

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR**

**COMPARAÇÃO DOS GRAUS DE DESAFIO DE  
*EIMERIA* COM ALTERAÇÃO DA PERMEABILIDADE  
GASTROINTESTINAL E MORFOLOGIA INTESTINAL  
DE FRANGOS DE CORTE.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**GIOVANA CAMARGO DE SOUZA**

**GUARAPUAVA-PR**

**2023**

**GIOVANA CAMARGO DE SOUZA**

**COMPARAÇÃO DOS GRAUS DE DESAFIO DE *EIMERIA* COM ALTERAÇÃO DA  
PERMEABILIDADE GASTROINTESTINAL E MORFOLOGIA INTESTINAL DE  
FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dra. Ana Paula Almeida Bastos

Orientadora

**GUARAPUAVA-PR**

**2023**

Catálogo na Publicação  
Rede de Bibliotecas da Unicentro

S729c Souza, Giovana Camargo de  
Comparação dos graus de desafio de *eimeria* com alteração da permeabilidade gastrointestinal e morfologia intestinal de frangos de corte / Giovana Camargo de Souza. -- Guarapuava, 2023.  
xii, 68 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Saúde e Produção Animal Sustentável, 2023.

Orientadora: Ana Paula Almeida Bastos  
Banca examinadora: Adriana Mércia Guarantini Ibelli, José Rodrigo Cláudio Pandolfi

Bibliografia

1. *Eimeriose*. 2. Saúde intestinal. 3. Danos intestinais. 4. *Coccidiose*. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

| CDD 636

**Giovana Camargo de Souza**

**COMPARAÇÃO DOS GRAUS DE DESAFIO DE *Eimeria* COM ALTERAÇÃO DA PERMEABILIDADE GASTROINTESTINAL E MORFOLOGIA INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 23 de junho de 2023.

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Almeida Bastos – EMBRAPA-SC/UNICENTRO**

Documento assinado digitalmente  
 ANA PAULA ALMEIDA BASTOS  
 Data: 23/06/2023 15:24:47 -0300  
 Verifique em <https://validar.j5.gov.br>

---

Presidente

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Mércia Guaratini Ibelli – EMBRAPA-SC/UNICENTRO**

Documento assinado digitalmente  
 ADRIANA MERCIA GUARATINI IBELLI  
 Data: 23/06/2023 15:50:20 -0300  
 Verifique em <https://validar.j5.gov.br>

---

Membro


**Prof. Dr. José Rodrigo Cláudio Pandolfi – EMBRAPA-SC**

Documento assinado digitalmente  
 JOSÉ RODRIGO CLAUDIO PANDOLFI  
 Data: 23/06/2023 18:13:33 -0300  
 Verifique em <https://validar.j5.gov.br>

---

GUARAPUAVA-PR  
 2023

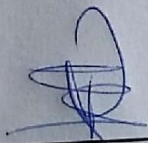
## PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO CEUA

 <b>Embrapa</b> Suínos e Aves	Certificado*	ETICA 1/1
--	--------------	--------------

\*Em concordância com a Orientação Técnica CONCEA no 8, de 18 de março de 2016 (Anexo I)

Certificamos que a proposta intitulada **“Desenvolvimento e Avaliação de Nanomedicamento para Tratamento de Coccidiose em Frangos de Corte”**, registrada com o nº **002/2018**, sob a responsabilidade de **Francisco Noé da Fonseca** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO(A) Embrapa Suínos e Aves, em reunião de **18/01/2018**.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	02/01/2019 – 01/08/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Gallus gallus</i>
Nº de animais	50
Peso/Idade	35 gr/ 1 dia
Sexo	Machos/Fêmeas
Origem	Embrapa



**Paulo Augusto Esteves**  
 CRB: 2563603D  
 Matrícula: 320571

\_\_\_\_\_  
 Presidente CEUA/CNPSA

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida e, por me permitir realizar mais essa conquista, por ser minha base e minha segurança.

Agradeço aos meus pais pela base e, principalmente ao meu amor, por ter sido a minha melhor companhia nesses anos de trabalho.

Agradeço também, meus amigos e colegas, os quais tivemos a oportunidade de compartilhar todas as experiências.

Aos colegas que também contribuíram para a realização desta pesquisa.

A professora, Dra. Ana Paula Almeida Bastos, por aceitar me orientar ao longo desses dois anos, por toda paciência e compreensão que teve comigo além da disponibilidade de tempo e dedicação para a finalização desse trabalho, meu muito obrigada!

À equipe da Embrapa Suínos e Aves de Concórdia/SC.

**RESUMO**

Giovana Camargo de Souza. Comparação dos graus de desafio de *Eimeria* com alteração da permeabilidade gastrointestinal e morfologia intestinal de frangos de corte

O estudo teve como objetivo, observar como os desafios graduais de *Eimeria* afetaram a permeabilidade gastrointestinal, a morfologia intestinal e os escores de lesões intestinais em frangos de corte. Este estudo incluiu quatro grupos de dez frangos, cada um com uma dose de tratamento de *Eimeria* distinta, como desafio de dose alta, média-alta e média-baixa. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do desafio graduado de *Eimeria* na permeabilidade gastrointestinal, morfologia intestinal e escores de lesão intestinal em frangos de corte. Os resultados mostraram que o aumento da dose de desafio com *Eimeria* resultou em uma diminuição considerável na altura das vilosidades intestinais, relação ao tamanho da vilosidade e profundidade de cripta e das células caliciformes. Além disso, após o desafio, houve um aumento da permeabilidade gastrointestinal (P 0.05). Em conclusão, quanto mais altas as doses de *Eimeria* administradas às galinhas, mais graves são os danos intestinais observados em vários índices de saúde gastrointestinal. Uma dose ideal de desafio de *Eimeria* de níveis médio-baixo ou médio-alto de oocistos mistos de *Eimeria* é proposta para construir um modelo de desafio clínico para futuras investigações testando intervenções dietéticas.

**Palavras-chave:** Eimeriose, saúde intestinal, danos intestinais, coccidiose

**ABSTRACT**

Giovana Camargo de Souza. Comparison of eimeria defiance grade with alteration in gastrointestinal permeability and intestinal morphology in broiler chickens.

The purpose of this study was to see how graded Eimeria challenges affected gastrointestinal permeability, intestinal morphology, and intestinal lesion scores in broiler chickens. This study included four groups of ten chickens each, each with a distinct Eimeria treatment dose, such as high-dose challenge, medium-high, and medium-low. Five days after the challenge, intestinal lesions and gastrointestinal permeability were assessed. The results showed that increasing the Eimeria challenge dose resulted in a considerable decrease in intestinal villi height, ratio villus size and crypt depth and goblet cells. Furthermore, after the challenge, there was a considerable increase in gastrointestinal permeability. In conclusion, the higher the Eimeria doses given to the chickens, the more serious the gut damage seen in numerous gastrointestinal health indices. An ideal Eimeria-challenge dose of medium-low or medium-high levels of mixed Eimeria oocysts is proposed to construct a clinical challenge model for future investigations testing dietary interventions.

**Key words:** Eimeriosis, gut health, injury intestinal, avian coccidiosis



**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

**Figura 1.** Ciclo de vida *Eimeria spp.* 19

**CAPÍTULO I**

**Figura 1.** Duodeno e Ceco avaliado macroscopicamente em frango de corte 61

**Figura 2.** Intestino superior, médio e ceco corado com Hematoxilina e Eosina 62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Espécies de <i>Eimeria</i> que infectam aves ( <i>Gallus gallus</i> )	22
<b>Tabela 2.</b> Descrição das alterações e escores das lesões intestinais por infecção de <i>Eimeria</i> spp.	29

## CAPÍTULO I

<b>Tabela 1.</b> Dose de desafio de <i>Eimeria</i> spp. para cada tratamento	63
<b>Tabela 2.</b> Escore de lesão para lesões típicas de <i>Eimeria</i> spp.	64
<b>Tabela 3.</b> Número de oocistos para cada tratamento no estudo piloto, antes do desafio e 1, 3 e 5 dias pós-desafio (dpi) realizado pela técnica de contagem em câmara de Mc Master	65
<b>Tabela 4.</b> Escores de lesões intestinais por <i>Eimeria</i> spp. nos quatro grupos experimentais	66
<b>Tabela 5.</b> Efeitos de doses crescentes de oocistos de mistura de <i>E.</i> , <i>E.acervulina</i> , <i>E. tenella</i> na morfologia intestinal	67

**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

<i>C°</i>	Graus celsius
<i>L</i>	Litro
<i>μL</i>	Microlitro
<i>mg</i>	Miligrama
<i>mL</i>	Mililitro
<i>nm</i>	Nanometro
<i>%</i>	Porcentagem
<i>AFLP</i>	Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado
<i>CEUA</i>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<i>CONCEA</i>	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
<i>CO2</i>	Dióxido de Carbono
<i>DAI</i>	Dia após infecção
<i>DNA</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>EDTA</i>	Ácido etilenodiamino tetra-cético
<i>HE</i>	Hematoxilina e eosina
<i>ITS1</i>	Espaço interno transcrito 1
<i>MSL</i>	Score para as lesões microscópicas
<i>OPG</i>	Contagem de ovos por gramas de fezes
<i>PBS</i>	Solução salina fosfatada tamponada (phosphate-buffered saline)
<i>PCR</i>	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>PV</i>	Vacúolo parasitóforo
<i>RAPD</i>	Polimórfico Amplificado Aleatório
<i>RFLP</i>	Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
<i>RNA</i>	Ácido ribonucleico
<i>TAE</i>	Tris-Acetato-EDTA

## SUMÁRIO

<b>PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO CEUA.....</b>	<b>v</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
2.1 Coccidioses em frangos de corte.....	16
2.2 O gênero <i>Eimeria</i> spp.....	17
2.3 Ciclo de vida.....	18
2.4 Características do patógeno.....	21
2.5 Fatores ambientais e de transmissão.....	23
2.6 Mecanismo de invasão.....	24
2.7 Reconhecimento da célula alvo.....	25
2.8 Sintomatologia das aves contaminadas.....	26
2.9 Diagnóstico das coccidioses.....	26
2.10 Prevenção e tratamento das coccidioses.....	31
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>33</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
3.1 Objetivo Geral.....	41
3.2 Objetivos Específicos.....	41
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>42</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>44</b>
<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>45</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>51</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>53</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>57</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>58</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Voltando o olhar para a produção de frango de corte, é possível destacar diversas patologias que acometem a produção e afetam diretamente na economia, tanto do produtor, quanto na comercialização e remuneração mundial. Dentre estas, podemos destacar as coccidioses, como sendo umas das principais doenças com alto impacto econômico na avicultura mundial (FEDDERN et al., 2016). Coccidiose é o termo usado para descrever uma doença entérica causada por infecção com uma ou mais espécies de *Eimeria* (CHAPMAN, 2014; QUEIROZ-CASTANEDA; DANTAN-GONZALEZ, 2015).

A coccidiose é uma doença de grande relevância na avicultura industrial, seja para frangos de corte ou de postura (SHIVARAMAIAH et al., 2014). Em nível mundial, estima-se que os custos em virtude das infecções por *Eimeria* spp. estejam em torno de US\$ 2,4-3 bilhões, sendo 76% deste montante em virtude das infecções (clínicas e subclínicas) e 24% devido aos gastos com tratamento (profilático ou terapêutico). No Brasil, um dos maiores produtores e exportadores de frangos de corte do mundo, 14.329 milhões de toneladas produzidas no ano de 2021, sendo o terceiro maior exportador do mundo, a prevalência de coccidiose é 25% e os prejuízos podem chegar a US\$ 19 milhões/ano (AHMAD et al., 2016; EMBRAPA, 2021; LUCHESE et al., 2007).

Os agentes etiológicos desta doença intestinal, são espécies patogênicas de *Eimeria* que pertencem ao filo Apicomplexa, em particular *Eimeria maxima*, *E. tenella* e *E. acervulina*, as quais podem se desenvolver tanto em animais domésticos quanto selvagens, sejam eles mamíferos ou aves (CHAPMAN, 2014). Atualmente, sete espécies de *Eimeria* são conhecidas por infectar galinhas e diferem em patogenicidade, são as *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella* (LUCHESE et al., 2007). *Eimeria* spp. possuem altos graus de especificidade de hospedeiro e local. Isso explica por que qualquer animal pode hospedar várias *Eimeria* spp., cada uma com uma localização distinta no intestino. As *Eimeria* spp. produzem diferentes interações parasita-hospedeiro gerando sinais clínicos variada de coccidiose (BORTOLUZZI et al., 2018). Por se desenvolverem no trato intestinal, além de lesões na mucosa, a infecção por coccídeos acarreta redução no desempenho zootécnico dos animais de produção, pois a absorção dos nutrientes é afetada; em casos mais graves, há incremento na taxa de mortalidade do plantel (WALK et al., 2011).

A doença clínica em frangos de corte inclui diarreia (de mucóide e aquosa a

hemorrágica), redução no ganho de peso e ingestão de ração e, em casos graves, mortalidade (CHAPMAN, 2014). A maioria das galinhas são infectadas com coccídeos em algum momento de sua vida, mas apenas algumas desenvolvem manifestações clínicas de coccidiose. Os sinais clínicos tendem a ocorrer em animais jovens, mas ocasionalmente afetam adultos (CHAPMAN, 2014). Esta enfermidade acomete principalmente aves jovens, devido sua imunidade ainda em desenvolvimento, não excluindo a possibilidade de contaminação nas demais idades, sendo que sua principal forma de contaminação se inicia após a ingestão de oocistos (GUPTA, 2009).

Desafio com baixos níveis de *Eimeria* pode estimular a resposta imune protetora do hospedeiro e esta é a base das estratégias de vacinação (CHAPMAN; JEFFERS, 2014; PRICE, 2012). Afirma-se que a doença só ocorre se o animal for exposto a uma alta dose infecciosa ou a imunidade do hospedeiro for bastante fraca (TAYLOR et al., 2007). *Eimeria* spp. exibem altos graus de especificidade de hospedeiro e local. Isso explica por que qualquer animal pode hospedar várias *Eimeria* spp., cada uma com uma localização distinta no intestino. Cada *Eimeria* spp. produz diferentes interações parasita-hospedeiro gerando sinais clínicos variados de coccidiose (ALLEN; FETTERER, 2002).

A primeira fase do ciclo do parasita é a interação *Eimeria*-célula hospedeira que leva à destruição maciça das células intestinais (MUND et al., 2017; PEEK; LANDMAN, 2003). A compreensão dessa interação e dos fatores ambientais são fundamentais para o correto controle da doença (PEEK; LANDMAN, 2003). O ciclo biológico da *Eimeria* spp. É composto por duas fases, uma parasitária e uma não infecciosa. Ao ser ingerido, sob ação do conteúdo intestinal, o oocisto esporulado libera os esporocistos, que por sua vez liberam os esporozoítos; estes invadem a mucosa intestinal em diferentes porções (conforme tropismo de cada espécie), seguindo por uma fase de crescimento intracelular e multiplicação assexuada (merozoítos). Adicionalmente, ocorre uma fase sexuada intracelular (gametócitos). Após a fertilização, os oocistos resultantes são liberados pelas fezes e passam pelo processo de esporulação no ambiente, tornando-se infectantes (GERHOLD, 2015).

As aves criadas em sistemas extensivos apresentam uma resistência às coccidioses maior, quando comparado com as galinhas convencionais, tornando esta enfermidade importante nos sistemas confinados. A transmissão da coccidiose em nível comercial tem como fatores de risco a superlotação dos aviários, pouca ventilação, umidade elevada da cama, reutilização desta e imunidade insuficiente das aves, uso inadequado de fármacos e resistência,

enterites bacterianas associadas, desafio com alta carga de oocistos, virulência da cepa, entre outros (CHAPMAN, 2009). As estratégias para o controle da doença incluem o uso de vacinas e medicamentos para profilaxia. No entanto, o uso contínuo de diferentes coccidiostáticos levaram à resistência aos medicamentos por *Eimeria* (CHAPMAN, 2009; SHIRLEY et al., 2007).

Os anticoccidianos podem ser divididos em duas grandes categorias: os agentes quimioterápicos, cujos mecanismos de ação são diversos, como nicarbazina, diclazuril e amprolium; e os ionóforos, os quais desencadeiam um desequilíbrio eletrolítico nas células do parasita, a exemplo, a monensina, salinomomicina e toltrazuril. Ainda, dentre as diversas opções disponíveis constam os coccidiostáticos (interferem no ciclo do parasita sem matá-lo) e os coccidicidas (matam o protozoário). No entanto, o surgimento de resistência aos fármacos e as restrições aos resíduos destes compostos na carcaça das aves tem causado impacto negativo na cadeia produtiva (CHAPMAN, 2009; CHAPMAN; JEFFERS, 2014; WILLIAMS, 2001).

