UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DE FATORES PREDISPONENTES DE ENTERITE NECRÓTICA EM FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE DESAFIADOS

LARISSA JUSTINO

Botucatu-SP
2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DE FATORES PREDISPONENTES DE ENTERITE NECRÓTICA EM FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE DESAFIADOS

LARISSA JUSTINO

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, Campus de Botucatu - SP, para obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária

Orientador: Prof.Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho

Coorientadora: Profª.Drª. Ana Angelita Sampaio Baptista

Botucatu-SP
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Justino, Larissa.
Avaliação de fatores predisponentes de enterite necrótica em frangos de corte experimentalmente desafiados / Larissa Justino. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Raphael Lucio Andreatti Filho
Coorientador: Ana Angelita Sampaio Baptista
Capes: 50503014

1. Frangos de corte. 2. Enterite. 3. *Clostridium perfringens*. 4. Causalidade.

Palavras-chave: *Clostridium perfringens*; Enterite necrótica; Fatores predisponentes.

Nome do Autor: Larissa Justino

Título: AVALIAÇÃO DE FATORES PREDISPONENTES DE ENTERITE NECRÓTICA EM FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE DESAFIADOS.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho
Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof.Dr. Adriano Sakai Okamoto
Membro
Departamento de Clinica Veterinaria
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof.Dr. Edir Nepomuceno da Silva
Membro
Departamento de Tecnologia de Alimentos
UNICAMP – Campinas

Data defesa: 08 de abril de 2022

A Deus e a meus pais

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser meu melhor amigo, por estar sempre ao meu lado, ajudando, confortando, guiando meus passos, Ele é a minha certeza de que tudo ficará bem.

Aos meus pais, Joel Justino e Rozemari Aparecida Justino, por todo apoio, carinho e amor. Sempre estiveram ao meu lado, me dando conselhos, abraços e um ombro amigo, dedico a eles todas as minhas conquistas. Sou infinitamente grata por tê-los em minha vida, amo vocês.

Ao meu orientador professor Raphael Lucio Andreatti Filho pela disponibilidade, paciência e ensinamentos durante o desenvolvimento do trabalho.

A minha querida coorientadora professora Ana Angelita Sampaio Baptista pelo apoio, paciência e auxilio durante o desenvolvimento do trabalho e pelos ensinamentos ao longo dos anos, que me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente.

Aos membros da banca professor Adriano Sakai Okamoto e Edir Nepomuceno da Silva, por terem aceito o convite, pelo tempo dispensado para corrigir este trabalho e pelas críticas e sugestões.

Ao pessoal do Laboratório de Medicina Aviária, João Vitor, Giovanna Bazo e Barbara Tiemi, pelo auxílio nos manejos das aves e durante as necropsias.

A Marielen de Souza, minha amiga que ajudou durante o experimento, pelo apoio emocional, por ser minha companhia diária e sempre me ouvir e oferecer o ombro amigo, sou grata a Deus por ter colocado você no meu caminho.

A minha amiga, Maisa Menck por sempre estar disposta a ajudar, pela parceria durante todos esses anos, por me ouvir e me dar os melhores conselhos, sou grata por sua vida.

Ao pessoal do Laboratorio de Ornitopatologia da UNESP-Botucatu, Camila Oro, Cauê Tertuliano, Tais Coletti, Gabriella Ribeiro e Ana Carolina, por ter me recebido de braços abertos no laboratório e pela amizade.

A professora Ana Paula Bracarense, pelo auxílio no trabalho e por disponibilizar o Laboratório de Anatomia Patologica Animal para realização

das análises histopatológicas.

Quero também agradecer a todos os meus familiares, que sempre me apoiaram. Aos meus amigos de graduação Letícia Santos, Karina Ono, Bárbara Rodrigues, Letícia Vida e Leonardo de Souza (*in memoriam*) por todos os bons momentos, risadas, amizade e apoio que tive em todos esses anos.

À CAPES pela concessão da bolsa, que viabilizou a execução deste projeto. A empresa GhenVet pelo auxilio financeiro no desenvolvimento do trabalho. A UEL, UNESP-Botucatu, ao Laboratório de Medicina Aviária, Laboratório de Ornitopatologia, Laboratório de Patologia Animal e a todos que contribuíram de certa forma para conclusão desta etapa.

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

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos grupos G1-controle negativo, G2- CP13 + *Eimeria* spp.; G3- CP13 + IBVD, G4- CP13 + *Eimeria* spp. + IBVD; G5- CP14 + *Eimeria* spp.; G6- CP14 + IBVD; G7- CP14 + *Eimeria* spp. + IBVD; G8- CP03 + *Eimeria* spp.; G9- CP03 + IBVD; G10- CP03 + *Eimeria* spp. + IBVD; G11- *Eimeria* spp.....20

Tabela 2 - Escore de lesão adotado para avaliar as lesões observadas no intestino das aves, descrito por Cravens et al. (2013).....22

Tabela 3 - Escore de lesão adotado para avaliar as lesões observadas no intestino das aves, descrito por Dahiya et al. (2005).....22

Tabela 4 - Escore de lesão adotado para avaliar as lesões observadas no intestino das aves, descrito Teirlynck et al. (2011)..... 23

Tabela 5 - Média do escore de lesão macroscópica segundo a metodologia de Cravens et al. (2013), Dahiya et al. (2005) e Teirlynck et al. (2011), dos diferentes grupos..... 27

Tabela 6 - Média (*Log 10*) da quantificação bacteriana em aerobiose e anaerobiose presentes no fígado das aves dos diferentes grupos.....29

Tabela 7 - Média da cotagem de linfócitos intraepiteliais (IELs) do intestino delgado e células caliciformes das aves dos diferentes grupos.....31

Tabela 8 - Média do escore de lesão microscópico do duodeno e jejuno dos grupos administrados *Eimeria* spp.....31

