

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Medicina Veterinária - Campus de Araçatuba

BRUNA MATARUCCO SAMPAIO BERETTA

**INFECÇÃO POR *EIMERIA* SPP. EM NÚCLEOS COMERCIAIS DE FRANGOS DE
CORTE NA REGIÃO OESTE DO ESTADO DE SANTA CATARINA:
PREVALÊNCIA, IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CORRELAÇÃO COM A
PROFILAXIA ANTICOCCIDIANA**

Araçatuba

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Medicina Veterinária - Campus de Araçatuba

BRUNA MATARUCCO SAMPAIO BERETTA

INFECÇÃO POR *EIMERIA* SPP. EM NÚCLEOS COMERCIAIS DE FRANGOS DE CORTE NA REGIÃO OESTE DO ESTADO DE SANTA CATARINA: PREVALÊNCIA, IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CORRELAÇÃO COM A PROFILAXIA ANTICOCCIDIANA

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal

Araçatuba

2024

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Daniela Sanches Moreira

CRB 8/9077

Beretta, Bruna Matarucco Sampaio.

B492i Infecção por *Eimeria* spp. em núcleos comerciais de frangos de corte na região oeste do estado de Santa Catarina: prevalência, identificação molecular e correlação com a profilaxia anticoccidiana / Bruna Matarucco Sampaio Beretta. -- Araçatuba, 2024.

47 f.

Tese de doutorado (em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2024.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles.

1. Avicultura - Santa Catarina. 2. Doenças intestinais. 3. Coccidiose. 4. Frango de corte. 5. *Eimeria* spp. I. Autor. II. Título.

CDD: 619

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE BRUNA MATARUCCO SAMPAIO BERETTA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL, DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA - CÂMPUS DE ARAÇATUBA.

Aos 04 dias do mês de julho do ano de 2024, às 08:30 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de BRUNA MATARUCCO SAMPAIO BERETTA, intitulada **INFECÇÃO POR *EIMERIA* SPP. EM NÚCLEOS COMERCIAIS DE FRANGOS DE CORTE NA REGIÃO OESTE DO ESTADO DE SANTA CATARINA: PREVALÊNCIA, IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CORRELAÇÃO COM A PROFILAXIA ANTICOCCIDIANA**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Associado MARCELO VASCONCELOS MEIRELES (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP, Pesquisadora GIANE SERAFIM DA SILVA (Participação Virtual) do(a) Instituto Biológico, Laboratório de Parasitologia Animal / Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Profa. Adjunta VALÉRIA DE SÁ JAYME (Participação Virtual) do(a) Departamento de Medicina Veterinária / Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia/UFG. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.


Prof. Associado MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

CONFERE COM O ORIGINAL
Seção Técnica de Pós-Graduação

05 JUL 2024


LUCILA MAKO KAVANO
Supervisora Técnica de Seção

Dedico este trabalho ao meu marido Leonardo e minha filha Ana Lis, pela compreensão e auxílio para a consolidação deste sonho. Sempre entendi que não existe um bom profissional sem o interesse pelos estudos e pesquisas. Foram incontáveis os dias de dedicação para a elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do Coordenador da Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, o professor Dr. Paulo Sergio Patto dos Santos, e da vice coordenadora, a Professora Dra. Flávia de Almeida Lucas.

Ao professor Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles, que nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para o meu crescimento científico e intelectual, pela atenção e apoio durante todo o processo de definição e orientação deste trabalho, bem como pela paciência nos momentos em que me faltavam tempo e forças; ele foi meu esteio e meu exemplo de profissional que quero seguir.

Agradeço as empresas que me permitiram realizar as coletas e em especial minha amiga e colega de profissão Paula Minussi.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Só fazemos melhor aquilo que repetidamente insistimos em melhorar. A busca da excelência não deve ser um objetivo, e sim um hábito.”
(ARISTÓTELES).

RESUMO

A coccidiose é uma das enfermidades de maior importância econômica para a indústria avícola. Dez espécies de *Eimeria* infectam a galinha doméstica: *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria lata*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria nagambie*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria praecox*, *Eimeria tenella* e *Eimeria zaria*. Há poucos estudos relacionados à epidemiologia da eimeriose em aves de produção industrial no Brasil. O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência da infecção por *Eimeria* spp., realizar a identificação molecular das espécies de *Eimeria* e determinar a correlação da prevalência da infecção com os anticoccidianos administrados em núcleos comerciais de frangos de corte (NCFC) na região oeste do estado de Santa Catarina. Noventa e seis amostras fecais correspondentes a 96 núcleos comerciais de frangos de corte foram examinadas por exame microscópico e PCR gênero-específica. As amostras positivas foram examinadas por sequenciamento de nova geração para identificação das espécies de *Eimeria*. Em NCFC tratados com salinomicina ou nicarbazina, a positividade para *Eimeria* spp. foi de 100% (62/62) e 41,2% (14/34), respectivamente. Foi observada prevalência de *Eimeria* spp. de 79,2% (76/96). O sequenciamento de nova geração identificou *E. acervulina* 70/76 (92,1%), *E. maxima* 61/76 (80,3%), *E. mitis*/*E. mivati* 13/76 (17,1%) e *E. praecox* 33/76 (43,4%). Todas as amostras foram negativas para *E. brunetti*, *E. lata*, *E. nagambie*, *E. necatrix*, *E. tenella* e *E. zaria*. Os NCFCs tratados com nicarbazina apresentaram menor positividade para *Eimeria* spp.

Palavras-chave: Avicultura - Santa Catarina; Doenças intestinais; Coccidiose; Frango de corte; *Eimeria* spp.

ABSTRACT

Coccidiosis is one of the most economically important diseases for the poultry industry. Ten species of *Eimeria* infect domestic chickens: *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria lata*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria nagambie*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria praecox*, *Eimeria tenella*, and *Eimeria zaria*. Few studies are related to the epidemiology of eimeriosis in chickens from commercial production systems in Brazil. This study aimed to determine the prevalence of infection by *Eimeria* spp., perform the molecular identification of *Eimeria* species, and correlate *Eimeria* spp. infection with the anticoccidial prophylaxis in commercial broiler chicken farms from the western region of the state of Santa Catarina. Ninety-six fecal samples corresponding to 96 commercial broiler flocks were examined by microscopy and genus-specific PCR. Next-generation sequencing was performed in samples positive for *Eimeria* spp. aiming at the identification of *Eimeria* species. *Eimeria* spp. was identified in 76/96 (79.2%). Next-generation sequencing identified *E. acervulina* 70/76 (92,1%), *E. maxima* 61/76 (80,3%), *E. mitis/E. mivati* 13/76 (17,1%), and *E. praecox* 33/76 (43,4%). All samples were negative for *E. brunetti*, *E. lata*, *E. nagambie*, *E. necatrix*, *E. tenella*, and *E. zaria*. In flocks treated with salinomycin or nicarbazin, positivity for *Eimeria* spp. was 100% (62/62) and 41.2% (14/34), respectively. There was lower positivity for *Eimeria* spp. on CBCFs employing treatment with nicarbazin.

Keywords: Poultry production- Santa Catarina; Intestinal diseases; Coccidiosis; Broiler; *Eimeria* spp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Municípios da região oeste do estado de Santa Catarina, Brasil, onde foram coletadas amostras de fezes de frango em granjas comerciais de frangos de corte	22
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolos de diagnóstico molecular usados para detecção e identificação de <i>Eimeria</i> spp.....	26
Tabela 2 - Detecção de <i>Eimeria</i> spp. por microscopia ou PCR gênero-específico em granjas comerciais de frangos de corte que empregam tratamento com salinomicina ou nicarbazina	29
Tabela 3 - Identificação de <i>Eimeria</i> spp. em granjas comerciais de frangos de corte usando a nested PCR visando o gene 18S rRNA e sequenciamento de nova geração	30
Tabela 4 - Identificação de infecções únicas ou múltiplas por <i>Eimeria</i> spp. em granjas comerciais de frangos de corte.....	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Importância da Avicultura na Região Oeste de Santa Catarina	13
1.2	Introdução à coccidiose avícola	15
1.3	Objetivos	17
2	CAPÍTULO 1 - INFECÇÃO POR <i>EIMERIA</i> SPP. EM NÚCLEOS COMERCIAIS DE FRANGOS DE CORTE NA REGIÃO OESTE DO ESTADO DE SANTA CATARINA: PREVALÊNCIA, IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CORRELAÇÃO COM A PROFILAXIA ANTICOCCIDIANA.....	18
2.1	Resumo.....	18
2.2	Abstract	18
2.3	Introdução.....	19
2.4	Material e métodos	21
2.4.1	Locais de colheita das amostras	21
2.4.2	Cálculo do número de amostras	22
2.4.3	Processamento das amostras	24
2.4.4	Exame microscópico - Quantificação.....	24
2.4.5	PCR gênero-específica	24
2.4.6	Eletroforese dos fragmentos amplificados por PCR	25
2.4.7	Nested PCR e sequenciamento genético de nova geração para detecção de <i>Eimeria</i> spp.	25
2.4.8	Colheita de dados referentes à administração de anticoccidianos.....	28
2.5	Análise estatística	28
2.6	Resultados	28
2.7	Discussão.....	31
3	CONCLUSÃO.....	35
3.1	Referências	36
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	40
	ANEXO A – Normas da Revista Brasileira de Ciência Avícola (2022).....	43

1 INTRODUÇÃO¹

A avicultura é uma atividade econômica importante no Brasil, e a região oeste de Santa Catarina é conhecida por sua produção significativa de frangos de corte. No entanto, a infecção por *Eimeria* spp., protozoários causadores da coccidiose, é uma preocupação constante nesse setor. A coccidiose pode causar perdas econômicas significativas devido à redução da produção e ao aumento dos custos com tratamento e controle.

Os avanços na biologia, imunobiologia, diagnóstico e controle de infecções por *Eimeria* spp. têm sido significativos (Allen; Fetterer, 2002). A identificação molecular desses parasitos tornou-se uma ferramenta importante para compreender a diversidade genética e a epidemiologia da coccidiose em aves (Carvalho et al., 2011). Além disso, a aplicação de técnicas moleculares pode facilitar a detecção e a identificação precisa das espécies de *Eimeria* presentes nos sistemas avícolas (Hauck et al., 2019).

A correlação entre a infecção por *Eimeria* spp. e a eficácia da profilaxia anticoccidiana é um aspecto crucial a ser investigado. O uso de anticoccidianos químicos e vacinas para controlar a coccidiose é comum na indústria avícola (Chapman, 1999). No entanto, o desenvolvimento de resistência aos anticoccidianos e a necessidade de alternativas sustentáveis têm impulsionado a pesquisa em novas estratégias de controle, como probióticos, fitoterápicos e vacinas vivas atenuadas (Quiroz-Castañeda; Dantán-González, 2015).