Para melhorar os resultados negativos da infecção leve por *Eimeria*, estratégias nutricionais, como suplementação de enzimas exógenas, podem compensar a falha na digestão e melhorar o desempenho de crescimento de frangos de corte (WALK et al., 2011; ZHANG et al., 2016). Além disso, alterar a composição da dieta é outra estratégia potencial para ajustar a exigência de nutrientes para aves infectadas com *Eimeria* (ADEDOKUN; ADEOLA, 2016). Embora essas abordagens não possam substituir os medicamentos anticoccidianos ou a vacinação, elas são benéficas para melhorar a digestibilidade dos nutrientes das dietas e o desempenho do crescimento sob infecção leve. Para avaliar uma estratégia nutricional, um modelo subclínico com desafio experimental por *Eimeria* deve ser primeiro estabelecido. Nesse sentido, deve-se também estabelecer o impacto da dose de desafio no desempenho zootécnico e de lesão intestinal no frango é importante para o pesquisador selecionar uma dose apropriada no modelo de desafio subclínico ou clínico. Um estudo anterior relatou que o aumento das doses de inoculação de *Eimeria* resultou em uma redução linear do desempenho de crescimento e da digestibilidade ileal aparente dos aminoácidos (ROCHELL et al., 2016). No entanto, mais estudos são necessários para entender a relação entre a gravidade da infecção por *Eimeria* e os parâmetros de saúde gastrointestinal. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do desafio graduado de *Eimeria* na permeabilidade gastrointestinal, morfologia intestinal e escores de lesão intestinal em frangos de corte.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

Segundo ABPA (2022), o Brasil ocupa o primeiro lugar na exportação mundial de carne de frango, destinando seu produto para mais de 131 países. Este cenário mostra a qualidade, viabilidade de preço e segurança dos produtos brasileiros produzidos, sendo que sua maior parte deriva do sistema intensivo de criação (BLAKE et al., 2021). Em 2022, o Brasil foi capaz de produzir cerca de 14,329 milhões de toneladas de carne de frango, ficando com o 3º lugar na posição mundial, onde 32% foi direcionada às exportações e 68% ao consumo interno (ABPA, 2022). O crescimento da avicultura brasileira está ligada na introdução de tecnologias modernas no processo produtivo, em decorrência da estruturação governamental no ano de 1960, quando o Ministério da Agricultura autorizou a importação de tecnologias e material genético aprimorado, este estímulo auxiliou na disseminação da produção e seu rápido crescimento nas regiões Sudeste, Sul e Centro oeste (BELUSSO e HESPANHOL, 2010).

Os índices nacionais apontam que no ano de 2022, estados como Paraná, seguido por Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo, respectivamente, foram os maiores produtores e exportadores de frango de corte (ABPA, 2022).

Mesmo com o cenário positivo, existem limitações que o produtor nacional da avicultura de corte enfrenta diariamente e que impede seu crescimento e expansão. Sendo que a alimentação e suplementação ineficientes, falta de bem-estar animal e a ocorrência de doenças, como as verminoses, estão entre os desafios do avicultor (MARQUES et al., 2021).

### 2.1 Coccidiose em frangos

Observando todo o sistema funcional de produção de frangos de corte, existem barreiras das quais são necessárias serem ultrapassadas, como a preocupação com as doenças aviárias que tendem a prejudicar as produções e comercialização, além de trazer gastos extras aos produtores (FEDDERN et al., 2016). Devido ao grande impacto econômico na avicultura, o controle das coccidioses é um dos pilares quando se trata de produção de frangos para corte. Blake et al. (2021), apontam um prejuízo de 14 bilhões de dólares no mundo por ano, quando existe a falta de noções de profilaxia, tratamento equivocado e até mesmo uso indiscriminado de anticoccídeos, sendo este um fator importante nas mutações do gênero *Eimeria*.

As coccidioses são causadas por protozoários e podem estar relacionadas aos gêneros da *Eimeria* spp. e *Isospora* spp., sendo recorrentes nas produções (ABBAS, 2011). De modo



geral, essas enfermidades ocorrem quando o protozoário invade o organismo e se instala no epitélio intestinal das aves, sua transmissão ocorre pela ingestão de oocistos esporulados presentes em rações, camas ou água contaminadas (CRESPO, 2015). Estes organismos são unicelulares e parasitas obrigatórios, ao infectar a ave seu destino final são as mucosas intestinais, contudo podem acabar chegando em órgãos como rins e fígado, levando à morte do animal (LEITÃO, 1971). No intestino, o parasita causa lesões nos tecidos levando a sinais de depressão, baixa conversão alimentar, anorexia, diarreia aquosa e sanguinolenta, má absorção de nutrientes, desidratação, dificuldade de absorção de ferro, cálcio e magnésio, podendo também levar à morte do animal, acometendo geralmente animais jovens (TOLEDO et al., 2011).

A grande problemática das eimerioses está no fato de não ser uma simples contaminação, mas pelo fato dela estar associada diretamente à queda de imunidade, levando a diversas outras enfermidades secundárias e de difícil controle pelo sistema imunológico das aves (GUPTA, 2009). Se não tratada de forma correta, a coccidiose pode não apenas adoecer os animais, mas também levar a perda da eficácia de medicamentos utilizados no cotidiano das granjas avícolas (DEL CACHO et al., 2012).

## **2.2 O gênero *Eimeria* spp.**

Espécies de *Eimeria* são conhecidas por gerar graves doenças no trato intestinal das aves e com isso levar a altas perdas econômicas. Este gênero é composto por cerca de 1.700 espécies, afetando tanto mamíferos domésticos quanto aves. Todas as *Eimeria* spp. são espécies específicas e, portanto, conhecidas como parasitas monoxenos; isto é, realizam seu ciclo de vida em único hospedeiro (MULLER; HEMPHILL, 2013).

O gênero *Eimeria* contém as espécies de maior impacto econômico para as galinhas. Em geral, todos os oocistos recém-excretado consistem em uma parede externa espessa e uma massa arredondada com um zigoto nucleado; entretanto, uma vez que a esporulação ocorre, as características distintivas de cada espécie tornam-se mais aparentes (LOPEZ-OSORIO et al., 2020a).

Historicamente, a *E. tenella* foi descoberta e descrita inicialmente em 1891, por Railliet e Lucet, onde apresentava como uma enfermidade de pintainhos. Posteriormente, Fanttan no ano de 1909, esclareceu que a espécie causava doenças em região de ceco, e sua contaminação ocorria por ingestão de oocistos (TYZZER, 1929). O mesmo autor relata ainda a descoberta de

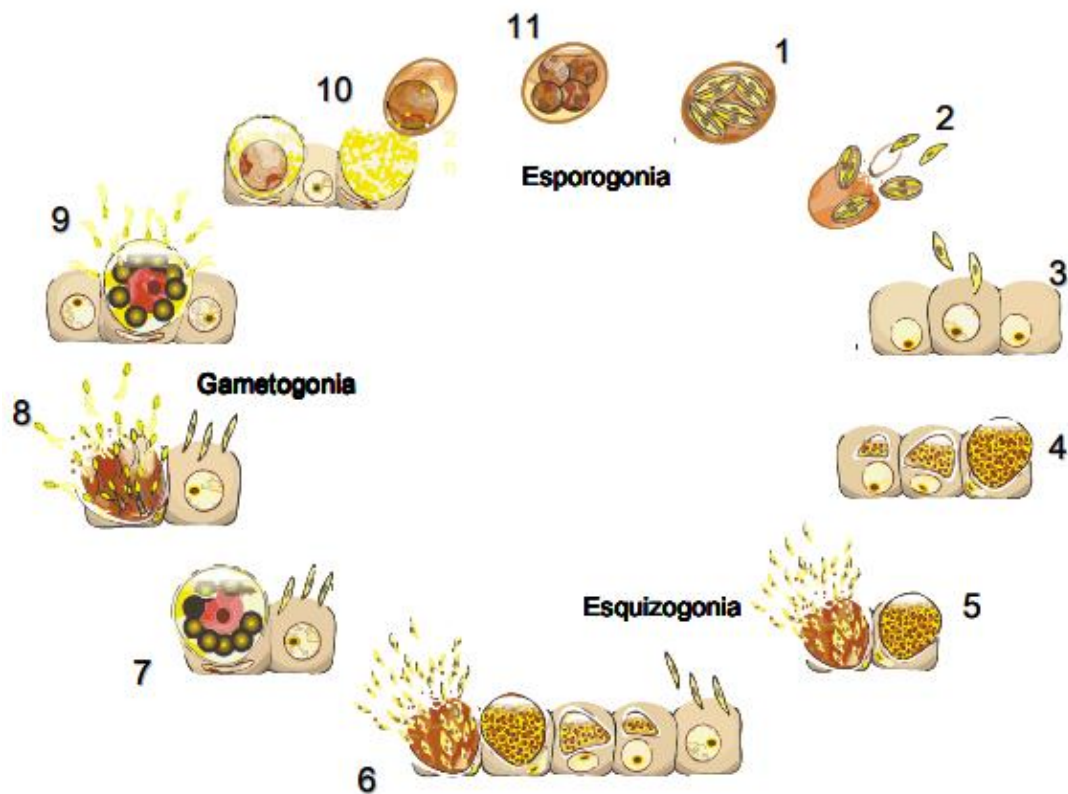
uma nova espécie, com características semelhantes e que também atingia as aves, sendo denominada de *E. maxima*.

As espécies *E. tenella*, *E. acervulina* e *E. maxima* são comumente encontradas nas contaminações em produção de frango de corte, sendo assim, a indústria avícola busca novas moléculas, em vacinas e antiparasitários, que sejam capazes de combater infestações mistas, de modo que haja menos perdas produtivas (LIU et al., 2018). A espécie denominada como *E. maxima*, possui este nome por conta da característica grande dos oocistos na sua forma sexuada, está também descrita como formato oval com parede lisa e amarelada (GAZONI et al., 2020).

### **2.3 Ciclo de vida**

O ciclo de vida da *Eimeria* tem basicamente duas fases: a fase exógena (esporogonia) e a fase endógena (esquizogonia e gametogonia). A unidade infectante inicial de todas as *Eimeria* spp. é o estágio de esporozoítos, que é uma célula móvel em forma alongada (ALLEN; FETTERERA, 2002).

O esporozoítos de todo parasita apicomplexa é caracterizado por um complexo único de estruturas especializadas na invasão das células hospedeiras (AUGUSTINE, 2001). Assim, o ciclo de vida desses parasitas inicia-se pela ingestão de um oocisto esporulado por um hospedeiro suscetível. O esporozoítos é o início e o fim do ciclo de vida de qualquer coccídeo. Os esporozoítos são as formas infectantes encontradas nos oocistos esporulados e são o resultado da segmentação dos esporocistos (ALLEN; FETTERERA, 2002; AUGUSTINE, 2001). O esporocisto é circundado por uma parede de oocisto resistente e é eliminado com as fezes. Os oocistos são ovóides e variam em tamanho e forma de acordo com a espécie (Figura 01). A transmissão ocorre por via fecal-oral e a infecção inicia-se com a ingestão de oocistos esporulados contendo oito esporozoítos, iniciando o estágio denominado esquizogonia.



**Figura 1.** - Ciclo de vida da *Eimeria* spp.

Fonte: GRUBER et al, 2005

Após a fase exógena (esporogonia), os oocistos esporulados podem iniciar a replicação, uma vez que são ingeridos oralmente por um hospedeiro suscetível, neste caso a galinha (CHAPMAN, 2014). O microambiente enzimático do trato digestivo e a ação mecânica da moela alteram a estrutura e a permeabilidade da parede do oocisto e ajudam na liberação dos esporozoítos (HAUG et al., 2008). Para a emergência do esporozoítos, dois estímulos distintos devem estar presentes: primeiro, o estresse por dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), que provoca a ruptura da micrópila e aumento da permeabilidade no oocisto. Isso leva a um colapso do conteúdo do oocisto em uma solução salina hipertônica (LOPEZ-OSORIO et al., 2020b). A concentração ótima de  $\text{CO}_2$  e o tempo de incubação diferem de acordo com a espécie (LANG et al., 2009). A temperatura corporal também é essencial para a liberação de esporozoítos infecciosos (MESAPINEDA et al., 2021).

Posteriormente, a ação de compostos, como tripsina e bile (CHAPMAN, 1978), ativam os esporozoítos dentro do esporocisto e digerem o corpo de *Stieda* gerando uma ruptura na membrana do esporocisto. A bile pode facilitar a entrada de enzimas digestivas a micrópila

alterada no oocisto, ou pode alterar as lipoproteínas do corpo de *Stieda* de oocistos de *Eimeria* (MULLER; HEMPHILL, 2013). Embora a bile não seja estritamente necessária para a ativação dos esporozoítos, foi demonstrado que a falta de bile para muitas *Eimeria* spp. resulta em uma liberação mais lenta e mobilidade de esporozoítos egressos (CHAPMAN, 1978; LOPEZ-OSORIO et al., 2020a).

A tripsina digere a parede do esporocisto, juntamente com enzimas específicas do parasita secretadas por esporozoítos ativados. Devido ao movimento contínuo dos esporozoítos, o corpo de *Stieda* incha e depois desaparece, deixando um pequeno orifício por onde os esporozoítos escapam. Este processo é muito rápido (LOPEZ-OSORIO et al., 2020a). Até esta fase do ciclo de vida, nenhum dano foi causado ao hospedeiro.

Os esporozoítos livres infectam as células intestinais e se desenvolvem dentro de um vacúolo parasitóforo (PV) em um organismo arredondado e crescente chamado trofozoíto, que se torna um meronte durante a primeira geração de merogonia (TIERNEY; MULCAHY, 2003). À medida que o esporozoíto cresce, a célula endotelial torna-se hipertrófica e seu núcleo sofre alterações, tornando-se maior, com nucléolo aumentado e com cromatina dispersa, seu citoplasma é organizado em duas zonas concêntricas e não apresenta aspecto vacuolizado (HAMMOND et al., 1965). Inicialmente, o núcleo da célula hospedeira tem uma distribuição aleatória, mas depois migra para a periferia para acomodar o desenvolvimento do meronte (BERDENIK, 1975).

A merogonia começa com múltiplas divisões do núcleo do trofozoíto de *Eimeria* sem a divisão do citoplasma, resultando na formação de estruturas elipsoidais chamadas blastóforos com uma camada periférica de núcleos. O merozoíto se forma ao redor de cada núcleo e cresce radialmente. No final da fase, a divisão do citoplasma resulta na formação de células filhas mononucleares fusiformes e móveis, conhecidas como merozoítos (LOPEZ-OSORIO et al., 2020a). Os merozoítos I maduros são separados pelo corpo residual, um remanescente do blastóforo (McDONALD; SHIRLEY, 2009). Uma vez que o meronte está maduro, os merozoítos rompem a célula e escapam para o lúmen do intestino delgado e provavelmente são transportados pela corrente intestinal para o intestino grosso, onde os merozoítos entram em novas células. Esses merozoítos I penetram nas células epiteliais e se desenvolvem em segundo estágio de meronte, liberando apenas alguns merozoítos II (LOPEZ-OSORIO et al., 2020a).

Após a maturação do segundo estágio do meronte, os merozoítos II liberados invadem as células epiteliais adjacentes que sofrem gamogonia sexual. Durante a gamogonia, a maioria

dos merozoítos II se desenvolve em uma única célula esferóide, grande e mononuclear, o macrogameta feminino. Poucos merozoítos II se desenvolvem em grandes células polinucleadas (microgamontes masculinos) que formam muitas células fusiformes com dois flagelos, os microgametas (LOPEZ-OSORIO et al., 2020a).

Os gamontes geram rapidamente alterações na célula hospedeira, que distorce e perde sua estrutura colunar (LOPEZ-OSORIO et al., 2020a). As alterações patológicas e os sinais clínicos associados à *Eimeria* são gerados principalmente pelos gamontes (LOPEZ-OSORIO et al., 2020a), pois geram destruição da mucosa do jejuno, íleo e ceco, causando desequilíbrios na absorção (principalmente água e eletrólitos) e resultando em diarreia (MESA-PINEDA et al., 2021). A partir daí, os microgametas liberados fertilizam os macrogametas circundantes, formando os zigotos. Os grânulos eosinofílicos convergem e formam uma parede de oocisto resistente ao redor do zigoto que diminui de tamanho e se torna um esporonte. Os oocistos são finalmente liberados das células epiteliais rompidas e excretados com as fezes no ambiente (MESA-PINEDA et al., 2021).

O oocisto não esporulado excretado do hospedeiro contém um estágio diplóide de esporo que se desenvolve por meiose. Primeiro, quatro esporoblastos haplóides são gerados e envolvidos por uma concha tornando-se um esporocisto. Dois esporozoítos são formados em cada esporocisto. Esse processo de esporulação exógena, também conhecido como esporogonia, requer 1-2 dias e condições ambientais ideais, incluindo oxigênio suficiente, umidade (16%) e temperatura (23°C) adequada (MESA-PINEDA et al., 2021). A esporulação parece ser um processo estritamente aeróbico.

Ao término da esporulação, o metabolismo e a respiração do oocisto são reduzidos, porém, ele utiliza suas reservas de polissacarídeos, e eventualmente se torna não infeccioso, pois o parasita fica sem energia para realizar o processo de excitação endógena final no lúmen intestinal (LOPEZ-OSORIO et al., 2020a). Oocistos esporulados podem sobreviver por longos períodos fora do hospedeiro, dependendo de fatores ambientais. Os oocistos são resistentes a alguns desinfetantes comumente usados, mas são mortos por congelamento ou altas temperaturas ambientais.

