificação do DNA dos oocistos de <i>Eimeria</i> sp.....</b>	49
<b>4.2.6.3</b>	<b>PCR para <i>Eimeria</i> sp.....</b>	50

<b>4.2.8</b>	<b>Análise estatística dos dados.....</b>	51
4.3	RESULTADOS.....	51
4.4	DISCUSSÃO .....	55
4.5	CONCLUSÃO.....	58
<b>5</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA E MOLECULAR DE <i>Eimeria</i> sp. EM FRANGOS DE CORTE.....</b>	59
5.1	INTRODUÇÃO .....	60
5.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	62
<b>5.2.1</b>	<b>Local de pesquisa e coleta do material .....</b>	62
<b>5.2.2</b>	<b>Avaliação macroscópica dos intestinos .....</b>	62
<b>5.2.3</b>	<b>Análise histopatológica dos intestinos .....</b>	62
<b>5.2.4</b>	<b>Pesquisa de <i>Eimeria</i> sp. no conteúdo intestinal pela técnica de PCR.....</b>	63
<b>5.2.5</b>	<b>Análise estatística dos dados.....</b>	63
5.3	RESULTADOS.....	63
5.4	DISCUSSÃO .....	67
5.5	CONCLUSÃO.....	70
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	71
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	72

## 1 INTRODUÇÃO

A carne de frango representa uma importante fonte de proteína e gordura animal. A sua produção crescente está relacionada ao aumento do número de habitantes no mundo e ao seu menor preço comparado com outras fontes de carne (BELOVA; SMUTKA; ROSOCHATECK'A, 2012).

O Brasil foi o segundo maior produtor de carne de frango do mundo em 2018, com 12,86 milhões de toneladas e o maior exportador com 4,10 milhões de toneladas, com receita de US\$6,57 bilhões. Santa Catarina está em segundo lugar na produção de frango de corte no Brasil (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2019).

Na avicultura industrial ocorreu intenso aprimoramento nas tecnologias de ambiência. Os aviários com sistema de ventilação por pressão positiva passaram por inovações, as quais permitiram o desenvolvimento de aviários com ventilação por pressão negativa, onde o controle de ambiência ocorre por painéis de comando (ABREU; ABREU, 2011) e assim, com a ambiência correta, favorece a manutenção da boa qualidade intestinal e o controle da mortalidade (CARVALHO et al., 2014). Além disso, houve um intenso desenvolvimento nas áreas de genética, nutrição e sanidade. Todos estes fatores em equilíbrio possibilitam à avicultura obter o máximo desempenho com melhor custo de produção (OLIVEIRA et al., 2006).

Devido a intensificação da produção avícola, o atual sistema de criação tem favorecido o desenvolvimento de doenças que afetam o desempenho dos lotes. A coccidiose constitui-se uma das enfermidades infecciosas de maior importância econômica na avicultura industrial e gera perdas econômicas globais, incluindo custos de produção, prevenção e tratamento. A eficácia no controle desta doença tem papel fundamental para atingir os melhores resultados de campo (WILLIAMS, 1999; BLAKE; TOMLEY, 2014; QUIROZ-CASTAÑEDA; DANTÁN-GONZÁLEZ, 2015). É extremamente raro encontrar um lote comercial de frango de corte que não esteja acometido por *Eimeria* sp. (PEEK; LANDMAN, 2011). A coccidiose é uma doença entérica causada por protozoários do gênero *Eimeria* que vivem intracelularmente ao longo do epitélio intestinal das aves. Os oocistos esporulados são comumente ingeridos com alimento ou água contaminados, os quais infectam e desenvolvem-se nas células intestinais modificando suas estruturas e vilosidades. Este processo de reprodução afeta o desempenho e a mortalidade dos lotes e causa grande impacto negativo para o sistema de produção de frangos de corte (MCDOUGALD, 2008; KAWAZOE, 2009).

Conforme a espécie, grau de infecção e medidas preventivas utilizadas para o seu controle, a coccidiose pode apresentar-se de maneira subclínica. Desta forma, o diagnóstico e o tratamento devem ser estabelecidos de forma correta. Entretanto, ainda é necessário aprimorar os estudos para auxiliar no diagnóstico da coccidiose subclínica, pois esta também provoca prejuízos econômicos com a redução dos processos digestivos e assortivos (MEIRELES, 2009; SHIRZAD et al., 2011).

A identificação das espécies circulantes e a importância destas para o desenvolvimento do lote é fundamental para que as equipes técnicas de veterinários e os avicultores sejam direcionados para as decisões assertivas em relação à composição e o uso de anticoccidianos ou vacinas nos lotes (MCDOUGALD; FULLER; MATTIELO, 1997). Com o tratamento correto e a desinfecção das instalações, a indústria avícola moderna conseguirá atingir o desempenho almejado na produção de frangos de corte (CHAPMAN, 2014).

A avaliação da prevalência de *Eimeria* sp. em aviários com ventilação por pressão positiva e negativa, dos resultados técnicos dos lotes e também do manejo de cama realizado no intervalo entre lotes, irão auxiliar nas medidas de controle para a coccidiose. A comparação dos testes de diagnóstico macroscópico, histopatológico e reação em cadeira da polimerase (PCR) irão direcionar a melhor técnica para diagnosticar as espécies de *Eimeria* sp. presentes nos lotes de frangos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Determinar a prevalência e identificar as espécies de *Eimeria* presentes em lotes de frangos de corte na Mesorregião Oeste de Santa Catarina, utilizando diferentes métodos de diagnóstico.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Verificar se há diferença na prevalência de *Eimeria* sp. em aviários com ventilação por pressão positiva e negativa e avaliar os fatores associados a infecção;
- b. Comparar a avaliação das lesões macroscópicas com a análise histopatológica para *Eimeria* sp.;
- c. Determinar a eficiência da avaliação macroscópica, histopatológica e PCR no diagnóstico de coccidiose;
- d. Verificar as espécies de *Eimeria* presentes nos lotes de frango de corte pela técnica de PCR.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 ETIOLOGIA E CICLO BIOLÓGICO DE *Eimeria* sp.

A coccidiose aviária é a principal infecção parasitária presente na avicultura industrial. É causada por protozoários do gênero *Eimeria* que pertencem ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriorina e Família *Eimeriidae*, sendo espécie-específico (KAWAZOE, 2009). Sete espécies podem parasitar as galinhas (*Gallus gallus domesticus*): *Eimeria acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella*. Cada espécie parasita uma região específica do intestino, as infecções podem ser por mais de uma espécie simultaneamente e não há imunidade cruzada entre as espécies (ROSE; LONG, 1962; ALLEN; FETTERER, 2002; MEIRELES, 2009; SHIVARAMAIAH; BARTA; HERNANDEZ-VELASCO, 2014).

O ciclo de vida de *Eimeria* sp. é de quatro a oito dias, conforme a espécie, e desenvolve-se em um único hospedeiro (monoxeno), com multiplicação assexuada (merogonia ou esquizogonia), sexuada (gametogonia) dentro das células do hospedeiro e por último a esporogonia no meio ambiente (CHAPMAN et al., 2013). Apenas o oocisto esporulado é infectante, e possui quatro esporocistos com dois esporozoítos, totalizando oito esporozoítos (KAWAZOE, 2009). Para a esporulação são necessários três pontos importantes: temperaturas entre 18 e 30°C, umidade relativa maior que 70% e ambiente bem oxigenado. O tempo médio de esporulação é de 17 horas para *E. acervulina*, 18 horas para *E. tenella* e 30 horas para *E. maxima* (LONG; REID, 1982), e ficam viáveis no ambiente por até seis meses (ALLEN; FETTERER, 2002).

A infecção é fecal-oral, e após a ingestão dos oocistos esporulados as aves tornam-se infectadas e ocorre a liberação dos esporozoítos. Estes invadem a célula hospedeira, geralmente os enterócitos, células da lâmina própria ou criptas epiteliais, conforme a espécie de *Eimeria*. Após a penetração nas células do epitélio intestinal há o desenvolvimento de um esquizonte de primeira geração (esquizogonia) e a sua consequente maturação com rompimento e liberação de merozoítos, que penetram nas células do epitélio intestinal e formam o esquizonte de segunda geração. Os merozoítos de segunda e terceira geração são liberados e penetram nas células intestinais onde se diferenciam em micro e macrogametas. Há a fertilização dos macrogametas pelos microgametas biflagelados (gametogonia), seguida da formação do oocisto e rompimento da célula intestinal, finalizando com a liberação do oocisto imaturo nas fezes. A esporogonia é a fase da esporulação do oocisto no ambiente (KAWAZOE, 2009).

Durante a segunda e terceira fase da replicação assexuada, o dano intestinal é mais evidente devido ao alto número de merozoítos que infectam os enterócitos. Esta fase da vida assexual resulta em um grande número de parasitos (CHAPMAN et al., 2013).

A forma de disseminação dos oocistos é mecânica e ocorre pela propagação de fezes que contaminam cama, poeira, insetos, moscas e fômites. As infecções são autolimitadas e dependem do número de oocistos ingeridos e do estado imunológico da ave (MCDOUGALD, 2008).

A parede do oocisto é extremamente forte e resistente a danos mecânicos, químicos e desafios ambientais. A parede é dupla e formada pela liberação sequencial do conteúdo de duas organelas específicas formadoras de parede Tipo 1 e 2, encontradas exclusivamente no estágio sexual de macrogameta. Essa resistência permite que os oocistos sobrevivam por longos períodos, facilitando a transmissão de hospedeiro para hospedeiro (MAI et al., 2009).

### 3.2 MORFOLOGIA E PATOGENIA DE *Eimeria* sp.

Para cada oocisto de *Eimeria* sp. existem características específicas que auxiliam na sua identificação. Os oocistos de *E. acervulina* são ovoides e mais alongados que os das demais espécies e medem de 17,7 a 20,2 $\mu\text{m}$  por 13,7 a 16,3 $\mu\text{m}$  (LONG; REID, 1982). Desenvolvem-se na porção anterior do intestino delgado e em infecções severas podem ser encontrados no jejuno. Essa espécie causa alterações visíveis na mucosa e na serosa do intestino, que podem causar desde pontos brancos até estrias brancas coalescentes. Na microscopia pode-se observar numerosos oocistos e gametócitos em desenvolvimento (MCDOUGALD, 2008).

*Eimeria maxima* possui oocistos que superam no tamanho das demais espécies, os maiores medem 42,5 $\mu\text{m}$  por 21,5 $\mu\text{m}$  e os menores de 29,8 $\mu\text{m}$  por 16,5 $\mu\text{m}$  (LONG; REID, 1982). Os oocistos são ovoides, com parede lisa ou discretamente rugosa e são de cor amarelada (MCDOUGALD, 2008). Desenvolvem-se na região média do intestino delgado (jejuno e íleo) mas, em infecções severas podem alcançar o duodeno ou se deslocarem até a junção ileocecal. Causa um espessamento da mucosa intestinal com petéquias na serosa. O intestino pode apresentar uma dilatação na região afetada e estar repleto de conteúdo mucoso de coloração laranja ou estar com hemorragias (CONWAY; MCKENZIE, 2007). Na microscopia observa-se o desenvolvimento dos esquizontes até o quarto dia após a infecção e do quinto ao oitavo dia os estágios sexuados (macrogametas e microgametas) (MCDOUGALD, 2008).

*Eimeria tenella* possui oocistos ovoides, medindo de 19,5 a 26 $\mu\text{m}$  por 16,5 a 22,8 $\mu\text{m}$  (LONG; REID, 1982). A infecção é aguda e altamente patogênica, responsável por surtos com

alta morbidade e mortalidade. Todo o ciclo ocorre nos cecos causando tiflite, com sangramento e espessamento da parede intestinal do quarto ao sexto dias após a infecção, coincidindo com a maturação da segunda geração da esquizogonia. A súbita mortalidade das aves causada por esta espécie pode ultrapassar 20% em um período de dois a três dias. Porém, a hemorragia por si só não é a única responsável pela morte da ave, provavelmente ocorre interação de fatores tóxicos e bacterianos durante a infecção (MCDOUGALD, 2008).

*Eimeria brunetti* possui oocistos ovoides, medindo 20,7 a 30,3 $\mu\text{m}$  por 18,1 a 24,2 $\mu\text{m}$  (LONG; REID, 1982) e abriga-se na junção ileocecal e cólon. É uma espécie patogênica que em infecções leves causa engrossamento da mucosa e petéquias, até uma colite fibronecrótica em casos graves. Na análise microscópica, no quarto dia após a infecção observa-se os esquizontes. A partir do quinto dia, as vilosidades são rompidas e os merozoítos passam para a fase sexuada (MCDOUGALD, 2008).

Os oocistos de *E. necatrix* são ovoides e oblongos e medem de 13,2 a 22,7 $\mu\text{m}$  por 11,3 a 18,3 $\mu\text{m}$  (LONG; REID, 1982). Devido a competição com outras espécies de *Eimeria*, nas primeiras semanas de vida das aves e por ser pouco prolífera, *E. necatrix* causa casos clínicos apenas em aves de vida longa, entre nove a 14 semanas de idade. Desenvolvem-se no jejuno e íleo, onde ocorre a reprodução assexuada. Em seguida, a terceira geração de esquizontes migra para o ceco onde passa pela reprodução sexuada e formação dos oocistos (SHIRLEY; BUMSTEAD, 1994). As lesões que ocorrem no intestino delgado são causadas principalmente pela segunda geração de esquizontes que alcançam a camada muscular e os vasos sanguíneos. Pode-se observar acentuada dilatação do intestino na região afetada, com um aumento de até duas vezes o seu tamanho normal. Formam placas brancas na serosa devido a aglomeração de esquizontes e o interior do intestino pode estar repleto de sangue e muco (CHAPMAN, 2014; MCDOUGALD, 2008). É altamente patogênica e causa alta morbidade e mortalidade (WILLIAMS, 1999).

Os oocistos de *E. mitis* possuem em média 16,2 $\mu\text{m}$  x 15,5 $\mu\text{m}$ , quase esféricos. Seu desenvolvimento ocorre no duodeno e jejuno até aproximadamente o divertículo de Meckel. A infecção pode causar intestino pálido e flácido, mas sua visualização macroscópica não é percebida pois, não formam colônias e localizam-se superficialmente no epitélio da mucosa do intestino. *E. praecox* possui oocistos ovoides e são mais largos que as demais espécies, medem de 19,8 a 24,7 $\mu\text{m}$  por 15,7 a 19,8 $\mu\text{m}$  (LONG; REID, 1982). Essa espécie desenvolve-se no duodeno e jejuno e o conteúdo intestinal pode apresentar-se aquoso e com muco (MCDOUGALD, 2008).

*Eimeria praecox* e *E. mitis* não produzem lesões macroscópicas e não causam aumento da mortalidade nas aves e, muitas vezes, são consideradas apatogênicas. No entanto, em infecções experimentais estas duas espécies causaram enterite, diarreia e perda na conversão alimentar (ALLEN; FETTERER, 2002). Portanto, certamente podem causar perdas comerciais e precisam ser pesquisadas e controladas nos lotes de frangos de corte (MEIRELES; ROBERTO; RIERA, 2004).

Quanto a patogenicidade, os protozoários de *Eimeria* sp. modificam a estrutura e a aparência da parede intestinal e causam alta morte celular (FORTUOSO et al., 2019a). Todas as fases do ciclo destroem as células intestinais, resultando em 2.048 células destruídas para cada oocisto que for ingerido. Essas células são responsáveis pela absorção de vitaminas, sais minerais, carotenoides, carboidratos, lipídeos, proteínas, água e medicamentos (KAWAZOE, 2009).

A coccidiose pode ser aguda ou subclínica. Na coccidiose aguda, os aspectos zootécnicos mais observados são desuniformidade, penas arrepiadas, diarreia mucoide ou sanguinolenta e consequente desidratação, baixo ganho de peso, perda na conversão alimentar e pode apresentar aumento da mortalidade (VERMEULEN; SCHAAP; SCHETTERS, 2001; BELOTE et al., 2019). A coccidiose subclínica está presente em quase todos os lotes de frango de corte (ALLEN; FETTERER, 2002). É uma doença importante e compromete o desenvolvimento das aves, mesmo com ausência ou sinais clínicos discretos. O difícil diagnóstico da coccidiose subclínica também impede a indústria avícola de avaliar a melhor estratégia possível para o controle desta doença (SHIRZAD et al., 2011).

Em pesquisa realizada para estimar o impacto no desafio da coccidiose na curva de crescimento da ave, observou-se que para cada ponto de aumento na avaliação microscópica das lesões de coccidiose, o peso corporal diário caiu 1,5% durante o período de desafio de seis dias (GAZONI et al., 2015).

A coccidiose pode contribuir com a ocorrência de outras infecções, uma vez que a destruição da parede intestinal abre portas para outros agentes infecciosos oportunistas (FORTUOSO et al., 2019a). As lesões na mucosa intestinal contribuem com a elevação da mucogênese e o aumento do muco facilita a adesão e replicação de *Clostridium perfringens* e a produção de toxinas (BELOTE et al., 2018). Também podem predispor a colonização por *Salmonella* sp., na qual destaca-se *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, que são de grande preocupação para saúde humana por causarem infecção alimentar (BLAKE; TOMLEY, 2014).

### 3.3 IMUNIDADE PARA COCCIDIOSE EM FRANGOS DE CORTE

Os estudos sobre a aquisição de imunidade das aves por *Eimeria* sp. mostraram que a resistência a uma dose desafiadora de oocistos não era devido à idade, mas era dependente da exposição prévia à infecção. Também relataram as variações distintas no tamanho e na forma dos oocistos na mesma ave, sugerindo que mais de uma espécie poderia ocorrer no frango (JOHNSON, 1927; CHAPMAN, 2014). Em seguida, ficou estabelecido que a infecção com uma espécie *Eimeria* não provocava proteção contra outras espécies, desta forma não há imunidade cruzada (ROSE; LONG, 1962). Nos estudos posteriores, esta informação foi confirmada e sabe-se que é comum ocorrer infecções simultâneas por mais de uma espécie de *Eimeria* e que após uma infecção primária a ave pode desenvolver imunidade para novos desafios (MEIRELES, 2009).

*Eimeria* provoca no hospedeiro a ativação das respostas imune humoral e celular (HONG et al., 2006). A principal responsável pela proteção é a imunidade celular, realizada principalmente por células T residentes no tecido linfoide associado ao intestino. Os linfócitos T podem atuar como células citotóxicas que ajudam a eliminar o parasita, bloqueando seu ciclo de reprodução (ALLEN; FETTERER, 2002; LILLEHOJ; MIN; DALLOUL, 2004). A imunidade adquirida é dependente de linfócitos T e os linfócitos B não estão envolvidos neste processo (CHAPMAN, 2014).

Aves jovens, devido à falta de maturidade do sistema imunológico, são mais suscetíveis a infecções clínicas e, quanto menor a idade, mais grave será o contágio e o desenvolvimento da doença (GAZONI et al., 2015). Nas infecções primárias há o desenvolvimento de resistência específica para cada espécie de *Eimeria* e nas infecções secundárias as aves desenvolvem imunidade sólida homóloga. A imunidade não impede a invasão de células pelo esporozoíto, mas impede o seu desenvolvimento (ALLEN; FETTERER, 2002).