Estudos anteriores destacaram a diversidade genética de *Eimeria* spp. em diferentes regiões geográficas e sistemas de produção avícola (Clark et al., 2016). A presença de genótipos específicos de *Eimeria* pode influenciar a eficácia das medidas de controle e a resposta imune das aves hospedeiras (Blake et al., 2015).

Portanto, este estudo pretende contribuir para o entendimento da epidemiologia da coccidiose em núcleos comerciais de frangos de corte na região oeste de Santa Catarina, fornecendo informações importantes para o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes e sustentáveis. Ao investigar a prevalência da infecção, realizar a identificação molecular dos parasitos e avaliar a eficácia da profilaxia anticoccidiana, espera-se fornecer subsídios para a implementação de medidas de manejo e controle mais direcionadas e eficientes, visando a redução do impacto econômico e sanitário da coccidiose na avicultura brasileira.

A identificação das lacunas de conhecimento e das questões não resolvidas na literatura sobre a coccidiose em sistemas avícolas comerciais é fundamental para orientar futuras

¹ De acordo com a norma ABNT NBR 6023 (2018).

pesquisas e melhorar a compreensão e o manejo dessa doença. De acordo com Abreu e Abreu (2011), o controle eficaz da coccidiose é essencial para a produção avícola, pois essa doença parasitária pode causar significativas perdas econômicas. No entanto, apesar dos avanços recentes na biologia e imunobiologia das espécies de *Eimeria* e no diagnóstico e controle da infecção, ainda existem lacunas no entendimento completo desses parasitos e em suas interações com o hospedeiro (Allen; Fetterer, 2002).

Um dos desafios atuais é a diversidade genética das espécies de *Eimeria* que infectam as aves, com variações genéticas interespecies e intraespecies (Blake et al., 2017). Isso pode influenciar na eficácia das medidas de controle, incluindo o desenvolvimento de vacinas (Blake, 2015). Além disso, a presença de genótipos crípticos de *Eimeria* em diferentes regiões geográficas pode complicar ainda mais o controle da coccidiose (Clark, 2016). Portanto, são necessários estudos adicionais para entender melhor a diversidade genética desses parasitos e seu impacto nas estratégias de controle.

Outro aspecto importante é a identificação precisa das espécies de *Eimeria* presentes em diferentes regiões e sistemas avícolas. Estudos moleculares, como a amplificação de sequências de DNA, têm se mostrado eficazes para identificar e caracterizar esses parasitos (Hauck et al., 2019). No entanto, ainda existem desafios na padronização e na aplicação dessas técnicas em larga escala, especialmente em contextos comerciais (Carvalho et al., 2011). Além disso, a prevalência e a distribuição das espécies de *Eimeria* podem variar em diferentes condições ambientais e sistemas de produção (Balestrin et al., 2021). Assim, são necessários mais estudos epidemiológicos para mapear a ocorrência desses parasitos em diferentes contextos e identificar fatores de risco associados à infecção.

1.1 Importância da Avicultura na Região Oeste de Santa Catarina

A avicultura desempenha um papel fundamental na região oeste de Santa Catarina, destacando-se não apenas por sua importância econômica, mas também por seu significativo impacto na produção nacional de carne de frango. A avicultura é uma atividade consolidada nessa região, representando uma fonte significativa de renda e emprego para os habitantes locais, e contribui para a economia regional e para o sustento de muitas famílias (Abreu e Abreu, 2011).

A relevância econômica da avicultura na região oeste de Santa Catarina é inegável, uma vez que essa atividade gera uma série de oportunidades de negócio ao longo de toda a cadeia produtiva. Conforme Balestrin et al. (2021), a presença de estabelecimentos avícolas na região

demonstra o seu potencial como polo de produção de carne de frango. Isso destaca a importância estratégica da avicultura para a economia local, contribuindo não apenas para a geração de empregos diretos e indiretos, mas também para o desenvolvimento de outras atividades relacionadas.

Além disso, a avicultura na região oeste de Santa Catarina desempenha um papel crucial na produção nacional de carne de frango. De acordo com Aragão e Contini (2021), o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de carne de frango e a região oeste de Santa Catarina desempenha um papel significativo nesse contexto, com destaque para a contribuição dessa região para a posição do Brasil no mercado global de aves, evidenciando a sua importância para o setor avícola nacional. A importância da avicultura na região oeste de Santa Catarina vai além do aspecto econômico, pois também desempenha um papel crucial na segurança alimentar e na oferta de proteína de qualidade para a população brasileira. Conforme destacado por Oliveira (2017), a carne de frango é uma fonte importante de proteína animal, sendo acessível a diferentes grupos socioeconômicos. Isso ressalta o impacto positivo da avicultura na nutrição e no bem-estar da população, especialmente em um país com uma demanda crescente por alimentos de origem animal.

Também é importante mencionar que a avicultura está em constante evolução, buscando cada vez mais a adoção de práticas sustentáveis e o uso responsável dos recursos naturais. A ambiência nos sistemas avícolas tem sido identificada como um dos desafios enfrentados pela indústria avícola no Brasil (Abreu; Abreu, 2011). Condições ambientais inadequadas, como temperatura e umidade elevadas, podem contribuir para o aumento da carga parasitária e a disseminação da infecção por *Eimeria* spp. Portanto, é essencial compreender a relação entre as condições ambientais e a prevalência da infecção.

1.2 Introdução à coccidiose avícola

A coccidiose avícola é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Eimeria*, que afeta principalmente aves domésticas, como frangos de corte e poedeiras. Essa enfermidade é considerada uma das principais preocupações na avicultura devido ao seu impacto econômico e na produção de aves (Allen; Fetterer, 2002). A coccidiose em galinhas domésticas é causada por sete espécies de *Eimeria*: *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria necatrix*, *E. praecox* e *Eimeria tenella*. Três novas espécies foram propostas recentemente propostas: *Eimeria lata*, *Eimeria nagambie* e *Eimeria zaria* (Blake et al., 2021).

Eimeria spp. têm um ciclo de vida complexo que envolve a reprodução assexuada e sexuada dentro do trato digestivo das aves hospedeiras (Blake; Tomley, 2014). Durante o ciclo de vida, os oocistos esporulados são eliminados nas fezes das aves infectadas, contaminando o ambiente e propagando a infecção (Allen; Fetterer, 2002).

A prevalência da coccidiose em galinhas domésticas é significativa em todo o mundo e é um dos principais desafios enfrentados pelos produtores avícolas (Balestrin et al., 2021). A doença causa uma série de problemas de saúde nas aves, incluindo danos à mucosa intestinal, redução da absorção de nutrientes, diarreia, perda de peso e letalidade (Blake et al., 2021). Além disso, a infecção por *Eimeria* pode comprometer o desempenho produtivo das aves, resultando em perdas econômicas significativas devido à redução na taxa de crescimento, na conversão alimentar e na qualidade da carne (Blake et al., 2020).

O controle da coccidiose representa um desafio constante para os produtores avícolas devido à resistência aos agentes anticoccidianos convencionais e à necessidade de estratégias de manejo integrado (Quiroz-Castañeda; Dantán-González, 2015). O uso excessivo e inadequado de medicamentos anticoccidianos tem sido associado ao desenvolvimento de resistência e à seleção de cepas mais virulentas de *Eimeria*, aumentando a complexidade do controle da doença (Peek; Landman, 2011). Além disso, as vacinas vivas atenuadas têm sido amplamente utilizadas para controlar a coccidiose, mas sua eficácia pode ser afetada por fatores ambientais e genéticos, exigindo estratégias de vacinação mais eficazes (McDonald; Shirley, 2009).

Além dos desafios associados ao controle da coccidiose, a variabilidade genética e a capacidade de adaptação das diferentes espécies de *Eimeria* também representam uma preocupação significativa. Estudos recentes têm demonstrado diversidade genética entre as populações de *Eimeria*, com a presença de genótipos únicos em diferentes regiões geográficas

e sistemas de produção avícola (Clark et al., 2016). Essa diversidade genética pode influenciar na resposta imune das aves, na eficácia das vacinas e nas estratégias de controle da doença, destacando a importância da vigilância contínua e do desenvolvimento de abordagens de controle adaptáveis às diferentes cepas e condições ambientais (Blake et al., 2015). Portanto, a compreensão da diversidade genética e da epidemiologia molecular de *Eimeria* é essencial para o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes e sustentáveis para a coccidiose.

Com o avanço da tecnologia molecular, novas abordagens diagnósticas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento genômico, têm sido empregadas no diagnóstico da coccidiose em aves (Hauck et al., 2019). A PCR permite a detecção específica de DNA de *Eimeria* nas fezes das aves, proporcionando maior sensibilidade e capacidade de identificação de diferentes espécies do parasito (Vrba et al., 2010). Além disso, o sequenciamento genômico tem sido utilizado para caracterizar geneticamente as populações de *Eimeria*, permitindo uma compreensão mais abrangente da diversidade genética e epidemiologia molecular do parasito (Blake et al., 2021).

Essas técnicas avançadas oferecem vantagens significativas em relação aos métodos tradicionais de diagnóstico, permitindo uma identificação mais precisa das espécies de *Eimeria* presentes e uma avaliação mais abrangente da carga parasitária nas populações avícolas (Haug et al., 2007). Além disso, a aplicação de métodos moleculares pode contribuir para a detecção precoce de infecções e o monitoramento da eficácia das medidas de controle adotadas nas granjas avícolas (Vrba et al., 2011).

No entanto, é importante destacar que a implementação dessas técnicas avançadas de diagnóstico requer infraestrutura laboratorial adequada, conhecimento técnico especializado e custos operacionais mais elevados em comparação com os métodos tradicionais (Fatoba; Adeleke, 2018). A escolha da abordagem diagnóstica mais apropriada deve levar em consideração não apenas a sensibilidade e especificidade do método, mas também a viabilidade econômica e logística para sua aplicação em diferentes contextos de produção avícola (McDonald; Shirley, 2009).

A aplicação de técnicas avançadas de diagnóstico, como a PCR e o sequenciamento genômico, desempenha um papel crucial na compreensão da epidemiologia da coccidiose em aves. Essas abordagens permitem uma caracterização mais detalhada das populações de *Eimeria* presentes nas granjas avícolas, incluindo a identificação de espécies específicas e a análise da diversidade genética do parasita (Blake et al., 2021). Ao fornecer informações mais precisas sobre a distribuição geográfica, a variabilidade genética e os padrões de transmissão da coccidiose, essas técnicas contribuem para o desenvolvimento de estratégias de controle

mais eficazes e direcionadas, visando reduzir o impacto econômico e sanitário da doença na indústria avícola (Haug et al., 2008).

A pesquisa relacionada à infecção por *Eimeria* spp. em frangos de corte tem sido objeto de estudo em várias regiões geográficas, abordando uma ampla gama de tópicos, desde estudos de prevalência até identificação molecular, fatores de risco e estratégias de controle. Estudos como o de Haug et al. (2008) têm explorado a prevalência da coccidiose em diferentes regiões, enquanto outros, como o de Blake et al. (2021), têm se concentrado na diversidade genética do parasito e sua relevância para o desenvolvimento de vacinas. A compreensão desses aspectos é fundamental para implementar medidas eficazes de controle da doença, especialmente considerando o impacto significativo que a coccidiose pode ter na produção avícola, como destacado por Balestrin et al. (2021) e Blake et al. (2020).