## 2.4 Características do patógeno

Entre as galinhas, foram descritas sete espécies de *Eimeria* que infectam diferentes regiões do intestino (Tabela 1) (VRBA et al., 2010). Cada espécie de parasita tem preferência

por um local específico no trato gastrointestinal, além de características diferenciadas no aparecimento de lesões macroscópicas, na morfologia dos oocistos, no tempo mínimo de esporulação, no período mínimo pré-patente (tempo entre a infecção da ave com um oocisto esporulado e a excreção dos primeiros oocistos no ambiente através das fezes), o tamanho do esquizonte e a localização do desenvolvimento do parasita no epitélio intestinal (GYORKE et al., 2013; ARABKHAZAEI et al., 2011 ).

**Tabela 1.** Espécies de *Eimeria* que infectam aves (*Gallus gallus*).

Espécies	Local de desenvolvimento	Patogenicidade	Tempo de esporulação (h) na temperatura de 20°C
<i>E. acervulina</i>	duodeno, jejuno	++	27
<i>E. maxima</i>	jejuno, íleo	++	48
<i>E. tenella</i>	ceco	+++	48
<i>E. praecox</i>	duodeno, jejuno	+	-
<i>E. mitis</i>	íleo	+	48
<i>E. brunetti</i>	ceco e reto	+++	24 - 48
<i>E. necatrix</i>	jejuno, íleo e ceco	+++	48

Dentro das espécies descritas, existem três espécies particularmente relevantes em frangos de corte: *E. acervulina*, que se desenvolve nas células epiteliais da região proximal do intestino delgado, principalmente no duodeno (GYORKE et al., 2013), *E. maxima*, que tem como alvo a região intermediária do intestino e é facilmente reconhecível pelo tamanho de seus oocistos (os maiores), e *E. tenella*, que infecta o ceco e causa diarreia sanguinolenta (MESAPINEDA et al., 2021).

Sendo uma das espécies mais conhecidas na produção avícola de corte, a *E. tenella* gera uma condição grave da doença a ave, assim como possui alto potencial de disseminação para o plantel. Podendo ser encontrada em região de ceco, causando graves hemorragias, alta mortalidade e morbidade e perda de peso, durante a necrópsia é possível identificar lesões aglomeradas, esquizontes e diversos oocistos (CALNEK, 2000). O intestino das aves é afetado mostrando um encurtamento das vilosidades do epitélio intestinal (GAZONI et al., 2020).

A espécie de *Eimeria acervulina*, dentre as três, possui importância não apenas na produção, mas na sanidade de modo geral das aves, já que pode facilmente ser encontrada em aves domésticas, contudo, comparando entre *E. maxima* e *E. tenella*, a *E. acervulina* apresenta

o menor grau de patogenicidade (TEWARI; MAHARANA, 2011). Esta espécie possui característica invasiva nas células epiteliais do duodeno e intestino delgado, a morfologia dos oocistos é descrita como formato alongado. Durante a necropsia das aves contaminadas, é possível encontrar pontos brancos transversais em duodeno, em casos graves até mesmo o jejuno pode ser acometido, levando a formação de muco e diminuição das vilosidades intestinais (GAZONI et al., 2020).

## 2.5 Fatores ambientais e de transmissão

A frequência de ocorrência de coccidiose pode ser atribuída à presença de condições ambientais favoráveis à esporulação de oocistos. A cama profunda sob condições sanitárias precárias pode fornecer temperatura e umidade relativa ideais para a esporulação de oocistos (MERSHA et al., 2009). A alta incidência de coccidiose é geralmente observada em aves manejadas sob sistema de manejo intensivo, como cama profunda, devido ao aumento da probabilidade de acúmulo de oocistos nas camas (DAKPOGAN; SALIFOU, 2013).

O manejo de aviários desempenha uma função importante na disseminação da coccidiose porque os oocistos coccidianos são onipresentes e facilmente disseminados no ambiente do aviário. É muito complexo manter as galinhas livres de coccídeos, especialmente nas atuais condições de criação intensiva (ADHIKARI et al., 2020). A prevalência varia de acordo com o manejo, mas não varia de acordo com o tamanho do lote; enquanto o mau manejo, como cama úmida que estimula a esporulação de oocistos, bebedouros e comedouros contaminados, má ventilação e alta densidade de lotação podem piorar os sinais clínicos das aves (HADIPOUR et al., 2011).

Os oocistos são resistentes a fatores estressantes ambientais e desinfetantes, permanecendo viáveis na pintaiada por muitos meses. As espécies de *Eimeria* podem sobreviver em aves infectadas e no meio ambiente por longos períodos (McDONALD; SHIRLEY, 2009). Assim, sua viabilidade fora do hospedeiro por muito tempo é crucial no que diz respeito ao curso da doença e a falta de imunidade cruzada entre as espécies de *Eimeria* predispõe as aves a infecções e surtos de doenças causadas por diferentes espécies (YUM et al., 2000). Devido ao curto período pré-patente do parasita e seu alto potencial biótico, o número de oocistos na pintaiada sobe rapidamente. Os coccídeos das aves têm alta capacidade de reprodução dentro do hospedeiro, levando a um rápido aumento para o sucesso e a subsequente alto nível do parasita dentro do hospedeiro suscetível e, conseqüentemente, alto nível de

contaminação do meio ambiente (MESA-PINEDA et al., 2021).

A transmissão da coccidiose avícola é por via feco-oral. A coccidiose é transmitida pelo contato direto e indireto com os excretas de aves infectadas, na sua grande maioria são derivadas de pastagens contaminadas pelos oocistos esporulados, ou a introdução de animais doentes em plantéis sadios. Desta forma destaca-se a importância do período de quarentena das pastagens e animais recém chegados (MARTINS et al., 2019). Também pode ser transmitida entre aves pelo consumo de alimentos ou água potável contaminados por fezes contendo o estágio infeccioso dos coccídeos, conhecidos como oocistos esporulados (CHAPMAN, 2014).

A contaminação fecal de veículos e pessoal pode espalhar a infecção para outras granjas. Os oocistos são distribuídos dentro do galpão, dentro e fora do galpão por invertebrados e vermes, enquanto os sistemas de ventilação mecânica servem para espalhar os oocistos fora do galpão (McDONALD; SHIRLEY, 2009). As pessoas são importantes vetores de coccídeos na disseminação de oocistos, que podem ser transportados por vestígios de fezes nos sapatos ou por utensílios transportados de uma granja para outra. Moscas, besouros, baratas, roedores, animais de estimação e outras aves também foram incriminados como vetores mecânicos (CHAPMAN et al., 2002).

## 2.6 Mecanismo de invasão

Para gerar a doença, os parasitas Apicomplexas precisam primeiro invadir as células hospedeiras suscetíveis. Para isso, o processo de reconhecimento e início da infecção são pontos-chave que podem ser utilizados como fatores de direcionamento para um potencial tratamento. No entanto, poucas são as informações sobre a invasão da *Eimeria spp.*, e ainda há lacunas na compreensão de como ocorre a infecção (AUGUSTINE, 2001).

Sabe-se que a infecção se dá pela ingestão de oocistos esporulados por via oral, com ração e/ou água contaminada. Após a ingestão, os oocistos infecciosos excisam, liberando a forma infectante denominada esporozoíto. Os esporozoítos infectam as células epiteliais do intestino. A transferência dos esporozoítos até o locus da lesão primária é feita com a ajuda de linfócitos intraepiteliais (DASZAK, 1999).

A patogênese da infecção é influenciada pelas espécies do coccídeos, doenças concomitantes e fatores nutricionais. *E. necatrix* e *E. tenella* são as mais patogênicas em galinhas, pois a esquizogonia ocorre na lâmina própria e nas criptas do epitélio do intestino delgado e ceco, respectivamente, e causa extensa hemorragia. A maioria das espécies se



desenvolve nas células epiteliais que revestem as vilosidades (VRBA et al., 2010). Os parasitas invadem o revestimento do intestino e causam danos nos tecidos, diminuição da ingestão de ração, má absorção de nutrientes da ração, desidratação e perda de sangue (DASZAK, 1999). O dano tecidual também pode expor a ave a infecções bacterianas, como *Clostridium sp.* e *Salmonella sp.* Doenças que causam imunossupressão na ave podem atuar com a coccidiose para produzir um problema mais grave. Por exemplo, a doença de Marek pode interferir na resposta imune à coccidiose e a doença infecciosa da Bursa, também conhecida como Gumboro, pode exacerbar uma infecção por coccidia (MESA-PINEDA et al., 2021).

## 2.7 Reconhecimento da célula alvo

A invasão requer reconhecimento e interação do esporozoíto com a célula hospedeira. Somente em seu hospedeiro específico que a *Eimeria spp.* completa seu ciclo de vida e produz oocistos eliminados nas fezes. No entanto, para este processo específico o parasita requer uma série de estímulos (AWAIS et al., 2012; VENKATESWARA et al., 2015). Um grande número de estudos tentaram infectar diferentes espécies hospedeiras com vários tipos de *Eimeria*, entretanto a maioria dos experimentos não teve sucesso, e apenas infecções experimentais de galinhas com as espécies de perus (*E. gallopavonis* e *E. meleagridis*) foram alcançados com sucesso (LOPEZ-OSORIO et al., 2020a).

Essas observações sugeriram que algumas moléculas de reconhecimento provavelmente são necessárias para que os esporozoítos entrem nas células hospedeiras específicas. Embora as células hospedeiras não tenham um papel ativo no processo físico que promove a entrada do parasita na célula, elas fornecem moléculas e receptores de superfície apropriados, ou secretam metabólitos que se acredita iniciar a atração ou ativação de parasitas Apicomplexa e, posteriormente, iniciar seu reconhecimento (AUGUSTINE, 2001).

*In vivo*, *Eimeria spp.* mostram um alto grau de especificidade das células hospedeiras para o seu desenvolvimento, sendo que infectam, geralmente, um número limitado de células hospedeiras e especificamente uma porção de um órgão ou sistema (LOPEZ-OSORIO et al., 2020a). Essa especificidade pode estar associada a condições únicas do lúmen intestinal, como pH, enzimas, mucosas, metabólitos, concentração de nutrientes entre outros (LOPEZ-OSORIO et al., 2020a).

A motilidade, estrutura e secreções dos esporozoítos permitem que eles penetrem na célula, mas há também evidências de que a célula hospedeira forneça características que são

fundamentais para a infecção da célula hospedeira (TIERNEY et al., 2007). Dentre estas, existem algumas moléculas da superfície celular do epitélio intestinal que atuam como receptores ou sítios de reconhecimento para os esporozoítos, tais como moléculas catiônicas, enzimas e inibidores de proteases (AWAIS et al., 2012; CRANE; McGALEY, 1991).

Evidências mostraram a presença de antígenos do parasita que se ligam a moléculas presentes na superfície da célula hospedeira (AUGUSTINE, 2001). Até o momento, acredita-se que os mecanismos de invasão sejam semelhantes para todos os parasitas Apicomplexas, porém os receptores podem mudar entre as diferentes espécies. O reconhecimento de grupos glicosilados, como sulfato de heparan e sulfato de condroitina nas células hospedeiras, parece ser a regra e pode ser responsável por diferenças na especificidade da célula alvo (LOPEZ-OSORIO et al., 2020a).

## **2.8 Sinais clínicos das aves contaminadas**

Quando os coccídeos invadem a mucosa intestinal, geram lesões nos tecidos, o que leva a inflamação das células epiteliais e diminuição das vilosidades e conseqüentemente a diminuição da absorção de nutrientes, desidratação e hemorragias (MESA-PINEDA et al., 2021). Merontes, gamontes e oocistos causam alterações histológicas marcantes nas células epiteliais intestinais do hospedeiro em um curto período de tempo, incluindo distorção, ruptura, separação de células adjacentes e descamação (MESA-PINEDA et al., 2021). Conseqüentemente, a ave fica exposta a diversas infecções secundárias, como a *Salmonella spp.* (ARAKAWA et al., 1992).

As coccidioses podem se apresentar de duas formas, sendo clínicas ou subclínicas. As aves infectadas na forma clínica apresentam penas eriçadas e sinais de depressão, apatia ou sonolência; podendo apresentar redução no consumo de ração e água, as fezes podem ser aquosas, esbranquiçadas e ocasionalmente sanguinolentas. Isso resulta na desidratação, diminuição do ganho de peso prejudicado, redução de atividade enzimática da borda em escova, ruptura da integridade intestinal e na ausência de tratamento, morte (MESA-PINEDA et al., 2021). Quando encontrada em forma subclínica, os sinais clínicos inicialmente começam com o baixo ganho de peso e diminuição de conversão alimentar (ZIOMKO; CENCEK, 1999). Nematollahi et al., (2009), coloca em seu trabalho que a forma de apresentação clínica está relacionada ao número de oocisto esporulados que o animalingere, bem como o grau de letalidade com a idade da ave contaminada. Citando ainda que quanto mais as aves se

contaminam, mais prejuízos estas geram, pois tendem a serem menos produtivas.

Quanto se trata especificamente das espécies *E. acervulina* e *E. maxima*, a infecção com oocistos demonstra um aumento no tamanho e o número de células caliciformes ao longo das criptas ileais, estes por sua vez desempenham a função de proteção no trato intestinal, ao liberar glicoproteínas denominadas de mucinas (COLLIER et al., 2008). As mucinas são a primeira linha de defesa contra patógenos intestinais e atuam na proteção do epitélio de patógenos e irritantes no lúmen intestinal (TIERNEY et al., 2007). De forma similar, a *E. tenella* atinge as células epiteliais das porções de ceco, gerando a produção excessiva de muco, esta reação imunológica promove a proteção contra o parasita (TIERNEY et al., 2007). No entanto, esse aumento da produção de mucina pode ser prejudicial, promovendo a colonização secundária por outros patógenos, como também pode desregular a saúde intestinal, reduzindo a absorção de nutrientes (MESA-PINEDA et al., 2021).

## 2.9 Diagnóstico das coccidioses

A identificação correta das espécies de *Eimeria* é importante para o diagnóstico e controle da doença, mesmo apresentando sinais clínicos bem claros, as coccidioses ainda não são de fácil identificação, já que seus sinais clínicos se assemelham entre as mais variadas doenças das aves. Contudo seu diagnóstico é iniciado ao primeiro sinal clínico, como perda de peso, diarreia aquosa à sanguinolenta, presença de ponto de sangue na cama das aves, penas eriçadas, queda de produtividade e desidratação (GAZONI et al., 2020). Classicamente, a avaliação de infecções por *Eimeria* incluem diagnóstico macroscópico com observação de sinais clínicos em animais infectados, localização e aparência de lesões macroscópicas durante a necropsia; e o diagnóstico microscópico que se concentra na avaliação do tamanho e forma dos oocistos e quando for necessário maior precisão diagnóstica, o diagnóstico molecular pode ser incluído (WALKER et al., 2013).

As lesões causadas pelas coccidioses levam a graus de inflamação e danos à mucosa intestinal, onde nos exames de necropsia é possível observar parede intestinal espessa, exsudatos pastosos e sanguinolentos, além de petéquias hemorrágicas, necrose tecidual, enterites, sangramento e estrias em região de ceco (COLLIER et al., 2008; YUN et al., 2000). Nos exames *pós mortem*, a primeira visão macroscópica se dá pelas diversas lesões intestinais, presença de alimentos mal digeridos, hemorragias em ceco, jejuno e íleo. A espécie *E. tenella*, representa a menos predominante entre as três, já que suas lesões permanecem apenas em ceco,

não afetando tanto na digestão e absorção de alimentos, portanto sendo menos prejudicial no quesito crescimento e desenvolvimento.

Em relação às *E. acervulina* e *E. maxima*, estas apresentam a maior taxa de contaminação, sendo que podem causar lesões esbranquiçadas em duodeno. No que se trata da *E. maxima*, é possível encontrar petéquias em intestino médio (MATHIS; BROUSSAD, 2006). Portanto, para a avaliação das lesões macroscópicas, é utilizada uma técnica padronizada de pontuação (score) das lesões intestinais (JOHNSON; REID, 1970), resumida na Tabela 2. Essa avaliação se baseia na atribuição de uma pontuação em uma escala de zero a quatro, com o objetivo de obter uma classificação numérica das lesões macroscópicas causadas por cada espécie de *Eimeria*. Nessa avaliação todo o intestino da ave deve ser avaliado. O muco e as membranas serosas também são examinados para detectar lesões. Este é um método trabalhoso, pode ser subjetivo e necessita de pessoal experiente para obter um resultado preciso, mas ainda é o método diagnóstico mais utilizado.