### 3.4 DIAGNÓSTICO DE COCCIDIOSE

#### 3.4.1 Métodos tradicionais para o diagnóstico de coccidiose

As técnicas tradicionalmente utilizadas para a identificação das espécies de *Eimeria* são morfologia e morfometria de seus esporocistos e oocistos, contagem de oocistos por grama de fezes (OOPG), tempo de esporulação dos oocistos, duração dos períodos pré-patentes e testes de especificidade imunológica (JOYNER; LONG, 1974; LONG; REID, 1982; GASSER et al., 2001; BARKWAY et al., 2015). Para as duas últimas técnicas, é necessário o uso de animais e requer maior tempo para a experimentação. A morfologia e morfometria são realizadas em

testes laboratoriais com o exame das fezes ou da cama do aviário pelo método de concentração dos oocistos por flutuação saturada (LONG; JOYNER, 1984). A identificação de diferentes espécies com base nestas técnicas é desafiadora e requer uma combinação de características para fechar o diagnóstico por espécie. Todos os métodos requerem mão-de-obra qualificada, têm uma relação pobre com o impacto do parasito no desempenho de um lote (LONG; JOYNER, 1984; HAUG et al., 2008) e necessitam de combinação com outra técnica de diagnóstico (WILLIAMS et al., 1996).

### **3.4.2 Avaliação macroscópica de *Eimeria* sp.**

O diagnóstico clássico de coccidiose é realizado pela avaliação macroscópica do intestino com observação de lesões específicas em duodeno, jejunio, íleo, cecos e cólon (JOHNSON; REID, 1970). Os sinais clínicos, o histórico do lote e a avaliação macroscópica do intestino fornecem um indicativo da espécie envolvida (LONG; JOYNER, 1984).

*Eimeria acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella* causam lesões típicas no duodeno, jejunio e cecos, respectivamente. Estas são as espécies que têm maior ocorrência nas monitorias sanitárias nos lotes de frangos de corte. *E. mitis* e *E. praecox* instalaram-se na região superficial do epitélio e causam lesões leves. Estas são comuns em frangos de corte, mas difíceis de observar, pois não produzem lesões macroscópicas que facilitem seu monitoramento. *Eimeria tenella* e *E. necatrix* possuem localização profunda no epitélio e podem causar hemorragias e necrose epitelial (CHAPMAN, 2014).

Na avaliação macroscópica de *Eimeria* sp. as lesões são classificadas em escores de 0 a 4, onde 0 é ausência de lesão e 4 é a lesão mais grave, conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1 - Descrição dos escores de lesões intestinais causadas por *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. tenella* e *E. brunetti*\* em frangos de corte.

<i>Eimeria</i>	Localização	Escore 1	Escore 2	Escore 3	Escore 4
<i>E. acervulina</i>	Duodeno	Estrias brancas, com orientação transversa em relação às paredes intestinais. Até 5 lesões por cm <sup>2</sup> .	Lesões mais próximas, mas não coalescentes. Parede intestinal sem espessamento. Conteúdo intestinal normal.	Lesões menores, abundantes e coalescentes. Podem se estender até o resquício do saco vitelínico. Parede intestinal engrossada e conteúdo aquoso.	Lesões completamente coalescentes na mucosa do duodeno, com aspecto acinzentado. Jejuno com estrias brancas. Mucosa espessa e com descamação celular.
<i>E. maxima</i>	Jejuno	Presença de petéquias dispersas na serosa. Pode estar presente pequena quantidade de muco alaranjado. Ausência de embalonamento e espessamento do intestino.	Serosa com numerosas petéquias. Pode haver muco alaranjado. Pouco ou nenhum embalonamento. Espessamento da parede intestinal.	Parede intestinal com embalonamento e espessamento. Superfície mucosa áspera. Conteúdo intestinal com coágulos sanguíneos e muco.	Parede intestinal espessada e embalonada em quase toda a extensão. Presença de sangue digerido.
<i>E. necatrix</i>	Jejuno	Petéquias dispersas e manchas brancas na serosa. Dano pouco aparente na mucosa.	Numerosas petéquias na serosa. Pode estar presente leve embalonamento.	Hemorragia no lúmen do jejuno. Serosa com petéquias vermelhas e/ou placas brancas. Superfície serosa áspera e espessa com pequenas hemorragias pontuais. Ausência de conteúdo intestinal. Embalonamento se estende sobre a metade inferior do jejuno.	Presença de hemorragia e intestino escuro, com muco marrom ou vermelho. Embalonamento pode se estender por quase todo o intestino.
<i>E. tenella</i>	Cecos	Poucas petéquias dispersas na mucosa. Conteúdo cecal normal. Sem espessamento da parede cecal.	Maior número de petéquias e presença de sangue aquoso. Parede cecal um pouco espessa. Trabéculas cecais normais.	Grande quantidade de sangue coagulado. Cecos com pouco ou nenhum conteúdo fecal. Trabéculas disformes e parede cecal espessa.	Parede cecal distendida, com sangue e áreas de necrose. Material fecal ausente.
<i>E. brunetti</i>	Côlon	Parede intestinal acinzentada. Parte inferior espessada. Presença de descamação celular cor alaranjada.	Parede intestinal espessada com presença de exsudato catarral vermelho. Riscos vermelhos podem estar presentes no côlon, com lesões nas tonsilas cecais.	Necrose da mucosa com coagulação sanguínea, enterite com sangue na parte final do côlon. Lesões podem se estender para os cecos, ileo e jejuno.	

\*Adaptado de Johnson e Reid, 1970.

### 3.4.3 Exame histopatológico de *Eimeria* sp.

O diagnóstico por histopatologia é muito importante e deve ser realizado em conjunto com a macroscopia. Contribui principalmente nos casos onde há lesões discretas ou inespecíficas macroscopicamente, auxilia a estabelecer a taxa de infecção e as lesões epiteliais. Os fragmentos do intestino (duodeno, jejuno, íleo, cecos e/ou côlon) são coletados e os cortes geralmente são corados por hematoxilina e eosina (HE) (KAWAZOE et al., 2005).

*Eimeria acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* e *E. tenella* são facilmente identificadas pelo tamanho de seus oocistos e esquizontes em conjunto com a localização e a aparência das lesões macroscópicas no intestino. Os maiores oocistos pertencem a *E. maxima*, tornando-se facilmente distinguível. As lesões produzidas pelas demais espécies não são seguramente distintas na histopatologia pois o tamanho dos oocistos são semelhantes aos de outras espécies (MCDOUGALD, 2008).

Estudos para a identificação de *Eimeria* sp. por histologia são utilizados para auxiliar no diagnóstico macroscópico em conjunto com as avaliações de impacto nos indicadores técnicos como mortalidade, ganho de peso e conversão alimentar (AMER et al., 2010; BELOTE et al., 2019; FORTUOSO et al., 2019a). Emprega-se também para avaliar a efetividade de produtos anticoccidianos (SHE et al., 2017; FORTUOSO et al., 2019b) e de vacinas (JEFFERS, 1975; SONG et al., 2016; SUPRIHATI; YUNUS, 2018).

### 3.4.4 Diagnóstico molecular para identificação das espécies de *Eimeria*

O desenvolvimento de métodos moleculares para a análise de *Eimeria* sp. destacou-se como uma ferramenta importante para a detecção de infecção subclínica (MORGAN et al., 2009) e para auxiliar no diagnóstico em casos com mais de uma espécie infectante (MORRIS et al., 2007). A maior prevalência de uma espécie em um lote de frangos pode indicar o aumento na resistência as drogas utilizadas para essa espécie e desta forma, direcionar para a melhor escolha de novos tratamentos (LAN et al., 2017). Outra aplicação importante para o diagnóstico de espécies é o controle de pureza das cepas usadas para preparar vacinas vivas, assim evitando o potencial de contaminação cruzada (ALLEN; FETTERER, 2002; FERNANDEZ et al., 2003b).

Os avanços nos estudos moleculares e o surgimento da PCR permitiram análises com menor quantidade de parasitos (MORRIS; GASSER, 2006). O desenvolvimento de ferramentas moleculares não permitiu apenas os diagnósticos, mas também o estudo da variabilidade genética de patógenos baseados em pequenas quantidades de oocistos através de marcadores moleculares (CARVALHO et al., 2011).

As pesquisas continuaram voltadas para o diagnóstico das espécies de *Eimeria* que infectam as aves domésticas, e a Multiplex PCR apresentou resultado eficiente, com diagnóstico simultâneo das sete espécies de *Eimeria*. Amplificações de PCR padrão foram inicialmente testadas para reações individuais de cada par de *primer*, a fim de obter uma condição de reação comum para as sete espécies de *Eimeria*. Esta condição foi então adaptada para reações múltiplas. Em seguida, foi realizado teste preliminar em reações individuais e múltiplas utilizando suspensões de oocistos para avaliar a sensibilidade do ensaio em condições semelhantes às de campo, utilizando fezes ou cama de aviário (FERNANDEZ et al., 2003b).

A Multiplex foi utilizada para detectar *Eimeria* sp. em frangos de corte na Índia (VENKATESWARA et al., 2013). Em pesquisa realizada na Mesorregião Sul do estado de Santa Catarina foram diagnosticadas as sete espécies de *Eimeria* na mesma reação de PCR (MORAES et al., 2015). Com esta mesma técnica, pesquisou-se a prevalência e resistência a medicamentos para as espécies de *Eimeria* em granjas de frangos de corte na China (LAN et al., 2017). As reações múltiplas mostraram-se eficientes, entretanto a complexa interação molecular pode alterar a eficiência de ligação dos *primers* (MORAES et al., 2015).

A tecnologia de PCR em tempo real (qPCR) é uma evolução do método da PCR convencional e permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA

sejam realizados em uma única etapa. A qPCR oferece sensibilidade e velocidade para a análise das amostras, e a abordagem tem a capacidade de quantificar o DNA (HEID et al., 1996).

Apesar de muitos esforços de pesquisa direcionados para técnicas moleculares, e muito progresso foi observado neste campo, o uso prático para os diagnósticos de coccidiose não estão disponíveis nos sistemas de produção de frangos de corte, pois a PCR e a qPCR requerem maior custo na aquisição dos equipamentos e no material para as análises (MORRIS; GASSER, 2006; VRBA; BLAKE; POPLSTEIN, 2010; YOU, 2014).

### 3.5 INSTALAÇÕES DE FRANGO DE CORTE

Atualmente, na avicultura industrial há dois sistemas de controle de ventilação nos aviários: por pressão positiva e negativa. No primeiro, o manejo de cortinas, ventiladores e aquecimento são realizados de forma manual pelo avicultor. No segundo, houve a aplicação de novas tecnologias e a ventilação, controle de temperatura e umidade dos aviários são realizados por um painel de comando, no qual as necessidades de ambiência das aves são ajustadas. A ventilação é realizada por exaustores e todos os equipamentos são ativados automaticamente. Estes sistemas são chamados de aviários convencionais e climatizados, respectivamente (ABREU; ABREU, 2011).

As aves são homeotérmicas e capazes de regular a temperatura corporal. O mecanismo de homeostase, entretanto, é eficiente somente quando a temperatura ambiente está dentro do desejado. Regiões onde a temperatura ambiente é alta ou muito baixa, as aves possuem maior necessidade de energia do que aquelas que estão em ambientes termo neutralizados. Esse desequilíbrio prejudica a produtividade das aves (OLANREWAJU et al., 2010).

A temperatura ambiente de conforto térmico das aves é de 35°C nos primeiros três dias de vida, 28°C na segunda semana de vida e de 18°C na fase adulta (ABREU; ABREU, 2011). Porém, essas temperaturas favorecem o ciclo de reprodução da *Eimeria* sp. e quando o aviário encontra-se com a umidade relativa maior que 70%, os oocistos liberados na cama do aviário sofrem esporulação rapidamente (LONG; REID, 1982; ALLEN; FETTERER, 2002).

O sistema de ventilação por pressão negativa possui a associação de ventilação com sistemas de resfriamento do ar e trabalha com luminosidade controlada, e quando bem manejados, permitem uma maior densidade de aves por metro quadrado. Este sistema foi desenvolvido para melhorar a eficiência na produção, com ênfase nos aspectos produtivos, sanitários e bem-estar das aves (ABREU; ABREU, 2011; NOWICK et al., 2011). Nos aviários com ventilação por pressão positiva os avicultores apresentam maior dificuldade em manter a

temperatura e a renovação de ar desejada durante todas as fases do lote. No entanto, as instalações climatizadas possuem maior densidade de alojamento e por este motivo também podem sujeitar as aves ao estresse calórico na fase final de produção. Assim, o manejo correto de ambiência é necessário, pois o estresse ambiental influencia na redução do desempenho de produção e no aumento da mortalidade do lote (CARVALHO et al., 2014).

Um aviário climatizado pode conter de 25 a 50 mil aves por instalação de 1.200m<sup>2</sup> a 2.400 m<sup>2</sup>, respectivamente, e ainda podem estar presentes até dez aviários na mesma propriedade. Atualmente, as indústrias de frangos de corte estão mais restritas geograficamente, com produção elevada em pequenas áreas. Assim, as condições comerciais sob as quais as aves são criadas fornecem condições ideais para a transmissão de *Eimeria* sp. (CHAPMAN et al., 2013). A intensificação da produção de aves aumentou a importância da coccidiose, pois além das aves serem susceptíveis a todas as espécies de *Eimeria* sp., a produção em alta densidade facilita a transmissão do parasito entre os animais e propriedades diferentes (SHIRLEY; SMITH; BLAKE, 2007; HINSU et al., 2018).

### 3.6 PREVENÇÃO E CONTROLE DE COCCIDIOSE

A produção comercial de aves somente é viável economicamente com o controle da coccidiose. O cuidadoso manejo com os animais e a biosseguridade das instalações, combinados com medicamentos anticoccidianos na ração e/ou vacinação, são importantes ferramentas para a prevenção e controle desta doença (KAWAZOE, 2009; ABDISA et al., 2019).

#### 3.6.1 Anticoccidianos para frangos de corte

Os anticoccidianos são classificados como coccidiostáticos e coccidicidas. Os coccidicidas são produtos químicos utilizados para o tratamento da doença e têm modos específicos de ação diretamente no metabolismo do parasito e causam a sua morte (amprólio, tolazuril, sulfas). Os coccidiostáticos são drogas utilizadas para o controle, pois interrompem o ciclo do parasito sem destruí-lo. São divididos em dois grupos: drogas resultantes de síntese química (diclazuril, nicarbazina e robenidina) ou os antibióticos ionóforos (lasalocida, maduramicina, monensina, narasina, salinomicina e senduramicina) (ALLEN; FETTERER, 2002).

Os coccidiostáticos foram os primeiros a serem descobertos. Essas moléculas são absorvidas na corrente sanguínea das aves e atingem os parasitos em desenvolvimento nas células epiteliais do intestino. A nicarbazina foi lançada em 1955 e ainda continua em uso devido aos seus bons resultados (CHAPMAN, 1997; CHAPMAN et al., 2013). É o único anticoccidiano químico que não apresentou resistência ao longo do tempo. Porém, em condições de alta temperatura ambiente observa-se piora no desempenho do lote e aumenta a taxa de mortalidade por estresse calórico (DONZELE et al., 2001).

Os ionóforos são subprodutos da fermentação bacteriana e têm um modo de ação diferente das drogas sintéticas. São capazes de destruir esporozoítos e merozoítos no lúmen do intestino ou após a penetração celular. Agem através de mecanismos gerais de alteração do transporte iônico e desequilíbrio osmótico (CHAPMAN et al., 2013; ALLEN; FETTERER, 2002). Atualmente, por proporcionarem um lento desenvolvimento de resistência quando comparados às drogas químicas, os antibióticos ionóforos são os mais utilizados nas criações comerciais de frangos de corte (MARTINS et al., 2012).

O início da utilização da monensina foi em 1971, a qual teve grande utilização para o controle da coccidiose (CHAPMAN, 1997). Porém, em 1981 foi lançada a salinomicina no Brasil e a senduramicina em 1995, tornando-se os ionóforos mais usados no controle da coccidiose aviária, por aliar eficácia e custo compatíveis. Estes anticoccidianos demonstraram ser eficientes no controle da enfermidade, com diminuição dos oocistos e das lesões intestinais, somado com a melhora do ganho de peso e conversão alimentar (MCDOUGALD et al., 1990; CONWAY; DAYTON; MCKENZIE, 1999; PESTI et al., 2002; DINIZ et al., 2009).

Embora possa haver variação sazonal no uso de drogas, a quimioterapia como meio de controle é generalizada. Pesquisas realizadas nos Estados Unidos indicam que o uso de drogas anticoccidianas em frangos de corte varia de 70% a 98%, dependendo da estação do ano. Na Europa Ocidental, o uso é de 91% (CHAPMAN et al., 2013). No Reino Unido, mais de 40% dos medicamentos vendidos para uso em animais de produção são para o controle de parasitos, destes os ionóforos representaram mais de 70% (BLAKE; TOMLEY, 2014).

Os coccidiostáticos não são utilizados para combater um surto, mas sabe-se que as drogas permanecem eficazes no campo apenas porque suprimem parcialmente o desenvolvimento do parasito. Desta forma, permitem que as aves adquiram imunidade natural pela baixa exposição de oocistos no ambiente, os quais não foram atingidos pela ação da droga (ABDISA et al., 2019). Para eliminar resíduos de anticoccidianos das carcaças dos frangos, é utilizado uma ração pré-abate livre de medicação. Porém, o período de carência pode causar aumento no risco de infecção na fase final de crescimento do lote (MARTINS et al., 2012). Por

outro lado, o desenvolvimento da imunidade natural pode atuar de forma positiva neste período de retirada da ração e evitar surtos (CHAPMAN, 1999).

Um certo grau de resistência a todas as drogas anticoccidianas, incluindo os ionóforos, se desenvolveu. A evolução de coccídios resistentes a várias drogas pode se tornar uma ameaça potencial à avicultura. Recomenda-se a rotação de drogas anticoccidianas e principalmente programas alternativos para prevenir novas perdas econômicas causadas pela coccidiose (LAN et al., 2017).

Em 2003 foi publicado o regulamento EC 1831/2003, com a Legislação Europeia vigente, que aprova e regulamenta o uso de aditivos para alimentação animal. O Conselho da União Europeia definiu que substâncias com efeitos coccidiostáticos deverão ser consideradas como aditivos para a alimentação animal e que, estes não devem ter um efeito adverso sobre a saúde animal, humana ou ambiental. Diante a isso, a União Europeia solicitou a retirada progressiva dos anticoccidianos utilizados como aditivos na alimentação animal até 31 de dezembro de 2012. Podem ser utilizados os produtos cujos princípios ativos estejam listados no regulamento e que cumpram as doses e período de carência estabelecidos, e sem resíduos na matéria prima (UNIÃO EUROPEIA, 2003).

A velocidade com que a resistência pode aparecer, combinado com as restrições legislativas e as preocupações do consumidor em relação aos resíduos químicos em produtos alimentícios, desencorajaram as tentativas de desenvolver novos anticoccidianos (CHAPMAN, 1999; BLAKE; TOMLEY, 2014).

### **3.6.2 Vacinas anticoccidianas para frangos de corte**

Uma opção alternativa para o controle da coccidiose é a vacinação, que é mais utilizada para proteger poedeiras e reprodutoras, mas pouco aplicada no frango de corte. As vacinas induzem uma imunidade ativa nas aves e específica para cada espécie de *Eimeria* sp. As vacinas são baseados em formulações com uma ou mais espécies vivas, que são escolhidas conforme a prevalência da região (SHIRLEY; SMITH; TOMLEY, 2005; MCDONALD; SHIRLEY, 2009).