Além disso, a aplicação de técnicas avançadas de diagnóstico molecular, como PCR e sequenciamento genômico, tem permitido uma caracterização mais detalhada das populações de *Eimeria*, como mencionado por Haug et al. (2007) e Vrba et al. (2010). Essas abordagens não apenas facilitam a identificação precisa das espécies presentes, mas também ajudam a entender melhor a epidemiologia da doença e a monitorar a eficácia das estratégias de controle.

A pesquisa sobre infecção por *Eimeria* spp. em frangos de corte é essencial não apenas para mitigar o impacto econômico da coccidiose na indústria avícola, como evidenciado por Williams (1999), mas também para garantir a segurança alimentar e o bem-estar animal. Esses estudos fornecem uma base sólida para o desenvolvimento de medidas de controle mais eficazes e sustentáveis, alinhadas com as condições específicas de cada região geográfica e sistema de produção, como destacado por Chapman (2014) e Blake et al. (2021).

1.3 Objetivos

O presente estudo teve como objetivo investigar a prevalência da infecção por *Eimeria* spp. em núcleos comerciais de frangos de corte na região oeste do estado de Santa Catarina, bem como realizar a identificação molecular desses parasitos e investigar a correlação entre a infecção e a profilaxia anticoccidiana.

2 CAPÍTULO 1 - INFECÇÃO POR *EIMERIA* SPP. EM NÚCLEOS COMERCIAIS DE FRANGOS DE CORTE NA REGIÃO OESTE DO ESTADO DE SANTA CATARINA: PREVALÊNCIA, IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CORRELAÇÃO COM A PROFILAXIA ANTICOCIDIANA²

O texto que segue faz parte de um artigo destinado à publicação no periódico *Revista Brasileira Agrícola*. O manuscrito foi elaborado em conformidade com as diretrizes editoriais e normas de submissão estabelecidas pelo referido periódico, assegurando a padronização necessária para atender aos critérios de avaliação e publicação científica adotados pela revista.

2.1 Resumo

A coccidiose é uma das enfermidades de maior importância econômica para a indústria avícola. Dez espécies de *Eimeria* infectam a galinha doméstica: *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria lata*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria nagambie*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria praecox*, *Eimeria tenella* e *Eimeria zaria*. Há poucos estudos relacionados à epidemiologia da eimeriose em aves de produção industrial no Brasil. O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência da infecção por *Eimeria* spp., realizar a identificação molecular das espécies de *Eimeria* e determinar a correlação da prevalência da infecção com os anticoccidianos administrados em núcleos comerciais de frangos de corte (NCFC) na região oeste do estado de Santa Catarina. Noventa e seis amostras fecais correspondentes a 96 núcleos comerciais de frangos de corte foram examinadas por exame microscópico e PCR gênero-específica. As amostras positivas foram examinadas por sequenciamento de nova geração para identificação das espécies de *Eimeria*. Em NCFC tratados com salinomocina ou nicarbazina, a positividade para *Eimeria* spp. foi de 100% (62/62) e 41,2% (14/34), respectivamente. Foi observada prevalência de *Eimeria* spp. de 79,2% (76/96). O sequenciamento de nova geração identificou *E. acervulina* 70/76 (92,1%), *E. maxima* 61/76 (80,3%), *E. mitis/E. mivati* 13/76 (17,1%) e *E. praecox* 33/76 (43,4%). Todas as amostras foram negativas para *E. brunetti*, *E. lata*, *E. nagambie*, *E. necatrix*, *E. tenella* e *E. zaria*. Os NCFCs tratados com nicarbazina apresentaram menor positividade para *Eimeria* spp.

Palavras-chave: Avicultura; Doenças intestinais; Coccidiose; Frangos de corte.

2.2 Abstract

Coccidiosis is one of the most economically important diseases for the poultry industry. Ten species of *Eimeria* infect domestic chickens: *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria lata*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria nagambie*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria praecox*, *Eimeria tenella*, and *Eimeria zaria*. Few studies are related to the epidemiology of eimeriosis in chickens from commercial production systems in Brazil. This study aimed to determine the prevalence of infection by *Eimeria* spp., perform the molecular identification of *Eimeria* species, and correlate *Eimeria* spp. infection with the anticoccidial prophylaxis in commercial broiler chicken farms from the western region of the state of Santa Catarina. Ninety-six fecal

² De acordo com a norma do periódico *Revista Brasileira de Ciência Avícola* (2022).

samples corresponding to 96 commercial broiler flocks were examined by microscopy and genus-specific PCR. Next-generation sequencing was performed in samples positive for *Eimeria* spp. aiming at the identification of *Eimeria* species. *Eimeria* spp. was identified in 76/96 79.2%. Next-generation sequencing identified *E. acervulina* 70/76 (92,1%), *E. maxima* 61/76 (80,3%), *E. mitis/E. mivati* 13/76 (17,1%), and *E. praecox* 33/76 (43,4%). All samples were negative for *E. brunetti*, *E. lata*, *E. nagambie*, *E. necatrix*, *E. tenella*, and *E. zaria*. In flocks treated with salinomycin or nicarbazin, positivity for *Eimeria* spp. was 100% (62/62) and 41.2% (14/34), respectively. There was lower positivity for *Eimeria* spp. on CBCFs employing treatment with nicarbazin.

Keywords: Poultry production; Intestinal diseases; Coccidiosis; Broilers.

2.3 Introdução

A coccidiose, denominação usada para a doença causada por protozoários do gênero *Eimeria* na galinha doméstica, é uma das enfermidades de maior importância econômica para a indústria avícola, com prejuízo global anual estimado em mais de 3 bilhões de dólares (Williams, 1999; Dalloul & Lillehoj, 2006). Em um trabalho recente, ao analisar dados referentes ao Brasil, Egito, Estados Unidos, Guatemala, Índia, Nigéria, Nova Zelândia e Estados Unidos, Blake *et al.* (2020) estimaram um prejuízo global anual de 10,4 bilhões de libras esterlinas, considerando os valores de 2016.

O gênero *Eimeria* pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiorida, subordem Eimeriorina, família Eimeriidae. Dez espécies foram relatadas, sendo, sete espécies de *Eimeria* infectam a galinha doméstica: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. mitis*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella* (Vrba *et al.*, 2010; 2011). A classificação de três novas espécies, *E. lata*, *E. nagambie* e *E. zaria*, foi sugerida por Blake *et al.* (2021a).

As infecções por *Eimeria* spp. resultam em encurtamento das vilosidades e diminuição de absorção de nutrientes, particularmente pelas espécies que infectam as regiões proximal e média do intestino (*E. acervulina*, *E. praecox*, *E. mitis*, *E. maxima* e *E. necatrix*), devido à lise de enterócitos, aumento da permeabilidade intestinal, perda de fluidos e eletrólitos e aumento da susceptibilidade a outras doenças. Além da interferência em parâmetros produtivos, a infecção por espécies de alta patogenicidade, como *E. brunetti*, *E. necatrix* e *E. tenella*, podem resultar em lesões graves na mucosa intestinal, com ocorrência de hemorragia e alta mortalidade (Lillehoj & Lillehoj, 2000; Allen & Fetterer, 2002).

No Brasil, as vacinas contra a eimeriose são utilizadas principalmente em aves de vida longa, particularmente em aves reprodutoras (bisavós, avós e matrizes). Apesar de os anticoccidianos ainda serem predominantes na profilaxia da coccidiose em frangos de corte, há

uma pressão crescente de países importadores em relação a resíduos de medicamentos em carcaças. Além disso, observa-se a crescente demanda da sociedade por produtos livres de qualquer produto químico, o que eventualmente pode resultar em banimento do uso de anticoccidianos em aves destinadas à exportação e ao consumo interno e na substituição do uso de anticoccidianos pela vacinação (Blake *et al.*, 2021b).

A resposta imune induzida por infecções por *Eimeria* spp. é espécie-específica, o que significa que não há proteção cruzada após um desafio com uma espécie heteróloga (McDonald & Shirley, 2009). Portanto, para prevenir a eimeriose por meio de vacinação, é fundamental conhecer as espécies de *Eimeria* presentes nas diferentes regiões e tipos de criação.

A primeira descrição de variantes genéticas (pX e pY) de *Eimeria* foi feita na Austrália por Morris *et al.* (2007), em frangos de corte previamente vacinados contra a coccidiose, usando a eletroforese capilar de amplicons obtidos por PCR (gene ITS2). Em estudos posteriores, três variantes genéticas, denominadas como unidades taxonômicas operacionais (OTUs) x, y e z (Cantacessi *et al.*, 2008), foram detectadas em diversos países, principalmente no hemisfério sul (Fornace *et al.*, 2013; Godwin & Morgan, 2015; Clark *et al.*, 2016; Jatau *et al.*, 2016).

Clark *et al.* (2016) descreveram a primeira identificação de variantes genéticas na América do Sul (OTUs x e z), na Venezuela, e identificaram as três OTUs na Índia, Zâmbia, Uganda, Tanzânia e Gana. Após a descrição na Venezuela, a identificação das OTUs x, y e z no continente americano foi realizada nos Estados Unidos, por meio de PCR e sequenciamento de nova geração, em aves comerciais, representando a primeira identificação das OTUs no hemisfério norte (Hauck *et al.*, 2019); posteriormente, as três OTUs foram detectadas em aves em criações semi-intensivas nos Estados Unidos (Terra *et al.*, 2021).

Blake *et al.* (2021a), após realizar infecção experimental com diferentes isolados das OTUs x, y e z e analisar o tropismo tecidual, a patogenicidade, os dados morfológicos e morfométricos dos oocistos e realizar a análise filogenética das três OTUs, sugeriram a classificação de três novas espécies correspondentes às OTUs x, y e z como, respectivamente, *E. lata*, *E. nagambie* e *E. zaria*.

A aparente rápida disseminação de *E. lata*, *E. nagambie* e *E. zaria* e a falta de informações referentes à sua patogenia e epidemiologia suscitaram preocupações em relação à prevalência e importância epidemiológica dessas novas espécies, inclusive sobre a efetividade das atuais medidas de controle contra a coccidiose, particularmente sobre a efetividade dos esquemas de vacinação contra a eimeriose (Venkatas & Adeleke, 2019), pois as vacinas disponíveis contra a eimeriose aviária não contêm oocistos de *E. lata*, *E. nagambie* e *E. zaria*,

que têm a capacidade de infectar aves previamente vacinadas contra a eimeriose (Morris *et al.*, 2007; Godwin & Morgan, 2015; Jatau *et al.*, 2016; Blake *et al.*, 2021a).