**Tabela 2.** Descrição das alterações e escore das lesões intestinais por infecção de *Eimeria spp.*

<i>Eimeria spp.</i>	Pontuação	Descrição
<i>acervulina</i>	0	Sem lesões grosseiras
	1	Presença de lesões brancas espalhadas (não mais de cinco por centímetro quadrado) orientadas transversalmente ou em forma de escada, visíveis na superfície mucosa da alça duodenal. As lesões brancas contêm oocistos em desenvolvimento.
	2	As lesões são muito mais próximas, mas não coalescentes; paredes intestinais não apresentam espessamento. Placas brancas alongadas transversalmente distintas podem ser facilmente reconhecidas na serosa, bem como na superfície da mucosa.
	3	As lesões são mais numerosas e começam a coalescer. A parede intestinal é espessada e o conteúdo aquoso. As lesões podem se estender até o divertículo de Meckel.
	4	As lesões coalescem na porção do duodeno aderida à moela e a parede mucosa está acinzentada, a parede intestinal está muito espessada e o intestino é preenchido com um exsudato cremoso que pode conter grande número de oocistos.
<i>maxima</i>	0	Sem lesões grosseiras
	1	Pequenas petéquias vermelhas no lado seroso do intestino médio. Não há inchaço ou espessamento do intestino, pequenas quantidades de muco alaranjado possam estar presentes
	2	Superfície serosa pode ser salpicada com numerosas petéquias vermelhas; o intestino pode ser preenchido com muco alaranjado; espessamento da parede
	3	Parede intestinal está inchada e espessada. A superfície da mucosa é rugosa; o conteúdo intestinal está cheio de coágulos sanguíneos e muco pontual.
	4	Parede intestinal pode estar inflamada na maior parte da sua extensão; contém coágulos sanguíneos dando uma cor característica e odor pútrido; a parede é muito espessada.
<i>tenella</i>	0	Sem lesões grosseiras
	1	Poucas petéquias espalhadas na parede cecal; sem espessamento das paredes cecais; conteúdo cecal normal presente.
	2	Lesões mais numerosas com sangue perceptível no conteúdo cecal; parede cecal é um pouco espessada
	3	Grandes quantidades de sangue; paredes cecais muito espessadas; pouco, se houver, conteúdo fecal no ceco
	4	Parede cecal muito distendida com sangue ou grandes núcleos caseosos; detritos fecais ausentes ou incluídos nos núcleos

Raspagem da mucosa intestinal podem ser feitas para avaliar a presença e forma dos oocistos ou esta contagem pode ser feita com fezes (BORTOLUZZI et al., 2018). Normalmente, o escore de lesão intestinal é complementado com contagens de oocistos por grama (OPG) de pela técnica de McMaster (BORTOLUZZI et al., 2018). Entretanto, a excreção de oocistos não se correlaciona bem com a diminuição do ganho de peso corporal ou escores de lesões intestinais porque altas doses de *Eimeria* podem resultar em um efeito de aglomeração que reduz a excreção de oocistos enquanto ainda causa danos significativos ao intestino (WILLIAMS, 2001).

Nos exames histopatológicos, a parede intestinal se mostra engrossada, com presença de edema, hemorragias e hiperemias, estas alterações levam à perda produtiva e diminuição da resposta imune (MARQUARDT et al., 2000). A detecção da *Eimeria* pode ser facilmente confundida pela sintomatologia apresentada no decorrer da enfermidade, onde a forma mais segura de determinar a doença está nos exames microscópicos, onde é possível identificar os oocistos presentes nas fezes, assim como alteração da integridade e tamanho das vilosidades do intestino (ESCOBAR GRIMALDI et al., 2010). Outra tecnologia no diagnóstico da *Eimeria*, está na utilização do teste de reação em cadeia polimerase (PCR), onde são gerados dados quantitativos através da amplificação cópias de DNA capazes de elucidar o resultado seguro da patologia (SNYDER et al., 2021). Nas lesões microscópicas, é possível encontrar o desenvolvimento dos estágios diferentes da *Eimeria* spp. onde os esfregaços são retirados das lesões, além de presença de oocistos, esquizontes ou gametócitos. Contudo, os resultados deste exame devem ser comparados com os achados na macroscopia e com os sinais clínicos (McDOUGALD; JEFFERS, 1976).

Na produção, durante as infecções causadas por *Eimeria* spp. geralmente estão presentes as três espécies já citadas, deixando o diagnóstico a campo limitado. Entretanto, com o aumento da resistência parasitária aos anticoccídios, diversas variantes foram surgindo, com isso fez-se necessário a tipagem de sequência única ou multilocus, bem como polimorfismo de comprimento de restrição (PCR – RFLP), e amplificação aleatória (OGEDENGBE et al., 2011). Diante do exposto, métodos mais sensíveis foram desenvolvidos, como o diagnóstico molecular, que oferece maior especificidade. Deste modo, diagnósticos baseados em PCR, onde há a ampliação das regiões do espaço interno transcrito 1 (ITS1) do DNA Ribossômico. Presente no RNA não funcional, este está localizado nas estruturas ribossômicas do RNA ribossômico (rRNA) (ROCCO et al., 2019). Nesta parte do genoma, é possível identificar

diversos segmentos de *Eimeria* spp. Esta técnica pode ser facilmente aplicada em pequenas porções de DNA, mesmo com alta contaminação de diversas espécies, elas apresentam grandes diferenças entre si. Entre demais técnicas, o DNA polimórfico (RAPD), apresenta marcadores de região, e PCR quantitativo, que detectam cerca de sete espécies de *Eimeria* spp. (YOU, 2014).

Baseados em sinais clínicos, coproparasitológicos, morfológico e análise patológica, bioquímicos e métodos moleculares, é possível diagnosticar quadros de *Eimeria* spp. (MORRISON et al., 2004; CONWAY et al., 2007).

## **2.10 Prevenção e tratamento das coccidioses**

Ainda não há comprovações que as coccidioses possam ser erradicadas, logo o maior objetivo está na prevenção destas, bem como garantir custos menores em diagnóstico, prevenção, tratamento e estímulo de imunidade do hospedeiro, com o objetivo de cada vez taxas menores de perdas produtivas (LIU et al., 2018). Os principais meios de prevenção e controle, são a utilização de vacinas, aditivos naturais nas rações, a administração de antimicrobianos profiláticos, além de métodos rotineiros de higiene, como limpeza e desinfecção das instalações, boa circulação de ar nos galpões, controle de contaminação de água e ração. Estes são fatores que auxiliam no controle da esporulação dos oocistos, além de evitar surtos de demais enfermidades (MESA-PINEDA et al., 2021).

A utilização de antimicrobianos cresceu com o passar dos anos produtivos, seu mecanismo de ação se divide em coccidiostáticos e coccidicidas. O coccidiostático impede que o parasita conclua seu desenvolvimento, este por sua vez permanece impossibilitando a replicação, porém ao retirar o coccidiostático da dieta, as aves podem estar susceptíveis às parasitoses novamente. Enquanto os coccidicidas levam a morte ou causam danos irreversíveis ao patógeno (PEEK, 2010).

Uma das formas mais utilizadas para a proteção de coccidioses, está relacionada às vacinas, nas quais são administrados oocistos vivos (virulentos ou atenuados) para induzir imunidade passiva e ativa, de cepas como *E. tenella*, *E. maxima* e *E. acervulina*. A vacinação irá estimular o sistema imune, levando ao reconhecimento do invasor e conseqüentemente a proteção (SHIVARAMAIAH et al., 2014). Demais meios de impedir surtos desta parasitose, está na administração de probióticos, extratos fúngicos e produtos fitoquímicos, desta forma é possível aumentar a imunidade e melhorar o desempenho da ave (BAFUNDO et al., 2021). Para

Betancourt et al., (2019), tanto o combate quanto a prevenção pode-se utilizar fármacos químicos em conjunto com extratos de ervas com propriedades antibacterianas, antiprotozoários e antifúngicos, a fim auxiliar a droga de escolha e evitar a resistência parasitária.

Frente ao efeito negativo causada pela coccidiose nos frangos, em suma, foram necessários diversos métodos de controles para estas enfermidades, como o emprego da biossegurança nos plantéis, estratégias de controle de doenças, utilização de drogas sintéticas como o nicarbazina, diclazuril e toltrazuril (SHIVARAMAIAH et al., 2014).



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, G., KHAN, S.H., HASSAN, M., MAHMOOD, S., NAZ, S.; GILANI, S.S. . Incidence of poultry diseases in different seasons in Khushab district, Pakistan. **Journal of Advance Veterinary and Animal Research**, v.2, n. 2, p.141-145, 2015
- ADEDOKUN, S. A.; ADEOLA, O . The response in jejunal and ileal nutrient and energy digestibility and the expression of markers of intestinal inflammation in broiler chickens to coccidial vaccine challenge and phytase supplementation. **Canadian Journal Animal Science**, v.97, n.2, p. 258–267, 2016.
- ADHIKARI, P.; KIESS, A.; ADHIKARI, R.; JHA, R. . An approach to alternative strategies to control avian coccidiosis and necrotic enteritis. **Journal of Applied Poultry Research**, v.29, n.2, p.515-534, 2020.
- 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 Microbiology Reviews**, v.15, n.1, p. 58-65, 2002.
- ARABKHAZAEI, F.; NABIAN, S. ; MODIRSANEII, M. ; MANSOORI, B.; RAHBARI, S. Biopathologic Characterization of Three Mixed Poultry *Eimeria spp.* Isolates. **Iranian Journal of Parasitology**, v.6, n.4, p.23-32, 2011.
- ARAKAWA, A.; FUKATA, T.; BABA, E.; MCDOUGALD, L. R.; BAILEY, J. S.; BLANKENSHIP, L. C. Influence of coccidiosis on Salmonella colonization in broiler chickens under floor-pen conditions. **Poultry Science**, v.71, n.1, p.59-63, 1992.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). Relatório anual 2022, 2022. Disponível em: <[https://abpa-br.org/wpcontent/uploads/2022/04/ABPA\\_Relatorio\\_Anual\\_2022\\_web.pdf](https://abpa-br.org/wpcontent/uploads/2022/04/ABPA_Relatorio_Anual_2022_web.pdf)>. Acesso em: 20/04/2023.
- AUGUSTINE, P.C. . Cell: sporozoite interactions and invasion by apicomplexan parasites of the genus *Eimeria*. **International Journal for Parasitology**, v.31, n.1, p.1-8, 2001.
- AWAIS, M.M.; AKHTAR, M. ; IQBAL, Z. ; MUHAMMAD, F. ; ANWAR, M.I. . Seasonal prevalence of coccidiosis in industrial broiler chickens in Faisalabad, Punjab, Pakistan. **Tropical Animal Health and Production**, v.44, n.2, p.323-328, 2012.
- BAFUNDO, K. W., GOMEZ, L., LUMPKINS, B., MATHIS, G. F., MCNAUGHTON, J. L. & DUERR, I. Concurrent use of saponins and live coccidiosis vaccines: the influence of a quillaja

and yucca combination on anticoccidial effects and performance results of coccidia-vaccinated broilers. **Poultry Science**, v.100, n.3, 2021.

BEDRNIK, P., Development of *Eimeria-Tenella* Sporozoites in Tissue-Cultures Derived from Chickens Recovered from *Eimeria-Tenella* Infection. The **Journal of Protozoology**, v.22, p,A58-A58, 1975.

BELUSSO, D.; HESPANHOL, A. N. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. **Revista Percurso**, v. 2, n. 1, p. 25-51, 2010.

BETANCOURT, L.; Hume, M.; Rodríguez, F.; Nisbet, D.; Sohail, M.U.; Afanador-Tellez, G, . Effects of Colombian oregano essential oil (*Lippia origanoides* Kunth) and *Eimeria* species on broiler production and cecal microbiota. **Poultry Science**, v. 98, n. 10, p. 4777-4786, 2019.

BLAKE, D.P.; VRBA, V.; XIA, D. ; JATAU, I.D. ; SPIRO, S. ; NOLAN, M.J. ; UNDERWOOD, G.; TOMLEY, F.M . Genetic and biological characterisation of three cryptic *Eimeria* operational taxonomic units that infect chickens (*Gallus gallus domesticus*). **International Journal for Parasitology**, v.51, n.8, p.621-634, 2021.

BORTOLUZZI, C.; PARAS, K.L. ; APPLGATE, T.J. ; VEROCAI, G.G. Comparison between McMaster and Mini-FLOTAC methods for the enumeration of *Eimeria maxima* oocysts in poultry excreta. **Veterinary Parasitology**, v.254, p.21-25, 2018.

BOWMAN, DWIGHT D. Emerging Parasites in Developing Countries. In: **WEFTEC 2014**. Water Environment Federation, 2014.

CALNEK, B.W. (2000). Enfermedades de las aves. 2da. **Ed. Manual moderno**. D.F. Cap 34. p 891-905.

CHAPMAN, H.D. . A landmark contribution to poultry science--prophylactic control of coccidiosis in poultry. **Poultry Science**, v.88,n.4, p.813-815, 2009.

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

CHAPMAN, H.D.; CHERRY, T.E.; DANFORTH, H.D.; RICHARDS, G.; SHIRLEY, M.W.; WILLIAMS, R.B. Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. **International journal for parasitology**, v.32, n.5, p.617-629, 2002.

CHAPMAN, H.D.; JEFFERS, T.K. Vaccination of chickens against coccidiosis ameliorates drug resistance in commercial poultry production. **International journal for parasitology. Drugs and drug resistance**, v.4, n.3, p.214-217, 2014.

- COLLIER, C.T.; HOFACRE, C.L.; PAYNE, A.M.; ANDERSON, D.B.; KAISER, P.; MACKIE, R.I.; GASKINS, H.R.. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.122, n.1-2, p.104-115, 2008.
- CONWAY, DONAL P.; MCKENZIE, M. Elizabeth. Poultry coccidiosis: diagnostic and testing procedures. **John Wiley & Sons**, 2007.
- CRANE, M.S.J.; MCGALEY, C.J. *Eimeria-Tenella* - Inhibition of Host-Cell Invasion by Phospholipase Treatment of Sporozoites. **Experimental Parasitology**, v.72, p. 219-222, 1991.
- CRESPO, R.; SENTIES-CUE, G. Postmortem survey of disease conditions in backyard poultry. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 24, n. 2, p. 156-163, 2015.
- DASZAK, P.. Zoite migration during *Eimeria tenella* infection: Parasite adaptation to host defences. **Parasitology Today**, v.15, n.2, p.67-72, 1999.
- DAKPOGAN, H.B.; SALIFOU, S. Coccidiosis prevalence and intensity in litter based high stocking density layer rearing system of Benin. **Journal of Animal & Plant Sciences**, v.17, n.2, p.2522-2526, 2013.
- DEL CACHO, E.; GALLEGO, M.; LEE, S. H.; LILLEHOJ, H. S.; QUILEZ, J.; LILLEHOJ, E. P.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. Induction of protective immunity against *Eimeria tenella*, *Eimeria maxima*, and *Eimeria acervulina* infections using dendritic cell-derived exosomes. **Infection and Immunity**, v.80, n.5, p.1909-1916, 2012.
- EMBRAPA, Central de Inteligência de Aves e Suínos, 2021. Disponível em <<https://www.embrapa.br/en/suinos-e-aves/cias/estatisticas>> Acesso em 26 de Nov. de 2022.
- CHAPMAN, H.D. Studies on the excystation of different species of *Eimeria in vitro*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v.56, n.2, p.115-121, 1978.
- ESCOBAR GRIMALDI, M.J., LÓPEZ RIVAS, A.J. & RAMÍREZ LÓPEZ, P.E. TESIS DE GRADO. 2010. Determinación de fuentes de transmisión de coccidiosis (*Eimeria spp*) en aves de la línea hy line brown desarrolladas en jaula en dos granjas de El Paisnal, **Departamento de San Salvador. El Salvador**. Universidad de El Salvador.
- FEDDERN, V.B.; BACILA, D.M.; CARON, L. Uso racional de anticoccidianos na avicultura e estratégias para minimizar seu uso na produção animal. **Avicultura Industrial**, v.107, p.6, 2016.
- GAZONI, F.L.; ADORNO, F.C.; MATTE, F.; ALVES, A.J.; CAMPAGNONI, I.D.P.; URBANO, T.; ZAMPAR, A.; BOIAGO, M.M.; DA SILVA, A.S. Correlation between

intestinal health and coccidiosis prevalence in broilers in Brazilian agroindustries. **Parasitology International**, v.76, 102027, 2020.

GERHOLD, RICHARD. Parasitic diseases. Backyard Poultry Medicine and Surgery: **A Guide for Veterinary Practitioners**, p. 82-92, 2015.

GUPTA, S. K. Diagnosis and control of poultry coccidiosis: an update. **Haryana Veterinarian**, v. 48, p.1-10, 2009.

GRUBER, Arthur et al. Entendendo e controlando a coccidiose aviária. **Avicultura Industrial**, v. 96, n. 1133, 2005.

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

HADIPOUR, M.M., OLYAIE, A., NADERI, M., AZAD, F., NEKOUIE, O., 2011. Prevalence of *Eimeria* species in scavenging native chickens of Shiraz, Iran. **Afr J Microbiol Res** 5, 3296-3299.

HAMMOND, D. M.; ERNST, J. V.; GOLDMAN, M. Cytological observations on *Eimeria bovis* merozoites. **The Journal of Parasitology**, v.51, n.5, p.852-858, 1965.

HAUG, A.; GJEVRE, A.G.; SKJERVE, E.; KALDHUSDAL, M. A survey of the economic impact of subclinical *Eimeria* infections in broiler chickens in Norway. **Avian Pathology**, v.37, n.3, p.333- 341, 2008.

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.