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Presença de desuniformidade entre os grupos em relação ao controle negativo. G1-controle negativo; G2- CP13 + *Eimeria* spp.; G3- CP13 + IBVD.; G4- CP13 + *Eimeria* spp. + IBVD; G5- CP14 + *Eimeria* spp.; G6- CP14 + IBVD; G7- CP14 + *Eimeria* spp. + IBVD; G8- CP03 + *Eimeria* spp.; G9- CP03 + IBVD; G10- CP03 + *Eimeria* spp. + IBVD; G11- *Eimeria* spp.....26

FIGURA 2. Média da altura das vilosidades, profundidade das criptas e relação vilo/cripta dos diferentes grupos. G1-controle negativo; G2- CP13 + *Eimeria* spp.; G3- CP13 + IBVD.; G4- CP13 + *Eimeria* spp. + IBVD; G5- CP14 + *Eimeria* spp.; G6- CP14 + IBVD; G7- CP14 + *Eimeria* spp. + IBVD; G8- CP03 + *Eimeria* spp.; G9- CP03 + IBVD; G10- CP03 + *Eimeria* spp. + IBVD; G11- *Eimeria* spp.....30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC Antibióticos Promotores de Crescimento

CP Clostridium perfringens

DDV Dias de Vida

EN Enterite Necrótica

IBDV Infectious bursal disease virus

PCR Polymerase Chain Reaction

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....

ABSTRACT.....

1 INTRODUÇÃO.....11

2 REVISÃO DE LITERATURA.....12

3 OBJETIVOS.....19

3.1 Objetivo geral.....19

3.2 Objetivos específicos.....19

4 MATERIAL E MÉTODOS.....19

4.1 Extração e PCR das amostras de *Clostridium perfringens*.....19

4.2 Grupos experimentais.....20

4.3 Infecção experimental.....20

4.3.1 Dieta Experimental.....20

4.3.2 Desafio Com Vacina De Coccidiose e Gumboro.....20

4.3.3 Preparo do Inóculo e Desafio Com Clostridium perfringens.....21

4.4 Avaliação macroscópica do intestino.....21

4.5 Colheita do fígado para quantificação em aerobiose e anaerobiose....23

4.6 Avaliação microscópica do intestino.....23

4.6.1 Morfometria Intestinal.....24

4.6.2 Contagem de Células Caliciformes do Íleo e Linfócitos Intraepiteliais do Intestino Delgado.....24

4.6.3 Contagem de Linfócitos Intraepiteliais do Intesitno Delgado.....24

4.6.4 Escore de lesão microscópico do intestino.....24

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....25

6 RESULTADOS.....25

6.1 Infecção Experimental.....25

6.2 Avaliação Macroscópica do Intestino.....26

6.3 Quantificação de Bactérias Aeróbicas e Anaeróbicas do Fígado.....28

6.4 Avaliação Microscópica do Intestino.....29

6.4.1 Morfometria Intestinal.....29

6.4.2 Contagem de Células Caliciformes do Íleo e Linfócitos Intraepiteliais do Intestino Delgado.....30

6.4.3 Escore de lesão microscópico do intestino.....31
7 DISCUSSÃO.....32
8 CONCLUSÕES.....38
9 BIBLIOGRAFIA.....39
10 TRABALHO CIENTÍFICO.....48

JUSTINO, L. **Avaliação de fatores predisponentes de enterite necrótica em frangos de corte experimentalmente desafiados.** Botucatu, 2021. 75p. Dissertação- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A enterite necrótica (EN) é considerada uma das principais doenças de alto impacto na avicultura, sendo o *Clostridium perfringens* (CP) o agente etiológico. Para compreensão da patogênese da doença e controle da doença é necessário a indução experimentalmente da EN, todavia, é relatado dificuldades entre os pesquisadores e por se tratar de uma doença multifatorial o uso de fatores predisponentes vem sendo empregado, diante disso, o objetivo deste estudo foi induzir EN utilizando fatores que predispõem a enterite necrótica em frangos de corte, como imunossupressão (IBVD), *Eimeria* spp. associados a dieta a base de trigo e desafio com três cepas de CP tipo G (CP13, CP14, CP03). Para isso, frangos de corte (n=94), Ross foram distribuídos em 11 grupos. As aves foram desafiadas entre 15-19º dias de vida (ddv), via oral (10^7 UFC/mL CP) e autopsiadas no 20ºdv para avaliação de lesão macroscópica intestinal frente a três modelos de escore distintos, colheita de fígado para quantificação de bactérias aeróbicas e anaeróbicas, avaliação morfométrica intestinal, contagem de linfócitos intraepiteliais do intestino delgado e células caliciformes do íleo. Foi observado diferença significativa nas lesões macroscópicas entre os grupos frente aos diferentes escores, sendo que foi encontrado diferença no resultados entre os modelos utilizados. Na quantificação de bacterias anaerobicas do fígado, o grupo com CP14+Eimeria+IBDV obteve a maior média entre os grupos e na contagem de linfócitos os grupos contendo *Eimeria* spp. apresentaram as maiores médias. Na análise da altura das vilosidades observou-se efeito da *Eimeria* spp. sobre a diminuição dos vilos e menor relação vilo/cripta. Na analise do escore microscópico, observou-se que a *Eimeria* spp teve um efeito nas lesoes encontradas. No presente estudo ficou evidente que existirá um efeito sinérgico entre a cepa empregada e os fatores predisponentes, todavia, não ficou claro qual fator predisponente é mais eficaz em potencializar as lesões, sugerindo que para cada protocolo experimental seja avaliada, previamente, a associação da cepa aos fatores.

Palavras-chave: Enterite necrótica; Fatores predisponentes; *Clostridium perfringens*.