A infecção por *Eimeria* spp. apresenta alta prevalência em criações industriais de aves e é pouco provável que um lote de aves de criações intensivas não apresente infecção por pelo menos uma espécie (Williams, 1999). McDougald *et al.* (1987) encontraram oocistos de *Eimeria* spp. em 98,9% dos lotes examinados no Brasil e Argentina e Moraes *et al.* (2015) relataram prevalência de *Eimeria* spp. em 96% (241/251) das criações de frangos de corte examinadas na região sul do estado de Santa Catarina.

Meireles *et al.* (2004) utilizaram a reação em cadeia pela polimerase espécie-específica para detectar *E. mitis* e *E. praecox* em amostras de frangos de corte no Distrito Federal e nos estados de Goiás, Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, obtendo positividade de 40,5% (45/111) e 81,4% (70/86) para *E. mitis* e *E. praecox*, respectivamente.

É evidente a necessidade de pesquisar a prevalência das diferentes espécies de *Eimeria* e de suas variantes genéticas em território nacional para determinar sua importância econômica e para a saúde das aves, assim como definir a possível ineficácia de vacinas nas quais essas variantes genéticas não estão incluídas. Da mesma forma, é fundamental obter informações atualizadas sobre a prevalência das diferentes espécies de *Eimeria* em criações industriais e alternativas.

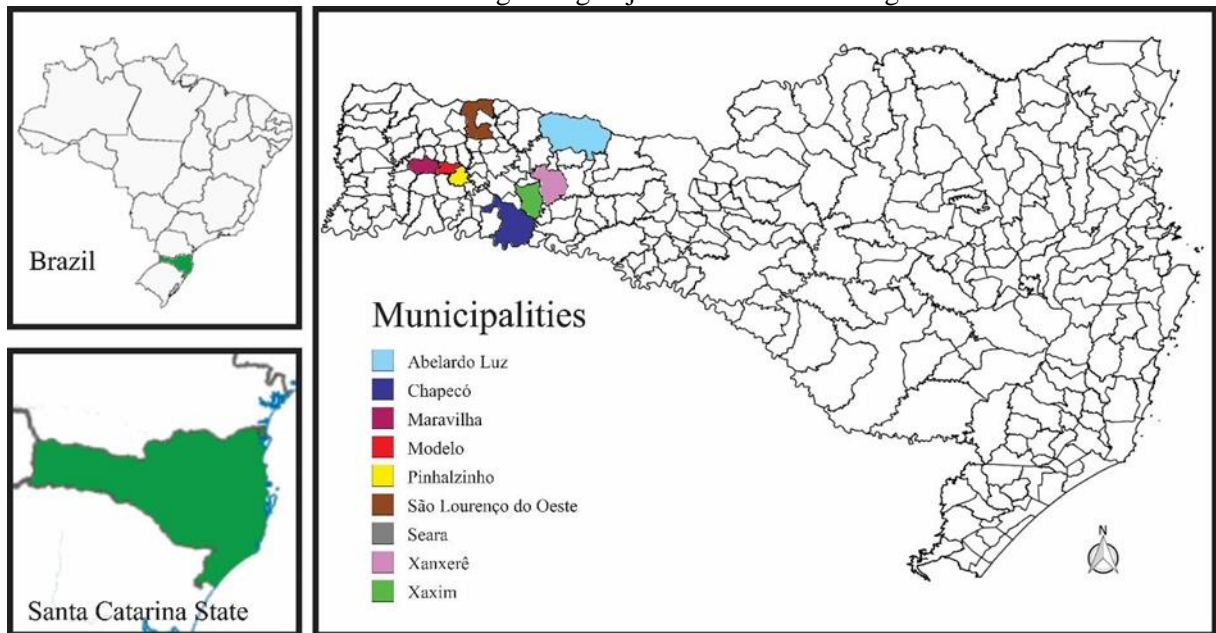
2.4 Material e métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, processo FOA 0778-2021.

2.4.1 Locais de colheita das amostras

As amostras de fezes foram colhidas em núcleos comerciais de frangos de corte (NCFC), que correspondem a uma unidade física de produção avícola composta por um ou mais galpões que alojam aves da mesma espécie e idade (Brasil, 2017), localizados em oito municípios da região oeste do estado de Santa Catarina (Figura 1).

Figura 1 - Municípios da região oeste do estado de Santa Catarina, Brasil, onde foram coletadas amostras de fezes de frango em granjas comerciais de frangos de corte



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Todos os lotes pesquisados foram referentes a frangos de corte de criações industriais, alojados em galpões com dimensões variadas, em sua maioria do tipo convencional, com piso de alvenaria e média de 30.000 aves alojadas, não vacinados contra a coccidiose. A cama utilizada nos galpões é composta em sua maioria por maravalha; na maioria dos lotes, a cama é reaproveitada entre os lotes, por três a oito vezes, após fermentação em lona. O alojamento de novos lotes ocorre após um período de vazio sanitário de 15 dias, em média, após a limpeza e desinfecção dos galpões com produtos desinfetantes.

2.4.2 Cálculo do número de amostras

Foi realizado o cálculo para determinação do número de NCFC a serem pesquisados, de galpões por NCFC e de amostras por galpão.

Apesar de a infecção por *Eimeria* spp. estar presente na quase totalidade dos lotes de criação intensiva de frangos de corte (Moraes *et al.*, 2015), como não há dados sobre a prevalência de *E. lata*, *E. nagambie* e *E. zaria* e somente informações parciais e desatualizadas sobre a prevalência de cada uma das outras espécies de *Eimeria* nas regiões a serem pesquisadas, a taxa de prevalência de *Eimeria* spp. estimadas foi de 50%. Os outros critérios utilizados foram o número de 4.857 NCFC registrados na Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina, na região oeste do estado de Santa Catarina

(Cidasc, 2021), margem de erro de 10% e nível de confiança de 95% (Sergeant, 2018). Dessa forma foi definido o número mínimo de 96 NCFC.

Os municípios nos quais a colheita de amostras foi realizada são: Abelardo Luz, Chapecó, Modelo, Pinhalzinho, São Lourenço do Oeste, Xanxerê, Xaxim e Seara.

A maioria dos NCFC na região oeste de Santa Catarina contém no máximo três galpões. Como a distância entre os galpões em cada NCFC é de aproximadamente 10-15 m e as aves alojadas nos diferentes galpões têm a mesma idade e procedência e são submetidas às mesmas técnicas de manejo nutricional e sanitário, muito provavelmente as espécies presentes em todos os galpões de cada NCFC são as mesmas; por esse motivo, a colheita foi realizada em somente um galpão por NCFC.

Após a definição do número mínimo de NCFC e de galpões por NCFC, foi realizado o cálculo para determinação do número de amostras a serem colhidas em cada galpão para detectar a presença das diferentes espécies. Para realizar esse cálculo, é necessário informar a taxa de prevalência esperada no galpão, a taxa de sensibilidade do teste a ser utilizado e o nível de confiança. Não foram encontradas publicações relacionadas à taxa de prevalência de *Eimeria* spp. intragalpão de frangos de corte. Mesmo considerando que o pico da eliminação de oocistos no galpão ocorre entre 21 e 35 dias de idade, período em que as amostras deste trabalho foram colhidas, e que provavelmente 100% das aves foram infectadas em algum momento da criação, não é possível determinar com precisão a taxa de prevalência intragalpão de cada espécie ou OTU de *Eimeria* nessa faixa etária. Por esse motivo e com o objetivo de aumentar a confiabilidade da amostragem, foi utilizada a taxa de prevalência estimada de 10%, mesmo que muito provavelmente essa taxa seja superior a esse valor (Snyder *et al.*, 2021).

As amostras foram colhidas em 2020 e 2021 percorrendo todo o galpão em um trajeto em forma de W e preservadas em solução de bicromato de potássio 2,5% a 4° C, por um período de aproximadamente um a dois meses após a colheita, e foram constituídas por cinco *pools*, cada um constituído por amostras de fezes recém-eliminadas por 10 aves de 21 a 35 dias de idade (Snyder *et al.*, 2021), totalizando 480 *pools* e 4.800 amostras fecais de aves em 96 NCFC em Santa Catarina.

Durante a coleta das amostras de fezes, os produtores foram questionados sobre os anticoccidianos que eram adicionados à ração.

2.4.3 Processamento das amostras

Os cinco *pools* de cada galpão foram processados separadamente. As amostras foram homogeneizadas com água deionizada/tween 20 0,1%, coadas em um tamis de metal com porosidade de 600 µm e centrifugadas a 2.000 g por 10 minutos, seguindo-se a purificação e concentração de oocistos por centrífugo-flutuação em solução de Sheather.

Os sedimentos resultantes da purificação de cada um dos cinco *pools* de cada galpão foram reunidos em um único *pool* do qual foram retiradas duas alíquotas: uma de 150 mg, que foi congelada a -20° C, para extração de DNA genômico; e a outra, armazenada em bicromato de potássio 2,5% a 4° C, para exame microscópico.

Dessa forma, a purificação e concentração de oocistos resultou em uma amostra por NCFC, totalizando 96 amostras, cada uma correspondendo a um NCFC.

2.4.4 Exame microscópico - Quantificação

Os sedimentos resultantes da purificação foram submetidos à pesquisa de oocistos de *Eimeria* spp. por exame microscópico. A quantificação da eliminação de oocistos foi realizada utilizando um método semiquantitativo, descrito a seguir: 0+ (negativo); 1+ (1 a 20 oocistos por lâmina; 2+: 21 a 50 oocistos por lâmina; 3+: mais de 1 oocisto por campo em objetiva de 20 X; 4+: mais de 10 oocistos por campo em objetiva de 20 X.

2.4.5 PCR gênero-específica

Todas as amostras negativas pelo exame microscópico foram submetidas à PCR gênero-específica para *Eimeria* spp. O DNA genômico foi extraído de todas as amostras a partir de 150 mg do sedimento resultante da purificação das amostras colhidas em cada NCFC, usando o GenElute® Stool DNA Isolation Kit (Sigma Aldrich), de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras de DNA foram armazenadas a -20° C.

A pesquisa de *Eimeria* spp. foi realizada por PCR gênero-específica usando os *primers* EF1 e ER1 descritos por Lew et al. (2003) (Tabela 1) e o Jumpstart® Taq ReadyMix (Sigma Aldrich), no termociclador SimpliAmp® (Thermo Fisher Scientific), nas seguintes condições: desnaturação inicial do DNA a 94° C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos, cada uma consistindo em desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 55° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 1 minuto, com um ciclo de extensão final a 72° por 7 minutos. Como controle positivo,

foi usado o DNA genômico extraído de oocistos de *Eimeria* provenientes da vacina comercial Bio-Coccivet R (Biorad). Água ultrapura foi usada como controle negativo.

2.4.6 Eletroforese dos fragmentos amplificados por PCR

Os fragmentos amplificados pela PCR gênero-específica foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% adicionado com o fluoróforo GelRed® (Biotium).