LANG, M.; KANN, M.; ZAHNER, H.; TAUBERT, A.; HERMOSILLA, C. Inhibition of host cell apoptosis by *Eimeria bovis* sporozoites. **Veterinary Parasitology**, v.160, n.1-2, p.25-33, 2009.

LIU, J.H.; LIU, L.R.; LI, L.J.; TIAN, D.; LI, W.Y.; XU, L.X.; YAN, R.F.; LI, X.R.; SONG, X.K. Protective immunity induced by *Eimeria* common antigen 14-3-3 against *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima*. **BMC Veterinary Research**, v.14, n.1, p.1-11, 2018.

LOPEZ-OSORIO, S.; CHAPARRO-GUTIERREZ, J.J.; GOMEZ-OSORIO, L.M. Overview of Poultry *Eimeria* Life Cycle and Host-Parasite Interactions. **Frontiers in Veterinary Science**, v.7, p.384, 2020a.

LOPEZ-OSORIO, S.; SILVA, L.M.R.; CHAPARRO-GUTIERREZ, J.J.; VELASQUEZ, Z.D.; TAUBERT, A.; HERMOSILLA, C. Optimized excystation protocol for ruminant *Eimeria bovis*- and *Eimeria arloingi*-sporulated oocysts and first 3D holotomographic microscopy

- analysis of differing sporozoite egress. **Parasitology international**, v.76, p.102068, 2020b.
- LEITÃO, J. S. Parasitologia veterinária – II volume. Parasitoses. 2 ed. **Fundação Calouste Gulbenkian**, Lisboa, 1971.
- LUCHESE, F. C.; PERIN, M.; AITA, R. S.; MOTTIN, V. D.; MOLENTO, M. B.; MONTEIRO, S. G. Prevalência de espécies de *Eimeria* em frangos de criação industrial e alternativa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 2, p. 81-86, 2007.
- MARTINS, I. V. F. Parasitologia veterinária [recurso eletrônico]. 2 ed. Vitória: **EDUFES**, 320 p. 2019.
- MARQUES, S.M.T.; MENETRIER, L.D.C.; MATTOS, M.J.T.D. Parasitismo simultâneo de helmintos e coccídeos em ovinos de pequenas propriedades do Rio Grande do Sul. **Revista Agrária Acadêmica. Imperatriz, MA**, v.4, n. 1, p. 84-90, 2021.
- MARQUARDT, C. W., DEMAREE, S. R., & GRIEVE, B. R. **Parasitology and vector biology** 2 ed. , p. 152, 2000.
- MATHIS, G.F.; BROUSSAD, C. Increased level of *Eimeria* sensitivity to diclazuril after using a live coccidial vaccine. **Avian Diseases**, v. 50, n. 3, p. 321-324, 2006.
- 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.
- MCDONALD, V.; SHIRLEY, M. W. Past and future: vaccination against *Eimeria*. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p. 1477-1489, 2009.
- MCDUGALD, L. R.; JEFFERS, T. K. *Eimeria tenella* (Sporozoa, Coccidia): Gametogony following a single asexual generation. **Science**, v. 192, n. 4236, p. 258-259, 1976.
- MESA-PINEDA, C.; NAVARRO-RUÍZ, J. L.; LÓPEZ-OSORIO, S.; CHAPARRO-GUTIÉRREZ, J. J.; GÓMEZ-OSORIO, L. M. Chicken coccidiosis: from the parasite lifecycle to control of the disease. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 787653, 2021.
- MERSHA, C.; NEGASH, T.; SAMUEL, B. T. Occurrence of concurrent infectious diseases in broiler chickens is a threat to commercial poultry farms in central Ethiopia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, p. 1309 – 1317, 2009.
- MORRISON, D.A., BORNSTEIN, S., THEBO, P., WERNERY, U., KINNE, J., MATTSSON, J.G. The current status of the small subunit rRNA phylogeny of the coccidia (*Sporozoa*). **International Journal for Parasitology** v. 34, n. 4, p. 501-514, 2004.

- MULLER, J.; HEMPHILL, A. *In vitro* culture systems for the study of apicomplexan parasites in farm animals. **International Journal for Parasitology** v. 43, n. 2, p. 115-124, 2013.
- MUND, M.D.; KHAN, U.H.; TAHIR, U.; BAHAR-E-MUSTAFA; FAYYAZ, A. Antimicrobial drug residues in poultry products and implications on public health: **A review. International Journal of Food Properties** v. 20, n. 7, p. 1433-1446, 2017.
- NEMATOLLAHI A.; MOGHADDAM G.H.; POURABAD R.F.. Prevalence of *Eimeria* species among broiler chicks in Tubriz (North West of Iran). **Munis Entomology & Zoology Journal**. v. 4, n. 1, p. 53-58, 2009.
- OGEDENGBE, J. D.; HUNTER, D. B.; BARTA, J. R. Molecular identification of *Eimeria* species infecting market-age meat chickens in commercial flocks in Ontario. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 3-4, p. 350-354, 2011.
- PEEK, H.W.; LANDMAN, W.J.M. Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2001. **Avian Pathology** v. 32, n. 4, p. 391-401, 2003.
- PRICE, K.R. Use of live vaccines for coccidiosis control in replacement layer pullets. **Journal of Applied Poultry Research** v. 21, n. 3, p. 679-692, 2012.
- QUIROZ-CASTANEDA, R.E.; DANTAN-GONZALEZ, E. Control of Avian Coccidiosis: Future and Present Natural Alternatives. **BioMed Research International** v. 2015, 2015.
- ROCCO, P.; EBERINI, I.; MUSAZZI, U.M.; FRANZE, S.; MINGHETTI, P. Glatiramer acetate: A complex drug beyond biologics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 133, p. 8-14, 2019.
- ROCHELL, S. J.; PARSONS, C. M.; DILGER, R. N. Effects of *Eimeria acervulina* infection severity on growth performance, apparent ileal amino acid digestibility, and plasma concentrations of amino acids, carotenoids, and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein in broilers. **Poultry science**, v. 95, n. 7, p. 1573-1581, 2016.
- SNYDER, R. P. et al. Exploiting digital droplet PCR and Next Generation Sequencing technologies to determine the relative abundance of individual *Eimeria* species in a DNA sample. **Veterinary Parasitology**, v. 296, p. 109443, 2021.
- 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..
- SHIVARAMAIAH, C.; BARTA, J.R.; HERNANDEZ-VELASCO, X.; TELLEZ, G.; HARGIS, B.M. 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 Reports**, p. 23-34, 2014.
- TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. **Veterinary Parasitology**. Oxford, UK, Blackwell Publishing, v.3, p475-483, 2007.
- TEWARI A.K.; MAHARANA BR. Control of poultry coccidiosis: changing trends. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 35, p. 10-17, 2011.
- TIERNEY, J., MULCAHY, G. Comparative development of *Eimeria tenella* (Apicomplexa) in host cells *in vitro*. **Parasitology research** v. 90, p. 301-304, 2003.
- TIERNEY, J.B.; MATTHEWS, E.; CARRINGTON, S.D.; MULCAHY, G. Interaction of *Eimeria tenella* with intestinal mucin *in vitro*. **The Journal of parasitology** v. 93, n. 3, p. 634-638, 2007.
- TOLEDO, G. A.; ALMEIDA, J. D. M.; ALMEIDA, K. S.; FREITAS, F. L. C. 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.
- TYZZER, E. E. Coccidiosis in gallinaceous birds. **The American journal of hygiene**, v. 10, n. 2, p. 269-283, 1929.
- VENKATESWARA RAO, P.; RAMAN, M.; GOMATHINAYAGAM, S. Sporulation dynamics of poultry *Eimeria* oocysts in Chennai. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 39, p. 689-692, 2015.
- 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. 3-4, p. 183-190, 2010.
- WALK, C. L.; COWIESON A. J.; REMUS J. C.; NOVAK C. L.; MCELROY A. P.; Effects of dietary enzymes on performance and intestinal goblet cell number of broilers exposed to a live coccidia oocyst vaccine. **Poultry science**, v. 90, n. 1, p. 91-98, 2011.
- WALKER, R.A.; FERGUSON, D.J.; MILLER, C.M.; SMITH, N.C. Sex and *Eimeria*: a molecular perspective. **Parasitology** v. 140, n. 14, p. 1701-1717, 2013.
- WILLIAMS, R.B. Quantification of the crowding effect during infections with the seven *Eimeria* species of the domesticated fowl: its importance for experimental designs and the production of oocyst stocks. **International Journal for Parasitology** v. 31, n. 10, p. 1056-1069, 2001.
- YUN, C.H.; LILLEHOJ, H.S.; LILLEHOJ, E.P. Intestinal immune responses to coccidiosis.

**Developmental & Comparative Immunology**, v. 24, n. 2-3, p. 303-324, 2000.

ZHANG, Q.; CHEN, X.; EICHER, S. D.; AJUWON, K. M.; APPLGATE, T. J. Effect of threonine deficiency on intestinal integrity and immune response to feed withdrawal combined with coccidial vaccine challenge in broiler chicks. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 12, p. 2030-2043, 2016.

ZIOMKO, I.; CENCEK, T. Influence of coccidiosis on productive effect in poultry husbandry.

**Wiadomosci parazytologiczne** v. 45, n. 2, p. 181-186, 1999.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral:

Avaliar os efeitos das doses de desafio de *Eimeria* spp. na permeabilidade gastrointestinal, morfologia intestinal e escores de lesão intestinal.

#### 3.2 Objetivos Específicos:

- Verificar o efeito de diversas doses desafio de *Eimeria* em frangos machos da linhagem fêmea Cobb 500 de corte com 14 dias de idade;
- Verificar a permeabilidade duodenal após diferentes doses de desafio de *Eimeria*;
- Comparar a lesão macroscópica entre os grupos com diferentes doses de desafio;
- Comparar as análises histológicas e histomorfométricas nas diferentes doses dos desafios.

## CAPÍTULO I

*Artigo submetido à Revista Ciência Rural*

**Comparison of graded *Eimeria* challenge with changes in gastrointestinal permeability and intestinal morphology in broiler chickens**

**Comparação dos graus de desafio de *Eimeria* com alteração da permeabilidade gastrointestinal e morfologia intestinal de frangos de corte**

**Giovana C. de Souza<sup>1</sup>, Giovanna Fernandes Esteves<sup>2</sup>, Franciana Volpato<sup>3</sup>, Rovian Miotto<sup>3</sup>, Marcos Mores<sup>4</sup>, Adriana Ibelli<sup>1,4</sup>, Ana Paula Bastos<sup>1,4\*</sup>**

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi ver como os desafios graduais de *Eimeria* afetaram a permeabilidade gastrointestinal, a morfologia intestinal e os escores de lesões intestinais em frangos de corte. Este estudo incluiu quatro grupos de dez frangos cada, cada um com uma dose de tratamento de *Eimeria* distinta, como desafio de dose alta, média-alta e média-baixa. Cinco dias após o desafio, avaliaram-se as lesões intestinais e a permeabilidade gastrointestinal. Os resultados mostraram que o aumento da dose de desafio com *Eimeria* resultou em uma diminuição considerável na altura das vilosidades intestinais, relação tamanho da vilosidade e profundidade de cripta e das células globulares. Além disso, após o desafio, houve um aumento considerável da permeabilidade gastrointestinal. Em conclusão, os modelos de desafio (médio-baixo, médio-alto e alto) podem ser utilizados como ensaios para infecção experimental, mas os níveis médio-baixo ou médio-alto de oocistos são sugeridos como modelo de desafio de *Eimeria* para estabelecer um modelo de desafio subclínico para estudos futuros avaliando estratégias nutricionais.

**Palavras-chave:** Eimeriose, saúde intestinal, permeabilidade gastrointestinal, coccidiose

**ABSTRACT**

The purpose of this study was to see how graded *Eimeria* challenges affected gastrointestinal permeability, intestinal morphology, and intestinal lesion scores in broiler chickens. This study included four groups of ten chickens each, each with a distinct *Eimeria* treatment dose, such as high-dose challenge, medium-high, and medium-low. Five days after the challenge, intestinal lesions and gastrointestinal permeability were assessed. The results showed that increasing the *Eimeria* challenge dose resulted in a considerable decrease in intestinal villi height, ratio villus size and crypt depth, and goblet cells. Furthermore, after the challenge, there was a considerable increase in gastrointestinal permeability. In conclusion, the medium-low, medium-high, and high-challenge models can be utilized for experimental infection. However, medium-low or medium-high levels of oocysts are recommended as an *Eimeria* challenge dose to establish a subclinical, challenge model for future studies evaluating nutritional strategies.

**Key words:** Eimeriose, helth gut, gastrointestinal permeability, coccidiosis.

## INTRODUÇÃO

A coccidiose é uma doença de grande relevância na avicultura industrial, seja para frangos de corte ou de postura (Shivaramaiah et al., 2014). Os agentes etiológicos desta doença intestinal são protozoários do gênero *Eimeria* que pertencem ao filo Apicomplexa, as quais podem se desenvolver tanto em animais domésticos quanto selvagens, sejam eles mamíferos ou aves (Allen and Fetterer, 2002b, Chapman, 2014). Atualmente, sete espécies de *Eimeria* são conhecidas por infectar galinhas e diferem em patogenicidade, são as *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella* (Tewari and Maharana, 2011). As diferenças entre essas espécies de *Eimeria* incluem a invasão de locais do intestino, patogenicidade e tipo de lesão produzida. Por se desenvolverem no trato intestinal, além de lesões na mucosa, a infecção por coccídios acarreta redução no desempenho zootécnico dos animais de produção devido à má absorção de nutrientes e, em alguns casos graves, há alta taxa de mortalidade do plantel (Collier et al., 2008, Yun et al., 2000, Muller and Hemphill, 2013).

A doença clínica em frangos de corte inclui diarreia (de mucóide e aquosa a hemorrágica), redução no ganho de peso, ingestão de ração e, em casos graves, mortalidade (Haug et al., 2008). Esta enfermidade acomete principalmente aves jovens, devido sua imunidade ainda em desenvolvimento, não excluindo a possibilidade de contaminação nas demais idades, sendo que sua principal forma de contaminação se inicia após a ingestão de oocistos (Chapman, 2014, Madlala et al., 2021). Desafio com baixos níveis de *Eimeria* pode estimular a resposta imune protetora do hospedeiro e esta é a base das estratégias de vacinação (Price, 2012, Chapman, 2014). Afirma-se que a doença só ocorre se o animal for exposto a alta dose infecciosa ou a imunidade do hospedeiro for bastante fraca (Chapman, 2014). *Eimeria* spp. exibem alto grau de especificidade de hospedeiro e local. Isso explica por que qualquer animal pode hospedar várias *Eimeria* spp., cada uma com uma localização distinta no intestino. *Eimeria* spp. produz diferentes interações patógeno-hospedeiro gerando sintomatologia variada

de coccidiose (Allen and Fetterer, 2002b).

Para melhorar os resultados negativos da infecção leve por *Eimeria*, estratégias nutricionais, medicamentos anticoccidianos ou a vacinação são utilizados (Parker et al., 2007, Walk et al., 2011, Adedokun and Adeola, 2017). No entanto, para avaliar uma estratégia nutricional, um modelo subclínico ou clínico de coccidiose deve ser primeiro estabelecido. Assim, para melhor avaliar o impacto da dose de desafio no desempenho zootécnico e intestino de frango é importante para o pesquisador selecionar uma dose apropriada no modelo de desafio subclínico e clínico. Um estudo anterior relatou que o aumento das doses de inoculação de *Eimeria* resultou em uma redução linear do desempenho de crescimento e da digestibilidade ileal aparente dos aminoácidos (Rochell et al., 2016). No entanto, mais estudos são necessários para entender a relação entre a gravidade da infecção por *Eimeria* e os parâmetros de saúde gastrointestinal. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos de graus diferentes de desafio com *Eimeria* na permeabilidade e lesão no intestino em frangos de corte.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Aspectos Éticos*

O estudo foi conduzido na Embrapa Suínos e Aves, sendo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Suínos e Aves, sob o número 002/2018. Ainda, tanto a manutenção quanto a manipulação das aves foram realizadas conforme as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

### *Cepas do Desafio*

A Dra. Giovana Esteves do Centro de Amparo à Pesquisa Veterinária forneceu os oocistos de *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*. Os métodos para detectar, recuperar os oocistos dos frangos infectados, esporulação de oocistos e preparação da dose de desafio, foram realizados

conforme descrito anteriormente. (Teng et al., 2020, Haug et al., 2006). As aves utilizadas para a propagação dos oocistos foram criadas em isolador desinfetado e infectadas com oocistos de *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella* aos 14 dias de idade. Aos 7 pós- desafio (dpi), as fezes foram coletadas do isolador. Os oocistos foram separados das fezes por flotação salina e esporulados com bomba de ar à temperatura ambiente. Três rodadas de passagens foram realizadas para obter oocistos de *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella* suficientes para o experimento atual.