JUSTINO, L. **Evaluation of predisposing factors for necrotic enteritis in experimentally challenged broiler chickens.** Botucatu, 2004. 75p. Dissertação - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Necrotic enteritis (NE) is considered one of the main diseases with a high impact on poultry, and *Clostridium perfringens* (CP) is the etiologic agent. In order to understand the pathogenesis of the disease and control the disease, the experimental induction of EN is necessary, however, difficulties are reported among researchers and because it is a multifactorial disease, the use of predisposing factors has been used. was to induce EN using factors that predispose to necrotic enteritis in broilers, such as immunosuppression (IBVD), *Eimeria* spp. associated with a wheat-based diet and challenge with three strains of type G CP (CP13, CP14, CP03). For this, broilers (n=94), Ross were distributed in 11 groups. The birds were challenged between the 15th and 19th days of life (dl), orally (107 CFU/mL CP) and autopsied at the 20th dv for evaluation of macroscopic intestinal injury against three different scoring models, liver harvest for quantification of aerobic bacteria and anaerobic, intestinal morphometric evaluation, intraepithelial lymphocyte count of the small intestine and goblet cells of the ileum. A significant difference was observed in macroscopic lesions between the groups in relation to the different scores, and a difference was found in the results between the models used. In the quantification of anaerobic bacteria in the liver, the group with CP14+*Eimeria*+IBDV had the highest mean between the groups and in the lymphocyte count the groups containing *Eimeria* spp. showed the highest averages. In the analysis of villus height, an effect of *Eimeria* spp. on the decrease of villi and lower villus/crypt ratio. In the analysis of the microscopy score, it was observed that *Eimeria* spp had an effect on the lesions found. In the present study, it was evident that there will be a synergistic effect between the strain used and the predisposing factors, however, it was not clear which predisposing factor is more effective in potentiating the lesions, suggesting that, for each experimental protocol, the association of the strain must be previously evaluated. to the factors

Key words: Necrotic enteritis; Predisposing factors; *Clostridium perfringens.*

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da indústria avícola no Brasil é consequência da integração genética, nutrição e sanidade das aves, estes fatores permitiram que o país alcançasse a terceira posição no *ranking* de países produtores de carne de frangos, atingindo uma produção de 13,8 milhões de toneladas, deste montante 69% foram destinados ao mercado interno, sendo o consumo *per capita* 45,27 kg/hab (ABPA, 2021). No que se refere a exportações de carne de frango, o Brasil encontra-se na primeira posição de exportação mundial do produto e contribuí com cerca de 3,5 milhões de empregos de forma direta e indireta (ABPA, 2018).

Os antibióticos promotores de crescimento (APC) foram utilizados por longos anos na dieta dos animais de produção, com a finalidade de aumentar o ganho de peso e melhora na conversão alimentar, e consequentemente a lucratividade na produção avícola, porém, o uso indevido contribuiu para seleção de bactérias resistentes, disseminação de genes de resistência e detecção de resíduos de antibiótico na carcaça dos animais (IMMERSEEL et al., 2008). Com a proibição do uso APC, em 2006 pela União Europeia (IMMERSEEL et al., 2016), na perspectiva de reduzir a seleção de bactérias resistentes, houve aumento do número de casos de enterite necrótica (EN) em frangos de corte, causada pela bactéria *Clostridium perfringens*, proporcionando perdas econômicas significativas na indústria avícola (TIMBERMONT et al., 2011).

Por longos anos, a patogênese da EN vem sendo estudada, a fim de desenvolver estratégias eficazes de prevenção e controle (YANG et al., 2018), pelos prejuízos causados por esta doença, todavia, os fatores predisponentes essenciais para o indução da doença, não estão totalmente elucidados, devido a diversas variaveis que podem alterar o equilíbrio da microbiota intestinal, levando ao aparecimento da doença (TSIOURISET, 2016). Com isso, a indução experimental da EN torna-se difícil, com diversos protocolos descritos na literatura. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar os fatores predisponentes para a indução de EN em frangos de corte alimentados com dieta a base de trigo, e desafiados com três de cepas diferentes de *Clostridium perfringens* tipo G, associados administração de 10 vezes a dose recomendada pelo fabricante de vacina de coccidiose e/ou Gumboro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil possui destaque no agronegócio mundial, ocupando a terceira posição na produção mundial de carne de frango com cerca de 13,8 milhões de toneladas, e o primeiro lugar no *ranking* mundial de exportação do produto com cerca de 4,2 milhões de toneladas em 2020 (ABPA, 2021). Para atingir esses índices, a eficiência da produção avícola depende dos avanços em genética, nutrição e sanidade (FERREIRA et al., 2018), pois a saúde das aves deve ser observada e zelada, já que patógenos podem ser altamente disseminados devido ao sistema intensivo de criação das aves (SESTI, 2004).

Durante muitos anos, os antibióticos promotores de crescimento (APC) foram adicionados na alimentação dos animais, entretanto, esta prática elevou o número de bactérias com perfil de multirresistência a drogas, assim, em 2006 a União Europeia proibiu o uso de APC, aumentando os casos de doenças como a enterite necrótica (EN) (IMMERSEEL et al., 2016), gerando altos custos ao setor avícola, cerca de dois bilhões de dólares anualmente (ZAHOOR et al., 2018), devido a piora da conversão alimentar (44%), diminuição do ganho de peso (27%) e aumento de condenações no abate (19%) (KALDHUSDALA et al., 2016).

O *Clostridium perfringens* (CP) é o agente etiológico da EN, designado como bactéria por Louis Pasteur em 1861, classificando como um microorganismo anaeróbico. A nomenclatura *Clostridium* vem do grego da palavra *kloster* que significa fuso, e *klostridion*, latinizado para *Clostridium*, significa pequeno fuso, isolado pela primeira vez no final do século XIX de um caso de reumatismo articular agudo e aneurisma da aorta (DÜRRE, 2001).

Welch e Nuttal denominaram de *Bacillus aerogenes* capsulatus, em seguida, Fränkel mudou para *Bacillus phlegmonis* emphysematosae, posteriormente, *Bacillus perfringens*, sendo perfringens, originado do latin que significa “quebra” pela desorganização no ágar devido ao gás produzido (DÜRRE, 2001), já o termo enterite necrótica, foi empregado em 1961 na inglaterra por Parish (MOHAMED et al., 2022).

O CP é uma bactéria Gram positiva anaeróbica (WILLIAMS et al., 2003), formadora de esporos (SHEN et al., 2019), com motilidade mediada por pili tipo IV que permite a adesão e formação de biofilmes (GOHARI et al., 2021), além de produzir dupla hemólise em ágar sangue (HUSTÁ et al., 2021).