2.4.7 Nested PCR e sequenciamento genético de nova geração para detecção de *Eimeria* spp.

As amostras positivas para *Eimeria* spp. pela microscopia ou PCR gênero-específica foram submetidas à *nested* PCR usando *primers* gênero-específicos, para amplificação de um fragmento parcial do gene da subunidade 18S do rRNA (18S rRNA), seguida de sequenciamento genético de nova geração (Hauck et al., 2019) (Tabela 1).

Tabela 1 - Protocolos de diagnóstico molecular usados para detecção e identificação de *Eimeria* spp.

Protocol	Primer	Primer sequence	Amplicon size (bp)	<i>Eimeria</i> species	Target gene	References
PCR	EF1	AAGTTGCGTAAATAGAGCCCTC	317-585	<i>Eimeria</i> spp.	ITS-1	Lew et al. (2003)
	ER1	AGACATCCATTGCTGAAAG				
Nested PCR/NGS	18S-F-out	CGGGTAACGGGGAATTAGGG	538	<i>Eimeria</i> spp.	18S rRNA	Hauck et al. (2019)
	18S-R-out	TACGAATGCCCCCAACTGTC				
	18S-F-in*	<u>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGA</u> <u>CAGATTGGAGGGCAAGTCTGGTG</u>	260			
	18S-R-in*	<u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAG</u> <u>ACAGTGCTGCAGTATTCAGGGCRA</u>				

*Sequences of the Illumina adapters are underlined.

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A região amplificada, de ± 260 pb, contém uma região polimórfica, correspondente à região V4 do gene 18S rRNA, que permite a diferenciação entre as dez espécies de *Eimeria* da galinha doméstica e as eventuais novas OTUs.

Os *primers* da *nested PCR* foram adicionados com adaptadores na extremidade 5', compatíveis com o MiSeq® Reagent (Illumina). O protocolo de PCR foi realizado usando o Jumpstart® Taq ReadyMix (Sigma Aldrich), no termociclador SimpliAmp® (Thermo Fisher Scientific). As condições da reação foram padronizadas utilizando como controle positivo o DNA genômico extraído de oocistos provenientes da vacina comercial Bio-Coccivet R (Biorad), nas seguintes condições: preparação de 25 μ L de solução contendo 2,5 μ L do Jumpstart® Taq ReadyMix (Sigma Aldrich), 400 nM (PCR) ou 800 nM (*nested PCR*) de cada *primer* e 2,5 μ L (PCR) ou 1 μ L (*nested PCR*) de DNA alvo. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial por 2 min a 94° C seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 s, anelamento a 60° C por 30 s e extensão a 72° C por 30 s, seguindo-se um ciclo final a 72° C por 7 min, no termociclador SimpliAmp® (Thermo Fisher Scientific). Água ultrapura foi usada como controle negativo.

Os amplicons da *nested PCR* foram visualizados por eletroforese em gel de agarose, purificados com o ProNex® Size-Selective Purification System (Promega) e quantificados com o fluorímetro digital Qubit® (Thermo Fisher Scientific).

As amostras foram processadas de acordo com o protocolo Illumina 16S metagenomic (Illumina, 2013), com paired-end reads de 150 bp e usando o MiSeq® Reagent kit v2 (Illumina). Para o preparo das bibliotecas foi usado 1 μ l do amplicon da *nested PCR*, independentemente do resultado da quantificação. O protocolo da reação está descrito a seguir: preparo de 50 μ l de solução contendo 5 μ l do Nextera XT® index *primer* 1 (N7xx) (Illumina), 5 μ l do Nextera XT® index *primer* 2 (S5xx) (Illumina), 25 μ l do Kapa® Hot Start High Fidelity Ready Mix (Kapa Biosystems) e 14 μ l de água ultrapura. O protocolo da reação consistiu em desnaturação inicial a 95° C por 3 minutos seguida de 8 ciclos de desnaturação a 95° C por 30 segundos, anelamento a 55° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos, com um ciclo final de extensão a 72° C por 5 minutos.

As bibliotecas foram purificadas com o ProNex® Size-Selective Purification System (Promega), quantificadas com o fluorímetro digital Qubit® (Thermo Fisher Scientific) e normalizadas para a concentração final de DNA de 6 pM. A concentração do controle Phix foi de 15%. As amostras foram sequenciadas no Laboratório de Epigenômica da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, UNESP, no sequenciador MiSeq® (Illumina).

As amostras foram sequenciadas no Laboratório de Epigenômica da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, UNESP, no sequenciador MiSeq® (Illumina). As sequências foram analisadas com auxílio do MetaAmp Version 3.0 (<https://ebg.ucalgary.ca/metaamp/index.otu.html>). Para a remoção de chimeras foi usado o algoritmo chimera.uchime (The Galaxy Community). Uma determinada espécie/OTU foi considerada como presente na amostra quando: 1) suas sequências corresponderam a mais de 0,1% do total das sequências; 2) suas sequências se agruparam em um mesmo cluster; 3) sua sequência consenso apresentou similaridade genética a partir de 97% com as sequências de referência. As sequências representativas de cada espécie/OTU foram comparadas com sequências de *Eimeria* spp. usando o Basic Local Alignment Search Tool (Blast) para determinar a similaridade das sequências geradas neste trabalho com as sequências publicadas no *GenBank*.

2.4.8 Colheita de dados referentes à administração de anticoccidianos

Durante a coleta das amostras de fezes, foi questionado informações sobre os NCFC, incluindo os anticoccidianos que eram adicionados à ração.

2.5 Análise estatística

Os dados foram tabulados e analisados para determinação da prevalência de *Eimeria* spp. considerando o intervalo de confiança de 95% (Sergeant, 2018). O teste de Fisher e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foram utilizados para a análise estatística da correlação entre os anticoccidianos administrados e a positividade para *Eimeria* spp. e os escores de oocistos fecais, respectivamente. Os dados foram tabulados e processados utilizando o programa Jamovi (The Jamovi Project, 2021).

2.6 Resultados

Pelo exame microscópico, foi observada positividade para *Eimeria* spp. de 70,8% (68/96; IC: 61,1-79). A PCR gênero-específica realizada nas amostras negativas resultou em 31% (9/28; IC: 17,9-50,7) de positividade. Considerando os resultados do exame microscópico e da PCR, a prevalência de *Eimeria* spp. foi de 80,2% (77/96; IC:71,1-87) (Tabela 2). A PCR foi realizada em todas as amostras, incluindo as positivas e negativas na microscopia.

Tabela 2 - Detecção de *Eimeria* spp. por microscopia ou PCR gênero-específico em granjas comerciais de frangos de corte que empregam tratamento com salinomomicina ou nicarbazina

Municipality	Anticoccidial drug	Microscopy No. positive/No. sampled* (% positive)	Score of oocysts shedding** (No. samples)	Genera-specific PCR No. positive/No. sampled (% positive)	Total positive by microscopy and PCR No. positive/No. sampled (% positive)
Abelardo Luz	Salinomycin	7/7 (100)	1+ (2); 2+ (4); 3+ (1)	-	7/7 (100)
	Nicarbazin	8/8 (100)	1+ (8)	-	8/8 (100)
Chapecó	Salinomycin	18/18 (100)	1+ (2); 3+ (16)	-	18/18 (100)
Modelo	Nicarbazin	0/7 (0)	0+ (7)	2/7 (28.6)	2/7 (28.6)
Pinhalzinho	Nicarbazin	1/10 (10)	0+ (9); 1+ (1)	2/9 (25)	3/10 (30)
São Lourenço do Oeste	Nicarbazin	0/9 (0)	0+ (9)	2/9 (22.2)	2/9 (22.2)
	Seara	Salinomycin	20/23 (87)	0+ (3); 1+ (8); 2+ (1); 3+ (8)	3/3 (100)
Xanxerê	Salinomycin	10/10 (100)	1+ (4); 3+ (6)	-	10/10 (100)
Xaxim	Salinomycin	4/4 (100)	1+ (2); 3+ (2)	-	4/4 (100)
Total	Salinomycin	59/62 (95.2)	0+ (3); 1+ (18); 2+ (5); 3+ (33)^a	3/3 (100)	62/62 (100%)^c
	Nicarbazin	9/34 (26.8)	0+ (25); 1+ (9)^b	6/25 (24)	15/34 (44.1)^d
	Salinomycin + Nicarbazin	68/96 (70.8)	0+ (28); 1+ (27); 2+ (5); 3+ (33)	9/28 (32.1)	77/96 (80.2)

*Each sample is composed of a pool of samples from a commercial broiler chicken farm.

** 0+ (negative); 1+: 1-20 oocysts per slide; 2+: 21-50 oocysts per slide; 3+: more than one oocyst in each 20X optical field.

Different letters in the same column indicate a statistically significant difference ($p < 0.001$) using the Kruskal-Wallis test ^(ab) and the Fisher's exact test ^(cd).

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

As taxas de positividade e o número de sequências obtidas pelo sequenciamento de nova geração por diferentes sistemas de produção estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 - Identificação de *Eimeria* spp. em granjas comerciais de frangos de corte usando a nested PCR visando o gene 18S rRNA e sequenciamento de nova geração

<i>Eimeria</i> species (No. positive/No. sampled; % positive)	Genetic similarity to sequences published in the GenBank database			
	<i>Eimeria</i> species (number of sequences amplified by NGS)	Accession numbers	Geographic origin	% similarity
<i>E. acervulina</i> (70/77; 90.9)	<i>E. acervulina</i> (145,901)	OR226405	Brazil	100
		FJ236372	United States	100
<i>E. maxima</i> (65/77; 84.4)	<i>E. maxima</i> (131,970)	OR226412	Brazil	100
		FJ236357	United States	100
<i>E. mitis</i> (17/77; 22.1)	<i>E. mitis</i> (3,069)	OR226409	Brazil	100
		FR775303	Czech Republic	99.55
<i>E. mivati</i> (17/77; 22.1)	<i>E. mivati</i> (8,129)	OR226406	Brazil	100
		FJ236375	United States	100
<i>E. praecox</i> (37/77; 48.1)	<i>E. praecox</i> (28,158)	OR226407	Brazil	100
		FJ236375	Canada	100

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Embora o gene 18S rRNA de *E. mivati* seja considerado como uma cópia distinta desse gene no genoma de *E. mitis* (Vrba *et al.*, 2011), as sequências deste estudo foram identificadas de acordo com a espécie registradas no *GenBank*. Em relação às sequências de *E. necatrix* e *E. tenella*, como não é possível diferenciá-las pela análise da sequência do amplicon da *nested* PCR, elas são apresentadas de forma conjunta. Nos NCFC de Santa Catarina foram identificadas as seguintes espécies, em ordem de prevalência: *E. acervulina* (70/77; 90,9%), *E. maxima* (65/77; 84,4%), *E. praecox* (37/77; 48,1%) e *E. mitis/mivati* (17/77; 17,22,1%). Todas as amostras foram negativas para *E. brunetti*, *E. lata*, *E. nagambie*, *E. necatrix/tenella* e *E. zaria*.