### *Desenho Experimental*

Um total de quarenta frangos de corte machos de um dia de idade (machos da linhagem fenminina Cobb 500) foram alocadas aleatoriamente em quatro grupos com carga de desafio distintas. Os tratamentos incluem o grupo controle negativos sem desafio (G1), o grupo com dose desafio alto (G2), a dose de desafio média-alta (G3) e a dose de desafio média-baixa (G4). As aves foram pesadas no dia do alojamento e foram alojadas em gaiolas (0,049 m<sup>2</sup> por ave). Com 16 dias de idade, as aves foram desafiadas por gavagem com 1 mL. O número de oocistos usados em cada grupo de desafio estão descritos na Tabela 1. Os níveis de dosagem para o estudo atual foram escolhidos com base em estudos anteriores (Teng et al., 2020). As aves foram alimentadas com ração inicial à base de milho e farelo de soja (21% de proteína bruta e 2.975 kcal/kg) sem receber vacina coccídica e coccidiostáticos do dia 0 ao 21 dias de idade. A ração e água foram fornecidas *ad libitum*, e o programa de temperatura ambiente foi seguido de acordo com as recomendações do Cobb Broiler Management Guide. Ao 5° dpi, as aves foram eutanasiadas por deslocamento cervical. Foi coletado sangue, fezes e secções de 3 cm de comprimento do duodeno, jejuno e ceco. A seguir, o tecido intestinal foi imediatamente fixado em formol a 10% para análise da morfologia intestinal. Para análise da expressão

gênica, a mucosa duodenal foi cuidadosamente raspada com uma microlâmina romba, imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C até processamento posterior.

#### *Contagem de oocistos (OPG) e pontuação da lesão*

O número de oocistos foi determinado nas excretas aos 15, 17, 19 e 21 dias de idade. Resumindo, as excreções dentro de cada gaiola foram reunidas e misturadas. As excretas/gaiola (aproximadamente 500 mg) foram pesadas e agitadas por uma peneira com 300 ml de solução saturada de NaCl. Uma amostra da mistura foi transferida para as duas câmaras de uma lâmina McMaster (Bortoluzzi et al., 2018). Após 5 min, as quatro espécies de oocistos de *Eimeria* foram contadas em microscópio com aumento de 10x. O número de oocistos foi expresso em oocistos por grama de fezes. Além disso, lesões macroscópicas (1 ave/gaiola aos 21 dias de idade) foram pontuadas no duodeno, médio jejuno e ceco de acordo com Conway et al. (1990), já que as três espécies presentes no desafio têm como alvo a alça duodenal (*E. acervulina*, área do intestino médio) e jejuno superior (*E. maxima*) e ceco (*E. tenella*).

#### *Análise de PCR em tempo real*

Antes dos desafios, as fezes foram coletadas e análises de qPCR para *Eimeria* spp. e contagem de oocistos foram realizadas. As mesmas análises foram realizadas com 1, 3 e 5 dpi. Para realizar identificação da *Eimeria* spp., primers e sondas para *Eimeria* spp. foram utilizados para ensaios de PCR em tempo real (F: TCATCACCCAAAGGGATT; R:TTCATACTGCGTCTAATGCAC; P: [6FAM] CGCCGCTTAACTTCGGAGTTCAGATGGGAT [BHQ1]) (Baron et al., 2022, Vrba et al., 2010). As reações de qPCR foram realizadas em equipamento de PCR em tempo real

Quantstudio 6 (Applied Biosystems, EUA) em 15 µL contendo 2X GoTaq Probe qPCR Master Mix com ROX como corante de referência passiva (Promega, EUA), 0,13 µM de cada primer, 0,09 µM de sonda e 1,5 µL de DNA. As condições de ciclagem utilizadas foram 95 °C por 2 min seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 s e 60 °C por 60 s. As amostras foram executadas em duplicata e controles negativo e positivo. Após as reações de qPCR, os ciclos limiares (Ct) foram coletados. As curvas padrão foram realizadas usando um fragmento de DNA Gblock (IDT, EUA) contendo a sequência do ensaio (*Eimeria* spp.). Uma diluição de 10 vezes ( $10^7$ - $10^{10}$  cópias/µL) foi realizada e executada em cada reação de qPCR. A eficiência da PCR e a quantificação absoluta foram baseadas em  $10^{(-1/\text{slope})}$ .

#### *Pontuação da lesão macroscópica do intestino*

As lesões macroscópicas do intestino das aves foram pontuadas no duodeno, jejuno médio e ceco de acordo com Conway et al. (1990), pois as três espécies presentes no inóculo do desafio têm como alvo a alça duodenal (*E. acervulina*), região do intestino médio ou jejuno (*E. maxima*) e ceco (*E. tenella*). As lesões macroscópicas foram pontuadas separadamente para lesões induzidas por coccídios de acordo com Johnson and Reid (1970)(Tabela 2) incluindo pontuações variando de zero a quatro para os sistemas de pontuação (0 sem lesões; 4 pontuação máxima da lesão).

#### *Permeabilidade intestinal*

A fluorescência em isotiocianato-dextrano (FITC-d, MW 3–5 KDa; Sigma Aldrich Co., EUA) foi administrada por via oral, e sua presença no sangue foi usada como um marcador de transporte paracelular e disfunção da barreira mucosa. FITC-Dextran foi dissolvido em água estéril a uma concentração final de 20 mg/ml. Aos 21 dias de idade, FITC-d (2,2 mg/ave, peso



molecular 3.000–5.000; Sigma Aldrich) foi administrado por via oral a 1 ave/gaiola, 2 h antes da eutanásia das aves. O sangue foi coletado pela veia jugular após a eutanásia, mantido em temperatura ambiente por 3 h para permitir a coagulação e, em seguida, centrifugado (1000 g por 15 min) para separação do soro. Uma curva padrão foi preparada usando diluição em série de FITC-Dextran em PBS (0, 125, 250, 375, 500, 750, 1.000 µg/ml)(Baxter et al., 2017). 100 µl de soro diluído foram adicionados a uma placa de fundo plano de 96 poços em duplicata. O controle negativo foi com soro do frango que não foi administrado a solução FITC-Dextran. Os níveis de fluorescência do soro diluído (1:1 em PBS) foram medidos em um comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 528 nm (Synergy HT, leitor de microplacas multimodo; BioTek Instruments), e a concentração de FITC-d por ml de soro foi calculada com base em uma curva padrão.

#### *Análise Histológica*

Análise histológica foi realizada no duodeno, jejuno e ceco das aves através da coloração das lâminas com hematoxilina e eosina. As lesões foram classificadas conforme Goodwin et al. (1998). Para tal, um score para as lesões microscópicas (MLS) foi estabelecido, onde a MLS é a soma de A mais B. A representa a distribuição dos estágios de desenvolvimento da *Eimeria* ao longo do segmento intestinal examinado (0 = sem parasitas, 1 = parasitas em um campo X10; 2 = parasitas em dois campos X10; 3 = parasitas em três campos X10; 4 = parasitas em todos os quatro campos X10), e B representa a gravidade da infecção por *Eimeria* nos campos examinados (0 = parasitas em 0% das vilosidades; 1 = parasitas em < 25% das vilosidades; 2 = parasitas em 25 a 50% das vilosidades; 3 = parasitas em 51 a 75% das vilosidades; 4 = parasitas em > 75% das vilosidades). Por exemplo, se A = 2 (parasitas em dois campos X 10) e B = 2 (parasitas em 25 a 50% das vilosidades), então A + B = 4. O MLS total inicial pode variar de 0

a 8.

### *Análise Histomorfométrica*

Após coloração de Alcian Blue & PAS, o duodeno, jejuno e ceco das aves foram avaliados em todos os grupos (Baron et al., 2022). Os parâmetros analisados foram: altura das vilosidades, profundidade da cripta, espessura da vilosidade, espessura da mucosa, quantidade de células caliciformes no vilão, relação altura de vilosidade/profundidade de cripta. Os vilos medidos foram aqueles que o corpo do vilão estava íntegro e possível de medir, esses vilos tiveram suas alturas obtidas mensurando-os desde o ápice até sua base, sendo o limite a área adjacente à zona de criptas. A quantificação foi realizada em microscopia óptica comum, no aumento de 10X, foram quantificados e realizadas três medições de cada parâmetro em 10 campos distintos da lâmina de cada segmento intestinal por animal. Após a seleção dos vilos viáveis para medição, foram contadas – nestes vilos – as células caliciformes presentes. A contagem foi realizada em toda extensão do vilão, de ambos os lados partindo desde a base até a o ápice e seguindo pelo lado oposto.

### *Estatística*

Os dados foram inicialmente analisados pelo teste de distância K-S. Nos dados não-paramétricos, o teste de Friedman foi usado, com o pós-teste de *Student-Newman-Keuls*. Para análise morfométrica foi usado o Kruskal-Wallis test. Este teste foi aplicado usando Prism 4.00 (GraphPad Software, CA, USA) e Sigma-Stat (SPSS Corporation, USA). Aceitamos neste estudo risco alfa menor ou igual a 5% e risco beta menor ou igual a 20%.

## RESULTADOS

### *Contagem de oocistos (OPG) e qPCR*

Nenhum oocisto foi detectado nas excretas das galinhas ao 15º dia de idade para todos os grupos. Oocistos não foram detectados nas aves sem desafio (G1) nos dias 17, 19 e 21 dias. Entretanto, nos grupos G2, G3 e G4 foram encontrados oocistos nas fezes em todos os dias avaliados após o desafio. Conforme esperado, os animais que receberam a maior concentração de inóculo no desafio apresentaram maiores quantidades de oocistos nas fezes (Tabela 3). As aves desafiadas (G2, G3 e G4) apresentaram queda do consumo de ração, apatia e diarreia como sinais clínicos, com maior intensidade no quarto e quinto dia após a inoculação. No quinto dia pós desafio, as aves de todos os grupos desafiados apresentaram diarreia sanguinolenta. Em relação à identificação molecular da *Eimeria* usando qPCR, todos os controles positivos (CP) amplificaram no ensaio espécie, sendo que o controle negativo (G1- grupo não desafiado) não amplificou. Nos grupos desafiados (G2, G3 e G4) houve detecção de DNA nas excretas nos dias 1, 3 e 5 após desafio (Tabela 3), mas a excreção de oocistos foi menor nos grupos desafiados e infectados com dose de desafio menor.

### *Avaliação das lesões macroscópicas e histopatológicas*

Todos as aves desafiadas (G2, G3 e G4) foram positivas para coccidiose, com lesões macroscópicas específicas no intestino para todas as cepas presentes no desafio (*E.acervulina*, *E.maxima* e *E.tenella*) (Figura 1). Todos os grupos desafiados tiveram pontuações de lesão macroscópica e microscópica mais altas do que o grupo controle (G1, Tabela 4) no intestino superior, intestino médio e ceco. As lesões macroscópica com menor extensão foram observadas na porção do jejuno (*E. maxima*). Os resultados demonstraram que as aves do grupo G4 (alto desafio) apresentaram lesão cecal macroscópica mais severa em comparação com as

aves desafiadas do grupo G3 e G2. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos desafiados (G2, G3 e G4) na análise macroscópica no intestino superior (duodeno) e médio (jejuno).

As análises histopatológicas do intestino delgado (duodeno e jejuno) e ceco são apresentadas na Figura 2 e Tabela 4. Nenhuma lesão óbvia para o intestino delgado e ceco foi observada no grupo G1 (ave não desafiada). Ao contrário, petéquias e sangramento (leve a moderado) no intestino delgado e no ceco foi detectado em todos os grupos desafiados (G2, G3 e G4), indicando que as aves do presente estudo apresentavam infecção coccídica moderada/grave. Aves desafiadas (G2, G3 e G4) apresentaram lesões moderadas a graves (escore 6–7 no duodeno, escore 6-8 no jejuno e escore 3-6 no ceco). As principais alterações encontradas nesta avaliação foram hemorragias na mucosa e submucosa, algumas vezes acompanhadas de estruturas parasitárias compatíveis com *Eimeria* spp., sem evidência de necrose (Figura 2). Nos cortes de jejuno que receberam escore 0 durante a avaliação macroscópica na análise histopatológica estruturas parasitárias de *E. maxima* foram observadas em todas as aves.

#### *Medidas Histomorfométricas do Duodeno, Jejuno e Ceco*

A histomorfometria do duodeno, jejuno e ceco dos frangos aos 21 dias de idade são apresentadas na Tabela 5. Para um frango saudável, espera-se que a relação altura de vilo/profundidade da cripta (VH:CD) seja de pelo menos 5 (cinco partes de vilo por uma parte da cripta) (Ruangpanit et al., 2020), conforme observado no grupo controle (G1). Os desafios (G2, G3 e G4) resultaram em uma diminuição significativa na relação VH:CD duodenal, jejunal e cecal ( $P \leq 0,05$ ) em comparação com as aves não desafiados (G1). Além disso, o desafio apresentou uma redução significativa na altura das vilosidades e profundidade das criptas

( $P \leq 0,05$ ) comparada as aves não desafiadas. Os frangos de corte desafiados apresentaram uma significativa redução na densidade das células calciformes em comparação com o grupo controle ( $P < 0,001$ ), sendo que interação entre a dose do desafio foi também observada na quantidade de células calciformes nas vilosidades do duodeno. Os grupos desafiados (G2, G3 e G4) apresentaram diminuição do tamanho da vilosidade (VH) e um aumento na espessura do vilo quando comparado as aves do grupo controle (G1) no duodeno, jejuno e íleo.

#### *Permeabilidade Gastrointestinal*

Os resultados da permeabilidade gastrointestinal são representados pelos níveis de FITC-d recuperados no soro das aves. Maiores concentrações de FITC-d no soro representa aumento da permeabilidade gastrointestinal. A permeabilidade gastrointestinal mais severa ( $300 \pm 14,1$  ng/mL) foi observada no grupo com desafio alto (G4). No entanto, as aves desafiadas no grupo médio-alto desafio (G3) não diferiram do G4 e apresentaram  $250 \pm 18,4$  ng/mL de FITC-dextran no soro. Entretanto, as aves do G4 e G3 apresentaram maior permeabilidade do que o grupo com médio-baixo desafio apresentou  $73,94 \pm 4,3$  ng/mL de FITC-dextran no soro ( $P \leq 0,05$ ) e o grupo não desafiado apresentou menos de  $7,7 \pm 2,8$  ng/mL ( $P \leq 0,0001$ ).

## **DISCUSSÃO**

As infecções coccídicas são autolimitadas e dependem em grande parte do número de oocistos esporulados ingeridos (Chapman, 2014). Vários estudos demonstraram que existe uma dose ideal, de modo que o potencial reprodutivo do parasita seja atingido e eles se reproduzam com eficiência dentro das células epiteliais. A ingestão de doses muito altas pode causar o chamado “efeito de aglomeração”, interrompendo a continuidade do ciclo de vida do parasita, ao mesmo tempo em que gera danos intestinais (Williams, 2001, Williams, 1973, Jenkins et al.,

2017). Alguns estudos caracterizaram o potencial reprodutivo de cada espécie de *Eimeria* em condições experimentais, usando diferentes doses infectantes de oocistos esporulados, de *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* ou *E. tenella* (Teng et al., 2020, Williams, 1973, Teng et al., 2021a). A utilização de desafio de *Eimeria* spp. em estudos de infecção ou de avaliação de aditivos e nutrientes em ração de frango é comum (Teng et al., 2021b, Teng et al., 2021a, Hernandez-Velasco et al., 2014, Allen and Fetterer, 2002a). Reforçando a importância de estudos sobre dose de desafio. A competição intraespecífica sobre as infecções de coccidiose, dependentes do número de inóculo esporulados ingeridos (oocistos) é relatado (Jenkins et al., 2008, Conway et al., 1993).

No estudo atual, observamos que a gravidade da infecção por *Eimeria* regulou linearmente as lesões macroscópicas e microscópicas no intestino superior, médio e no ceco, como também alterou a dinâmica da permeabilidade intestinal, o que está de acordo com relatórios anteriores (Teng et al., 2020). De fato, os coccídios do desafio invadem a mucosa intestinal e induzem certo grau de dano e inflamação das células epiteliais. Nos três desafios utilizados observamos oocistos causando alterações histológicas marcantes nas células epiteliais intestinais do frango, incluindo distorção, ruptura, separação de células adjacentes e descamação. Aves infectadas pelo desafio apresentaram a doença clínica, observamos penas eriçadas, apatia e diarreia. Além disso, o consumo de ração e água diminuiu, e as fezes apresentaram aquosas nos primeiros dias pós desafio e no quinto dia pós-desafio observamos diarreia hemorrágica nos três grupos desafiados. Essas alterações podem estar associadas a problema de má absorção devido à atividade reduzida da enzima da borda em escova (Adams et al., 1996) e à ruptura da integridade intestinal (Assis et al., 2010). A coccidiose também pode causar outras alterações intestinais; por exemplo, uma inoculação com oocistos de *E. acervulina* e *E. maxima* aumenta o tamanho e o número de células caliciformes ao longo das criptas ileais

em frangos de corte (Collier et al., 2008).