As vacinas vivas se dividem em dois grandes grupos. A primeira geração, baseada em fórmulas de oocistos vivos tipo selvagem e a segunda geração em oocistos vivos atenuados. As vacinas vivas do tipo selvagem baseiam-se na exposição controlada das aves com doses baixas de oocistos virulentos que iniciam a infecção e induzem uma resposta imune protetora natural (CHAPMAN, 2014). Embora eficazes e ainda amplamente utilizadas em alguns setores da indústria de produção avícola (PEEK; LANDMAN, 2011; SHE et al., 2017), essas vacinas

exigem a distribuição de forma igual em todo o lote, pois quando administrada em doses altas e/ou baixas pode causar um impacto negativo na conversão alimentar e sinais clínicos de coccidiose (BLAKE; TOMLEY, 2014). Com a vacinação, as aves liberam oocistos de *Eimeria* vacinal durante o lote e há uma infecção constante devido à presença no ambiente da granja. Em função do tempo necessário para adquirir a imunidade e o constante contato da ave com *Eimeria* vacinal, a principal indicação é aplicação via *spray* no primeiro dia de vida, ainda no incubatório (CHAPMAN, 2014).

O reconhecimento do risco apresentado pela patogenicidade vacinal do oocisto selvagem levou ao desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas de segunda geração. Essas vacinas contém parasitos com ciclos de vida mais rápido que o tipo selvagem e retêm a capacidade imunoprotetora total. Como perdem um ou dois ciclos de esquizogonia, as vacinas atenuadas são mais seguras (SHIRLEY; BEDRNÍK, 1997).

A vacina atenuada requer maior tempo de produção em comparação com a vacina do tipo selvagem e impõe limitações práticas ao número de doses que podem ser produzidas (BLAKE; TOMLEY, 2014). Essas vacinas também apresentam outras desvantagens, incluindo risco de patogenicidade vacinal e potencial reversão à virulência, bem como maior custo de produção. Por estas razões, o uso de vacinas vivas atenuadas em frango de corte não é viável e sua aplicação está direcionada principalmente aos setores de reprodução e postura de ovos (WITCOMBE; SMITH, 2014; BLAKE; TOMLEY, 2014; SONG et al., 2016).

Perante aos pontos negativos das vacinas vivas, nas últimas décadas numerosos esforços foram dedicados para identificar os抗ígenos recombinantes de diferentes estágios de desenvolvimento do parasito e os genes que os codificam, como novos alvos de pesquisa para vacinas anticoccidianas de terceira geração. A utilização de抗ígenos para confecção de vacinas utiliza um veículo que pode ser um vetor vivo, um DNA recombinante ou uma proteína expressa e purificada (BLAKE et al., 2006; SHIRLEY; SMITH; BLAKE, 2007). Assim como as vacinas de terceira geração, as vacinas de DNA têm sido sugeridas como uma estratégia alternativa promissora contra a coccidiose. As vacinas de DNA incluem a persistência da imunogenicidade a longo prazo, não apresentam risco de infecção, são estáveis e econômicas (LILLEHOJ; YUN; LILLEHOJ, 2000; BLAKE; TOMLEY, 2014; SONG et al., 2016).

### **3.6.3 Manejo sanitário para controle de coccidiose**

Diante da resistência aos medicamentos e da falta de uniformidade na imunidade para a coccidiose, a liberação de oocistos de *Eimeria* sp. ocorre por períodos prolongados durante o

crescimento do frango de corte (JENKINS et al., 2019). Em geral, seguem um padrão, com os níveis de pico de oocistos presentes nas fezes ocorrendo entre duas e quatro semanas de vida do lote (GRAAT et al., 1996; JENKINS; PARKER; RITTER, 2017). Os oocistos são onipresentes, com esporulação rápida, facilmente dissemináveis no ambiente e com grande potencial de reprodução. É muito difícil manter as aves totalmente livres do contato com os oocistos, especialmente sob condições atuais de criação intensiva (ALLEN; FETTERER, 2002; ABDISA et al., 2019).

O crescimento dos frangos de corte ocorre em aviários com contato direto ao piso e coberto por cama, o que facilita o acesso e a ingestão de oocistos potencialmente patogênicos liberados nas fezes das aves (JORDAN et al., 2018). Na avicultura, em sua grande maioria, os lotes de frangos de corte são criados no sistema todos dentro, todos fora, onde todas as aves alojam e abatem no mesmo dia (MACKLIN et al., 2006). A cama é reutilizada por lotes consecutivos para reduzir o impacto ambiental e para diminuir os custos de produção. Porém, esta prática está associada com riscos sanitários e para reduzir sua carga microbiana, a cama deve receber tratamento durante o intervalo entre os lotes (DAI PRÁ et al., 2009; MUNIZ et al., 2014).

O tratamento de cama pode ser realizado com a aplicação de condicionadores químicos para melhorar sua qualidade física, química e microbiológica. Os mais utilizados são: cal virgem (DAI PRÁ, 2009), cal hidratada, gesso agrícola, sulfato de alumínio ou superfosfato simples (OLIVEIRA; FERREIRA; CANCHERINI, 2004; FERREIRA; OLIVEIRA; TRALDI, 2004). Estas substâncias atuam no pH, na volatilização de amônia e na retenção de nitrogênio que, consequentemente, mantêm a cama com baixa umidade, que dificulta a esporulação do oocisto de *Eimeria* sp. (SOLIMAN; SALLAM; ABOUELHASSAN, 2018). A correlação positiva entre oocistos e umidade da cama durante o crescimento do lote indica a importância de manter a cama seca, para que o número de oocistos seja reduzido em galpões comerciais (CHAPMAN; JOHNSON, 1992). Deve-se ter atenção especial à cama perto de bebedouros e comedouros e a altura da cama precisa estar controlada (ABDISA et al., 2019).

Atualmente, o tratamento térmico é uma das técnicas mais aplicadas para reduzir ou eliminar possíveis patógenos em resíduos de animais (CHEN; JIANG, 2014). Na avicultura, a cama é reutilizada por vários lotes de frangos e retirada completamente após um ou dois anos (OVIEDO-RONDÓN, 2008). Quando há troca de cama no aviário, é realizado a compostagem fora das instalações com o objetivo de inativar os agentes patogênicos e para ser utilizada como adubo orgânico (CHEN et al., 2015). Este manejo também é muito importante para evitar a disseminação de oocistos de *Eimeria* sp. para outras propriedades (MCDOUGALD, 2008). A

cama pode receber o tratamento de compostagem dentro do aviário, onde é amontoada no centro da instalação com aproximadamente 1 metro de altura e 1,5 metro de largura, umedecida e coberta com lona plástica por uma semana. Neste processo, ocorre a redução dos patógenos de forma significativa pois a cama atinge temperaturas internas de 50 a 70°C (MACKLIN et al., 2006; OVIEDO-RONDÓN, 2008).

Para o controle de coccidiose, foi avaliado o tratamento de cama no intervalo entre lotes com fermentação por amontoamento. Na pesquisa foi realizada a contagem de oocistos de *Eimeria* sp. em cama nova e em camas reutilizadas, em instalações de frangos de corte. A cama de segundo e terceiro lote foi amontoada com altura de 1,5 m e compactada para eliminar o máximo de oxigênio possível e, em seguida, foi coberta com lona plástica. O material foi deixado em repouso por 10 a 15 dias, a fim de atingir uma temperatura entre 55 e 70°C. Em seguida, a cama foi descoberta e o material foi espalhado por todo o piso do aviário. Aos um, sete e 14 dias de idade do lote as camas reutilizadas apresentaram maior quantidade de oocistos do que em cama nova, no entanto, a contagem de oocistos entre 21 e 35 dias de idade do lote foi maior na primeira cama do que nas camas reutilizadas. Desta forma, o amontoamento reduziu o número de oocistos presentes na cama reutilizada (GARCÉS-GUDIÑO; MERINO-GUZMÁN; CEVALLOS-GORDÓN, 2018), reforçando os resultados de Chapman; Johnson (1992). Em outro estudo também houve redução significativa no número de oocistos de *Eimeria acervulina* quando a cama foi submetida ao método de fermentação com o amontoamento e cobertura sob lona plástica por 10 dias consecutivos (ASSIS; LUNS; CURY, 2013).

Experimento realizado com cama umedecida e coberta com lona plástica por um período de oito dias, atingiu temperatura máxima de 30,8°C, pH médio de 8,98 no primeiro dia e de 9,29 no oitavo dia. A umidade média da cama permaneceu estável até o quinto dia e depois aumentou gradualmente de 37 para 40%, com elevação do nível de amônia até o oitavo dia. Apresentou maior nível de amônia e diminuição significativa nas populações bacterianas quando a cama foi coberta com lona plástica em comparação com as que não foram cobertas. Mas, as contagens médias de oocistos de *E. maxima* não apresentaram diferença entre os tratamentos de cama. Segundo os autores, esses resultados indicam que são necessárias concentrações de amônia superiores para reduzir a contagem de oocistos e que as condições criadas no tratamento não foram suficientes para reduzir o número de oocistos na cama (MESA et al., 2016). Estes achados reforçam que os principais fatores que influenciam no tratamento da cama dos aviários são: temperaturas acima de 60°C, liberação de amônia, duração do

tratamento e nível de umidade (WICHUK; MCCARTNEY, 2007; MEIRELES, 2009; KIM et al., 2012).

A parede do oocisto de *Eimeria* sp. é resistente à proteólise e impermeável a substâncias solúveis em água, incluindo muitos detergentes e desinfetantes. Os agentes químicos que apresentam melhor resposta na eliminação dos oocistos são: gás de amônia, brometo de metila, substâncias lipossolúveis, solventes orgânicos e alguns compostos fenólicos, porém são tóxicos e de difícil aplicação (KAWAZOE, 2009; MEIRELES, 2009). Estes produtos são permeáveis à parede do oocisto e podem ser utilizadas no controle de *Eimeria* sp. no ambiente, mas para ter boa eficácia a concentração e tempo de exposição devem ser controlados. Essa resistência contribui para a dificuldade de excluir os oocistos dos aviários (MAI et al., 2009). Entretanto, a desinfecção de cama com amônia quaternária 10% (cloreto de benzalcônio) durante o intervalo entre lotes não foi efetiva na redução de oocistos de *E. acervulina*, como também não potencializou o controle da coccidiose em associação com fermentação da cama de frango de corte (ASSIS; LUNS; CURY, 2013).

Pesquisa realizada em camas de aviários no dia do alojamento de pintinhos de um dia, mostrou que quase todas as espécies de *Eimeria* estavam presentes em 100% dos aviários analisados e que 33,0% deles continham oocistos viáveis de *E. maxima* e 46,9% continham oocistos viáveis de *E. acervulina*, *E. praecox* e *E. tenella* (JENKINS et al., 2019). Desta forma, é extremamente necessário realizar o manejo correto das instalações para reduzir a exposição aos oocistos infectantes. O controle de ambiência com manutenção de temperatura e ventilação adequados para cada fase do lote e umidade da instalação, aliados à boa qualidade da cama do aviário são importantes para prevenir a esporulação dos oocistos (KAWAZOE, 2009; BLAKE; TOMLEY, 2014).

### 3.7 PREVALÊNCIA DE COCCIDIOSE

Coccidiose está presente em qualquer lugar que possua produção de frangos de corte, em pequena ou grande escala e em todo o mundo (CHAPMAN, 2014). Porém, a maior ocorrência de coccidiose é geralmente observada em sistema intensivo de produção de frangos de corte e com uso de cama no aviário. A doença é endêmica na maioria das regiões tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais e de manejo favorecem o desenvolvimento e a propagação do agente durante todo o ano (ABDISA et al., 2019). Em pesquisa de prevalência de *Eimeria* sp. em frangos de corte no Irã, em 120 propriedades avaliadas com exames macroscópicos e parasitológicos, foram identificadas cinco espécies de *Eimeria*, com as

seguintes prevalências: *Eimeria acervulina* (65,5%), *E. maxima* (17,7%), *E. tenella* (15,5%), *E. brunetti* (10%) e *E. necatrix* (5,5%), onde 75% das propriedades estavam com coccidiose subclínica (SHIRZAD et al., 2011).

Estudo realizado nas cinco principais granjas produtoras de frangos de corte na China identificou, através da análise morfológica, cinco espécies de *Eimeria* com a prevalência total de 30,7%, sendo *E. tenella* e *E. acervulina* as mais prevalentes com 30,5% e 24,2% respectivamente, seguidas de *E. maxima* (21,1%), *E. necatrix* (14,7%) e *E. mitis* (9,5%). Entretanto, as aves analisadas não apresentavam sinais clínicos, sugerindo a presença de coccidiose subclínica (LAN et al., 2017). Em outro estudo de prevalência na China, utilizando a análise morfométrica em 171 amostras, a prevalência foi de 87,75%. Nas amostras positivas foi realizada a PCR onde *E. tenella* apresentou maior prevalência (80,67%), seguida de *E. necatrix* (68%), *E. mitis* (55,33%), *E. maxima* (54,67%), *E. brunetti* (44,67%) e *E. acervulina* (2,67%). *Eimeria praecox* não foi detectada (HUANG et al., 2017).

Pesquisa de *Eimeria* sp. utilizando Eletroforese Capilar com base em PCR foi conduzido para levantamento epidemiológico em sete aviários de frangos de corte, na Austrália. As sete espécies de *Eimeria* foram identificadas, sendo as mais prevalentes *Eimeria acervulina* (89%) e *E. maxima* (87%), seguidas de *E. mitis* (64%), *E. praecox* (44%), *E. brunetti* (36%) e *E. tenella* (26%). *E. necatrix* foi a menos detectada (10%). Infecções com uma ou várias espécies de *Eimeria* sp. foram diagnosticadas em mais de 70% dos aviários analisados (MORRIS et al., 2007).

No Canadá, foi realizado estudo de prevalência das espécies de *Eimeria* em 360 intestinos de aves comerciais. Por análise parasitológica foram identificados 20 intestinos positivos (5,55%). Em seguida, nestas amostras foi realizada a pesquisa das espécies de *Eimeria* por Multiplex PCR, com as seguintes prevalências: 2,5% para *E. tenella*, 1,38% para *E. maxima* e 0,27% para *E. acervulina* (OGEDENGBE et al., 2011).

Para estabelecer a prevalência das espécies de *Eimeria*, pesquisa realizada na Romênia utilizou o teste de PCR com amostras de fezes coletadas em 23 aviários. Os resultados mostraram que *Eimeria* sp. estava presente em 91% dos aviários. As espécies identificadas e suas prevalências foram *E. acervulina* (91%), *E. tenella* (61%), *E. maxima* (22%) e *E. praecox* (13%) (GYÖRKE; POP; COZMA, 2013).

No Brasil, realizou-se um estudo de frequência de *Eimeria* sp. em 30 produtores de frangos de corte no estado da Bahia, com as técnicas de Multiplex PCR, análise morfológica e avaliação macroscópica dos intestinos de frangos de corte. As sete espécies de *Eimeria* sp. foram encontradas em 13,7% das propriedades utilizando a técnica de Multiplex PCR e em 60%

das propriedades com a morfologia dos oocistos. As espécies que apresentaram 100% de frequência na Multiplex PCR foram *E. praecox* e *E. maxima* e na análise morfológica foram *E. brunetti*, *E. tenella*, *E. praecox* e *E. maxima*. Diferentemente, no escore de lesão foram encontradas as espécies *E. maxima* (46,7%), *E. acervulina* (30,0%), *E. tenella* (23,3%) e *E. necatrix* (10,0%), e todas com menor frequência em comparação com as outras duas técnicas (CARVALHO et al., 2011).

Pesquisa realizada com a avaliação macroscópica da saúde intestinal, em 82 integrações de frangos de corte no Brasil, *E. acervulina* apresentou maior prevalência com 13,5%, seguida de *E. maxima* com 6,75% e *E. tenella* com 4,35% (GAZONI et al., 2015). No estado do Paraná, o exame macroscópico realizado em 80 lotes de frangos de corte, apresentou maior prevalência de *E. maxima* com 8,52%, seguida de 8,21% para *E. acervulina* e 2,42% para *E. tenella* (AMARAL; OTUTUMI, 2013).

Análise realizada em 251 aviários no estado de Santa Catarina, utilizando a técnica de Multiplex PCR, identificou as sete espécies de *Eimeria* com as prevalências 63,7% e 63,3% para *E. maxima* e *E. acervulina*, respectivamente, seguida de *E. tenella* (54,6%), *E. mitis* (38,6%), *E. praecox* (25,1%), *E. necatrix* (24,3%) e *E. brunetti* (13,1%) (MORAES et al, 2015).



## 4 PREVALÊNCIA DE *Eimeria* sp. EM AVIÁRIOS DE FRANGOS DE CORTE COM VENTILAÇÃO POR PRESSÃO POSITIVA E NEGATIVA, NO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL

*PREVALENCE OF Eimeria sp. IN BROILER HOUSES WITH POSITIVE AND NEGATIVE PRESSURE VENTILATION SYSTEMS IN STATE OF SANTA CATARINA, BRAZIL*

### RESUMO

A coccidiose é uma doença entérica causada por protozoários do gênero *Eimeria* e de grande importância econômica na avicultura industrial. O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de *Eimeria* sp. em aviários de frangos de corte com diferentes tipos de climatização e avaliar os fatores associados a infecção. Realizou-se um estudo transversal em 32 aviários com ventilação por pressão positiva (sistema 1) e 32 aviários por pressão negativa (sistema 2) em frangos de corte, fêmea com 29 dias de vida. Em cada lote foram avaliados oito frangos, totalizando 512. Realizou-se a avaliação macroscópica e histopatológica dos intestinos para coccidiose e reação em cadeia da polimerase (PCR) para *Eimeria* sp. Cada lote avaliado foi considerado positivo para *Eimeria* sp. quando houve a visualização do parasito na histologia em qualquer segmento intestinal e/ou PCR positivo. A prevalência de *Eimeria* sp. foi de 90,63% (58/64) (95% IC: 97,77-83,49), com 93,75% (95% IC: 100-85,36) para o sistema 1 e 87,50% (95% IC: 98,96-76,04) para o sistema 2. A espécie com maior prevalência foi *E. acervulina*. Na combinação de espécies, a mais prevalente foi *E. acervulina* associada a *E. maxima* e *E. tenella*, onde o sistema 1 obteve maior positividade. Na correlação entre o subgrupo positivo e negativo do sistema 2, a conversão alimentar (CA) apresentou melhor resultado no subgrupo negativo ( $p=0,028$ ). Entre o sistema 1 e o sistema 2 no subgrupo positivo para *Eimeria* sp. houve diferença significativa no ganho de peso diário (GPD) ( $p=0,001$ ) e na CA ( $p<0,001$ ), com melhor resultado no sistema 2. Da mesma forma, no subgrupo negativo para *Eimeria* sp. houve diferença significativa no GPD ( $p=0,013$ ) e na CA ( $p=0,024$ ), onde o sistema 2 também apresentou melhor resultado. Na análise univariada e multivariada, o tratamento de cama com cal virgem mostrou ser um método capaz de reduzir o risco de *E. maxima* (OR=0,26; IC%: 0,08-0,82) e de *E. tenella* (OR=0,22; IC%: 0,06-0,72) estarem presentes nos lotes. Conclui-se que *Eimeria* sp. possui alta prevalência em ambos os sistemas de ambientes, com predomínio

de infecções mistas. Aviários com ventilação por pressão negativa apresentaram melhor resultado em GPD e CA, com menor CA no subgrupo negativo e, o tratamento de cama com cal virgem se demostrou mais eficaz.