Os programas com o uso de anticoccidianos nos NCFC correspondiam à administração de salinomicina e de nicarbazina em 100% dos lotes de 1 a 35 dias de vida da ave, sendo que as primeiras coletas ocorreram no período do verão, quanto era administrada a salinomicina. Na segunda coleta, no inverno, havia o uso de nicarbazina. Essas drogas são utilizadas sem associação com outras drogas e são alternadas de acordo com as estações do ano, verão e inverno. Em NCFC tratados com salinomicina, a positividade para *Eimeria* spp. foi de 100% (62/62); naqueles tratados com nicarbazina, a positividade foi de 26,8% (9/34). Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre os lotes tratados com os dois anticoccidianos. Nos

NCFC nos quais a nicarbazina foi usada como anticoccidiano houve menor eliminação de oocistos, quando comparados àqueles com a utilização de salinomicina (Tabela 2).

Tabela 4 - Identificação de infecções únicas ou múltiplas por *Eimeria* spp. em granjas comerciais de frangos de corte

<i>Eimeria</i> species	No. broiler farms/No. sampled (% positive)
<i>E. acervulina</i>	6/77 (7.8)
<i>E. maxima</i>	3/77 (3.9)
<i>E. praecox</i>	1/77 (1.3)
<i>E. acervulina</i> + <i>E. maxima</i>	21/77 (27.3)
<i>E. acervulina</i> + <i>E. praecox</i>	5/77 (6.5)
<i>E. maxima</i> + <i>E. praecox</i>	3/77 (3.9)
<i>E. acervulina</i> + <i>E. maxima</i> + <i>E. mitis/mivati</i>	10/77 (12.9)
<i>E. acervulina</i> + <i>E. maxima</i> + <i>E. praecox</i>	21/77 (27.3)
<i>E. acervulina</i> + <i>E. maxima</i> + <i>E. mitis/mivati</i> + <i>E. praecox</i>	7/77 (9.1)
Total	77/77 (100%)

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

2.7 Discussão

Neste trabalho foi observada prevalência de *Eimeria* spp. 80,2% (77/96) em NCFC. Balestrin *et al.* (2021) identificaram prevalência de *Eimeria* spp. 90.6% (58/64) em frangos de corte do estado de Santa Catarina, ao examinar o conteúdo intestinal de frangos no abatedouro por PCR gênero-específica. Também no estado de Santa Catarina (Moraes *et al.*, 2015) encontraram prevalência de 96% (241/251) em NCFC.

Os outros critérios utilizados foram a taxa de sensibilidade do teste de diagnóstico de 70% e nível de confiança de 95%, de acordo com critérios preconizados para determinar o tamanho de amostras visando à detecção da presença de *Eimeria* spp. no galpão e considerando amostras colhidas como *pools* em uma população com um número grande de aves (Sergeant, 2018). A taxa de sensibilidade de 70% foi adotada com o objetivo de aumentar a confiabilidade da amostragem, independentemente do teste utilizado, ou seja, microscopia (item 2.4) e/ou PCR gênero-específica (item 2.6), mesmo que a PCR apresente taxa de sensibilidade superior a 70% (Fernandez *et al.*, 2003; Haug *et al.*, 2007; Vrba *et al.*, 2010).

Não é possível determinar o motivo da menor taxa de positividade encontrada neste trabalho em relação a outros realizados na mesma região pesquisada. No entanto, um dado que chamou a atenção em nossos resultados foi a menor prevalência de *Eimeria* spp. nos lotes nos quais a nicarbazina foi usada como anticoccidiano (26,8%; 9/34), quando comparados aos lotes tratados com salinomicina (95,2%; 59/62). Mesmo que esses dados sugiram que a administração de nicarbazina é a causa de menor eliminação de oocistos e menor taxa de prevalência, eles devem ser interpretados com cautela, pois a menor eliminação de oocistos não necessariamente implica em um melhor controle da coccidiose nesses NCFCs, uma vez que, para determinar a eficácia de métodos de controle da coccidiose, outras variáveis devem ser analisadas, como a conversão alimentar, o ganho de peso, o escore de lesões e a taxa de mortalidade (Kraieski et al., 2017). Além disso, a salinomicina foi administrada no verão e a nicarbazina, no inverno; nos meses de verão, a prevalência de coccidiose clínica é maior em decorrência da maior taxa de esporulação dos oocistos.

Não há informação sobre quais anticoccidianos foram utilizados nos lotes pesquisados por Terra *et al.* (2001) e Balestrin *et al.* (2021). Nos lotes pesquisados por Moraes *et al.* (2015) foram utilizados anticoccidianos ionóforos. Outrossim, a eliminação de oocistos não está relacionada somente ao anticoccidiano usado, mas a diversos outros fatores, incluindo o desenvolvimento de imunidade contra as diferentes espécies de *Eimeria* e a diversos fatores ambientais e de manejo (Chapman, 1999; Attree *et al.*, 2021). Mesmo que os NCFC pesquisados neste trabalho sejam provenientes de uma mesma empresa integradora, há variações nas técnicas de manejo e nas condições climáticas onde cada NCFC está localizado.

Eimeria lata não foi diagnosticada neste trabalho, porém já foi detectada em criações de galinha doméstica na Nigéria (Jatau *et al.*, 2016), Zâmbia, Tanzânia, Gana (Fornace *et al.*, 2013) e Índia (Hinsu *et al.*, 2018). Nas Américas, *E. zaria* foi identificada nos Estados Unidos por Hauck *et al.* (2019), em criações industriais, e por Terra *et al.* (2021), em criações semi-intensivas. No Brasil, *E. zaria* foi diagnosticada somente em criações extensivas e semi-intensivas no estado de São Paulo (Soares Júnior *et al.*, 2023). Todas as amostras foram negativas para a presença de *E. nagambie*, que já havia sido identificada na Austrália em frangos de corte (Godwin & Morgan, 2015; Morgan & Godwin, 2017), Nigéria (Jatau *et al.*, 2016), Estados Unidos (Hauck *et al.*, 2019). No Brasil, o primeiro relato da presença de *E. nagambie* em galinhas domésticas foi feito em criações extensivas e semi-intensivas no estado de São Paulo (Soares Júnior *et al.*, 2023).

Em relação às criações comerciais de frangos de corte, neste trabalho foram identificadas as espécies previamente identificadas em criações comerciais em outros trabalhos

realizados no Brasil e em outros países, com maior frequência para *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. praecox*. A alta prevalência encontrada em ambos os estados onde as amostras foram colhidas já foi relatada em outros trabalhos realizados no Brasil (Mcdougald *et al.*, 1987; Terra *et al.*, 2001; Moraes *et al.*, 2015; Balestrin *et al.*, 2021). As taxas de positividade entre as diferentes espécies diferem entre os diferentes trabalhos, sendo que, como esperado, foi observada maior positividade para as espécies mais comuns de *Eimeria* em frangos de corte: *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*.

As taxas de prevalência de sete espécies de *Eimeria* determinadas pela *nested* PCR e sequenciamento de nova geração apresentam frequências similares às de trabalhos realizados com técnicas similares em NCFC no estado de Santa Catarina. Balestrin *et al.* (2021) relataram maior frequência de *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*, menor frequência de *E. brunetti* e *E. mitis* e ausência de *E. necatrix* e *E. praecox* em frangos de corte; a exceção foi *E. tenella*, que não foi detectada neste trabalho. Em outro trabalho realizado em Santa Catarina, com amostras colhidas de agosto de 2011 a fevereiro de 2012, Moraes *et al.* (2015) identificaram taxas de prevalência mais altas para *E. mitis* (38.6%), *E. praecox* (25.1%), *E. necatrix* (24.3%) e *E. brunetti* (13.1%). Os resultados de Carvalho *et al.* (2011) também contrastam com nossos resultados, pois os autores relataram frequência de 93,3% para *E. mitis* e *E. necatrix* e de 100% para *E. maxima* e *E. praecox*, em frangos de corte no estado da Bahia. As diferenças na frequência de cada espécie de *Eimeria* em diferentes trabalhos podem refletir diferenças relacionadas ao método de diagnóstico, ao clima, manejo e ao anticoccidiano utilizado. Porém, no trabalho mais atual (Balestrin *et al.*, 2021), realizados no estado de Santa Catarina, os resultados são similares aos deste trabalho, exceto pela prevalência de *E. tenella*.

Em criações industriais de galinha doméstica no Brasil, há informações referentes à ocorrência de sete espécies de *Eimeria*: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella* (Terra *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2003; Meireles *et al.*, 2004; Luchese *et al.*, 2007; Moraes *et al.*, 2015). Porém, nesses trabalhos não foi avaliada a presença das três espécies classificadas recentemente por Blake *et al.* (2021a) ou de eventuais variantes genéticas de *Eimeria* spp. A identificação da espécie de *Eimeria* pode ser presumida por análise da morfologia e morfometria dos oocistos e das lesões macroscópicas (Long & Joyner, 1984; Castañón *et al.*, 2007) No entanto, essas características são subjetivas e podem resultar em diagnósticos equivocados, principalmente pelo fato de que a maioria das infecções está relacionada a múltiplas espécies e, mais recentemente, a três novas espécies de *Eimeria* (Haug *et al.*, 2008; Frölich *et al.*, 2013; Blake *et al.*, 2021b). Neste trabalho, foi utilizado pela primeira vez em NCFC no Brasil um protocolo de diagnóstico que identifica *E. lata*, *E. nagambie* e *E.*

zaria, o que justifica a falta de informações sobre essas espécies em trabalhos publicados anteriormente.

3 CONCLUSÃO

Foi identificada elevada prevalência de *Eimeria* spp. em núcleos comerciais de frango de corte (NCFC) da região oeste do Estado de Santa Catarina. Houve maior prevalência de *E. acervulina* e *E. maxima*, menor prevalência de *E. mitis* e *E. praecox* e ausência de *E. brunetti*, *E. lata*, *E. nagambie*, e *E. necatrix/tenella* e *E. zaria*. Houve menor positividade para *Eimeria* spp. em lotes tratados com nicarbazina.