Os resultados dos escores de lesão intestinal também foram associados à permeabilidade gastrointestinal. A mudança dinâmica da permeabilidade intestinal é relacionado com o ciclo de vida de *Eimeria*. Após a entrada de esporozoítos nas células intestinais, ele se transformará em trofozoíto em 12 a 48 h (McDougald, 1998). Nesse estágio ocorre a divisão múltipla assexuada, reproduzindo numerosos merozoítos nos esquizontes. Quando os esquizontes se tornam maduros (3 dias pós infecção), liberam os merozoítos no intestino (McDougald, 1998). Esses merozoítos liberados podem penetrar em outras células epiteliais e causar grande dano no intestino (Dubey e Jenkins, 2018). Alta concentração de merozoítos prejudica severamente o intestino do frango. No estudo atual, a infecção por *Eimeria* aumentou significativamente o vazamento gastrointestinal após 5 dias de desafio. Além disso, a permeabilidade gastrointestinal aumentou linearmente em resposta à dose de inoculação graduada. Os níveis séricos de FITC-d foram muito semelhantes entre os grupos com alto desafio e médio-alto desafio. Por outro lado, não houve diferença significativa entre os grupos desafiados nas pontuações de lesão do intestino médio e superior. Assim, com base nos resultados da permeabilidade gastrointestinal, especula-se que as doses crescentes podem aumentar o vazamento gastrointestinal porque mais esporozoítos no início da infecção podem reproduzir mais esquizontes e merozoítos nos estágios seguintes.

As lesões macroscópicas e microscópicas do intestino superior e médio não diferiram significativamente entre os grupos desafiados. O efeito de aglomeração pode ser responsável por esse achado, o qual ocorre quando há grandes números de oocistos ocupando o intestino, o que leva a uma auto-inibição do potencial reprodutivo e redução da excreção de oocistos (Teng et al., 2020, Williams, 2001, Conway et al., 1993). As aves desafiadas com menos oocistos, apresentam mais espaço disponível no intestino para *Eimeria* spp. passar pelo terceiro ou quarto

ciclo assexuado, resultando em um pico tardio de permeabilidade. Embora o alto desafio (G4) tenha levado a um pico mais precoce de permeabilidade gastrointestinal, ele ainda causou o maior nível de FITC-d entre todos os tratamentos durante todo o período de infecção. Como o alto desafio deu origem ao comprometimento intestinal mais grave, as aves apresentaram atraso na recuperação.

A morfologia intestinal mostrou vilosidades lesionadas nas aves desafiadas, especialmente nos grupos com médio-alto e alto desafio (G3 e G4), quanto maior o número de oocistos no desafio nos frangos, menor altura das vilosidades no duodeno, jejuno e ceco. Os desafios reduziram altura das vilosidades tanto no duodeno (>20%) quanto no jejuno e ceco (>30%) e aumentaram a profundidade das criptas em comparação com as aves não desafiadas. No entanto, é desejável que as vilosidades apresentem-se altas enquanto que as criptas reduzidas, a diminuição da altura das vilosidades é responsável pela redução da digestibilidade nas aves desafiadas (Bedrnik and Jurkovic, 1979). A menor relação altura de vilo/profundidade da cripta indica que as aves desafiadas, infectadas, consomem mais energia e nutrientes acelerando a renovação das células epiteliais intestinais para expulsar os parasitas do intestino (Cliffe et al., 2005; Clevers, 2013). O desafio, independentemente da dose utilizada, se relacionou com redução da quantidade das células caliciformes. As células caliciformes representam um importante mecanismo de defesa no trato intestinal (Bedrnik and Jurkovic, 1977), secretando mucinas que constituem a camada de muco, que atua como barreira física e apresenta funções imunológicas para inibir a entrada de patógenos nas células epiteliais (Augustine, 2001). As mucinas são a primeira linha de defesa contra patógenos intestinais, com a redução das células caliciforme as aves são mais susceptíveis a infecções (Bedrnik and Jurkovic, 1977).

No presente estudo, foi utilizado diferentes desafios com oocistos esporulados de



*Eimeria*, já que são ideais para serem usados quando um estudo visa um nível de desafio específico. Nossos resultados demonstram o impacto significativo na saúde do intestino de frangos de corte pela gravidade da coccidiose, com diferentes desafios de *Eimeria*. No entanto, a dose de desafio não é o único fator responsável pela gravidade da infecção, mas também a virulência da cepa de *Eimeria*, viabilidade dos oocistos, tempo e temperatura de armazenamento dos oocistos. Nossos resultados fornecem informações úteis para estabelecer modelos de desafio clínico ou subclínico para estudos futuros, como também subsidiam a decidir sobre uma dose apropriada de desafio de *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella* em estudos futuros sobre a avaliação de ingredientes de rações ou aditivos de rações para melhorar a saúde intestinal de frangos de corte.

## CONCLUSÃO

Nossos resultados das lesões macroscópicas, microscópicas e morfométricas demonstram que os três modelos de desafio (médio-baixo, médio-alto e alto) podem ser utilizados como ensaios para infecção experimental. A integridade intestinal em frangos de corte foram negativamente influenciados de maneira dose-dependente pela infecção por *E. acervulina*, *E. tenella* e *E. maxima*. No entanto, a permeabilidade gastrointestinal forneceu um quadro de grande mudança dinâmica do vazamento intestinal, principalmente, nos desafios médio-alto e alto. No geral, as lesões intestinais e a permeabilidade gastrointestinal nos animais com desafio alto não diferiu significativamente do desafio médio-alto sugerindo o efeito de aglomeração. Portanto, para ensaios nutricionais os desafios médio-baixo e médio-alto seriam mais adequados porque demonstraram relação entre a dose de desafio e parâmetros gastrointestinais sem complicações como o efeito de aglomeração.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Alexandre Luis Tessmann and Edilson Nedir Gastmann (lab technician at Embrapa Suínos e Aves) for the support in experiments. The authors thank Embrapa Suínos e Aves for providing the facilities and crew for the in vivo experiments.

## DECLARATION OF CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

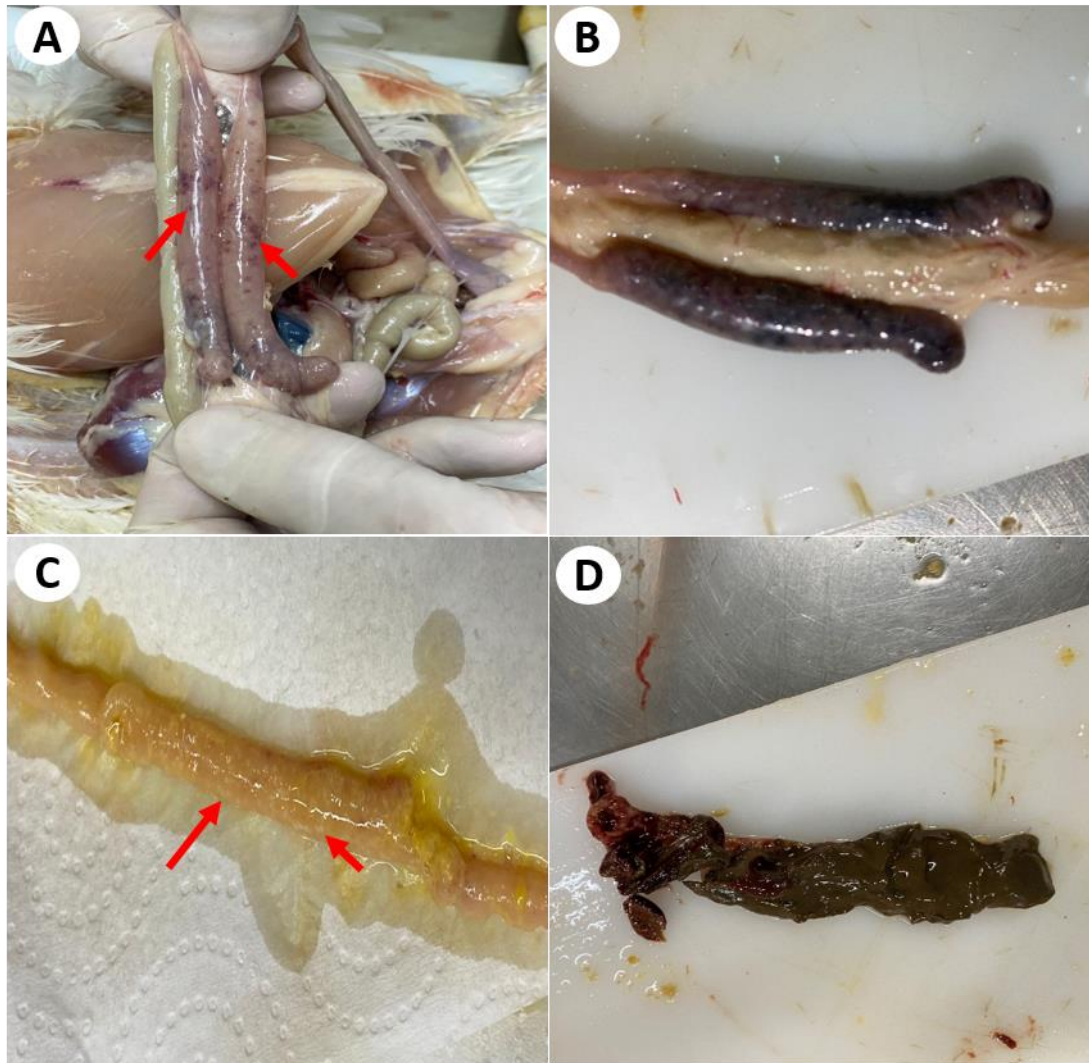
All authors contributed equally for the conception and writing of the manuscript. All authors critically revised the manuscript and approved of the final version.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, C., VAHL, H. A. & VELDMAN, A. (1996). Interaction between nutrition and *Eimeria acervulina* infection in broiler chickens: Development of an experimental infection model. *British Journal of Nutrition*, 75, 867-873.
- ADEDOKUN, S. A. & ADEOLA, O. (2017). The response in jejunal and ileal nutrient and energy digestibility and the expression of markers of intestinal inflammation in broiler chickens to coccidial vaccine challenge and phytase supplementation. *Canadian Journal of Animal Science*, 97, 258-267.
- ALLEN, P. C. & FETTERER, R. H. (2002a). Effects of dietary vitamin E on chickens infected with *Eimeria maxima*: Observations over time of primary infection. *Avian Diseases*, 46, 839-846.
- ALLEN, P. C. & FETTERER, R. H. (2002b). Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 58-+.
- ASSIS, R. C. L., LUNS, F. D., BELETTI, M. E., ASSIS, R. L., NASSER, N. M., FARIA, E. S. M. & CURY, M. C. (2010). Histomorphometry and macroscopic intestinal lesions in broilers infected with *Eimeria acervulina*. *Veterinary Parasitology*, 168, 185-189.
- AUGUSTINE, P. C. (2001). Cell: sporozoite interactions and invasion by apicomplexan parasites of the genus *Eimeria*. *International Journal for Parasitology*, 31, 1-8.
- BARON, L. F., FONSECA, F. N. D., MACIAG, S. S., BELLAVER, F. A. V., IBELI, A. M. G., MORES, M. A. Z., ALMEIDA, G. F. D., GUTERRES, S. S., BASTOS, A. P. A. & PAESE, K. (2022). Toltrazuril-Loaded Polymeric Nanocapsules as a Promising Approach for the Preventive Control of Coccidiosis in Poultry. *Pharmaceutics*, 14.
- BAXTER, M. F. A., MERINO-GUZMAN, R., LATORRE, J. D., MAHAFFEY, B. D., YANG, Y. C., TEAGUE, K. D., GRAHAM, L. E., WOLFENDEN, A. D., HERNANDEZ-VELASCO, X., BIELKE, L. R., HARGIS, B. M. & TELLEZ, G. (2017). Optimizing Fluorescein Isothiocyanate

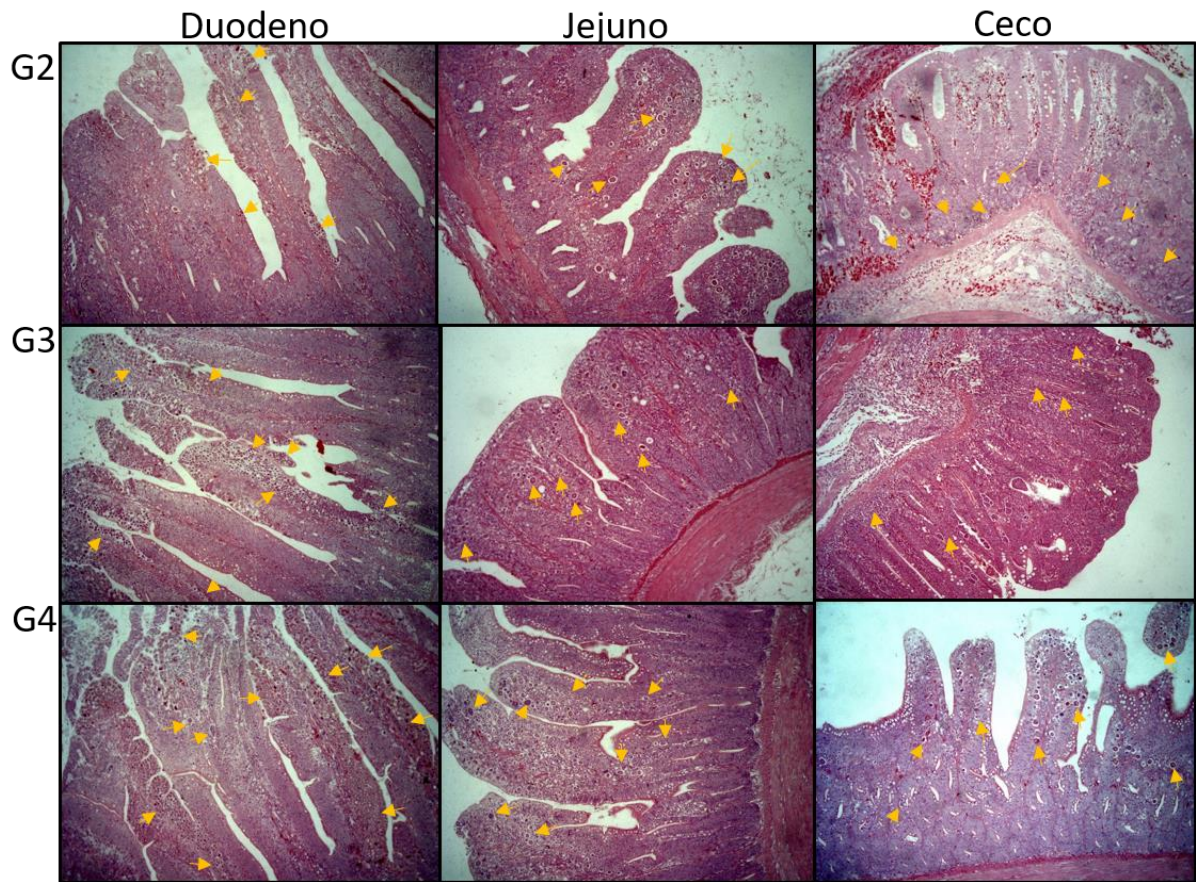
- Dextran Measurement As a Biomarker in a 24-h Feed Restriction Model to Induce Gut Permeability in Broiler Chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, 4.
- BEDRNIK, P. & JURKOVIC, P. (1977). Comparison of 2 Different Antigens of Eimeria-Tenella for Indirect Immunofluorescent Test (Ifat). *Journal of Protozoology*, 24, A48-A49.
- BEDRNIK, P. & JURKOVIC, P. (1979). An antigen from Eimeria tenella merozoites for the indirect fluorescence antibody test. *Folia Parasitol (Praha)*, 26, 169-172.
- BORTOLUZZI, C., PARAS, K. L., APPLGATE, T. J. & VEROCAI, G. G. (2018). Comparison between McMaster and Mini-FLOTAC methods for the enumeration of Eimeria maxima oocysts in poultry excreta. *Veterinary Parasitology*, 254, 21-25.
- CHAPMAN, H. D. (2014). Milestones in avian coccidiosis research: A review. *Poultry Science*, 93, 501-511.
- COLLIER, C. T., HOFACRE, C. L., PAYNE, A. M., ANDERSON, D. B., KAISER, P., MACKIE, R. I. & GASKINS, H. R. (2008). Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting Clostridium perfringens growth. *Vet Immunol Immunopathol*, 122, 104-115.
- CONWAY, D. P., MCKENZIE, M. E. & DAYTON, A. D. (1990). Relationship of Coccidial Lesion Scores and Weight-Gain in Infections of Eimeria-Acervulina, E-Maxima and E-Tenella in Broilers. *Avian Pathology*, 19, 489-496.
- CONWAY, D. P., SASAI, K., GAAFAR, S. M. & SMOTHERS, C. D. (1993). Effects of Different Levels of Oocyst Inocula of Eimeria Acervulina, E-Tenella, and E-Maxima on Plasma Constituents, Packed Cell-Volume, Lesion Scores, and Performance in Chickens. *Avian Diseases*, 37, 118-123.
- GOODWIN, M. A., BROWN, J. & BOUNOUS, D. I. (1998). Use of microscopic lesion scores, gross lesion scores and oocyst count scores to detect Eimeria maxima in chickens. *Avian Pathol*, 27, 405-408.
- HAUG, A., GJEVRE, A. G., SKJERVE, E. & KALDHUSDAL, M. (2008). A survey of the economic impact of subclinical Eimeria infections in broiler chickens in Norway. *Avian Pathology*, 37, 333-341.
- HAUG, A., WILLIAMS, R. B. & LARSEN, S. (2006). Counting coccidial oocysts in chicken faeces: A comparative study of a standard McMaster technique and a new rapid method. *Veterinary Parasitology*, 136, 233-242.
- HERNANDEZ-VELASCO, X., CHAPMAN, H. D., OWENS, C. M., KUTTAPPAN, V. A., FUENTE-MARTINEZ, B., MENCONI, A., LATORRE, J. D., KALLAPURA, G., BIELKE, L. R., RATHINAM, T., HARGIS, B. M. & TELLEZ, G. (2014). Absorption and deposition of xanthophylls in broilers challenged with three dosages of Eimeria acervulina oocysts. *British Poultry Science*, 55, 167-173.
- JENKINS, M., ALLEN, P., WILKINS, G., KLOPP, S. & MISKA, K. (2008). Eimeria praecox infection ameliorates effects of Eimeria maxima infection in chickens. *Veterinary Parasitology*, 155, 10-14.
- JENKINS, M. C., DUBEY, J. P., MISKA, K. & FETTERER, R. (2017). Differences in fecundity of Eimeria maxima strains exhibiting different levels of pathogenicity in its avian host. *Veterinary Parasitology*, 236, 1-6.
- JOHNSON, J. & REID, W. M. (1970). Anticoccidial Drugs - Lesion Scoring Techniques in Battery and Floor-Pen Experiments with Chickens. *Experimental Parasitology*, 28, 30-+.
- MADLALA, T., OKPEKU, M. & ADELEKE, M. A. (2021). Understanding the interactions between Eimeria infection and gut microbiota, towards the control of chicken coccidiosis: a review. *Parasite*, 28.
- MULLER, J. & HEMPHILL, A. (2013). In vitro culture systems for the study of apicomplexan parasites in farm animals. *International Journal for Parasitology*, 43, 115-124.
- PARKER, J., OVIEDO-RONDON, E. O., CLACK, B. A., CLEMENTE-HERNANDEZ, S., OSBORNE, J., REMUS, J. C., KETTUNEN, H., MAKIVUOKKO, H. & PIERSON, E. M. (2007). Enzymes as feed additive to aid in responses against Eimeria species in coccidia-