**Palavras-chaves:** ave, coccidiose, oocistos, ambiência, indicadores técnicos.

## ABSTRACT

Coccidiosis is an enteric disease caused by protozoa of the *Eimeria* genus. It is a disease of great economic relevance in industrial aviculture. The goal of this project was to determine the prevalence of *Eimeria* sp. in broiler houses with different climatization equipment and to evaluate the factors associated with infection. A transversal study was performed in 32 poultry houses with positive pressure ventilation (system 1) and in 32 houses with negative pressure ventilation (system 2). Broilers were 29 days old at the time of evaluation. Eight broilers from each house were evaluated, in a total of 512 samples. Diagnosis was based on macroscopic and histopathologic evaluations of the intestines and by polymerase chain reaction (PCR) for *Eimeria* sp. Flocks were considered positive for *Eimeria* sp. when the parasite could be visualized in histology and/or when the PCR was positive. The total prevalence of *Eimeria* sp. was of 90.63% (58/64) (95% CI: 97.77-83.49). Prevalence for system 1 was of 93.75% (95% CI: 100-85.36) and for system 2 was of 87.50% (95% CI: 98.96-76.04). The most prevalent species were *E. acervulina* associated with *E. maxima* and *E. tenella*. System 1 had the highest positivity for these species. In system 2, feed conversion (FC) was better in the negative subgroup ( $p=0,028$ ). In the comparison between ventilation systems 1 and 2, *Eimeria* sp. positive subgroup from system 2 had significantly better daily weight gain (DWG) ( $p=0,001$ ) and FC ( $p<0,001$ ). In *Eimeria* sp. negative subgroup, birds from system 2 also had improved DWG ( $p=0,013$ ) and FC ( $p=0,024$ ). In univariate and multivariate analysis, litter treatment with quicklime reduced the risk of presence of *E. maxima* (OR=0.26; CI%: 0.08-0.82) and of *E. tenella* (OR=0.22; CI%: 0.06-0.72). It is concluded that *Eimeria* sp. is highly prevalent in houses with both ventilation systems, with a predominance of mixed infections. Broiler houses with negative pressure ventilation systems showed the best results in DWG and FC, with lowest FC in the negative subgroup. Litter treatment with quicklime proved to be the most efficacious.

**Keywords:** poultry, coccidiosis, oocysts, ambience, technical indicators.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

Na avicultura industrial, a coccidiose constitui-se uma das enfermidades infecciosas de maior importância econômica e gera perdas globais pelo impacto nos indicadores técnicos, custos de produção, prevenção e tratamento (WILLIAMS, 1999; BLAKE; TOMLEY, 2014; QUIROZ-CASTAÑEDA; DANTÁN-GONZÁLEZ, 2015). É uma doença entérica causada pelo protozoário do gênero *Eimeria*, com sete espécies que podem parasitar as galinhas (*Gallus gallus domesticus*): *Eimeria acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella*. Cada espécie parasita uma região específica do intestino e se desenvolve nas células intestinais modificando suas estruturas e vilosidades. As infecções podem ser por mais de uma espécie simultaneamente e não há imunidade cruzada entre elas (ROSE; LONG, 1962; ALLEN; FETTERER, 2002; SHIVARAMAIAH; BARTA; HERNANDEZ-VELASCO, 2014).

Sinais clínicos típicos de coccidiose com lesões clássicas no intestino e mortalidade elevada, são relatados com pouca frequência nos últimos anos. No entanto, apesar das medidas de controle com anticoccidianos e vacinas, os oocistos de *Eimeria* sp. continuam presentes nos lotes de frangos de corte (CHAPMAN et al., 2016; JENKINS et al., 2019).

No sistema de produção de frangos de corte, ocorreu intenso aprimoramento nas tecnologias de ambiência. Os aviários com ventilação por pressão positiva passaram por inovações, as quais permitiram o desenvolvimento de aviários com ventilação por pressão negativa, onde o controle de ambiência ocorre por painéis de comando ativados automaticamente. Estes sistemas são chamados de aviários convencionais e climatizados, respectivamente (ABREU; ABREU, 2011). Os aviários climatizados foram desenvolvidos para melhorar a eficiência na produção, com ênfase nos aspectos produtivos, sanitários e bem-estar das aves (NOWICKI et al., 2011).

A intensificação na produção de frangos de corte aumentou a importância da coccidiose, pois além das aves serem susceptíveis a todas as espécies de *Eimeria* sp., a produção em alta densidade aumenta a disseminação do parasita, pois facilita a transmissão entre os animais e propriedades diferentes (SHIRLEY; SMITH; BLAKE, 2007). É extremamente raro encontrar um lote comercial de frango de corte que não esteja acometido por *Eimeria* sp. (PEEK; LANDMAN, 2011).

A alta ocorrência de coccidiose é geralmente observada em aves manejadas em sistema intensivo e com uso de cama no aviário, o que facilita o acesso e a ingestão de oocistos infectantes (JORDAN et al., 2018). A doença é endêmica na maioria das regiões tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais e de manejo favorecem o desenvolvimento e a

propagação do agente durante todo o ano (ABDISA et al., 2019). O controle de ambiência com manutenção de temperatura e umidade das instalações juntamente com ventilação adequada para cada fase do lote, aliados com boa qualidade da cama do aviário, são importantes para prevenir a esporulação dos oocistos de *Eimeria* sp. (KAWAZOE, 2009; BLAKE; TOMLEY, 2014).

Este trabalho tem como objetivo determinar a prevalência de *Eimeria* sp. em aviários de frangos de corte com ventilação por pressão positiva e negativa na Mesorregião Oeste de Santa Catarina e avaliar os fatores associados a infecção.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Cálculo para definição de amostra

O cálculo para definição desta amostra foi realizado através da fórmula de  $n = \frac{Z \times Z [P(1-P)]}{D^2}$ , de amostragem aleatória simples para populações infinitas, onde Z se refere ao multiplicador obtido através do intervalo de confiança desejado, com base na distribuição normal. Sendo P a prevalência esperada e D o erro máximo aceitável na estimativa. Com o cálculo em um intervalo de confiança de 95%, aonde Z= 1,96 e D= 0,05. Deve-se aceitar P= 50% sempre que não existir um estudo prévio na população em questão sobre o tema estudado. O número de frangos amostrados desta maneira deverá ser de no mínimo 384.

### 4.2.2 Local de pesquisa e coleta das amostras

Realizou-se um estudo transversal em 64 lotes de frangos de corte fêmeas, linhagem Cobb 500, com idade média de 29 dias, em um abatedouro sob Serviço de Inspeção Federal (SIF) na Mesorregião Oeste de Santa Catarina, Brasil, no período de outubro de 2017 a abril de 2018. A coleta das amostras foi realizada no abatedouro, em frangos provenientes de 32 aviários com ventilação por pressão positiva e 32 aviários com ventilação por pressão negativa. Em cada lote foram retirados aleatoriamente oito frangos da linha de abate, totalizando 512 frangos. Os intestinos foram avaliados macroscopicamente e coletados para análise histopatológica e reação em cadeia da polimerase (PCR).

### 4.2.3 Coleta de dados dos lotes avaliados

Para identificar fatores que podem estar relacionados com a infecção por *Eimeria* sp. foram avaliadas as informações dos documentos de acompanhamento do lote e obtidos dados de percentual de mortalidade (%M), conversão alimentar (CA), ganho de peso diário (GPD), peso médio no abate (PM), dias de intervalo entre o lote (IEL), número de lotes alojados na mesma cama (NC) e tratamento de cama realizado no intervalo do lote. Três tipos de tratamento de cama foram avaliados: aplicação de cal virgem (T1), fermentação da cama dentro do aviário (T2) e primeira cama após vazio sanitário (T3).

O estudo foi observacional, sem interferência em formulação de ração e em manejos aplicados nos lotes. Todos os lotes receberam o mesmo tratamento preventivo com anticoccidianos, estabelecido pela empresa integradora das aves.

#### **4.2.4 Análise macroscópica e histopatológica dos intestinos**

Foi realizada a avaliação macroscópica de oito intestinos de cada lote e observadas as lesões características causadas por cada espécie de *Eimeria*, segundo a classificação de Johnson e Reid (1970). Em seguida, foram coletados, separadamente, fragmentos de duodeno, jejuno, íleo, cecos e cólon e fixados em formalina tamponada a 10% por 24 a 48 horas, processados rotineiramente para exame histopatológico e corados por hematoxilina e eosina (HE). Na análise histopatológica foram considerados positivos os fragmentos intestinais com presença de estruturas parasitárias compatíveis com *Eimeria* sp.

#### **4.2.5 Pesquisa de *Eimeria* sp. no conteúdo intestinal**

Após a coleta de material para análise histopatológica, em cada lote foi realizado um raspado em todo o intestino e coletado um *pool* do conteúdo intestinal dos oito frangos avaliados. Estes foram acondicionados em frascos de 100mL, contendo 50mL de solução de dicromato de potássio a 2,5% e completado com o material colhido até atingir 100mL. Em seguida, as amostras foram encaminhadas para a purificação dos oocistos de *Eimeria* sp. conforme Moraes et al. (2015).

As amostras foram homogeneizadas e filtradas utilizando primeiro uma peneira com malha de nylon e depois um tecido de *voil*. O material resultante da filtragem foi colocado em tubo com capacidade para 125mL e centrifugado a 1.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado água destilada ao sedimento suspenso e

homogeneizado. Este processo foi repetido até a limpeza do sobrenadante (aproximadamente quatro vezes).

Para coletar os oocistos, o sedimento foi suspenso em solução 5,5M de NaCl (densidade de 1,209g/mL), homogeneizado e centrifugado a 200g por 10 minutos. Os oocistos foram removidos da superfície da solução com pipeta de Pasteur e transferidos para um tubo cônico de 50mL. A homogeneização, centrifugação e coleta dos oocistos da superfície da solução foram repetidas por quatro vezes. Para retirar o NaCl foi adicionado água destilada (1 parte de solução coletada para 9 partes de água), centrifugado a 1.000g por 5 minutos e descartado o sobrenadante. Foi adicionado ao sedimento resultante da etapa anterior uma solução de dicromato de potássio a 2,5% até completar um volume final de 10mL. Este volume foi homogeneizado e dividido em dois tubos cônicos com 5mL cada e armazenados a uma temperatura de 5 a 7°C.

#### **4.2.6 Identificação das espécies de *Eimeria* pela técnica de PCR**

Foi realizada a técnica de PCR para identificar as sete espécies de *Eimeria*: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella*. Os pares de *primers* específicos para cada espécie estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - “Primers Forward (F) e Reverse (R)”, 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. necatrix* (nc) e o tamanho dos *amplicons* (TA).

Designação	Sequências dos Primers	TA
ac-A03-F	AGT CAG CCA CAC AAT AAT GGC AAA CAT G	811pb
ac-A03-R	AGT CAG CCA CAG CGA AAG ACG TAT GTG	
br-J18-F	TGG TCG CAG AAC CTA CAG GGC TGT	626pb
br-J18-R	TGG TCG CAG ACG TAT ATT AGG GGT CTG	
tn-K04-F	CCG CCC AAA CCA GGT GTC ACG	539pb
tn-K04-R	CCG CCC AAA CAT GCA AGA TGG C	
mt-A03-F	AGT CAG CCA CCA GTA GAG CCA ATA TTT	460pb
mt-A03-R	AGT CAG CCA CAA ACA AAT TCA AAC TCT AC	
pr-A03-F	AGT CAG CCA CCA CCA AAT AGA ACC TTG G	354pb
pr-A03-R	GCC TGC TTA CTA CAA ACT TGC AAG CCC T	
mx-A09-F	GGG TAA CGC CAA CTG CCG GGT ATG	272pb
mx-A09-R	AGC AAA CCG TAA AGG CCG AAG TCC TAG A	
nc-A18-F	TTC ATT TCG CTT AAC AAT ATT TGG CCT CA	200pb
nc-ENec-R	ACA ACG CCT CAT AAC CCC AAG AAA TTT TG	

Fonte: Moraes et al., 2015.

#### 4.2.6.1 Limpeza dos oocistos

Para a limpeza dos oocistos foi adicionado água destilada no tubo cônico com 5mL da amostra e foi centrifugado a 2.000g e descartado o sobrenadante. Este processo foi repetido três vezes para a completa remoção do dicromato de potássio. O sedimento restante da limpeza das amostras foi armazenado em microtubo de 2mL. A alíquota foi utilizada para a extração do DNA, onde foi adicionado 150µL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% e homogeneizado por inversão. Em seguida a amostra foi centrifugada a 2.500g por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e adicionado ao sedimento água Milli-Q® até completar o volume final de 2mL. O conteúdo do microtubo foi novamente homogeneizado por inversão e submetido à centrifugação (2.500g por 5 minutos) e o sobrenadante foi descartado.

#### 4.2.6.2 Purificação do DNA dos oocistos de *Eimeria* sp.

Para a ruptura dos oocistos, o sedimento originado do procedimento de limpeza foi suspenso em 500µL de tampão de lise NewGene Prep (Symbios Biotecnologia, Cachoeirinha, RS), adicionado 2,5µL de enzima ribonuclease A (RNase A) (10µg/µL) e 0,5g de esferas de

vidro de 210 a 300 $\mu$ m de diâmetro (Sigma-Aldrich®). O microtubo com o conteúdo foi homogeneizado em um agitador tipo *vortex*, na velocidade máxima, por 10 minutos. Após a ruptura mecânica dos oocistos, o microtubo foi colocado em um termobloco a 37°C durante 15 minutos para a ação da RNase A e em seguida centrifugado a 10.000g por 5 minutos e o sobrenadante transferido para um microtubo de 1,5mL. Depois, foram adicionados 12,5 $\mu$ L a solução de SDS a 20% e 2,5 $\mu$ L de proteinase K (20 $\mu$ g/ $\mu$ L). O microtubo foi homogeneizado e incubado no termobloco a 50°C por 30 minutos, para a ação da proteinase K.

A extração de ácidos nucleicos foi realizada com *kits* comerciais NewGene PreAmp e Prep conforme protocolo do fornecedor (Symbios Biotecnologia, Cachoeirinha, RS). Inicialmente 100 $\mu$ L do sobrenadante da etapa anterior foi adicionado em um microtubo de 1,5mL contendo 400 $\mu$ L de solução de lise (NewGene Prep). Em seguida, foi agitado em *vortex* e incubado a 60°C por 10 min e após esse processo, foi adicionado 20 $\mu$ L de sílica. O ácido nucleíco total foi adsorvido na sílica e posteriormente submetido a uma centrifugação de 10.000g por 1 minuto.

O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado sucessivamente com 300 $\mu$ L das soluções de lavagem A e B, e 150 $\mu$ L da solução de lavagem C (Newgene PreAmp). Após a última lavagem, a sílica foi seca em termobloco a 60°C e o ácido nucleíco total eluído com 50 $\mu$ L de tampão EL.

#### 4.2.6.3 PCR para *Eimeria* sp.

As designações e sequências dos *primers* que foram utilizados e o tamanho dos *amplicons* para cada uma das sete espécies de *Eimeria* estão no Quadro 2.

Todas as reações foram realizadas com o uso do Mastermix comercial GeneAmp® Fast PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems Inc., Norwalk, CT, USA), com cada reação consistindo de 20 $\mu$ L, incluindo 0,4 $\mu$ L de cada *primer* Sense e Anti-Sense (a 10  $\mu$ M cada), 2 $\mu$ L do DNA extraído, 7,2 $\mu$ L de água livre de DNA e RNA (Invitrogen, USA) e 10 $\mu$ L de Mastermix 2X GeneAmp® Fast PCR fornecido pelo fornecedor (Applied Biosystems Inc., Norwalk, CT, USA). A amplificação foi realizada no equipamento 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, com etapa final de extensão a 72°C por 10 segundos. Foram utilizados marcadores de peso molecular de 100pb, controle negativo com água livre de DNA e RNA, e controle positivo com cepas puras de *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. tenella*, *E. mitis*, *E. praecox*,

*E. maxima* e *E. necatrix*. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídio e observados em luz ultravioleta.

#### 4.2.7 Análise estatística dos dados

Para análise dos dados, estes foram compilados em planilhas no *Microsoft Office Excel* e analisados por meio de estatística descritiva e inferencial. Cada lote avaliado foi considerado positivo para *Eimeria* sp. quando houve a visualização do parasito na histologia em qualquer segmento intestinal e/ou PCR positivo. Para o cálculo de prevalência de *Eimeria* sp. foi utilizado o intervalo de confiança de 95%.

Para avaliação das variáveis peso médio final (PM), ganho de peso diário (GPD), conversão alimentar (CA), percentual de mortalidade (%M), dias de intervalo entre lotes (IEL) e número de lotes alojados na mesma cama (NC), os lotes foram divididos em dois grandes grupos, de acordo com cada sistema de ambiência que o mesmo foi submetido, sendo sistema 1 (S1) para aviários com ventilação por pressão positiva e sistema 2 (S2) para aviários com ventilação por pressão negativa. Dentro de cada grupo formaram-se outros dois subgrupos: positivos para *Eimeria* sp. e negativos para *Eimeria* sp. Para avaliação estatística das variáveis, os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, então submetidos ao teste t. Para amostras não paramétricas foi utilizado o teste Mann-Whitney Rak Sun Test ( $p<0,05$ ), utilizando o programa Sigma Plot 12.0.

Para o teste de hipótese para a associação entre as diferentes espécies de *Eimeria*, tipos de sistemas de ambiência e tipos de tratamento de cama, dois modelos foram construídos para análise estatística, em que foi utilizada uma abordagem de regressão logística incondicional. Primeiro, as variáveis foram submetidas a análise univariada utilizando-se o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Todas as variáveis foram verificadas quanto à colinearidade e não foram encontradas correlações significativas. Nos casos em que ambas as variáveis apresentaram  $p\leq0,20$  na análise univariada foram consideradas também para análise multivariada. Todas as interações bidirecionais entre variáveis nos modelos finais foram avaliadas quanto ao nível de significância  $\alpha = 0,05$ . Os dados gerados foram analisados no software estatístico IBM® SPSS Statistics.

### 4.3 RESULTADOS

Os lotes de frangos de corte avaliados estavam com idade média de 29 dias, com mínima de 27 e máxima de 32 dias. A prevalência de *Eimeria* sp. foi de 90,63% (58/64) (IC 95%: 97,77-83,49). Entre os sistemas de ambiência foi de 93,75% (30/32) (IC 95%: 100-85,36) para o sistema 1 e 87,50% (28/32) (IC 95%: 98,96-76,04) para o sistema 2. A prevalência por espécie de *Eimeria* pode ser observada na Tabela 1. *Eimeria praecox* e *E. necatrix* não foram identificadas. As combinações das espécies de *Eimeria* estão representadas na Tabela 2.

Tabela 1. Prevalência das espécies de *Eimeria* em frangos de corte em aviários com ventilação por pressão positiva (sistema 1) e por pressão negativa (sistema 2).