3.1 Referências³

- Allen PC, Fetterer RH. 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* 2002 Jan;15(1):58-65.
- Attree E, Sanchez-Arsuaga G, Jones M, Xia D, Marugan-Hernandez V, Blake D, Tomley F. Controlling the causative agents of coccidiosis in domestic chickens: an eye on the past and considerations for the future. *CABI Agriculture and Bioscience* 2021;2(1):1-16.
- Balestrin PWG, Balestrin E, Santiani F, Biezus G, Moraes JC, Casa MS, Medeiros ALV, Casagrande RA. Prevalence of *Eimeria* sp. in broiler poultry houses with positive and negative pressure ventilation systems in Southern Brazil. *Avian Diseases*. 2021; 65(3):469-473.
- Blake DP, Knox J, Dehaeck B, Huntington B, Rathinam T, Ravipati V, Ayoade S, Gilbert W, Adebambo AO, Jatau ID, Raman M, Parker D, Rushton J, Tomley FM. Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. *Veterinary Research*. 2020 Sep 14;51(1):115.
- Blake DP, Marugan-Hernandez V, Tomley FM. Spotlight on avian pathology: *Eimeria* and the disease coccidiosis. *Avian Pathology*. 2021. Apr 20;50(3):209-213.
- Blake DP, Vrba V, Xia D, Jatau ID, Spiro S, Nolan MJ, et al. Genetic and biological characterisation of three cryptic *Eimeria* operational taxonomic units that infect chickens (*Gallus gallus domesticus*). *International Journal for Parasitology*. 2021 Jul;51(8):621-634.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Procedimentos para registro, fiscalização e controle de estabelecimentos avícolas de reprodução, comerciais e de ensino ou pesquisas. Brasília: Ministério da Saúde, Pecuária e Abastecimento, 2017.
- Cantacessi C, Riddell S, Morris GM, Doran T, Woods WG, Otranto D, Gasser RB. Genetic characterization of three unique operational taxonomic units of *Eimeria* from chickens in Australia based on nuclear spacer ribosomal DNA. *Veterinary Parasitology*. 2008 Apr 15;152(3-4):226-34.
- Carvalho FS, Wenceslau AA, Teixeira M, Matos Carneiro JA, Melo AD, Albuquerque GR. Diagnosis of *Eimeria* species using traditional and molecular methods in field studies. *Veterinary Parasitology*. 2011 Mar 10;176(2-3):95-100.
- Castañón CAB, Fraga JS, Fernandez S, Gruber A., Costa LF. Biological shape characterization for automatic image recognition and diagnosis of protozoan parasites of the genus *Eimeria*. *Pattern Recognition*. 2007; (40):1899-1910.
- Chapman HD. Anticoccidial drugs and their effects upon the development of immunity to *Eimeria* infections in poultry. *Avian Pathology*. 1999 Dec;28(6):521-35.

³ De acordo com a norma do periódico *Revista Brasileira de Ciência Avícola* (2022).

Cidasc. Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina. Consulta sobre o número de estabelecimentos avícolas de corte registrados na região oeste do estado de Santa Catarina. [cited 2021 Ago 26]. Mensagem recebida por m.meireles@unesp.br.

Clark EL, Macdonald SE, Thenmozhi V, Kundu K, Garg R, Kumar S, Ayoade S, et al. Cryptic *Eimeria* genotypes are common across the southern but not northern hemisphere. *International Journal for Parasitology*. 2016 Aug;46(9):537-44.

Dalloul RA, Lillehoj HS. Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert Review of Vaccines*. 2006 Feb;5(1):143-63.

Fernandez S, Pagotto AH, Furtado MM, Katsuyama AM, Madeira AM, Gruber A. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven *Eimeria* species that infect domestic fowl. *Parasitology*. 2003 Oct;127(Pt 4):317-25.

Fornace KM, Clark EL, Macdonald SE, Namangala B, Karimuribo E, Awuni JA, Thieme O, Blake DP, Rushton J. Occurrence of *Eimeria* species parasites on small-scale commercial chicken farms in Africa and indication of economic profitability. *PLoS One*. 2013 Dec 31;8(12):e84254.

Frölich S, Harhat J, Wallach M. Designing strategies for the control of coccidiosis in chickens on poultry farms using modern diagnostic tools. *Reports in Parasitology*. 2013 Jan; 3(1):3-10.

Godwin RM, Morgan JA. A molecular survey of *Eimeria* in chickens across Australia. *Veterinary Parasitology*. 2015 Nov 30;214(1-2):16-21.

Hauck R, Carrisosa M, McCrea BA, Dormitorio T, Macklin KS. Evaluation of Next-Generation Amplicon Sequencing to Identify *Eimeria* spp. of Chickens. *Avian Diseases*. 2019 Dec;63(4):577-583.

Haug A, Thebo P, Mattsson JG. A simplified protocol for molecular identification of *Eimeria* species in field samples. *Veterinary Parasitology*. 2007 May 15;146(1-2):35-45.

Haug A, Gjevre AG, Thebo P, Mattsson JG, Kaldhusdal M. Coccidial infections in commercial broilers: epidemiological aspects and comparison of *Eimeria* species identification by morphometric and polymerase chain reaction techniques. *Avian Pathology*. 2008 Apr;37(2):161-70.

Hinsu AT, Thakkar JR, Koringa PG, Vrba V, Jakhesara SJ, Psifidi A, Guitian J, Tomley FM, Rank DN, Raman M, Joshi CG, Blake DP. Illumina Next Generation Sequencing for the Analysis of *Eimeria* Populations in Commercial Broilers and Indigenous Chickens. *Frontiers in Veterinary Science*. 2018 Jul 30;5:176.

Jatau ID, Lawal IA, Kwaga JK, Tomley FM, Blake DP, Nok AJ. Three operational taxonomic units of *Eimeria* are common in Nigerian chickens and may undermine effective molecular diagnosis of coccidiosis. *BMC Veterinary Research*. 2016 Jun 4;12:1-6.

Kraieski AL, Hayashi RM, Sanches A, Almeida GC, Santin E. Effect of aflatoxin experimental ingestion and *Eimeiria* vaccine challenges on intestinal histopathology and immune cellular

- dynamic of broilers: applying an Intestinal Health Index. *Poultry Science*. 2017 May 1;96(5):1078-1087.
- Lillehoj HS, Lillehoj EP. Avian coccidiosis: a review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Diseases*. 2000 Apr-Jun;44(2):408-25.
- Long PL, Joyner LP. Problems in the identification of species of *Eimeria*. *Journal of protozoology research*. 1984 Nov;31(4):535-41.
- Luchese FC, Perin M, Aita RS, Mottin VD, Molento MB, Monteiro S.G. Prevalência de espécies de *Eimeria* em frangos de criação industrial e alternativa. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2007; 44(2):81-86.
- McDonald V, Shirley MW. Past and future: vaccination against *Eimeria*. *Parasitology*. 2009 Oct;136(12):1477-89.
- McDougald LR, Da Silva JM, Solis J, Braga M. A survey of sensitivity to anticoccidial drugs in 60 isolates of coccidia from broiler chickens in Brazil and Argentina. *Avian Diseases*. 1987 Apr-Jun;31(2):287-92.
- Meireles MV, Roberto LO, Riera RF. Identification of *Eimeria mitis* and *Eimeria praecox* in broiler feces using polymerase chain reaction. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2004 Dec; 6(4):249-252.
- Moraes JC, França M, Sartor AA, Bellato V, de Moura AB, de Lourdes Borba Magalhães M, de Souza AP, Miletto LC. Prevalence of *Eimeria* spp. in broilers by multiplex PCR in the Southern Region of Brazil on two hundred and fifty farms. *Avian Diseases*. 2015 Jun;59(2):277-81.
- Morgan JAT, Godwin RM. Mitochondrial genomes of Australian chicken *Eimeria* support the presence of ten species with low genetic diversity among strains. *Veterinary Parasitology*. 2017 Aug 30;243:58-66.
- Morris GM, Woods WG, Richards DG, Gasser RB. Investigating a persistent coccidiosis problem on a commercial broiler-breeder farm utilising PCR-coupled capillary electrophoresis. *Parasitology Research*. 2007 Aug;101(3):583-589.
- Santos RFS, Kavavata GM, Almeida SM, Hisano M, Calixto LFL, Meireles MV. Ocorrência de *Eimeria* sp. em frangos de corte no estado de São Paulo. *Ars Veterinaria*. 2003; 19(3):230-234.
- Sergeant ESG. Epitools Epidemiological Calculators. Ausvet. 2018.
- Snyder RP, Guerin MT, Hargis BM, Page G, Barta JR. Monitoring coccidia in commercial broiler chicken flocks in Ontario: comparing oocyst cycling patterns in flocks using anticoccidial medications or live vaccination. *Poultry Science*. 2021 Jan;100(1):110-118.
- Soares Júnior JC, Itoyama BF, Beretta BMS, Hossotani CMS, Silva MSC, Silva GS, et al. Identification of *Eimeria* spp. in domestic chickens raised in alternative poultry production

systems in the State of São Paulo, Brazil. *Journal of Veterinary Parasitology*. 2023; 32(4): e011123.

Terra, MTB, Pacheco WJ, Harrison M, McCrea BA, Hauck R. A Survey of *Coccidia* and nematodes in pastured poultry in the State of Georgia. *Avian Diseases*. 2021 Jun;65(2):250-256.

Terra AT, Costa PS, Figueiredo PC, Carvalho ECQ. Frequência de espécies do gênero *Eimeria* em frangos de corte abatidos industrialmente no município de Monte Alegre do Sul Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2001;10(2):87-90.

The Jamovi Project (2021). Jamovi. (Version 2.2) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

Venkatas J, Adeleke MA. Emerging threat of *Eimeria* operational taxonomic units (OTUs) on poultry production. *Parasitology*. 2019 Nov;146(13):1615-1619.

Vrba V, Blake DP, Poplstein M. Quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of all seven *Eimeria* species that infect the chicken. *Veterinary Parasitology*. 2010 Dec 15;174(3-4):183-190.

Vrba V, Poplstein M, Pakandl M. The discovery of the two types of small subunit ribosomal RNA gene in *Eimeria mitis* contests the existence of *E. mivati* as an independent species. *Veterinary Parasitology*. 2011 Dec 29;183(1-2):47-53.

Williams RB. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *International Journal for Parasitology*. 1999 Aug;29(8):1209-1229.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL⁴

ABREU, V. M. N.; ABREU, P. G. Os desafios da ambiência sobre os sistemas de aves no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.1-14, 2011. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/901939/1/osdesafiosdaambienciasobreosistemas.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2024.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/cmr.15.1.58-65.2002>. Acesso em: 14 jun. 2024.

ARAGÃO A., C. E. **O agro no Brasil e no Mundo: uma síntese do período de 2000 a 2020**. Embrapa SIRE, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/10180/62618376/O+AGRO+NO+BRASIL+E+NO+MUNDO.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2024.

BALESTRIN, P. W. G. et al. Prevalence of *Eimeria* sp. in broiler poultry houses with positive and negative pressure ventilation systems in southern Brazil. **Avian Diseases**, v. 65, n. 3, p. 469-473, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1637/aviandiseases-D-21-00044>. Acesso em: 15 jun. 2024.

BLAKE, D. P. et al. Population, genetic, and antigenic diversity of the apicomplexan *Eimeria* tenella and their relevance to vaccine development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 38, p. E5343-E5350, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1506468112>. Acesso em: 15 jun. 2024.

BLAKE, D. P. et al. Recombinant anticoccidial vaccines-a cup half full?. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 55, p. 358-365, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.009>. Acesso em: 15 jun. 2024.

BLAKE, D. P. et al. Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. **Veterinary Research**, v. 51, p. 1-14, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13567-020-00837-2>. Acesso em: 15 jun. 2024.