Apresenta distribuição cosmopolita, encontrada na microbiota dos animais

vertebrados (LI et al., 2016), ocupando a segunda posição nos casos de doenças transmitidas por alimentos em países desenvolvidos (SHRESTHA et al., 2016). Nas aves, o CP coloniza o intestino com maior concentração desta bactéria encontrada nos cecos (STANLEY et al., 2012). Em aves saudáveis encontra-se em torno de 10^2-10^4 UFC/g de fezes (CALY et al., 2015), já em aves com EN, pode chegar a 10^7-10^9 UFC/g de fezes (BROOM, 2017).

As cepas patogênicas acometem frangos de corte com quatro semanas de idade (IMMERSEEL et al., 2004), pois, os títulos de anticorpos via materna começam a decrescer levando aos surtos de EN, porém, também podem ocorrer surtos com 11 semanas de idade (COOPER et al., 2013). O desenvolvimento da enterite necrótica, também está relacionado a capacidade do CP em produzir cerca de 20 potentes toxinas de origem proteica, principalmente extracelulares, além disso, também possui fatores de virulência adicionais, incluindo enterotoxina, toxina semelhante à enterite B necrótica (NetB) e toxina beta-2 (KIU e HALL, 2018).

A antiga classificação do CP era baseada em grupos toxigênicos A-E de acordo com a produção das toxinas alfa, beta, épsilon e iota, sendo o mais comum em aves a enterite necrótica o tipo A, produtoras de alfa-toxina (ALBORNOZ et al., 2014). A nova classificação tem objetivo de facilitar o estudo epidemiológico e diagnóstico da doença, baseia-se na produção de toxina e a enfermidade proporcionada pela cepa, assim, o tipo A causador de enterite necrótica nas aves, foi atualmente classificado como tipo G de acordo com a produção de toxinas α e NetB (ROOD et al., 2018). Acomete galinhas, porém, já foram relatados casos em peru, avestruz, codorna, ganso e corvo (COOPER et al., 2013).

Estudos mostram que o gene da toxina NetB é expresso em cepas de CP isolados de quadros de enterite necrótica, demonstrando ser importante na patogênese da doença (KIU et al., 2019), além do mais, a presença do gene *net*B é raro em CP isolados de aves saudáveis (SILVA et al., 2015). A NetB é uma toxina pertencente a familia α-hemolisina, com capacidade de formação de poros na membrana pela união de sete subunidades (SAVVA et al., 2013). Esta toxina é regulada pelo sistema VirS, uma proteina transmembrana com função de molécula sensora e VirR uma molécula de resposta de transdução de sinais, resposáveis pela ativação de fatores de virulência (ABD EL-HACK et al., 2022).

O gene que codifica a toxina NetB está presente em plasmídeos, transferidos por conjugação (LEPP et al., 2010) e possui outros genes responsáveis pela

proliferação e manutenção do CP, como a presença de glicosídeos hidrolases, que tem papel na degradação do muco, que serve como nutriente para o CP (MOORE, 2016), além do mais, a presença do gene *netB* não garante o desenvolvimento da EN (YANG et al., 2018; ABILDGAARD et al., 2010),

Alfa toxina (CPA), presente em quase todos os isolados de CP, uma enzima fosfolipase C de ligação à membrana, produz espécies reativas de oxigênio (ROS) e IL-8, levando a morte celular (NAVARRO et al., 2018). A toxina beta (CPB) pertence a família α-hemolisina, aderem-se as células endoteliais, formando poros do tipo β na membrana plasmática das células, permitindo o influxo de cálcio, sódio e cloreto (NAGAHAMA et al., 2015).

A enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE) é responsável por proporcionar diarreia e cólicas em humanos (SHRESTHA et al., 2016), produz poros na membrana das células, ocorrendo o influxo cálcio, desencadeando apoptose nas células (CHAKARBARTI et al., 2005). Já a Toxina épsilon (ETX), presente apenas no tipo B, forma de poros na membrana, e a toxina Iota (ITX), encontrada em cepas do tipo E, levando a apoptose e necrose em células alvos (GOHARI et al., 2021).

A forma subclínica da EN, ganha destaque em razão ao impacto econômico na avicultura, pelo do baixo ganho de peso e piora da conversão alimentar nas aves (CRAVENS et al., 2013). Em casos de quebra de barreira intestinal, o CP alcança a corrente sanguínea e pode acometer o fígado, gerando quadros de colangiohepatite, desenvolvendo hepatomegalia, consistência firme, coloração pálida e presença de focos necróticos amarelos, aumentando as condenações de fígado nos abatedouros (COOPER et al., 2013). A forma clínica ocorre em frangos de corte de duas a cinco semanas de vida, observando sinais como depressão severa, diminuição do apetite, diarreia escura, penas eriçadas e alta mortalidade, que pode chegar a 1% por dia nas granjas (WADE e KEYBURN., 2015).

É descrito que o baixo ganho de peso e a concentração de bactérias totais no intestino é proporcional a gravidade das lesões intestinais nas aves com EN (YANG et al., 2021). Aves com EN apresentam lesões variadas em extensão e gravidade, podendo ser focais, multifocais a coalescentes, em casos graves, as lesões podem ser encontradas em todo o intestino delgado, mais comumente na região proximal do jejuno (SMYTH, 2016).

Observa-se distensão por gás, presença de líquido com odor fétido, parede intestinal delgada e friável, áreas de necrose, com presença de pseudomembrana

amarelada ou esverdeada, conforme o quadro se agrava torna-se uma pseudomembrana diftérica acastanhada, além de úlceras na mucosa intestinal e presença de sangue (OLKOWSKI et al., 2006; PRESCOTT et al., 2016), sendo as mesmas lesões observadas em casos subagudos e crônicos, porém, com a parede intestinal espessada de forma grave. Na forma subclínica é observada ulcerações focais a coalescentes, circulares ou irregulares com 1 a 2 mm de diâmetro (COOPER et al., 2013).