- vaccinated broilers fed corn-soybean meal diets with different protein levels. *Poultry Science*, 86, 643-653.
- PRICE, K. R. (2012). Use of live vaccines for coccidiosis control in replacement layer pullets. *Journal of Applied Poultry Research*, 21, 679-692.
- ROCHELL, S. J., PARSONS, C. M. & DILGER, R. N. (2016). Effects of *Eimeria acervulina* infection severity on growth performance, apparent ileal amino acid digestibility, and plasma concentrations of amino acids, carotenoids, and alpha 1-acid glycoprotein in broilers. *Poultry Science*, 95, 1573-1581.
- RUANGPANIT, Y., MATSUSHITA, K., MUKAI, K. & KIKUSATO, M. (2020). Effect of trehalose supplementation on growth performance and intestinal morphology in broiler chickens. *Veterinary and Animal Science*, 10.
- SHIVARAMAIAH, C., BARTA, J. R., HERNANDEZ-VELASCO, X., TELLEZ, G. & HARGIS, B. M. (2014). Coccidiosis: recent advancements in the immunobiology of *Eimeria* species, preventive measures, and the importance of vaccination as a control tool against these Apicomplexan parasites. *Vet Med (Auckl)*, 5, 23-34.
- TENG, P. Y., CHOI, J., TOMPKINS, Y., LILLEHOJ, H. & KIM, W. (2021a). Impacts of increasing challenge with *Eimeria maxima* on the growth performance and gene expression of biomarkers associated with intestinal integrity and nutrient transporters. *Veterinary Research*, 52, 81.
- TENG, P. Y., CHOI, J., YADAV, S., TOMPKINS, Y. H. & KIM, W. K. (2021b). Effects of low-crude protein diets supplemented with arginine, glutamine, threonine, and methionine on regulating nutrient absorption, intestinal health, and growth performance of *Eimeria*-infected chickens. *Poult Sci*, 100, 101427.
- TENG, P. Y., YADAV, S., CASTRO, F. L. S., TOMPKINS, Y. H., FULLER, A. L. & KIM, W. K. (2020). Graded *Eimeria* challenge linearly regulated growth performance, dynamic change of gastrointestinal permeability, apparent ileal digestibility, intestinal morphology, and tight junctions of broiler chickens. *Poult Sci*, 99, 4203-4216.
- TEWARI, A. K. & MAHARANA, B. R. (2011). Control of poultry coccidiosis: changing trends. *J Parasit Dis*, 35, 10-17.
- VRBA, V., BLAKE, D. P. & POPLSTEIN, M. (2010). Quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of all seven *Eimeria* species that infect the chicken. *Veterinary Parasitology*, 174, 183-190.
- WALK, C. L., COWIESON, A. J., REMUS, J. C., NOVAK, C. L. & MCELROY, A. P. (2011). Effects of dietary enzymes on performance and intestinal goblet cell number of broilers exposed to a live coccidia oocyst vaccine. *Poultry Science*, 90, 91-98.
- WILLIAMS, R. B. (1973). Effects of different infection rates on the oocyst production of *Eimeria acervulina* or *Eimeria tenella* in the chicken. *Parasitology*, 67, 279-288.
- WILLIAMS, R. B. (2001). Quantification of the crowding effect during infections with the seven *Eimeria* species of the domesticated fowl: its importance for experimental designs and the production of oocyst stocks. *International Journal for Parasitology*, 31, 1056-1069.
- YUN, C. H., LILLEHOJ, H. S. & LILLEHOJ, E. P. (2000). Intestinal immune responses to coccidiosis. *Developmental and Comparative Immunology*, 24, 303-324.



**Figura 1-** Avaliação macroscópica do duodeno e ceco em frango de corte (5 dpi), macho, 21 dias. Frango de corte desafiado experimentalmente com a dose de desafio alta, 125.000 oocisto de *E. acervulina*, 80.000 oocisto de *E. maxima* e 25.000 oocisto de *E. tenella*. A: duodeno apresentando petéquias (setas) associada a *Eimeria acervulina*. B: Ceco, tiflíte necro-hemorrágica difusa acentuada associada *Eimeria tenella*, cecos apresentando lesões hemorrágicas (petéquias); C: duodenite catarral associada a *Eimeria acervulina*, com lesões esbranquiçadas (setas); D: ceco, tiflíte necro-hemorrágica difusa acentuada associada a *Eimeria tenella*, ceco apresentando coágulo e petéquias em sua mucosa





**Figura 2-** Análise morfológica do duodeno, jejuno e ceco sob diversas condições de difentes quantidade de oocistos de *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella* na morfologia intestinal de frangos de corte (5 dpi). As setas indicam gametócito ou oocistos. G2 (Médio-baixo desafio), G3 (Médio-Alto desafio), G4 (Alto desafio): intestino apresentando contaminação grave por *Eimeria* spp. G2, G3 e G4: intestino apresentando descamação do revestimento intestinal e necrose das células e diferentes estágios de desenvolvimento de *Eimeria* spp. Os oocistos de *Eimeria* estão dentro dos enterócitos da coluna epitélio. O ceco apresentando grande presença de hemáceas. Ampliação, 100×.

**Tabela 1.** Dose de desafio de *Eimeria* spp. para cada grupo (Teng et al., 2020).

<b>Tratamentos</b>	<b><i>E. acervulina</i></b> <b>(n° oocistos)</b>	<b><i>E. maxima</i></b> <b>(n° oocistos)</b>	<b><i>E. tenella</i></b> <b>(n° oocistos)</b>
<b>Sem desafio (G1)</b>	0	0	0
<b>Médio-baixo desafio (G2)</b>	31.250	20.000	6.250
<b>Médio-Alto desafio (G3)</b>	62.500	40.000	12.500
<b>Alto desafio (G4)</b>	125.000	80.000	25.000

**Tabela 2.** Escore de lesão para lesões típicas de *Eimeria* spp.

<b>Escore de lesão</b>	<b>Achados macroscópicos observados</b>
<b>0</b>	Sem lesão
<b>1</b>	Parede do intestino delgado grosseiramente mais fina, rasga facilmente sob tensão leve, mas não tem evidência grosseira de necrose da mucosa ou outras anormalidades
<b>2</b>	Um ou mais focos necróticos de áreas de aproximadamente 1 a 5 mm de espessura total da mucosa
<b>3</b>	Necrose maior que 5 mm e consistindo de detritos necróticos laranja/marrom
<b>4</b>	Grandes áreas necróticas confluentes de espessura total da mucosa no intestino delgado afetando 25% ou mais do intestino delgado



**Tabela 3.** Número de oocistos por grama de fezes de *Eimeria* spp. para cada tratamento, antes do desafio e 1, 3 e 5 dias pós-desafio (dpi) realizado pela técnica de contagem em câmara de Mc Master.

			<i>Ovos. grama<sup>-1</sup></i>	Estatus qPCR	Quantidade media na qPCR
<b>Controle</b>	<b>negativo (G1)</b>	<b>Antes do desafio</b>	0	não detectável	0
		<b>1 dpi</b>	0	não detectável	0
		<b>3 dpi</b>	0	não detectável	0
		<b>5 dpi</b>	0	não detectável	0
<b>Médio-baixo</b>	<b>desafio (G2)</b>	<b>Antes do desafio</b>	0	não detectável	0
		<b>1 dpi</b>	2,0 x 10 <sup>3</sup>	detectável	3167,545
		<b>3 dpi</b>	2,9 x 10 <sup>4</sup>	detectável	25.569,347
		<b>5 dpi</b>	5,7 x 10 <sup>5</sup>	detectável	250.501,568
<b>Médio-alto</b>	<b>desafio (G3)</b>	<b>Antes do desafio</b>	0	não detectável	0
		<b>1 dpi</b>	3,0 x 10 <sup>3</sup>	detectável	8.665,856
		<b>3 dpi</b>	3,6 x 10 <sup>4</sup>	detectável	31.751,037
		<b>5 dpi</b>	7,4 x 10 <sup>5</sup>	detectável	250.059,875
<b>Alto</b>	<b>desafio (G4)</b>	<b>Antes do desafio</b>	0	não detectável	0
		<b>1 dpi</b>	9,6 x 10 <sup>4</sup>	detectável	41.723,154
		<b>3 dpi</b>	6,7 x 10 <sup>3</sup>	detectável	8.375,960
		<b>5 dpi</b>	3,4 x 10 <sup>6</sup>	detectável	417.284,204

**Tabela 4.** Escores das lesões macroscópicas e microscópicas intestinais em frangos de corte (5 dpi), experimentalmente infectados por *Eimeria* spp. (G1: controle negativo, G2: médio-baixo desafio, G3: médio-Alto desafio, G4: alto desafio)

Grupos	Sem desafio (G1)	Médio-baixo desafio (G2)	Médio-Alto desafio (G3)	Alto desafio (G4)	Pr> $\chi^2$
<b>Score Macroscópico</b>					
<b>Duodeno</b>	0±0 <sup>a</sup>	3,37±0,52 <sup>b</sup>	3,25±0,71 <sup>b</sup>	3,13±0,64 <sup>b</sup>	0,0017
<b>Jejuno</b>	0±0 <sup>a</sup>	1,00±0,75 <sup>b</sup>	1,25±0,25 <sup>b</sup>	1,37±0,38 <sup>b</sup>	0,0091
<b>Ceco</b>	0±0 <sup>a</sup>	2,00±0,93 <sup>b</sup>	3,12±0,99 <sup>b,c</sup>	3,63±0,52 <sup>c</sup>	0,0372
<b>Score Microscópico</b>					
<b>Duodeno</b>	0±0 <sup>a</sup>	6,13±2,85 <sup>b</sup>	7,38±0,52 <sup>b</sup>	7,00±1,19 <sup>b</sup>	0,0032
<b>Jejuno</b>	0±0 <sup>a</sup>	6,87±2,80 <sup>b</sup>	8,00±0,00 <sup>b</sup>	6,75±1,40 <sup>b</sup>	0,0020
<b>Ceco</b>	0±0 <sup>a</sup>	3,75±2,24 <sup>b</sup>	5,12±2,47 <sup>b</sup>	6,25±1,16 <sup>b</sup>	0,0082

A análise foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis e os dados são apresentados como Média ± SEM.

<sup>a, b, c, d</sup> Diferentes letras sobscritas indicam a diferença estatística significativa entre os grupos ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabela 5.** Valores médio (desvio padrão) da morfometria intestinal (em microns) de frangos de corte intectados experimentalmente com *E. maxima*, *E. acervulina* e *E. tenella* e necropsiados aos 21 dias de idade (5dpi) (G1: controle negative, G2: médio-baixo desafio, G3: médio-Alto desafio, G4: alto desafio) na morfologia intestinal de frangos de corte (5 DPI).

Variáveis	GRUPOS			
	G1	G2	G3	G4
<b>Duodeno</b>				
AV, $\mu\text{m}$	852 $\pm$ 88,64 <sup>a</sup>	586,5 $\pm$ 178,07 <sup>b</sup>	576,9 $\pm$ 214,64 <sup>b</sup>	636,6 $\pm$ 207,68 <sup>b</sup>
PC, $\mu\text{m}$	145,4 $\pm$ 8,52	168,2 $\pm$ 21,36	173,2 $\pm$ 67,72	157,5 $\pm$ 20,20
EM, $\mu\text{m}$	124,3 $\pm$ 30,68 <sup>a</sup>	211,2 $\pm$ 43,73 <sup>b</sup>	252,2 $\pm$ 66,30 <sup>b</sup>	274,5 $\pm$ 65,71 <sup>b</sup>
V/C	5,8 $\pm$ 0,69 <sup>a</sup>	3,5 $\pm$ 0,88 <sup>b</sup>	3,5 $\pm$ 1,36 <sup>b</sup>	4,1 $\pm$ 1,36 <sup>b</sup>
CC	126,8 $\pm$ 26,66 <sup>a</sup>	56,29 $\pm$ 8,48 <sup>b</sup>	34,13 $\pm$ 9,48 <sup>c</sup>	34,89 $\pm$ 8,95 <sup>c</sup>
<b>Jejuno</b>				
AV, $\mu\text{m}$	739,7 $\pm$ 39,78 <sup>a</sup>	389,9 $\pm$ 164,42 <sup>b</sup>	440,1 $\pm$ 124,42 <sup>b</sup>	429,4 $\pm$ 140,44 <sup>b</sup>
PC, $\mu\text{m}$	124,1 $\pm$ 11,49 <sup>a</sup>	163,4 $\pm$ 36,43 <sup>b</sup>	152,7 $\pm$ 49,42 <sup>b</sup>	146,1 $\pm$ 22,82 <sup>a,b</sup>
EM, $\mu\text{m}$	110,1 $\pm$ 10,33 <sup>a</sup>	227,8 $\pm$ 89,52 <sup>b</sup>	198,3 $\pm$ 40,52 <sup>b</sup>	235,2 $\pm$ 21,31 <sup>b</sup>
V/C	6,0 $\pm$ 0,65 <sup>a</sup>	2,3 $\pm$ 0,64 <sup>b</sup>	2,9 $\pm$ 1,00 <sup>b</sup>	3,1 $\pm$ 1,43 <sup>b</sup>
CC	135,87 $\pm$ 22,00 <sup>a</sup>	45,94 $\pm$ 12,00 <sup>b</sup>	31,05 $\pm$ 7,50 <sup>b</sup>	30,2 $\pm$ 4,30 <sup>b</sup>
<b>Ceco</b>				
AV, $\mu\text{m}$	583,5 $\pm$ 52,58 <sup>a</sup>	256,5 $\pm$ 125,70 <sup>b</sup>	183,0 $\pm$ 42,78 <sup>b</sup>	182,0 $\pm$ 43,39 <sup>b</sup>
PC, $\mu\text{m}$	109,8 $\pm$ 9,33 <sup>a</sup>	145,4 $\pm$ 23,04 <sup>b</sup>	137,8 $\pm$ 17,88 <sup>b</sup>	136,0 $\pm$ 20,62 <sup>b</sup>
EM, $\mu\text{m}$	101,8 $\pm$ 18,81	131,3 $\pm$ 46,95	122,2 $\pm$ 23,04	102,2 $\pm$ 19,99
V/C	5,3 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>	1,7 $\pm$ 0,70 <sup>b</sup>	1,3 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup>	1,3 $\pm$ 0,32 <sup>b</sup>
CC	124,5 $\pm$ 13,86 <sup>a</sup>	10,3 $\pm$ 3,50 <sup>b</sup>	6,5 $\pm$ 2,76 <sup>c</sup>	7,0 $\pm$ 2,86 <sup>b,c</sup>

AV: altura da vilosidade; PC: profundidade da cripta; EV: espessura da vilosidade; EM: espessura da mucosa; V/C: relação altura de vilosidade/profundidade de cripta; CC: células caliciformes

A análise foi realizada com os testes de Kruskal-Wallis.

<sup>a, b, c, d</sup> Diferentes letras sobrescritas indicam a diferença estatística significativa entre ( $P \leq 0,05$ ).