Espécie	Total	IC 95%	Sistema 1	IC 95%	Sistema 2	IC 95%
<i>E. acervulina</i>	89,06% (57/64)	81,41-96,71	90,63% (29/32)	80,53-100	87,50% (28/32)	76,04-98,96
<i>E. brunetti</i>	4,69% (3/64)	0-9,87	6,25% (2/32)	0-14,64	3,13% (1/32)	0-9,16
<i>E. maxima</i>	70,31% (45/64)	59,11-81,51	81,25% (26/32)	67,73-94,77	59,38% (19/32)	42,36-76,40
<i>E. mitis</i>	3,13% (2/64)	0-7,40	3,13% (1/32)	0-9,16	3,13% (1/32)	0-9,16
<i>E. tenella</i>	46,88% (30/64)	43,01-50,75	62,50% (20/32)	45,73-79,27	31,25% (10/32)	15,19-47,31

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Tabela 2. Associação das diferentes espécies de *Eimeria* em frangos de corte em aviários com ventilação por pressão positiva (sistema 1) e por pressão negativa (sistema 2).

Espécie	Total	Sistema 1	Sistema 2
<i>E. acervulina</i>	11/58 (18,96%)	2/30 (6,66%)	9/28 (32,15%)
<i>E. maxima</i>	1/58 (1,72%)	1/30 (3,33%)	0/28 (0%)
<i>E. acervulina</i> + <i>E. tenella</i>	2/58 (3,45%)	2/30 (6,66%)	0/28 (0%)
<i>E. acervulina</i> + <i>E. maxima</i>	16/58 (27,50%)	7/30 (23,33)	9/28 (32,15%)
<i>E. acervulina</i> + <i>E. maxima</i> + <i>E. tenella</i>	24/58 (41,38%)	16/30 (53,33%)	8/28 (28,58%)
<i>E. acervulina</i> + <i>E. brunetti</i> + <i>E. maxima</i> + <i>E. tenella</i>	2/58 (3,45%)	1/30 (3,33%)	1/28 (3,58%)
<i>E. acervulina</i> + <i>E. maxima</i> + <i>E. mitis</i> + <i>E. tenella</i>	1/58 (1,72%)	0/30 (0%)	1/28 (3,58%)
<i>E. acervulina</i> + <i>E. brunetti</i> + <i>E. maxima</i> + <i>E. mitis</i> + <i>E. tenella</i>	1/58 (1,72%)	1/30 (3,33%)	0/28 (0%)

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Na Tabela 3 podem ser observados os valores de média e desvio padrão das variáveis avaliadas, juntamente com as correlações entre os grupos e subgrupos.

Tabela 3. Valores médios com desvio padrão e correlação entre aviários com ventilação por pressão positiva (sistema 1) e por pressão negativa (sistema 2) para *Eimeria* sp. em frangos de corte.

Grupos	Variável	Subgrupos	
		<i>Eimeria</i> sp. positivo	<i>Eimeria</i> sp. negativo
<b>Sistema 1</b>	PM	1,385±0,105 <sup>a</sup>	1,490±0,001 <sup>a</sup>
	GPD	47,048±3,355 <sup>a</sup>	47,315±0,742 <sup>a</sup>
	CA	1,561±0,0678 <sup>a</sup>	1,555±0,0460 <sup>a</sup>
	%M	3,167±1,467 <sup>a</sup>	2,530±0,339 <sup>a</sup>
	IEL	25,033±9,575 <sup>a</sup>	32,500±19,092 <sup>a</sup>
	NC	9,733±6,680 <sup>a</sup>	8,000±8,485 <sup>a</sup>
<b>Sistema 2</b>	PM	1,419±0,058 <sup>a</sup>	1,454±0,061 <sup>a</sup>
	GPD	49,720±2,662 <sup>a*</sup>	51,440±1,225 <sup>a**</sup>
	CA	1,497±0,060 <sup>a*</sup>	1,432±0,0381 <sup>b***</sup>
	%M	3,453±1,625 <sup>a</sup>	2,820±1,532 <sup>a</sup>
	IEL	20,250±7,811 <sup>a*</sup>	29,250±11,026 <sup>b</sup>
	NC	9,357±4,809 <sup>a</sup>	11,250±5,500 <sup>a</sup>

Peso médio final (PM), ganho de peso diário (GPD), conversão alimentar (CA), percentual de mortalidade (%M), dias de intervalo entre lotes (IEL) e número de lotes alojados na mesma cama (NC). Letras minúsculas diferentes, existe diferença estatística nas médias de cada variável obtida nos subgrupos dentro de um mesmo grupo; \*, existe diferença significativa para subgrupos positivos nos diferentes grupos (sistemas 1 e 2); \*\*, existe diferença significativa para subgrupos negativos nos diferentes grupos (sistemas 1 e 2).

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Os resultados obtidos da análise de regressão logística para os fatores associados a espécie de *Eimeria*, sistema de ambiência e tipo de tratamento de cama podem ser observados na Tabela 4. *Eimeria maxima* apresentou associação significativa na análise univariada para o sistema 1 e tratamento de cama 1 ( $p \leq 0,20$ ). Na análise multivariada foi observada associação significativa entre o tipo de tratamento de cama ( $p=0,021$ ), onde o tratamento 1 diminui em 0,26 vezes o risco do lote ser positivo. Para *E. tenella*, na análise univariada houve associação significativa entre o sistema 1 e o tipo de tratamento de cama 1 ( $p \leq 0,20$ ). Na análise multivariada o tratamento de cama 1 apresentou associação significativa ( $p=0,012$ ), onde reduz em 0,22 vezes o risco do lote ser positivo.

Tabela 4. Resultados das análises univariada e multivariada na determinação de fatores associados a *Eimeria* sp., tratamento de cama e sistema de ambiência em frangos de corte.

Grupo	Variável	Univariável		Multivariável	
		Valor de <i>p</i>	OR (IC 95%)	Valor de <i>p</i>	OR (IC 95%)
<i>Eimeria</i> sp.	S1	0,67	2,14 (0,36-12,63)	-	-
	S2	-	-	-	-
	T1	0,37	2,37 (0,43-13,05)	-	-
	T2	-	-	-	-
	T3	-	-	-	-
<i>E. acervulina</i>	S1	1,00	1,38 (0,28-6,73)	-	-
	S2	-	-	-	-
	T1	0,19	3,38 (0,67-16,93)	-	-
	T2	-	-	-	-
	T3	-	-	-	-
<i>E. brunetti</i>	S1	1,00	2,07 (0,18-4,01)	-	-
	S2	-	-	-	-
	T1	-	-	-	-
	T2	-	-	-	-
	T3	0,25	0,15 (0,01-2,23)	-	-
<i>E. maxima</i>	S1	0,10	2,96 (0,95-9,21)	0,220	-
	S2	-	-	-	-
	T1	0,04	3,95 (1,23-2,67)	0,021	0,26 (0,08-0,82)
	T2	-	-	-	-
	T3	-	-	-	-
<i>E. mitis</i>	S1	1,0	1,00 (0,06-16,71)	-	-
	S2	-	-	-	-
	T1	-	-	-	-
	T2	-	-	-	-
	T3	0,172	0,07 (0,01-1,52)	-	-
<i>E. tenella</i>	S1	0,02	3,67 (1,30-10,32)	0,089	-
	S2	-	-	-	-
	T1	0,04	4,34 (1,23-15,34)	0,012	0,22 (0,06-0,72)
	T2	-	-	-	-
	T3	-	-	-	-

Sistema (S1), sistema 2 (S2), tratamento de cama 1 (T1), tratamento de cama 2 (T2), tratamento de cama 3 (T3).  
OR: Razão de possibilidade; IC: intervalo de confiança.

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

O estudo abrangeu três estações do ano, onde 34,38% dos lotes foram avaliados na primavera, com 30,0% de positividade no sistema 1 e 42,86% no sistema 2. No verão, 25% dos lotes foram avaliados, onde 23,33% apresentaram positividade no sistema 1 e 21,43% no sistema 2. No outono, 40,63% dos lotes foram estudados, com 46,67% de positividade no sistema 1 e 35,71% no sistema 2.

#### 4.4 DISCUSSÃO

A prevalência de *Eimeria* sp. no presente estudo foi elevada, semelhante a outros trabalhos que encontraram 96% de positividade, também no Brasil (MORAES et al., 2015), 92% na Romênia (GYÖRKE; POP; COZMA, 2013), 87,5% na China (HUANG et al., 2017), 88,4% na Argentina (MCDOUGALD; FULLER; MATTIELO, 1997), 78,7% na Coréia do Sul (LEE et al., 2010), 75% no Irã (SHIRZAD et al., 2011) e 70% na Austrália (MORRIS et al., 2007).

Neste estudo *E. acervulina* destacou-se com a maior prevalência total, tanto como único agente ou em associação a outras espécies de *Eimeria*. Resultado semelhante foi encontrado em pesquisa realizada em lotes de frangos corte com idade média de 28 dias, onde *E. acervulina* apresentou maior prevalência em infecções mistas (91%) e em infecção única (26%) (GYÖRKE; POP; COZMA, 2013). Outras pesquisas também observaram maior prevalência desta espécie em infecções mistas, com 100% de positividade em lotes com idade média de 31 dias (HAUG et al., 2008), 77% em lotes com 28 dias (TER VEEN et al., 2017) e 13,5% em lotes de 12 a 40 dias (GAZONI et al., 2017).

Infecções com duas ou mais espécies foram encontradas na maioria dos lotes e a maior combinação foi de *E. acervulina* com *E. maxima* e *E. tenella*, onde o sistema 1 se destacou. Estes dados são semelhantes aos encontrados em estudo com cama de aviário na Mesorregião Sul de Santa Catariana, no qual 82,5% dos lotes avaliados apresentaram mais de uma espécie de *Eimeria* e a mesma combinação entre as espécies (MORAES et al., 2015). Em outra pesquisa, 100% dos lotes avaliados apresentaram infecções por mais de uma espécie de *Eimeria* com a mesma combinação mais prevalente do presente estudo (JORDAN et al., 2018). Outros estudos demonstraram que 84% dos lotes estavam com infecções mistas com maior prevalência de *E. acervulina* com *E. tenella* (HAUG et al., 2008), com 70% dos lotes com infecções por mais de uma espécie de *Eimeria*, com prevalência de *E. acervulina* e *E. maxima* (MORRIS et al., 2007) e que 95% dos lotes avaliados apresentaram mais de uma espécie de *Eimeria* com maior prevalência de *E. acervulina* com *E. mitis* (WILLIAMS et al., 1996).

Houve diferença na prevalência de *Eimeria* sp. entre os sistemas de ambiência, com exceção de *Eimeria mitis*, que obteve a mesma positividade nos dois sistemas, a prevalência total e das espécies de *Eimeria* foi maior no sistema 1. Em outra pesquisa com aviários de frangos de corte com ventilação por pressão positiva e por negativa, a prevalência de *Eimeria* sp. também foi maior no primeiro sistema (90%) do que no segundo (73,6%) (SHIRZAD et al., 2011). Na avaliação dos indicadores de desempenho entre o sistema 1 e o sistema 2 no subgrupo positivo para *Eimeria* sp., houve diferença significativa no GPD e na CA, com melhor resultado no sistema 2. Da mesma forma, no subgrupo negativo para *Eimeria* sp., houve diferença significativa no GPD e na CA, onde o sistema 2 também apresentou melhor resultado. Os aviários com ventilação por pressão negativa apresentaram desempenho superior em comparação com os de pressão positiva. Estudos comparando os sistemas *dark house* e convencionais para a produção de frangos de corte, relataram que GPD, CA, PM e bem-estar das aves foram melhores em aviários *dark house* (NOWICKI et al., 2011; CARVALHO et al., 2014). Quando há uniformidade de temperatura e renovação de ar dentro das instalações, os frangos não passam por estresse térmico e ocorre o consumo ideal de ração e água e, consequentemente os frangos ingerem a dose correta de anticoccidianos, que é de grande importância para o controle de coccidiose (ARADAS; NÄÄS; SALGADO, 2005; MORRIS et al., 2007; JENKINS; PARKER; RITTER, 2017).

Observou-se diferença significativa no IEL entre os subgrupos do sistema 2, com maior IEL nos lotes negativos. O período de IEL é muito importante para realizar os procedimentos de limpeza e desinfecção de todos os equipamentos das instalações e o controle de pragas. Este período sem aves alojadas nas instalações é uma medida necessária para reduzir o potencial de infecção por oocistos de *Eimeria* sp. em lotes subsequentes (GUIMARÃES et al., 2007). Aviários com maior metragem e com alta densidade de alojamento possuem maior quantidade de bebedouros e comedouros, liberação de ração e água na cama e, também maior volume de fezes (RAZMI; KALIDERI, 2000). Assim, com maior IEL, o produtor consegue realizar a manutenção, a limpeza e a desinfecção dos equipamentos de forma mais eficiente (ZHANG et al., 2013) e dispõem de maior tempo para ventilar as instalações e reduzir a umidade da cama (OVIEDO-RONDON, 2008).

Não houve diferença significativa nos fatores avaliados entre o subgrupo positivo e negativo para *Eimeria* sp. do sistema 1, porém o subgrupo negativo apresentou resultados superiores. No sistema 2, entre o subgrupo positivo e negativo para *Eimeria* sp., a CA apresentou diferença significativa, onde o subgrupo positivo teve pior CA. O processo de multiplicação dos protozoários de *Eimeria* nas células do epitélio intestinal causam alta morte

celular e compromete o processo de digestão e absorção dos alimentos, água e medicamentos. Esta lesão no intestino reflete no aumento da CA (AMER et al., 2010; QUIROZ-CASTAÑEDA; DANTÁN-GONZÁLEZ, 2015; TER VEEN et al., 2017; DEBBOU-IOUKNANE; BENBAREK; AYAD, 2018).

A inativação dos oocistos de *Eimeria* sp. no tratamento da cama nos aviários depende dos fatores de temperaturas acima de 60°C, liberação de amônia, duração do tratamento da cama, nível de umidade e disponibilidade de oxigênio (MACKLIN et al., 2006; OVIEDO-RONDÓN, 2008; MEIRELES, 2009, KIM et al., 2012). Nessa pesquisa, o T1 (cal virgem) apresentou associação significativa com a diminuição de *E. maxima* e *E. tenella* nos lotes. Estudo com uso dos condicionadores químicos superfosfato, meta-bissulfeto e carvão, mostrou que a redução da umidade da cama gerou condições adversas para os oocistos de *E. tenella* concluírem seu desenvolvimento, pois interromperam a esporulação (SOLIMAN; SALLAM; ABOUELHASSAN, 2018). Para reduzir a umidade da cama, também pode-se utilizar cal virgem, cal hidratada, gesso agrícola e sulfato de alumínio (OLIVEIRA; FERREIRA; CANCHERINI, 2004; DAI PRÁ, 2009). A correlação positiva entre oocistos e umidade da cama durante o crescimento do lote indica a importância de manter a cama seca, para que o número de oocistos seja reduzido em galpões comerciais (CHAPMAN; JOHNSON, 1992).

Resultado de outra pesquisa com *E. acervulina* mostrou que a contagem máxima de oocistos esporulados em cama seca e úmida com diferentes combinações de temperatura e umidade relativa não mostrou diferença significativa (GRAAT et al., 1994). Em contra partida, outro estudo mostrou que a esporulação de *E. maxima* foi maior em camas com menor umidade e pior em camas mais úmidas (WALDENSTEDT et al., 2001). Porém, como mencionado pelo próprio autor e reforçado por outras pesquisas, este resultado pode não ter ocorrido pelo efeito direto da umidade, mas devido ao oxigênio limitado e pela liberação de amônia produzida por fermentação bacteriana na cama, que em altas concentrações, pode lesionar a parede dos oocistos esporulados e não esporulados (WILLIAMS, 1995; MESA et al., 2016).

Experimentos realizados em laboratório mostraram que a desinfecção da cama com produtos químicos como fenol e derivados de amônia foram eficazes na redução do número de oocistos de *E. tenella* (GUIMARÃES et al., 2007; SAMAHÀ et al., 2013), no entanto, a aplicação em cama de aviário com amônia quaternária durante o IEL não foi efetiva na redução de oocistos de *E. acervulina*. Porém, foi encontrada redução significativa no número de oocistos quando a cama foi submetida ao método de fermentação com amontoamento e coberta com lona plástica por 10 dias consecutivos (ASSIS; LUNS; CURY, 2013).

Para todas as espécies de *Eimeria* estudadas, não houve associação significativa para o T2 (fermentação da cama). Entretanto, não se pode confirmar qual temperatura as camas atingiram durante o tratamento no IEL, pois os manejos não foram acompanhados. Experimento realizado com cama umedecida e coberta com lona plástica por um período de oito dias, atingiu temperatura máxima de 30,8°C, pH médio de 9, com aumento gradual de umidade e nível de amônia. Este tratamento de fermentação não mostrou diferença na contagem de oocistos em comparação com a cama sem tratamento, em aves infectadas com *E. maxima* (MESA et al., 2016). Outro estudo encontrou redução significativa no número de oocistos de *Eimeria* sp. quando camas de dois ou mais lotes foram submetidas ao método de fermentação com amontoamento de 1,5 metros de altura e cobertas com lona plástica, por 10 a 15 dias consecutivos até atingir a temperatura entre 55 a 70°C. Com este tratamento, a contagem de oocistos na fase final dos lotes também foi menor em comparação com lotes alojados em primeira cama (GARCÉS-GUDIÑO; MERINO-GUZMÁN; CEVALLOS-GORDÓN, 2018).

É provável que em lotes de primeira cama a infecção dos frangos de corte com *Eimeria* sp. ocorra pela ingestão de oocistos que permaneceram nos aviários, mesmo após os processos de limpeza e desinfecção realizados no vazio sanitário. A parede do oocisto é extremamente forte e resistente a danos mecânicos, químicos e desafios ambientais (MAI et al., 2009; CHAPMAN et al., 2016). Neste estudo o uso de cama nova não foi significativo para o controle de coccidiose, assim como observado em outro estudo (CHAPMAN; JOHNSON, 1992).

#### 4.5 CONCLUSÃO

*Eimeria* sp. possui alta prevalência em ambos os sistemas de ambiência em aviários de frangos de corte na Mesorregião Oeste de Santa Catarina. Predominaram infecções mistas e a maior combinação foi de *E. acervulina* com *E. maxima* e *E. tenella*. Aviários com ventilação por pressão positiva apresentaram a maior prevalência total e entre as espécies de *Eimeria* sp. O melhor resultado em GPD e CA foi em aviários com ventilação por pressão negativa, com menor CA no subgrupo negativo. O uso de cal virgem na cama dos aviários no IEL foi o melhor tratamento para auxiliar no controle de *E. maxima* e *E. tenella*.