Após a adesão do CP a mucosa, as toxinas produzidas permeiam até lâmina própria, causando lise e descamação de enterócitos das vilosidades e criptas, induzindo necrose e trobose dos vasos na mucosa e submucosa, pode ocorrer isquemia, além de colonização e multiplicação do CP que produz toxinas, que se difundem pela mucosa, atingindo até a camada muscular do intestino, sendo possível observar na microscopia necrose coagulativa (ZACHARY, 2017), material necrótico eosinófilico com aglomerado bacteriano e infiltrado heterofílico (SMYTH, 2016), congestão e hemorragia (OLKOWSKI et al., 2006). É também observado espessamento epitelial, aumento da lâmina própria, infiltração de plasma celular no epitélio devido a infiltração de células inflamatórias, gerando aumento do número de células caliciformes (BELOTE et al., 2018).

As lesões iniciam na matriz extracelular e junções celulares, provocando danos a mucosa e estimulando a liberação de colagenases bacterianas e metaloproteinases (IMMERSEEL et al., 2008), proporcionando danos na membrana basal das vilosidades, na região lateral dos enterócitos extendendo na lâmina própria, bem como achatamento das criptas, nos casos mais graves, a necrose se estende para a mucosa muscular (OLKOWSKI et al., 2006).

O epitélio intestinal funciona como uma barreira, na qual os enterócitos são ligados por junções que controlam a permeabilidade intestinal (NEISH, 2002), compostos por células caliciformes, enterócitos e linfócitos intraepiteliais (IELs) (ABD EL-HACK et al., 2022). Para determinar a integridade do intestino das aves, é realizado a morfometria das células intestinais, avaliando a altura das vilosidades e a profundidade das criptas (SANCHES et al., 2020).

As vilosidades intestinais possuem um papel importante na absorção dos alimentos, pelo aumento da área de superfície, intensificando o contato com o conteúdo presente no lúmen, sendo renovadas através das criptas (CRAWLEY et al., 2014). O CP pode alterar a morfologia intestinal, reduzindo a altura das vilosidades,

aumentando a profundidade das criptas (DANESHMAND et al., 2020) e diminuindo a relação vilo/cripta, com isso, ocorre aumento dos gastos metabólicos para renovação do epitélio intestinal, diminuindo a absorção de nutrientes pelo intestino (NEVEL et al., 2005).

Os iIELs, desempenham um papel de proteção frente à infecção intestinal e atuam como moduladores na apresentação de antígenos (IERARDI et al., 2017). Auxiliam na manutenção da barreira na mucosa intestinal (INAGAKI-OHARA et al., 2006) e estão presentes entre as células epiteliais, sendo um iIELs para cada 10 enterócitos (KAER e OLIVARES-VILLAGOMEZ, 2018).

Já as células caliciformes são especializadas na produção de muco, constituído principalmente por glicoproteínas, com oito genes participantes na produção desta substância nas aves (Muc2, Muc5ac, Muc5b, Muc6 Muc13, Muc16 e Muc1e ovomucina), que recobre as células epiteliais intestinais, protegendo contra a adesão de patógenos à mucosa intestinal (ABD EL-HACK et al., 2022), diminuindo processos inflamatórios, penetração de bactérias nas criptas e translocação para o interior das células epiteliais (JOHANSSON et al., 2008). Em casos de enterite necrótica, pode ocorrer aumento da secreção de muco (ZAYTSOFF et al., 2020), pelo estímulo da expressão de Muc2 nas células caliciformes (DANESHMAND et al., 2020), todavia, outro estudo mostrou uma menor expressão de MUC2 em aves desafiadas com CP e *Eimeria* spp, sugerindo que os níveis de muco diminui conforme aumenta a lesão intestinal, dificultando o reestabelecimento da camada de muco protetor no epitélio (FORDER et al., 2012). A diferença nos resultados de expressão de mucina, entre os estudos descritos na literatura, pode ser consequência dos diferentes modelos de protocolos utilizados no qual variam os fatores predisponentes utilizados (ABD EL-HACK et al., 2022).

Para o desenvolvimento das lesões intestinais, experimentalmente, são necessários fatores predisponentes que alteram a taxa de passagem do conteúdo e consequentemente a microbiota intestinal, diminuição da resposta imune das aves e que causam danos a mucosa intestinal (SILVA et al., 2015). O aumento da densidade nos galpões, manejo deficiente e coccidiose podem aumentar os casos de enterite necrótica (HERMANS e MORGAN, 2007), entre esses fatores, destaca-se a coccidiose.

A coccidiose é causada por parasitas do gênero *Eimeria* spp., sendo que algumas espécies causam doença mais grave como *E. brunetti, E. maxima, E.*

necatrix, E. tenella e mais brandas como *E. acervulina, E. mitis, E. praecox*. A utilização de vacina de coccidiose é importante pelos danos à mucosa intestinal produzidos pelos coccidios, causando extravasamento de proteínas no lúmen intestinal, induzindo uma resposta inflamatória que aumenta a produção de muco intestinal (COLLIER et al., 2008), desencadeando um ambiente propício para o crescimento do CP e produção de toxinas (IMMERSEEL et al., 2008).

Para que ocorra as lesões de EN, a administração da vacina de coccidiose deve ser feita 10 vezes a dose recomendada pelo fabricante em até cinco dias antes do desafio com CP para que o dano intestinal coincida com o desafio da bactéria (SHOJADOOST et al., 2012). A presença de fatores estressante podem reduzir a capacidade de resposta imune adaptativa, dificultando a eliminação da infecção e aumenta a população de CP no intestino das aves (CALEFI et al., 2019). Fatores imunossupressores também auxiliam no desenvolvimento da EN (TSIOURISET, 2016).

Experimentalmente para gerar imunussupressão pode-se utilizar administração da vacina da doença de Gumboro 10 vezes a dose recomendada pelo fabricante (SHOJADOOST et al., 2012). A doença de Gumboro é causada pelo Vírus da Doença Infecciosa da Bursa, este vírus replica-se em células linfóides e macrófagos no intestino, alcançando a circulação, levando a viremia primária. Na viremia primária o vírus replica-se em linfócitos e macrófagos dos tecidos linfóides do intestino (GALT), já na viremia secundária, inicia a destruição dos linfócitos circulantes nos tecidos linfoides secundários, as aves tonam-se imunocomprometidas e suscetíveis a infecções secundária (WAGARI, 2021).