BLAKE, D. P.; MARUGAN-HERNANDEZ, V.; TOMLEY, F. M. Spotlight on avian pathology: *Eimeria* and the disease coccidiosis. **Avian Pathology**, v. 50, n. 3, p. 209-213, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03079457.2021.1912288>. Acesso em: 15 jun. 2024.

BLAKE, D. P.; TOMLEY, F. M. Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. **Trends in parasitology**, v. 30, n. 1, p. 12-19, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.10.003>. Acesso em: 15 jun. 2024.

CARVALHO, F. S. et al. Diagnosis of *Eimeria* species using traditional and molecular methods in field studies. **Veterinary parasitology**, v. 176, n. 2-3, p. 95-100, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.015>. Acesso em: 15 jun. 2024.

⁴ De acordo com a norma ABNT NBR 6023 (2018).

CARVALHO, R. H. et al. The effects of the dark house system on growth, performance and meat quality of broiler chicken. **Animal Science Journal**, v. 86, n. 2, p. 189-193, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/asj.12262>. Acesso em: 15 jun. 2024.

CHAPMAN, H. D. Anticoccidial drugs and their effects upon the development of immunity to *Eimeria* infections in poultry. **Avian pathology**, v. 28, n. 6, p. 521-535, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03079459994317>. Acesso em: 15 jun. 2024.

CHAPMAN, H. D. Milestones in avian coccidiosis research: a review. **Poultry science**, v. 93, n. 3, p. 501-511, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03634>. Acesso em: 15 jun. 2024.

CLARK, E. L. et al. Cryptic *Eimeria* genotypes are common across the southern but not northern hemisphere. **International journal for parasitology**, v. 46, n. 9, p. 537-544, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.05.006>. Acesso em: 15 jun. 2024.

FATOBA, A. J.; ADELEKE, M. A. Diagnosis and control of chicken coccidiosis: a recent update. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 42, n. 4, p. 483-493, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12639-018-1048-1>. Acesso em: 15 jun. 2024.

HAUCK, R. et al. Evaluation of next-generation amplicon sequencing to identify *Eimeria* spp. of chickens. **Avian diseases**, v. 63, n. 4, p. 577-583, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1637/aviandiseases-D-19-00104>. Acesso em: 15 jun. 2024.

HAUG, A.; THEBO, P.; MATTSSON, J. G. A simplified protocol for molecular identification of *Eimeria* species in field samples. **Veterinary parasitology**, v. 146, n. 1-2, p. 35-45, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.12.015>. Acesso em: 15 jun. 2024.

HAUG, A, et al. Coccidial infections in commercial broilers: epidemiological aspects and comparison of *Eimeria* species identification by morphometric and polymerase chain reaction techniques. **Avian pathology**, v. 37, n. 2, p. 161-170, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03079450801915130>. Acesso em: 15 jun. 2024.

MCDONALD, V.; SHIRLEY, M. W. Past and future: vaccination Against *Eimeria*. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p. 1477-1489, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182009006349>. Acesso em: 15 jun. 2024.

MORAES, J. C. et al. Prevalence of *Eimeria* spp. in broilers by multiplex PCR in the southern region of Brazil on two hundred and fifty farms. **Avian Diseases**, v. 59, n. 2, p. 277-281, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1637/10989-112014-Reg>. Acesso em: 15 jun. 2024.

OLIVEIRA, M. F. et al. A importância nutricional da alimentação complementar. **Revista Ciências Nutricionais Online**, v. 1, n. 1, p. 36-45, 2017. Disponível em: <https://unifafibe.com.br/revistasonline/arquivos/cienciasnutricionaisonline/sumario/46/27032017152234.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2024.

PEEK, H. W.; LANDMAN, W. J. M. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. **Veterinary quarterly**, v. 31, n. 3, p. 143-161, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01652176.2011.605247>. Acesso em: 15 jun. 2024.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; DANTÁN-GONZÁLEZ, E. Control of avian coccidiosis: future and present natural alternatives. **BioMed research international**, v. 2015, n. 1, p. 1-11, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/430610>. Acesso em: 15 jun. 2024.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.006>. Acesso em: 15 jun. 2024.

WILLIAMS, R. B. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. **International journal for parasitology**, v. 29, n. 8, p. 1209-1229, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00086-7). Acesso em: 15 jun. 2024.

ANEXO A – Normas da Revista Brasileira de Ciência Avícola (2022)⁵

Instructions to authors

Scope and policy

The publication of the Brazilian Journal of Poultry Science is coordinated by the Publishing Committee of [Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia Avícolas – FACTA](#) (Foundation of Poultry Science and Technology – FACTA). All published research data and conclusions are of authors' full responsibility.

The Brazilian Journal of Poultry Science is published quarterly and the journal will consider for publication only original research material relevant to the field of poultry science. Considered subject areas will include: Immunology, Biochemistry and Cellular Biology, Housing and Environment, Wasting Control, Avian Diseases, Nutrition, Genetic Improvement, Physiology and Breeding, Management, Egg Production, Meat Technology, and Wild and Exotic Birds and Quail Production.

The journal's main objective is to publish complete scientific and technical papers as well as literature reviews in the area of poultry science written by researchers and poultry science specialists. Authors wishing to submit a review, guest editorial or technical review should contact the journal's editor.

All submitted manuscripts are evaluated in a anonymous peer-review, and in a total confidential and impartial way

Manuscripts should be submitted in the **English language only**.

Submission of a manuscript to the Brazilian Journal of Poultry Science implies that:

1. it has not been previously published;
2. it has not being submitted for publication elsewhere;
3. all authors have approved the submission;

all authors have obtained permission from their employer or institution to publish it, and

4. that relevant permissions, including ethical approval, has been obtained. Papers describing experiments which demonstrate a lack of concern of current ethical and welfare standards will not be considered for publication.

The manuscript and other correspondence should be sent by [e-mail](#).

⁵ Disponível em: <https://www.scielo.br/journal/rbca/about/#instructions>.

The Journal uses the software Grammarly/Plagiarism for identifying plagiarism.

The process of review of manuscripts adopted by the journal is anonymous peer review

Preparing the manuscript

Full length article

It should contain the results of original research which contributes in a relevant way to the development of poultry science. If part of the results has been published previously as a summary or short paper in scientific events, it must be stated. Priority will be given to manuscript presenting new concepts, methodologies or innovative experimental approaches.

The manuscript should have the following sections:

Title

Abstract

Introduction

Material and Methods

Results

Discussion

References

Acknowledgements should be included after Discussion.

The sections Results and Discussion can be presented jointly if preferred. The Abstract should contain up to 250 (two hundred and fifty) words, followed by the key words in alphabetic order, limited to 5 (five) words which correspond to words or expressions that identify the contents of the article.

Short communications and Case Reports should have the same layout as full length papers, including the headings (Introduction, Abstract, Material and Methods, Result, Discussion, Acknowledgments and References). They should be presented in a text with up to 1000 words (plus Abstract and References) and should contain no more than three tables and/or figures.

Technical article

Technical articles should present the development of new methodologies and/or techniques that can be applied to improve poultry production. These should follow the editorial norms including all sections of the scientific article.

Guest Editorial and Invited Review

Both Guest Editorial and Invited Review will be published by invitation only. The review should follow the norms of the scientific article without the sub-items of Material and Methods, Results and Discussion and preserving all others present in a full length manuscript.

Publication Fees

The BJPS does not charge to submit the article. We only charge if the article is approved for publication. The author(s) will be charged US\$ 500,00 (five hundred dollars) per edited article, and the payment should be made before publication. The fees are destined to cover the expenses of English polishing, reference checking, and editing the final proof. No reprints will be supplied to authors as the articles are shown at www.scielo.br/rbca.

Layout of the articles

1. Cover Page: All manuscripts should have a cover page with the title, complete name(s) of the author(s) and institution of origin. A footnote mentioning the complete address (e-mail is essential) of the author to whom correspondence should be addressed.

2. Tables: Must be numbered consecutively with Arabic numerals in the text. Tables must have a descriptive title. All explanatory information should be given in a footnote below the table. All abbreviations must be defined in this footnote, even if they are explained in the text. Tables must be understandable without referring to the text.

3. Illustrations (photographs, graphs, drawings): Must be numbered consecutively with Arabic numerals. All figures should be submitted on separate pages with the title of the article, name(s) of the author(s) and indication of the part of the text where they should appear.

Photographs, figures and scanned material must be sent in high resolution (minimum 600 dpi, .tif or .jpg format). The figures will be published in black and white. Previous expenses agreement is needed if the author wishes to publish color photos and or figures.

4. Units: The International Metric System must be used for units and abbreviations.

5. References: We accept the adapted Vancouver norm. These should be arranged in alphabetic order by the author's last name and initials. When a source has more than one author, their names are separated by commas. If a source has more than three authors, list the first three followed by 'et al.' (in italic). The complete title of the journal should be mentioned. Please add the link of the article DOI by the end of the reference.

Examples:

Electronic journal article with DOI number:

Bakst MR, Gupta K, Akuffo V. Comparative development of the turkey and chicken embryo from cleavage through hypoblast formation. *Poultry Science* 1997; 76(1):83-90. <https://doi.org/10.1093/ps/76.1.83>

Rodrigues I, Silva R, Menezes J, et al. High Prevalence of multidrug-resistant nontyphoidal Salmonella recovered from broiler chickens and chicken carcasses in Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science* 2020;22(1). <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2019-1206>

Book:

Lawrie RA. *Ciência da carne*. 6th ed. Porto Alegre: Artmed Editora; 2005.

Chapter in a book:

Rosa PS. Cama para frangos de corte. In: Macari M, Mendes A.A, Menten JFM, Naas IA. *Produção de frangos de corte*. 2 nd ed. Campinas: FACTA; 2014 p.153-180. ISBN: 9788589327077

Theses/ Dissertation

Carvalho DA. *Caracterização fenotípica e genotípica de galinhas nativas canelas-preta*. [dissertation]. Diamantina (MG): Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri; 2016b [cited 2021 Nov 20]. Available from: <http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/1022>

6. Quotations in the text: State the last name of the author followed by the year in parenthesis. In the case of two authors both should be stated. In the case of more than two authors the quotation should be given by the last name of the first author followed by the expression et al. (in italic).

Examples:

Simon (1996)

Silva & Silva (1988)

Briceno et al. (1987)

7. Scientific names of microorganisms: Must follow Berg's Manual recommendation.

8. Manuscript Proof: Will be sent to the corresponding author, who should be identified on the cover page of the manuscript. Corrected proof should return within three days, preferable by fax. The Editor reserves the right to forward the manuscript to press without submitting the final proof to the author. The Editor shall not be hold responsible for any mistakes shown in the final publication.

9. Offprints: There is no free offprints. They can be provided after Editor consultation.

10. Copyright: It is a condition of publication that the authors issue copyright of their article to FACTA. Authors may use the article after the publication without prior permission from FACTA, provided that acknowledgement is given to the journal as its original source of publication. Authors are responsible for obtaining permission to reproduce in the text copyright material from other sources.

11. Submission: Manuscript should be submitted via [ScholarOne](#).