## 5 CARACTERIZAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA E MOLECULAR DE *Eimeria* sp. EM FRANGOS DE CORTE

*ANATOMOPHATOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF  
Eimeria* sp. *IN BROILERS*

### RESUMO

A coccidiose é uma doença infecciosa de grande importância na avicultura industrial. O diagnóstico correto direciona a indústria avícola ao seu melhor tratamento e controle. Este estudo objetiva caracterizar as lesões de *Eimeria* sp. em frangos de corte através da avaliação macroscópica, histopatológica e molecular, bem como comparar a eficácia destas técnicas. A pesquisa foi realizada em 64 lotes, com idade média de 29 dias, provenientes de um abatedouro sob Serviço de Inspeção Federal na Mesorregião Oeste de Santa Catarina. Em cada lote foram retirados aleatoriamente oito frangos da linha de abate, totalizando 512. Realizou-se a avaliação dos intestinos, os quais foram classificados na macroscopia e histopatologia em grau de 0 a 4, sendo grau 0 ausência de lesões e grau 4 lesões mais acentuadas. No conteúdo intestinal pesquisou-se por reação em cadeia da polimerase (PCR) oocistos das sete espécies de *Eimeria*. As avaliações macroscópicas demonstraram que 59,37% (38/64) dos lotes foram positivos para *E. acervulina*, 32,81% (21/64) para *E. maxima*, 29,68% (19/64) para *E. tenella* e 34,37% (22/64) para *E. brunetti*. Nas avaliações histopatológicas, 87,50% (56/64) apresentaram *Eimeria* sp. em duodeno, 70,31% (45/64) em jejuno, 18,75% (12/64) em íleo, 46,87% (30/64) em cecos e 4,68% (3/64) em cólon. Na PCR 21,87% (14/64) dos lotes foram positivos para *E. acervulina*, 12,5% (8/64) para *E. maxima*, 3,12% (2/64) para *E. mitis* e 32,81% (21/64) para *E. tenella*. O teste de concordância *Kappa-Cohen*'s entre a macroscopia e histologia se demonstrou com fraca correlação. Da mesma forma, as correlações das lesões macroscópicas e histopatológicas foram baixas com a PCR. Na comparação dos graus de macroscopia e histopatologia, foram encontradas diferenças significativas entre o grau 0 e 1 e não houve diferença significativa no grau 2, já no grau 3 houve diferença para duodeno, jejuno e cecos. Conclui-se que o diagnóstico macroscópico e a PCR do conteúdo intestinal podem gerar uma grande quantidade de falsos negativos, e o exame histopatológico se demonstrou mais eficaz, tornando fundamental a associação de diferentes técnicas para o correto diagnóstico de *Eimeria* sp. em frangos de corte.

**Palavras-chaves:** coccidiose, diagnóstico, metodologia, patologia, doença entérica.

## ABSTRACT

Coccidiosis is an infectious disease of great importance in industrial aviculture. The correct diagnosis directs the poultry industry to better treatment and control of the condition. The present study aimed to characterize the *Eimeria* sp. lesions in broilers by macroscopic, histologic and molecular analyses, as well as to compare these techniques. Broilers were 29 days old at the time of evaluation. All samples were derived from a slaughterhouse that is inspected by the Federal Service, at the Western mesoregion of the Brazilian state of Santa Catarina. Eight broilers from each house were randomly removed from the slaughter line, in a total of 512 samples. Intestines were macro and microscopically classified into grades 0 (absence of lesions) to 4 (severe lesions). Oocysts from seven species of *Eimeria* were detected in intestinal contents by polymerase chain reaction (PCR). Macroscopic evaluations showed that 59.37% (38/64) of houses were positive for *E. acervulina*, 32.81% (21/64) for *E. maxima*, 29.68% (19/64) for *E. tenella* and 34.37% (22/64) for *E. brunetti*. In histopathological evaluations, 87.5% (56/64) were positive for *Eimeria* sp. in duodenum, 70.31% (45/64) in jejunum, 18.75% (12/64) in ileum, 46.87% (30/64) in cecum and 4.68% (3/64) in colon. In PCR, 21.87% (14/64) of houses were positive for *E. acervulina*, 12.5% (8/64) for *E. maxima*, 3.12% (2/64) for *E. mitis* and 32.81% (21/64) for *E. tenella*. The *Kappa-Cohen*’s concordance test between macroscopy and histology were poorly correlated. Accordingly, macroscopic lesion and histopathology were poorly correlated with PCR. In the comparison between macroscopy and histopathology, there were significative differences between grades 0 and 1 and there were no differences on grades 2. For grade 3, there were significative differences in duodenum, jejunum and cecum. It is concluded that the macroscopic diagnostic and PCR of intestinal contents may yield high numbers of false negatives. The histopathology analysis proved to be the most efficacious method. This work demonstrates the importance of the association of different methods for the correct diagnosis of *Eimeria* sp. infection in broilers.

**Keywords:** coccidiosis, diagnostics, methods, pathology, enteric disease.

## 5.1 INTRODUÇÃO

A coccidiose é uma das doenças infecciosas de maior importância econômica na avicultura industrial e é causada por protozoários do gênero *Eimeria* que vivem intracelularmente ao longo do epitélio intestinal das aves (QUIROZ-CASTAÑEDA; DANTÁN-GONZÁLEZ, 2015). A infecção é fecal-oral, com a ingestão de oocistos esporulados, que invadem e desenvolvem-se nas células intestinais modificando suas estruturas e vilosidades. Este processo de reprodução resulta em perda de desempenho e aumento da mortalidade, causando grande impacto no sistema de produção de frangos de corte (MCDOUGALD, 2008; AMER et al., 2010). Sete espécies podem parasitar os frangos (*Gallus gallus domesticus*): *Eimeria acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella*. Cada espécie parasita uma região específica do intestino e as infecções podem ser por mais de uma espécie simultaneamente (ROSE; LONG, 1962; HUANG et al., 2017).

A identificação das espécies de *Eimeria* foi tradicionalmente realizada por morfologia e morfometria de seus esporocistos e oocistos presentes em fezes e camas dos aviários. Porém, têm uma relação pobre com o impacto do parasito no desempenho de um lote, requer mão-de-obra qualificada para diferenciação e identificação das espécies (LONG; JOYNER, 1984; HAUG et al., 2008) e necessita de combinação com outra técnica de diagnóstico (WILLIAMS et al., 1996).

O diagnóstico clássico de coccidiose é realizado pela avaliação macroscópica do intestino com metodologia estabelecida por Johnson e Reid (1970), na qual utiliza a observação de lesões específicas em duodeno, jejuno, íleo, cecos e cólon. Os sinais clínicos, o histórico do lote e a avaliação macroscópica do intestino fornecem um indicativo da espécie envolvida (LONG; JOYNER, 1984). As lesões intestinais causadas por *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella* são consideradas as mais importantes na produção de frangos de corte, pois mostraram causar maior impacto nos indicadores de produção. Por este motivo, as lesões no intestino causadas por essas espécies são priorizadas nas monitoradas sanitárias (TOLEDO et al., 2011; GAZONI et al., 2015; GAZONI et al., 2017; HUANG et al., 2017).

Para auxiliar no diagnóstico das lesões macroscópicas no intestino, é utilizada a análise histopatológica, que também auxilia a estabelecer a taxa de infecção por *Eimeria* sp. (KAWAZOE et al., 2005; BELOTE et al., 2019).

O desenvolvimento de métodos moleculares para a análise de *Eimeria* sp. se tornou uma ferramenta importante para auxiliar no diagnóstico de diferentes espécies (MORRIS et al., 2007), na detecção de infecção subclínica (MORGAN et al., 2009) e para estudar sua prevalência (CARVALHO et al., 2011; LAN et al., 2017). O surgimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) permitiu análises com menor quantidade de parasitos e a identificação

precisa das sete espécies de *Eimeria* sp. (FERNANDEZ et al., 2003a; FERNANDEZ et al., 2003b; MORAES et al., 2015; LAN et al., 2017).

Conforme a espécie, o grau de infecção e as medidas preventivas utilizadas para o seu controle, a coccidiose pode apresentar-se de maneira subclínica (ALLEN; FETTERER, 2002) e este difícil diagnóstico impede a indústria avícola de empregar a melhor estratégia para seu controle (SHIRZAD et al., 2011).

Este trabalho objetiva caracterizar as lesões de *Eimeria* sp. em frangos de corte através da avaliação macroscópica, histopatológica e molecular, bem como comparar a eficácia destas técnicas.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Local de pesquisa e coleta do material

A pesquisa foi realizada em 64 lotes de frangos de corte fêmeas, linhagem Cobb 500, com idade média de 29 dias, em um abatedouro sob Serviço de Inspeção Federal (SIF) na Mesorregião Oeste de Santa Catarina, Brasil, no período de outubro de 2017 a abril de 2018. Em cada lote foram retirados aleatoriamente oito frangos da linha de abate, totalizando 512. Os intestinos foram coletados para realizar as análises macroscópicas, histopatológicas e PCR.

### 5.2.2 Avaliação macroscópica dos intestinos

Foi realizada a avaliação macroscópica de oito intestinos de cada lote e observados os graus de lesões característicos causados por cada espécie de *Eimeria*, segundo a classificação de Johnson e Reid (1970), descritas no Quadro 1 (descrito anteriormente na página 30).

### 5.2.3 Análise histopatológica dos intestinos

Após a avaliação macroscópica, foram coletados, separadamente, fragmentos de 2cm de duodeno, jejuno, íleo, cecos e cólon. Estes foram fixados em formalina tamponada a 10% por 24 a 48 horas. Para o processamento histológico realizou-se corte transversal total dos fragmentos intestinais que foram corados com hematoxilina e eosina (HE). A análise das lesões histológicas, realizada em todo o corte histológico, das diferentes secções do intestino, foram classificadas de 0 a 4, conforme a presença de estruturas parasitárias compatíveis com *Eimeria*.

sp., sendo grau 0 ausência de *Eimeria* sp., grau 1 discreta quantidade de estruturas parasitárias em menos de 10 vilosidades, grau 2 moderada quantidade de estruturas parasitárias em menos de 10 vilosidades, grau 3 com moderada a grande quantidade de estruturas parasitárias em mais de 10 vilosidades e grau 4 com 80% a 100% das vilosidades acometidas por estruturas parasitárias.

#### **5.2.4 Pesquisa de *Eimeria* sp. no conteúdo intestinal pela técnica de PCR**

Após a coleta de material para análise histopatológica, em cada lote foi realizado um raspado em todo o intestino e coletado um *pool* do conteúdo intestinal dos oito frangos avaliados. Estes foram acondicionados em frascos de 100mL, contendo 50mL de solução de dicromato de potássio a 2,5% e completado com o material colhido até atingir 100mL. Em seguida, as amostras foram encaminhadas para a purificação dos oocistos e realização da técnica de PCR de *Eimeria* sp. (descrito anteriormente nas páginas 47 a 51).

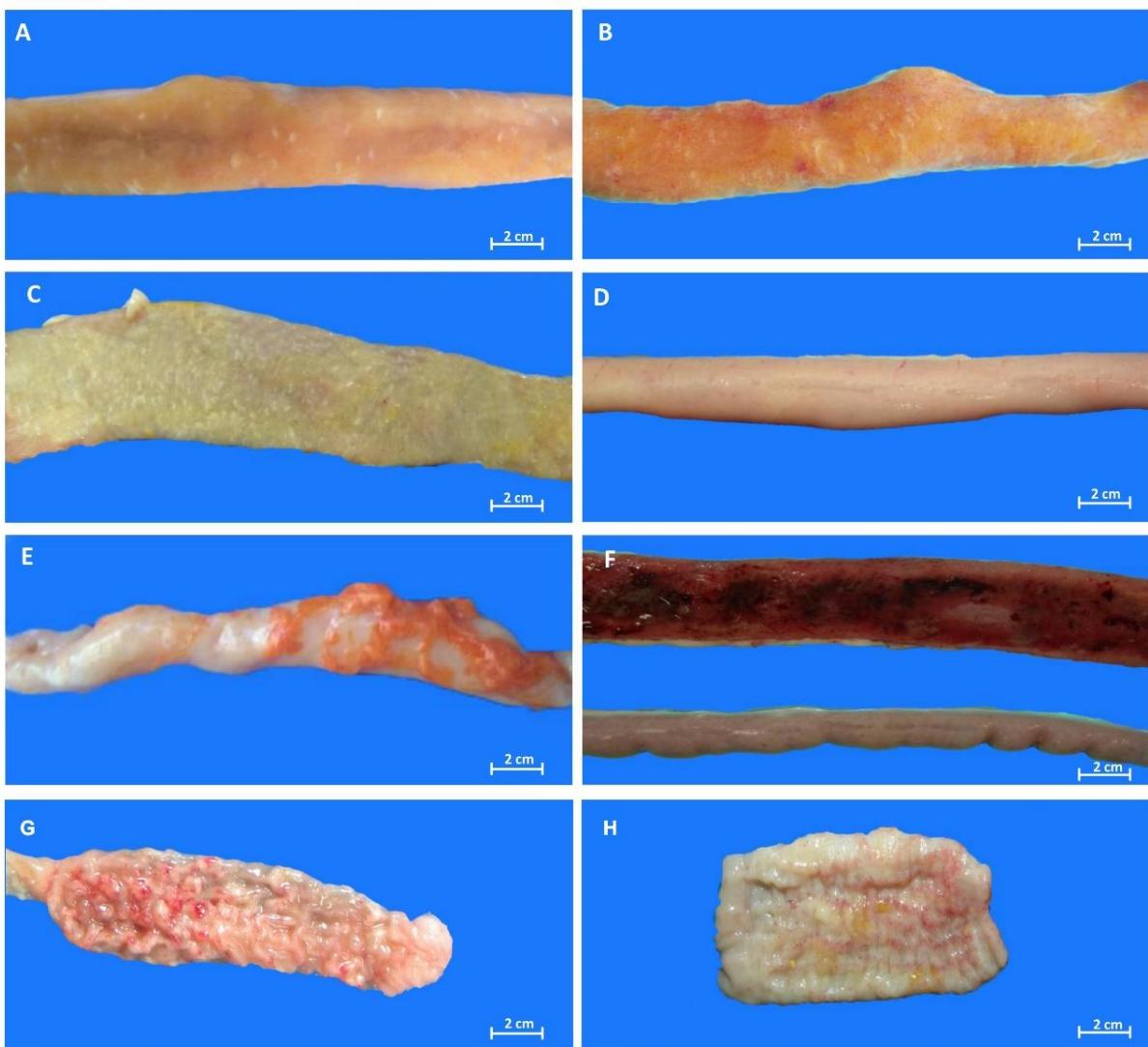
#### **5.2.5 Análise estatística dos dados**

Para obter a frequência de *Eimeria* sp., os resultados das análises macroscópicas, histopatológicas e PCR foram compilados em planilhas no *Microsoft Office Excel*. Para a avaliação da correlação das lesões macroscópicas e histopatológicas com a PCR foi empregado o teste de concordância *Kappa-Cohen*’s, onde 0 indica ausência de correlação e 1 indica total correlação entre as variáveis testadas. Os graus de lesões obtidos entre as avaliações macroscópicas e histopatológicas foram avaliados pelo teste de Wilcoxon com 5% de significância, utilizando o programa Sigma Plot 12.0.

### **5.3 RESULTADOS**

As avaliações macroscópicas dos lotes demonstraram que 59,37% (38/64) foram positivos para *E. acervulina*, 32,81% (21/64) para *E. maxima*, 29,68% (19/64) para *E. tenella* e 34,37% (22/64) para *E. brunetti* (Figura 1 A-H). Nenhum lote foi positivo para *E. necatrix*.

Figura 1 - Avaliação macroscópica de *Eimeria* sp. em frangos de corte: (A) *E. acervulina* grau 1 em duodeno com estrias brancas dispersas na mucosa. (B) *E. acervulina* grau 2, mucosa com estrias brancas não coalescentes. (C) *E. acervulina* grau 3 com parede intestinal engrossada, estrias brancas abundantes e coalescentes. (D) *E. maxima* grau 1 em jejuno com petéquias dispersas na serosa. (E) *E. maxima* grau 2 com espessamento da parede intestinal e muco alaranjado. (F) *E. maxima* grau 3, parede intestinal com embalonamento e espessamento, com petéquias em grande quantidade na serosa e conteúdo intestinal avermelhado no lúmen. (G) *E. tenella* grau 1 em ceco com petéquias dispersas na mucosa. (H) *E. brunetti* grau 1 em cólon com áreas avermelhadas na mucosa.

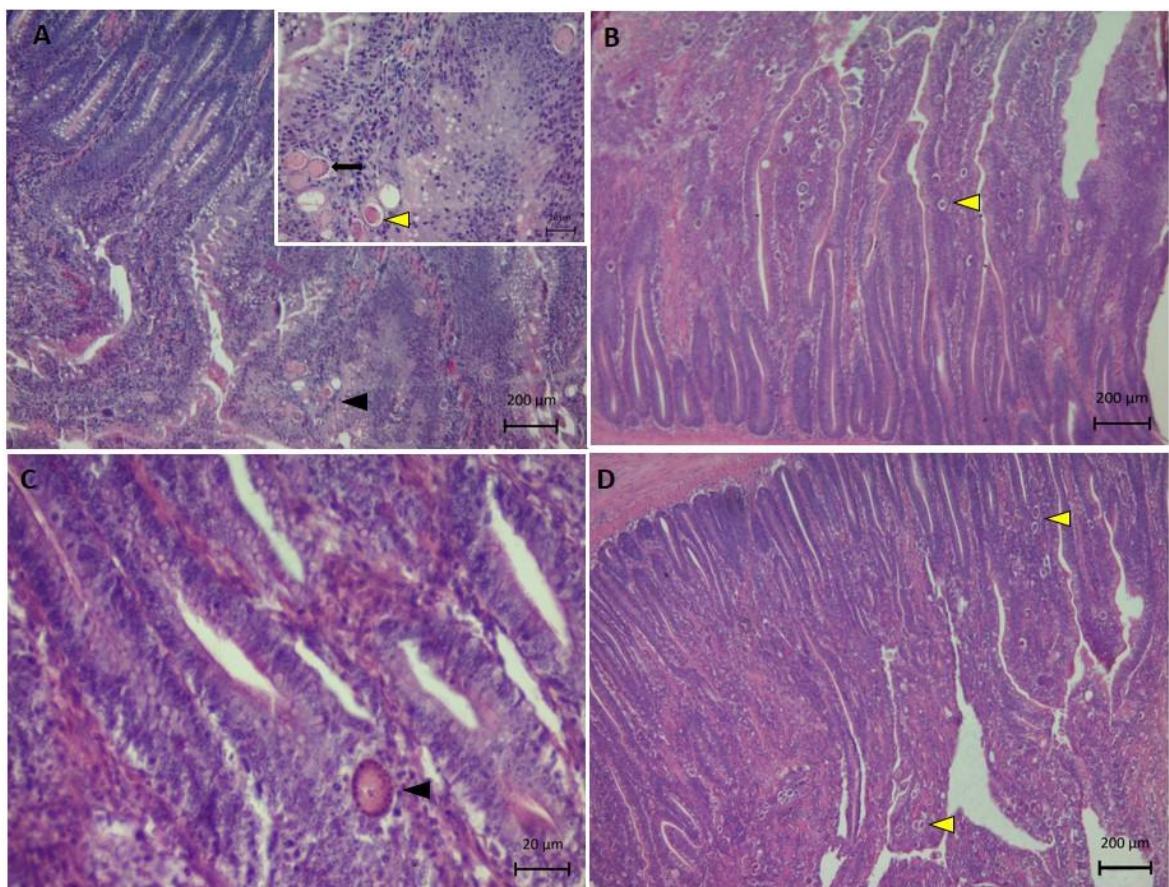


Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Na avaliação histopatológica, 87,50% (56/64) apresentaram estruturas parasitárias compatíveis com *Eimeria* sp. em duodeno, 70,31% (45/64) em jejuno, 18,75% (12/64) em íleo,