Na doença de Gumboro observa-se danos a integridade do intestino, sendo capaz de diminuir a altura das vilosidades em todo intestino delgado, reduzir a contagem de linfócitos intraepiteliais ao longo do tempo no intestino delgado e a contagem de células caliciformes no duodeno (WANG et al., 2009).

Outro fator utilizado na indução da EN, são dietas com alta concentração de polissacarídeos não amiláceos, com farinha de peixe, trigo e cevada (COOPER et al., 2009) que aumentam a viscosidade da digesta e prolonga o tempo de passagem do conteúdo, deixando a microbiota favorável para desenvolvimento do CP (ANNETT et al., 2002).

É proposto que fatores de virulência e regulação gênica, também estão ligados na indução da doença (CHALMERS et al., 2007). A variabilidade da atividade da

toxina NetB entre as amostras de CP, esta relacionada a expressão gênica e outros fatores que influenciam diretamente na virulência, demonstrando a importância da toxina NetB na patogênese da EN (HUSTÁ et al., 2021), além do mais, a utilização de cepas com características de virulência bem preservadas, isoladas de surtos de EN, pode ser cruciais na indução experimental da doença (REDONDO et al., 2016).

Mesmo que a cepas sejam positivas para *netB*, ocorre variação na produção desta toxina, além disso, não há uma correlação entre a produção *in vitro* e *in vivo* desta toxina (KYUNG-WOO et al., 2020). Outros fatores influenciam na virulência da cepa, como por exemplo o locus VR-10A, relacionado a colonização intestinal pela adesão a matriz extracelular, além de outros genes que codificam adesinas, bacteriocinas e cápsulas (LACEY et al., 2016).

A adesão do CP a mucosa intestinal, promove a liberação de toxinas e produção de toxinas citotóxicas e NetB, em contrapartida, a ausência do gene *netB* não descarta a possibilidade de indução de lesões típicas de enterite necrótica, demonstrando que há outros fatores envolvidos na patogênese da doença (PARENT et al., 2017), como por exemplo alteração na microbiota intestinal das aves pela infecção com CP (STANLEY et al., 2012), que competem por sítios de ligação e nutrientes com clostrídios residentes da microbiota (LACEY et al., 2018). A translocação de cepas de CP comensais, pelas cepas patogênicas dos sítios de ligação no intestino, também constituí uma importante etapa da patogênese da doença (LACEY et al., 2016), demonstrando que a diversos fatores influenciam na gravidade e indução da EN.

Para compreensão da patogênese da EN e seu controle, é necessário a indução experimental da doença, porém, por se tratar de uma doença complexa e multifatorial, é relatado na literatura dificuldade na indução da doença e conclusões contraditorias entre pesquisadores (BROOM et al., 2017), necessitando de fatores como dieta rica em proteínas, infecção com coccidiose e imunossupressão, com isso, muitos pesquisadores realizam um experimento piloto para indução da EN (SHOJADOOST et al., 2012), além disso, uma compreensão mais definida dos fatores predisponentes, pode auxiliar a melhorar os modelos experimentais para estudo da EN.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os fatores predisponentes em frangos de corte alimentados com dieta a base de trigo, desafiados com três cepas de *Clostridium perfringens* associados a administração de 10 vezes a dose da vacina de coccidios e/ou Gumboro, para indução de enterite necrótica.

3.2. Objetivos específicos

Comparar diferentes escores de lesão macroscópica proposto por Cravens et al. (2013) com modificações, Dahiya et al. (2005), e Teirlynck et al. (2011)

Quantificar bacterias aerobicas e anaerobicas do fígado das aves em todos os grupos.

Avaliar as alterações morfométricas do intestino dos diferentes grupos.

Avaliar a contagem de linfócitos intraepiteliais do intestino delgado e células caliciformes do íleo das aves.

Avaliar a diferença do escore de lesão microscópico nos grupos desafiado com *Eimeria* spp.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Extração e PCR das amostras de *Clostridium perfringens*

As cepas de CP foram cultivadas em caldo *Brain Heart Infusion* (Difco®) a 37ºC *overnight* em anaerobiose utilizando GasPak™ (BD), posteriormente foi realizada a extração do DNA utilizando Kit PureLink™ Genomic DNA Mini (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. A Polymerase Chain Reaction (PCR) foi realizada utilizando os primers NetB (*netB*), de acordo com Keyburn et al. (2010) e α-toxin (*plc*) de acordo com Rood et al. (2018). As amplificações foram realizadas em um termociclador Techne (STONE, Inglaterra), e os produtos amplificados foram observados em gel de agarose (1,5%) corados com gelred biotium em transiluminador Loccus.

4.2. Grupos experimentais

Frangos de corte (n=94), mistos, linhagem Ross 308, com um dia de vida (ddv) foram alojados em gaiolas experimentais (0,9 m x 1,20m e 0,5 de altura) no Infectório do Laboratório de Medicina Aviária da Universidade Estadual de Londrina (LMA-UEL), onde receberam água e alimento *ad libitum* e aquecimento conforme as exigências

fisiológicas. As gaiolas foram forradas com papel pardo e adicionado em seu interior maravalha, previamente fumigada com paraformaldeído, para mimetizar as condições de reinfecção que acontecem nas granjas de frangos. O projeto foi enviado e aprovado pelo ao comitê de ética da Universidade Estadual de Londrina Nº protocolo 019.2021.

Os animais foram divididos em 11 grupos descritos na Tabela 1.

TABELA 1- Descrição dos grupos, G1-controle negativo; G2- CP13 + *Eimeria* spp.; G3- CP13 + IBVD.; G4- CP13 + *Eimeria* spp. + IBVD; G5- CP14 + *Eimeria* spp.; G6- CP14 + IBVD; G7- CP14 + *Eimeria* spp. + IBVD; G8- CP03 + *Eimeria* spp.; G9- CP03 + IBVD; G10- CP03 + *Eimeria* spp. + IBVD; G11- *Eimeria* spp.