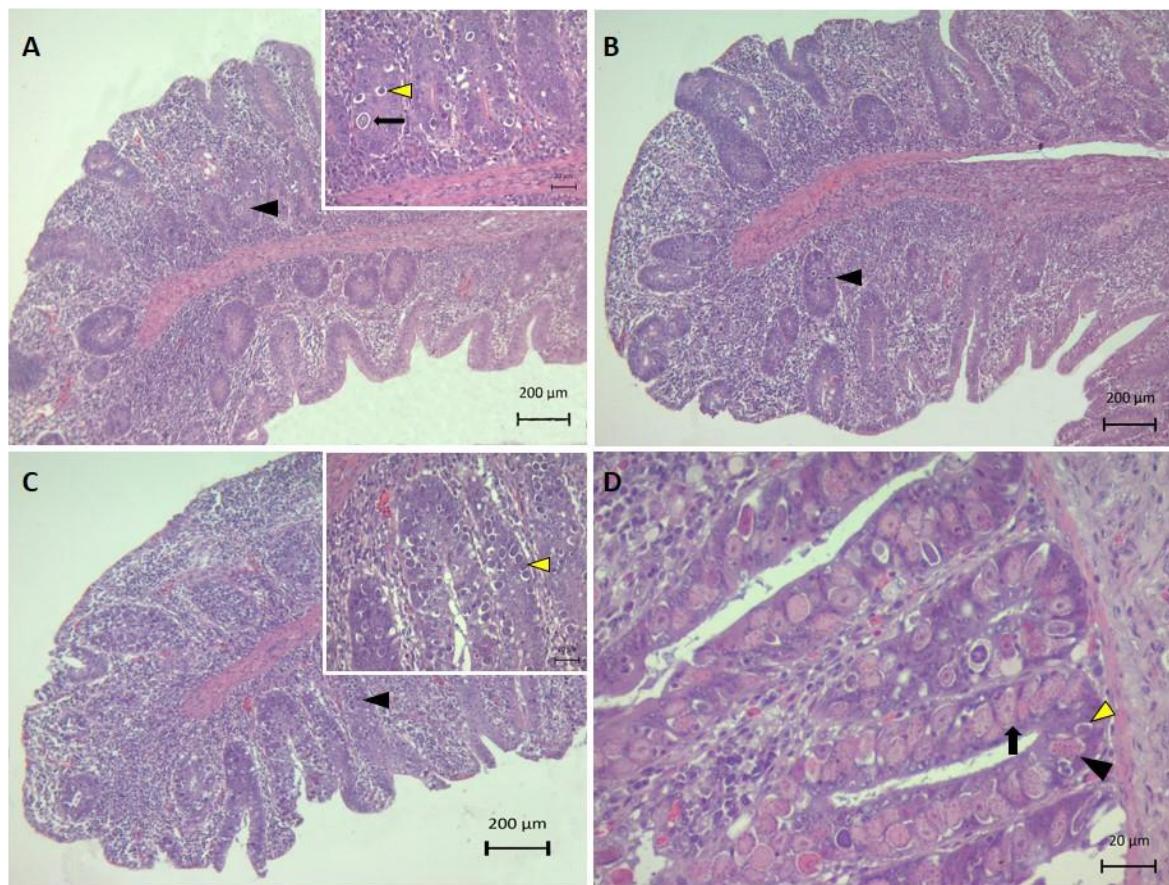
46,87% (30/64) em cecos e 4,68% (3/64) em cólon. As estruturas parasitárias compatíveis com *Eimeria* sp. foram observadas na mucosa e na submucosa intestinal e estavam presentes nas fases de desenvolvimento em esquizontes, macrogametas, microgametas e oocistos imaturos (Figuras 2A-D e 3A-D).

Figura 2 - Caracterização histopatológica de *Eimeria* sp. no intestino delgado em frangos de corte: (A) Lesão grau 1 em duodeno com discreta quantidade de parasitos em menos de 10 vilosidades (cabeça de seta). No destaque observa-se oocisto imaturo (cabeça de seta amarela) e macrogameta (seta). (B) Lesão grau 2 em duodeno com moderada quantidade de oocistos imaturos em mais de 10 vilosidades (cabeça de seta amarela). (C) Lesão grau 1 em jejuno demonstrando um macrogameta (cabeça de seta). (D) Lesão grau 2 em jejuno com moderada quantidade de oocistos imaturos em menos de 10 vilosidades (cabeças de setas amarelas). Hematoxilina e eosina (HE).



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Figura 3 - Caracterização histopatológica de *Eimeria* sp. no ceco de frangos de corte: (A) Lesão grau 1 com discreta quantidade de parasitos (cabeça de seta preta) em menos de 10 criptas. No destaque observa-se oocistos imaturos (cabeça de seta amarela) e um esquizonte (seta). (B) Lesão grau 2 com moderada quantidade de oocistos imaturos em menos de 10 criptas (cabeça de seta). (C) Lesão grau 3 com grande quantidade de parasitos (cabeça de seta preta) em mais de 10 criptas. No destaque observa-se oocistos imaturos (cabeça de seta amarela). (D) Lesão grau 4 com mais de 80% das criptas repletas de microgametas (cabeça de seta preta), macrogametas (seta) e oocistos imaturos (cabeça de seta amarela). Hematoxilina e eosina (HE).



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

A avaliação dos graus de lesões e o número de positividade em cada análise e a significância estatística entre os graus de lesões macroscópicas e histopatológicas para *Eimeria* sp. nos frangos de corte avaliados, estão demonstrados na Tabela 5.

Dos resultados obtidos por PCR, 21,87% (14/64) dos lotes foram positivos para *E. acervulina*, 12,5% (8/64) para *E. maxima*, 3,12% (2/64) para *E. mitis* e 32,81% (21/64) para *E. tenella*. As espécies *E. brunetti*, *E. necatrix* e *E. praecox* não foram identificadas.

Tabela 5. Frequências das lesões macroscópicas e histopatológicas para cada segmento intestinal nos diferentes graus de lesão por *Eimeria* sp. em frangos de corte.

Grau	Lesões macroscópicas					Lesões histopatológicas				
	Duodeno	Jejuno	Íleo	Ceco	Cólon	Duodeno	Jejuno	Íleo	Ceco	Cólon
<b>G0</b>	71,48% (366)a	93,94% (481)a	100% (512)a	92,57% (474)a	80,27% (411)a	47,85% (245)b	59,76% (306)b	94,72% (485)b	77,73% (398)b	98,82% (506)b
<b>G1</b>	23,24% (119)a	5,66% (29)a	0% (0)a	7,22% (37)a	19,73% (101)a	40,03% (205)b	26,75% (137)b	4,1% (21)b	12,3% (63)a	1,17% (6)b
<b>G2</b>	4,49% (23)a	0,19% (1)a	0% (0)a	0,19% (1)a	-	6,44% (33)a	3,12% (16)a	0,39% (2)a	2,53% (13)a	-
<b>G3</b>	0,78% (4)a	0,19% (1)a	0% (0)a	0% (0)a	-	5,66% (29)b	10,35% (53)b	0,78% (4)a	7,22% (37)b	-
<b>G4</b>	-	-	-	0% (0)a	-	-	-	-	0,19% (1)b	-

Letras iguais não apresentaram diferença estatística entre o mesmo grau avaliado nas duas análises, letras diferentes apresentaram diferença estatística entre o mesmo grau avaliado nas duas análises.

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Os resultados do teste de concordância *Kappa-Cohen's* entre macroscopia, histopatologia e PCR estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6. Concordância entre macroscopia, histopatologia e PCR de *Eimeria* sp. para cada segmento intestinal em frangos de corte.

Segmento intestinal	Variáveis testadas		
	Macroscopia / Histopatologia	Histopatologia / PCR	Macroscopia / PCR
<b>Duodeno</b>	0,16	0,03	0,12
<b>Jejuno</b>	0,19	0,11	0,28
<b>Íleo</b>	0*	0,25	0*
<b>Ceco</b>	0,52	0,65	0,49
<b>Cólon</b>	0,08	0*	0*

\*nenhum caso positivo em ambos os testes.

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

## 5.4 DISCUSSÃO

De acordo com os dados presentes, houve diferença nos resultados dos diagnósticos de coccidiose entre os três métodos avaliados. O diagnóstico de *Eimeria* sp. exclusivamente pela avaliação macroscópica foi falho, pois o teste de concordância entre a histopatologia e a macroscopia demonstrou-se com fraca correlação, sendo que muitos lotes que não apresentavam lesões macroscópicas apresentaram diferentes graus de parasitismo na análise histopatológica. Outro estudo utilizando estas duas metodologias também mostrou que a histopatologia contribuiu para o correto diagnóstico de coccidiose e, que utilizar isoladamente a avaliação macroscópica pode não representar a verdadeira magnitude da infecção por *Eimeria* sp. (IDRIS et al., 1997b). A histopatologia mostrou ser um método objetivo para analisar a infecção por *Eimeria* sp., porém, utilizar apenas esta técnica não é suficiente para definir a espécie infectante.

Entre as variáveis testadas, o ceco foi o segmento intestinal que apresentou correlação moderada entre as três técnicas de diagnóstico. Isto pode ter ocorrido por possuir maior quantidade de material fecal em todas as amostras coletadas, e assim maior presença de oocistos para a PCR. Em complemento, *E. tenella* apresenta lesões macroscópicas mais características, o que pode ter facilitado sua identificação. Duodeno e jejuno, apesar de apresentarem visualização macroscópica, obtiveram correlação mínima entre as variáveis testadas e diferença significativa entre os diferentes graus de lesões macroscópicas com histopatológicas.

Observou-se que a região do íleo não apresentou lesão macroscópica característica de *E. necatrix* e a PCR foi negativa para este protozoário e, que a PCR do cólon foi negativa para *E. brunetti*. A ausência de lotes positivos nestas metodologias de diagnóstico aplicadas, dificultou a análise destes dados. *Eimeria necatrix* é pouco prolífera nas primeiras semanas de vida das aves, mas poderia estar presente de forma discreta no íleo e ser encontrada na histopatologia (SHIRLEY; BUMSTEAD, 1994). Estas estruturas parasitárias também podem estar relacionadas com *E. maxima* que se desenvolve na região do jejuno e nas infecções severas pode se deslocar até a junção ileocecal (CONWAY; MCKENZIEH, 2007). Entretanto, no cólon, as aves apresentaram maior positividade na macroscopia em comparação com a histopatologia. Na avaliação macroscópica do colón, rotineiramente são observadas estrias avermelhadas na mucosa, organizadas longitudinalmente e paralelamente, devido a contração do músculo liso após a morte da ave. Essa alteração é chamada de víbices ou placas tigroides, não tem importância patológica e é uma alteração *post mortem* (ZACHARY; MCGAVIN, 2012).

Houve diferença significativa entre o grau 0 de lesão macroscópica e histológica em todos os segmentos intestinais e entre o grau 1 em duodeno, jejuno, íleo e cólon. Em

contrapartida, nestes segmentos intestinais não houve diferença significativa no grau 2. Deste modo, nota-se que na macroscopia não é possível detectar a presença de *Eimeria* sp. em infecções leves. A diferença estatística também pode ser observada no grau 3, com maior número de frangos acometidos por *Eimeria* sp. na análise histopatológica e assim, com dano intestinal mais severo do que o observado na macroscopia. Na análise histopatológica foi encontrado apenas um frango com grau 4 e acredita-se que possa ser a mesma ave acometida no grau 2 de lesão macroscópica. Em investigações anteriores, o método de pontuação de lesões histopatológicas também foi superior aos escores macroscópicos para detectar infecções por *E. maxima* em frangos de corte (IDRIS et al., 1997b; GOODWIN; BROWN; BOUNOUS, 1998). Assim, reforça-se a importância de associar as duas metodologias para detectar todos os graus de infecção e identificar a coccidiose subclínica (SHIRZAD et al., 2011).

Os resultados de correlação de lesões macroscópicas e histopatológicas foram baixas com a PCR. Isso ocorreu possivelmente devido à pequena quantidade de oocistos no conteúdo intestinal, pois os frangos passaram por jejum alimentar no período pré-abate para realizar a limpeza intestinal e evitar contaminações nas carcaças. Desta forma, *Eimeria* sp. estaria presente em maior quantidade na mucosa intestinal nas diferentes fases do ciclo reprodutivo, o que afetou a sensibilidade da PCR. Outras pesquisas com técnicas moleculares utilizaram fezes frescas (HUANG et al., 2017; PEEK et al., 2017) ou cama dos aviários com oocistos esporulados e obtiveram melhor resultado com a PCR (MORAES et al., 2015; JENKINS et al., 2019).

No diagnóstico molecular, *Eimeria mitis* e *E. praecox* tiveram frequência de 3,12% e 0%, respectivamente. Como não é possível realizar diagnóstico macroscópico é relevante utilizar as técnicas moleculares para verificar se há presença destas duas espécies nos lotes de frangos de corte (MEIRELES; ROBERTO; RIERA, 2004; CARVALHO et al., 2011).

Na literatura, não há trabalhos comparando os resultados destas três técnicas de diagnóstico para coccidiose. Ressaltando que o presente estudo foi realizado com aves coletadas de forma aleatória, provenientes do sistema de produção de frangos de corte, sem interferência em medidas preventivas e manejos das instalações. Poucos trabalhos utilizam três metodologias para definir o diagnóstico de coccidiose em frangos de corte. Um estudo para a identificação de *E. maxima* aplicou as técnicas de macroscopia, histopatologia e contagem de oocistos por grama de fezes (OOPG), onde a histopatologia se destacou por localizar significativamente mais *E. maxima* (GOODWIN; BROWN; BOUNOUS, 1998). Em outra pesquisa, o escore de lesão intestinal apresentou menor frequência de *Eimeria* sp. em comparação com a morfologia e, o PCR foi mais eficiente na identificação das espécies de *Eimeria* (CARVALHO et al., 2011).

Alguns estudos ainda aplicam a macroscopia com exames parasitológicos para monitorar a infecção por *Eimeria* sp. (SHIZARD et al., 2011, GAZONI et al., 2017, LAN et al., 2017, DEBBOU-IOUKNANE; BENBAREK; AYAD, 2018). A identificação de *Eimeria* sp. por histopatologia é utilizada em observações experimentais para medir o impacto da doença nos indicadores técnicos como mortalidade, ganho de peso e conversão alimentar (AMER et al., 2010; KAWAHARA et al., 2014; BELOTE et al., 2019) e em avaliações de lesões na parede intestinal causadas em infecções por *Eimeria* sp. (DEBBOU-IOUKNANE; BENBAREK; AYAD, 2018). Esta técnica também é aplicada para a avaliação da efetividade de produtos anticoccidianos (ZHANG et al., 2012; SHE et al., 2017; FORTUOSO et al., 2019b) e de vacinas (JEFFERS, 1975; SONG et al., 2016; SUPRIHATI; YUNUS, 2018).

Pesquisas com biologia molecular são aplicadas para verificar a ocorrência das espécies de *Eimeria* sp. em frangos de corte. Em sua grande maioria, as análises são associadas com exames parasitológicos apenas para confirmar a presença das espécies identificadas (SUN et al., 2009; OGLEDENGBE et al., 2011; GYÖRKE; POP; COZMA, 2013; MORAES et al., 2015; HUANG et al., 2017). Muitos estudos estão voltados para o aperfeiçoamento da especificidade e sensibilidade na identificação das espécies de *Eimeria* (RAO et al., 2013; BARKWAY et al., 2015; PEEK et al., 2017; HINSU et al., 2018).

## 5.5 CONCLUSÃO

Evidencia-se que o diagnóstico macroscópico e a PCR podem gerar uma grande quantidade de falsos negativos. O exame histopatológico demonstrou-se mais eficaz e auxiliou no diagnóstico em casos de lesões inespecíficas ou discretas macroscopicamente. Desta forma, a análise histopatológica associada com a avaliação macroscópica é a mais indicada para o diagnóstico de campo, incluindo a PCR para auxiliar no diagnóstico preciso das espécies de *Eimeria* presentes nos lotes de frangos de corte.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prevalência de *Eimeria* sp. encontrada na Mesorregião Oeste de Santa Catarina foi elevada contudo, semelhante a outros estudos realizados no Brasil e no exterior. A espécie mais prevalente foi *Eimeria acervulina*. Infecções com duas ou mais espécies estavam presentes na maioria dos lotes com associação de *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*.

A prevalência total e das espécies de *Eimeria* foi maior em aviários com ventilação por pressão positiva. Os aviários com ventilação por pressão negativa apresentaram melhor desempenho técnico em GPD e CA e, lotes negativos para *Eimeria* sp. obtiveram resultados ainda melhores em CA. Neste sistema, o maior intervalo entre lotes também auxiliou no controle de coccidiose. No tratamento de cama, o uso de cal virgem durante o intervalo entre lotes mostrou ser capaz de reduzir o risco do lote ser positivo para *E. maxima* e *E. tenella*.

Os três métodos avaliados para o diagnóstico de *Eimeria* sp. apresentaram diferença nos resultados. Entre a macroscopia e a histologia as avaliações dos grau 0 e 1 apresentaram diferença significativa, onde a histologia conseguiu diagnosticar as lesões brandas. Os resultados entre as duas técnicas foram semelhantes no grau 2, pois as lesões macroscópicas são mais evidentes. A correlação de lesões macroscópicas e histopatológicas foram baixas com a PCR. No entanto, esta técnica auxilia na confirmação das espécies identificadas na macroscopia e/ou histologia e no diagnóstico de *Eimeria mitis* e *E. praecox*.

Os resultados obtidos reforçam a importância de manter os frangos de corte com manejos corretos de ambiência e de procedimentos sanitários para o controle de coccidiose e assim, atingir o melhor custo final de produção. Os dados mostram que o diagnóstico por histopatologia se apresentou de forma superior as outras metodologias e, apenas a avaliação macroscópica não parece ser adequada para uso em monitorias que dependem da detecção de *Eimeria* sp. em frangos de corte. Assim, a associação de diferentes técnicas é fundamental para a conclusão do diagnóstico de coccidiose.

## 7 REFERÊNCIAS

ABDISA, T. et al. Poultry coccidiosis and its prevention, control. **Jornal of Veterinary and Jornal Animal Research**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2019.

ABREU, V. M. N; ABREU, P.G. Os desafios da ambiência sobre os sistemas de aves no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 256, p. 1-14, 2011.

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

AMARAL P. F. G. P.; OTUTUMI L. K. Prevalência da coccidiose em frangos de corte em uma integração avícola da Região Noroeste do Estado do Paraná. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16; p. 1759-1768, 2013.

AMER, M. M. et al. Isolation and identification of *Eimeria* from field coccidiosis in chickens. **Journal of American Science**, v. 6, n. 10, p. 1107-1114, 2010.

ARADAS, M.E.C.; NÄÄS, I.A.; SALGADO, D.D. Comparing the thermal environment in broiler houses using two bird densities under tropical conditions. **CIGR E-Journal**, v.7, p.1-12, 2005.

ASSIS, R. C. L.; LUNS, F. L.; CURY, M.C. Desinfecção com amônia quaternária associada à fermentação não potencializa o controle de coccidiose em cama de frango. **Ciência Rural**, v. 43, n. 8, p. 1459-1463, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br>>. Acesso em: 23, jan. 2020.

BARKWAY, C. P. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the species-specific detection of *Eimeria* that infect chickens. **Journal of Visualized Experiments**. v. 20, n. 96, p. 1-6, 2015.

BELOTE, B. L. et al. Histological parameters to evaluate intestinal health on broilers challenged with *Eimeria* and *Clostridium perfringens* with or without enramycin as growth promoter. **Poultry Science**, v. 97, p. 2287–2294, 2018.

BELOTE, B. L. et al. Applying I see inside histological methodology to evaluate gut health in broilers challenged with *Eimeria*. **Veterinary Parasitology**: X, v. 1, article 100004, 2019.

BELOVA, A. V.; SMUTKA, L.; ROSOCHATECK'A, E. World chicken meta Market – its development and current status. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 60, n. 4, p. 15–30, 2012.

BLAKE, D. et al. Genetic identification of antigens protective against coccidia. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 305–314, 2006.

BLAKE, D. P.; TOMLEY, F. M. Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 12–19, 2014.

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.

CARVALHO, R. H. et al. The effects of the dark house system on growth, performance and meat quality of broiler chicken. **Animal Science Journal**, v. 86. n. 2, p. 189–193, 2014.

CHAPMAN, H. D. Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. **Avian Pathology**, v. 26. n. 2, p. 221-44, 1997.

CHAPMAN, H. D. Anticoccidial drugs and their effects upon the development of immunity to *Eimeria* infections in poultry. **Avian Pathology**, v. 28, n. 6, p. 521–535, 1999.

CHAPMAN, H. D.; JOHNSON, Z. B. Oocysts of *Eimeria* in the litter of broilers reared to eight weeks of age before and after withdrawal of lasalocid or salinomycin. **Poultry Science**, v. 71, n. 8, p. 1342-1347, 1992.

CHAPMAN, H. D. et al. A selective review of advances in coccidiosis research. **Advances in Parasitology**, v. 83, n. 354, p. 93-171, 2013.

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

CHAPMAN, H. D. et al. The epizootiology of *Eimeria* infections in commercial broiler chickens where anticoccidial drug programs were employed in six successive flocks to control coccidiosis. **Poultry Science**, v. 95, n. 8, p. 1774-1778, 2016.

CHEN, Z.; JIANG, X. Microbiological safety of chicken litter or chicken litter-based organic fertilizer: a review. **Agriculture**, v. 4, p. 1-29, 2014.

CHEN, Z. et al. Effects of chicken litter storage time and ammonia content on thermal resistance of desiccation-adapted *Salmonella* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 19, p. 6883-6889, 2015.

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, M. E. **Poultry coccidiosis**: diagnostic and testing procedures. 3th ed. Ames, I. A.: Blackwell Publishing Professional, 2007. 37-40 p.

DAÍ PRA, M. A. et al. Uso de cal virgem para o controle de *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp. em camas de aviário. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1189-1194, 2009.

DEBBOU-IOUKNANE, N.; BENBAREK, H.; AYAD, A. Prevalence and aetiology of coccidiosis in broiler chickens in Bejaia province, Algeria. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 18, n. 85, p. 1-6, 2018.

DINIZ, G. S. et al. Salinomicina e semduramicina associadas em diferentes concentrações no controle da eimeriose em frangos de corte. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 53-58, 2009.

DONZELE, J. L. et al. Efeito da nicarbazina sobre o desempenho de frangos de corte recebendo diferentes níveis de lisina submetidos a estresse por calor. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, supl. 1, p. 1052-1057, 2001.

FERNANDEZ, S. et al. A survey of the inter- and intraspecific RAPD markers of *Eimeria* spp. of the domestic fowl and the development of reliable diagnostic tools. **Parasitology Research**, v. 89, n. 6, p. 437-445, 2003a.

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, n. 4, p. 317-325, 2003b.

FERREIRA, H. A.; OLIVEIRA, M. C., TRALDI, A. B. Efeito de condicionadores químicos na cama de frango sobre o desempenho de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p. 542-546, 2004.

FORTUOSO, B. F. et al. Impairment of the phosphotransfer network and performance in broiler chickens experimentally infected by *Eimeria* spp.: The role of the oxidative stress. **Parasitology International**, v. 70, p. 16-22, 2019a.

FORTUOSO, B. F. et al. Glycerol monolaurate in the diet of broiler chickens replacing conventional antimicrobials: Impact on health, performance and meat quality. **Microbial Pathogenesis**, v. 129, p. 161-167, 2019b.

GARCÉS-GUDIÑO, J.; MERINO-GUZMÁN, R.; CEVALLOS-GORDÓN, A. L. Litter reuse reduces *Eimeria* spp. oocyst counts and improves the performance in broiler chickens reared in a tropical zone in Ecuador. **Europe Poultry Science**, v. 82, 2018.

GASSER, R. B. et al. Automated, fluorescence- based approach for the specific diagnosis of chicken coccidiosis. **Electrophoresis**, v. 22, n. 16, p. 3546-3550, 2001.

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. 511-515, 2015.

GAZONI, F. L. et al. Study of the correlation between intestinal health and prevalence of coccidiosis in broiler chickens of Brazilian agribusinesses between the years 2015 and 2016. **International Journal of Poultry Science**, v. 16, n. 10, p. 381-386, 2017.

GOODWIN, M. A.; BROWN, J.; BOUNOUS, D. I. 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.

GRAAT, E. A. M. et al. Rate and course of sporulation of oocysts of *Eimeria acervulina* under different environment conditions. **Parasitology**, v. 108, p. 497–502, 1994.

GRAAT, E. A. M. et al. Effects of initial litter contamination level with *Eimeria acervulina* on population dynamics and production characteristics in broilers. **Veterinary Parasitology**, v. 65, n. 3-4, p. 223-232, 1996.

GUIMARÃES, J.S.J. et al. In vitro evaluation of the disinfectioneffi cacy on *Eimeria tenella* unsporulated oocysts isolated from broilers. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 2, p. 67-71, 2007.

GYÖRKE, A.; POP, L.; COZMA, V. Prevalence and distribution of *Eimeria* species in broiler chicken farms of different capacities. **Parasite**, v. 20, n. 50, p. 5-8, 2013.

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.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HINSU, A.T., et al. Illumina next generation sequencing for the analysis of *Eimeria* populations in commercial broilers and indigenous chickens. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, article 176, 2018.

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

HUANG, Y. et al. Prevalence of *Eimeria* species in domestic chickens in Anhui province, China. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 4, p. 1014-1019, 2017.

IDRIS, A. B. et al. Quantitative pathology of small intestinal coccidiosis caused by *Eimeria maxima* in young broilers. **Avian Pathology**, v. 26, n. 4, p. 731-747, 1997a.

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, n. 2, p. 388-391, 1997b.

JEFFERS, T. K. Attenuation of *Eimeria tenella* through selection for precociousness. **The Journal of Parasitology**, v. 61, n. 6, p. 1083-1090, 1975.

JENKINS, M. C.; PARKER, C.; RITTER, D. *Eimeria* oocyst concentrations and species composition in litter from commercial broiler farms during anticoccidial drug or live *Eimeria* oocyst vaccine control programs. **Avian Diseases**, v. 61, n. 2, p. 214-220, 2017.

JENKINS, M. C et al. Viable *Eimeria* oocysts in poultry house litter at the time of chick placement. **Poultry Science**, v. 98, n. 8, p. 3176-3180, 2019.

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

JOHNSON, W. T. Immunity or resistance of the chicken to coccidial infection. In: **Station Bulletin** 230, Oregon Agricultural College Experiment Station, Corvallis, OR. 1927, 5-31 p.

JORDAN A. B. et al. Molecular identification of *Eimeria* species in broiler chickens in Trinidad, West Indies. **Veterinary Science**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2018.

JOYNER, L. P.; LONG, P. L. The specific characters of the *Eimeria*, with special reference to the coccidia of the fowl. **Avian Pathology**, v. 3, n. 3, p. 145-157, 1974.

KAWAHARA, F. et al. Characterization of *Eimeria brunetti* isolated from a poultry farm in Japan. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 76, n. 1, p. 25-29, 2014.

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

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

KIM, J. et al. Validating thermal inactivation of *Salmonella* spp. in fresh and aged chicken litter. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 1302-1307, 2012.

LAN, L. H. et al. Prevalence and drug resistance of avian *Eimeria* species in broiler chicken farms of Zhejiang province, China. **Poultry Science**, v. 96, n. 7, p. 2104-2109, 2017.

LEE, B. et al. Prevalence and cross-immunity of *Eimeria* species on Korean chicken farms. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 8, p. 985-989, 2010.

LILLEHOJ, E. P.; YUN, C. H.; LILLEHOJ, H. S. Vaccines against the avian enteropathogens *Eimeria*, *Cryptosporidium* and *Salmonella*. **Animal Health Research Reviews**, v. 1, n. 1, p. 47-65, 2000.

LILLEHOJ, H.S.; MIN, W.; DALLOUL, R.A. Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*. **Poultry Science**, v. 83, n. 4, p. 611-623, 2004.

LONG, P. L.; REID, W. M. **A guide for the diagnosis of coccidiosis in chickens**. 2nd. ed. The University of Georgia, College of Agriculture, 1982. 17 p.

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.

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

MAI, K. et al. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. **Memórias ao Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 2, p. 81-289, 2009.

MARTINS, G. F., et al. Uso de vacinas no controle da coccidiose aviária. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, p. 1165-1176, 2012.

MCDOUGALD, L. R. et al. Anticoccidial efficacy of diclazuril in broilers under simulated natural conditions in floor pens. **Avian Disease**, v. 34, n. 4, p. 905-910, 1990.

MCDOUGALD, L. R.; FULLER, L.; MATTIELO, R. A survey of coccidia on 43 poultry farms in Argentina. **Avian Diseases**, v. 41, n. 4, p. 923-929, 1997.

MCDOUGALD, L. R. Protozoal infections. In: SAIF Y.M.; BARNES, H.J.; GLISSON, J.R.; FADLY, A.M.; MACDOUGALD, L.R.; SWAYNE, D.E. **Disease of Poultry**. 12th ed. Iowa, EUA: Iowa State University Press. 2008, 1067-1085 p.

MCDONALD, V.; SHIRLEY, M. W. Past and future: vaccination against *Eimeria*. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p. 1477-1489, 2009.

MEIRELES, M.; ROBERTO, L.; RIERA, R. Identification of *Eimeria mitis* and *Eimeria praecox* in broiler feces using polymerase chain reaction. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 6, n. 4, p. 249-252, 2004.

MEIRELES, M. V. Coccidiose aviária. In: REVOLLEDO, L., FERREIRA, A. J. P. **Patologia aviária**. Barueri: Manole Ltda., 2009, 310-318 p.

MESA, D. et al. Influence of covering reused broiler litter with plastic canvas on litter characteristics and bacteriology and the subsequent immunity and microbiology of broilers. **Brazilian Journal Poultry Science**, v. 18, n. 4, p. 563-572, 2016.

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, n. 2, p. 277-281, 2015.

MORGAN, J. A. et al. Real-time polymerase chain reaction (PCR) assays for the specific detection and quantification of seven *Eimeria* species that cause coccidiosis in chickens. **Molecular and Cellular Probes**, v. 23, n. 2, p. 83-89, 2009.

MORRIS, G. M.; GASSER, R. B. Biotechnological advances in the diagnosis of avian coccidiosis and the analysis of genetic variation in *Eimeria*. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 6, p. 590–603, 2006.

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, n. 4, p. 288-294, 2007.

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

NOWICKI, R. et al. Desempenho de frangos de corte criados em aviários convencionais e escuros. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia**, v. 14, n. 1, p. 25-28, 2011.

OLANREWAJU, H. A. et al. Effect of ambiente temperature and light intensity on physiological reactions of heavy broiler chickens. **Poultry Science**, v. 89, n. 2, p. 2668-2677, 2010.

OGEDENGBE, J. D. et al. Molecular identification of *Eimeria* species infecting market-age meat chickens in commercial flocks in Ontario. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 1, p. 350–354, 2011.

OLIVEIRA, M. C.; FERREIRA, H. A.; CANCHERINI, L.C. Efeito de condicionadores químicos sobre a qualidade da cama de frango. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 536-541, 2004.

OLIVEIRA, R.F.M. et al. Efeitos da temperatura e da umidade relativa sobre o desempenho e o rendimento de cortes nobres de frangos de corte de 1 a 49 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 797-803, 2006.

OVIEDO-RONDÓN, E. O. Tecnologias para mitigar o impacto ambiental da produção de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 1, p. 239-252, 2008.

PEEK, H.W.; LANDMAN, W.J.M. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. **Veterinary Quarterly**, v. 31, n. 3, p. 143-161, 2011.

PEEK, H. W. et al. Validation of a quantitative *Eimeria* spp. PCR for fresh droppings of broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 46, n. 6, p. 615-622, 2017.

PESTI, G. M. et al. The influence of withdrawal time on the performance of broiler chickens fed semduramicin. **Poultry Science**, v. 81, n. 7, p. 939-944, 2002.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R.E.; DANTÁN-GONZÁLEZ E. Control of avian coccidiosis: future and present natural alternatives. **BioMed Research International**, Article 430610, p. 1-11, 2015.

RAO, P. V. et al. Multiplex PCR assay using SCAR primers to detect *Eimeria* spp. in chicken. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 37, n. 1, p. 110–113, 2013.

RAZMI, G.R.; KALIDERI, G.A. Prevalence of subclinical coccidiosis in broiler-chicken farms in the municipality of Mashhad, Khorasan, Iran. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 44, n. 3-4, p. 247-53, 2000.

ROSE, M. E.; LONG, P. L. Immunity to four species of *Eimeria* in fowls. **Immunology**, v. 5, p. 79–92, 1962.

SAMAHA, H. A. et al. Assessment efficiency of some chemical disinfectants commonly used against coccidia in poultry farms. **Alexandria Journal of Veterinary Sciences**, v. 39, n. 1, p. 82-90, 2013.

SHE, R. et al. Action of nitromezuril against *Eimeria tenella* with clinically anticoccidial indices and histopathology. **Parasitology Research**, v. 116, n. 8, p. 2167-2174, 2017.

SHIRLEY, M. W.; BEDRNÍK P. Live Attenuated Vaccines against avian coccidiosis: success with precocious and egg-adapted lines of *Eimeria*. **Parasitology Today**, v. 13, n. 12, p. 481-484, 1997.

SHIRLEY, M.W.; BUMSTEAD CHAPTER,, N. Intra-specific variation within *Eimeria tenella* detected by the random amplification of polymorphic DNA. **Parasitology Research**, v. 80, n. 4, p. 346-351, 1994.

SHIRLEY, M. W.; SMITH, A. L.; BLAKE, D. P. Challenges in the successful control of the avian coccidia. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5540-5547, 2007.

SHIRZAD, M. R. et al. Prevalence and risk factors for subclinical coccidiosis in broiler chicken farms in Mazandaran province, Iran. **Trop Animal Health Production**, v. 43, n. 8, p. 1601-1604, 2011.

SHIVARAMAIAH, C.; BARTA, J. R.; HERNANDEZ-VELASCO, X. Coccidiosis: recent advancements in the immunobiology of *Eimeria* species, preventive measures, and the importance of vaccination as a control tool against these Apicomplexan parasites. **Veterinary Medicine Research and Report**, v. 5, n. 1, p. 23-34, 2014.

SOLIMAN, E. S.; SALLAM, N. H.; ABOUELHASSAN, E. M. Effectiveness of poultry litter amendments on bacterial survival and *Eimeria* oocyst sporulation. **Veterinary World**, v. 11, n. 8, p. 1064-1073, 2018.

SONG, X. et al. Evaluation of the persistence, integration, histopathology and environmental release of DNA vaccine encoding *Eimeria tenella* TA4 and chicken IL-2. **Veterinary Parasitology**, v. 229, n. 1, p. 22-30, 2016.

SUPRIHATI, E.; YUNUS, M. Evaluation of the antigenicity and immunogenicity of *Eimeria tenella* by reproductive index and histopathological changes of cecal coccidiosis virulent live vaccine in broiler chickens. **African Journal of Infect Disease**, v. 12, n. 1, p.104-110, 2018.

SUN, X. M. et al. Prevalence of *Eimeria* species in broilers with subclinical signs from fifty farms. **Avian Diseases**, v.53, v. 2, p. 301-305, 2009.

TER VEEN, C. et al. Prevalence of histopathological intestinal lesions and enteric pathogens in Dutch comercial broilers with time. **Avian Pathology**, v. 46, n. 1, p. 95-105, 2017.

TOLEDO, G. A. et al. 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.

UNIÃO EUROPEIA. Parlamento Europeu e Conselho. Regulamento (CE) n. 1831, de 22 de Setembro de 2003. Relativo aos aditivos destinados à alimentação animal. Lex: Jornal Oficial da União Europeia. [Documento on line]. Disponível em: <[http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/pt/oj/2003/l\\_268/l\\_26820031018pt00290043.pdf](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/pt/oj/2003/l_268/l_26820031018pt00290043.pdf)>. Acesso em: 22, nov. 2019.

VENKATESWARA, R. P. et al. Multiplex PCR assay using SCAR primers to detect *Eimeria* spp. in chicken. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 37, n. 1, p. 110-3, 2013.

VERMEULEN, A.N.; SCHAAP, D.C.; SCHETTERS, T. P. M. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. **Veterinary Parasitology**, v. 100, n. 1, p. 13-20, 2001.

VRBA, V.; BLAKE, D.P.; POPLSTEIN, M. Quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of all seven *Eimeria* species that infect the chicken. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 3, p. 183-190, 2010.

WALDENSTEDT, L. et al. Sporulation of *Eimeria maxima* oocysts in litter with different moisture contents. **Poultry Science**, v. 80, n. 10, p.1412-1415, 2001.

WICHUK, K.M.; MCCARTNEY, D. A review of the effectiveness of current time temperature regulations on pathogen inactivation during composting. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v. 6, n. 5, p. 573-586, 2007.

WILLIAMS, R. B. Epidemiological studies of coccidiosis in the domesticated fowl (*Gallus gallus*): II. Physical condition and survival of *Eimeria acervulina* oocysts in poultry-house litter. **Applied Parasitology**, v. 36, n. 2, p. 90-96, 1995.

WILLIAMS, R. B. et al. A survey of *Eimeria* species in commercially reared chickens in France during 1994. **Avian Pathology**, v. 25, n. 1, p. 113-130, 1996.

WILLIAMS, R. B. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. **International Journal of Parasitology**, v. 29, n. 8, p. 1209-1229, 1999.

WITCOMBE, D. M.; SMITH, N. C. Strategies for anticoccidial prophylaxis. **Parasitology**, v. 141, n. 11, p. 1379–1389, 2014.

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.

ZACHARY, J. F; MCGAVIN. M. D. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 5th ed. St Louis, Missouri: Elsevier Mosby, 2012. 1322 p.

ZHANG, D. F. et al. Anticoccidial effect of halofuginone hydrobromide against *Eimeria tenella* with associated histology. **Parasitology Research**, v. 111, n. 2, p. 695-701, 2012.

ZHANG, J. J. et al. Investigation into the prevalence of coccidiosis and maduramycin drug resistance in chickens in China. **Veterinary Parasitology**, v. 16, n. 191(1-2), p. 29-34, 2013.