Grupo	Descrição	N
G1	Controle negativo (aves não desafiadas)	6
G2	CP13 + *Eimeria* spp.	9
G3	CP13 + IBVD	9
G4	CP13 + *Eimeria* spp. + IBVD	9
G5	CP14 + *Eimeria* spp.	9
G6	CP14 + IBVD	9
G7	CP14 + *Eimeria* spp. + IBVD	9
G8	CP03 + *Eimeria* spp.	9
G9	CP03 + IBVD	9
G10	CP03 + *Eimeria* spp. + IBVD	7
G11	*Eimeria* spp.	9
Total		94 aves

*CP- *Clostridium perfringens,* IBVD- Vírus da Doença Infecciosa da Bursa

4.3. Infecção experimental

4.3.1. Dieta experimental

A dieta experimental foi a base de milho e farelo soja até sete dias de vida (ddv) e posteriormente a dieta a base de trigo (62,75%) e farelo de soja (29,6%) com a finalidade de proporcionar condições favoráveis para o desenvolvimento de *Clostridium perfringens.*

4.3.2. Desafio com vacina de Coccidiose e Gumboro

Aos 13 ddv as aves dos grupos G2, G4, G5, G7, G8, G10 e G11 foram desafiadas com um mL via gavagem, da vacina comercial Bio-Coccivet® (Biovet, São Paulo, Brasil), constituída de oocistos esporulados e vivos de *E. acervulina, E. brunetti, E. máxima, E. necatrix, E. praecox, E. tenella e E. mitis* adotando como dose 10 vezes a recomendação do fabricante (SHOJADOOST et al., 2012).

Aos 14 ddv as aves dos grupos G3, G4, G6, G7, G9 e G10 receberam, via subcutânea, um mL da vacina Poulvac® Magniplex (Zoetis, São Paulo, Brasil), frente

a Doença Infecciosa da Bursa, liofilizada de vírus vivo com baixa atenuação (cepa forte), 10 vezes a dose recomendada pelo fabricante (COOPER e SONGER, 2009).

4.3.3. Preparo do inóculo e desafio com Clostridium perfringens

Foram utilizados neste estudo amostras de *C. perfringens* tipo G (*plc* e *net*B positivo) pertencente a bacterioteca do Laboratório de Ornitopatologia- FMVZ Unesp (CP13 e CP14) e uma do Laboratório de Medicina Aviária- UEL (CP03). No 15º a 19º ddv as aves pertencentes aos grupos G2, G3 e G4 foram desafiadas via gavagem com o CP13, G5, G6 e G7 com CP14 e G8, G9 e G10 com a cepa CP03, duas vezes ao dia (um mL em cada momento) para indução de EN. As aves do G1 receberam um mL de caldo BHI estéril.

Para o preparo do inóculo, as cepas de CP foram cultivadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Difco™) e incubadas em anaerobiose utilizando o kit comercial GasPak™ *overnight* a 37ºC (VAN DAMME et al., 2020), posteriormente uma alíquota da cultura (sendo realizado um *pool* do inóculo administrado no período da manhã e da tarde) foi reservada para realização de microdiluição seriada seguida de plaqueamento por *spread plate* em Agar Shahadi-Ferguson Perfringens (SFP) (Difco™), para quantificação do inóculo. Os inóculos fornecidos do CP13, CP14, CP03, foram de $3{,}2x10^7$, $4{,}3x10^7$, $3{,}51x10^7$ UFC/mL, respectivamente.

4.4. Avaliação macroscópica do intestino

Aos 20 ddv as aves foram eutanasiadas por deslocamento cervical e autopsiadas a fim de determinar o escore de lesão macroscópica intestinal em cada um dos grupos. A aparência macroscópica do intestino foi avaliada de forma duplo cega, aplicando-se três metodologias de escores, propostas por Cravens et al. (2013) com modificações, tabela 2, Dahiya et al. (2005), tabela 3 e Teirlynck et al. (2011), tabela 4.

TABELA 2. Escore de lesão adotado para avaliar as lesões observadas no intestino das aves, descrito por Cravens et al. (2013)

ESCORE	Característica das lesões intestinais
0	NORMAL: ausência de lesões de enterite necrótica, o intestino delgado tem elasticidade normal (retorna a posição normal após ser aberto).
1	LEVE: a parede do intestino delgado é fina e flácida (permanece plana após a abertura), muco espesso recobrindo mucosa intestinal; congestão de vasos da serosa, discreta hiperemia de mucosa.
2	ENTERITE NECRÓTICA DISCRETA: 1 a 6 úlceras discretas (*necrotic enteritis pocks)* e/ou necrose da parede intestinal); hiperemia moderada e edema; excesso de muco e conteúdo coloração alaranjada.
3	MODERADAS ERUPÇÕES/ÁREAS DE ENTERITE NECRÓTICA: mais de 6 pequenas úlceras ou erupções coalescentes. Hiperemia acentuada e/ou áreas hemorrágicas, depósito discreto de fibrina.
4	GRAVE: área extensa de necrose e ulceração da membrana do intestino delgado, hemorragia significativa, camada de fibrina e detritos necróticos na membrana mucosa (*Turkish towel appearance*).
5	MORIBUNDO: Ave gravemente debilitada, que provavelmente morreria dentro de 24 h. Na necropsia observa-se lesão de enterite necrótica pontuação de 2 ou mais.

TABELA 3**.** Escore de lesão adotado para avaliar as lesões observadas no intestino das aves, descrito por Dahiya et al. (2005)

ESCORE	Característica das lesões intestinais
0	Ausência de lesões de enterite necrótica
0,5	Congestão severa dos vasos da serosa e mesentério repleto de sangue
1	Excesso de muco, conteúdo alaranjado, parede fina e intestinos friáveis com pequenas petéquias (> 5)
2	Lesões necróticas focais
3	Placas de necrose (1 a 2 cm de comprimento)
4	Necrose difusa típica de casos de campo

TABELA 4**.** Escore de lesão adotado para avaliar as lesões observadas no intestino das aves, descrito por Teirlynck et al. (2011)

ESCORE	Característica das lesões intestinais
0	Intestino com aparência macroscópica normal
1	Edema intestinal
2	Presença de inflamação na região cranial ao divertículo de Meckel
3	Fragilidade intestinal visível macroscopicamente na região cranial ao divertículo de Meckel
4	Perda do tônus intestinal ao corte 3 segundos após a incisão na região cranial ao divertículo de Meckel
5	Volume de conteúdo intestinal anormal, cranialmente ao divertículo de Meckel
6	Inflamação caudal ao divertículo de Meckel
7	Fragilidade intestinal visível macroscopicamente na região caudal ao divertículo de Meckel
8	Perda do tônus intestinal ao corte 3 segundos após a incisão na região caudal ao divertículo de Meckel
9	Volume de conteúdo intestinal anormal, posterior ao divertículo de Meckel
10	Presença de alimento não digerido no cólon

4.5 Colheita do fígado para quantificação de bactérias em aerobiose e anaerobiose

Aos 20 ddv, foi realizada a colheita do fígado das aves (n=94) na perspectiva de avaliar se houve quebra de barreira e translocação intestinal de bactérias aeróbicas e anaeróbicas, realizado de acordo com Latorre et al. (2018), com algumas modificações. Uma porção do lobo caudal direito do fígado foi colhido de forma asséptica e acondicionados em recipiente estéreis, em seguida foi adicionado caldo BHI no fígado, na proporção 1:10, e posteriormente 100 µl da amostra foi plaqueada por *spread plate* para quantificação em ágar MacConkey (MC) incubada 37°C/24h em aerobiose e no ágar SFP em anaerobiose a 37°C/24h. A translocação bacteriana foi expressa em unidades formadoras de colônias (UFC/g).

4.6 Avaliação microscópica do intestino

As amostras (n=6/grupo) de duodeno, jejuno e íleo foram colhidos pela técnica de *Swiss roll* (Souza et al., 2020) e posteriormente submersos em formol tamponado (10%) por 24 h, em seguida, os cortes histológicos foram acondicionados em etanol (70%), e os tecidos desidratados em série graduada de álcool, clareados e diafanizados por xilol e incluídos em parafina para realização dos cortes de 5 µm posteriromente foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise

histológica.

4.6.1 Morfometria intestinal

O estudo morfométrico da altura das vilosidades foi realizado utilizando software de análise de imagem (software Motic Image Plus 2.0, Motic Instruments, Richmond, Canadá), sendo a altura das vilosidades feitas a partir da região basal, que coincide com a porção superior das criptas até o ápice. Foram medidas 30 vilosidades e criptas de forma aleatória em cada lâmina no duodeno, jejuno (ampliação de 2,5X) e íleo (ampliação de 10X) (SOUZA et al., 2021).

4.6.2 Contagem de células caliciformes do íleo

A contagem de células caliciformes, foi realizada utilizando microscópio óptico (Motic Instruments, Richmond, Canadá) de acordo com Souza et al (2021). As lâminas do íleo foram coradas com Alcian Blue e realizado a leitura de 15 vilos por lâmina (amplificação 20x).

4.6.3 Contagem de linfócitos intraepitelias do intestino delgado

As contagens dos linfócitos intraepiteliais foram realizadas utilizando a objetiva de 40x de 12 vilosidades do íleo escolhidas aleatoriamente, utilizando microscópio óptico (Motic Instruments, Richmond, Canadá) em tecidos corados com HE (SOUZA et al., 2021)

4.6.4 Escore de lesão microscópico do intestino

Foi realizada a avaliação do escore de lesão micróscopico do segmento duodenal e jejunal, do grupo controle negativo (G1) e dos grupos em que foram administrados CP+*Eimeria* spp. (G2, G5, G8, G11), devido aos danos causados por esse parasita no intestino das aves.

As alterações histológicas foram avaliadas por meio de uma escala de pontuação de lesão, considerando a intensidade da lesão conforme descrito por Terciolo et al. (2019). O escore da lesão foi estabelecido considerando o grau de gravidade (fator de gravidade) e a extensão de cada lesão (de acordo com a intensidade ou frequência observada, pontuada de 0 a 3). Para cada lesão, o escore da extensão foi multiplicado pelo fator de gravidade.

Os seguintes critérios morfológicos e lesionais foram incluídos no escore: achatamento dos enterócitos, atrofia e fusão das vilosidades, edema intersticial, dilatação dos vasos linfáticos, perda de enterócitos apicais, vacuolização celular e detritos necróticos.

5 ANÁLISE ESTATISTICA

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para um delineamento em blocos casualizados, com dois blocos, 11 grupos e seis repetições, seguido do teste post-hoc de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa RStudio versão 2021.09.1-372 (Boston, MA, EUA).

6 RESULTADOS

6.1 Infecção experimental

As amostras de *Clostridium perfringens* utilizadas neste estudo foram confirmadas como tipo G, positivas para *netB* e alfa toxina.

A partir do segundo dia de desafio observou-se aglomeração das aves nas gaiolas, diarreia, hiporexia, apatia, depressão, principalmente nos grupos G4 (CP13+IBVD+*Eimeria* spp.), G7 (CP14+IBVD+*Eimeria* spp.) e G10 (CP03+IBVD+*Eimeria* spp.). Também foi observado desuniformidade das aves desafiadas em relação aos animais do grupo controle negativo (Figura.1), sendo esta característica mais evidente nas aves do G3 (CP13+IBVD) e G10 (CP03+IBVD+*Eimeria* spp.).



Figura 1. Presença de desuniformidade entre os grupos em relação ao controle negativo. G1-controle negativo; G2- CP13 + *Eimeria* spp.; G3- CP13 + IBVD.; G4- CP13 + *Eimeria* spp. + IBVD; G5- CP14 + *Eimeria* spp.; G6- CP14 + IBVD; G7- CP14 + *Eimeria* spp. + IBVD; G8- CP03 + *Eimeria* spp.; G9- CP03 + IBVD; G10- CP03 + *Eimeria* spp. + IBVD; G11- *Eimeria* spp.

6.2 Avaliação macroscópica do intestino

O escore de lesões intestinais macroscópicas (Tabela 5) diferiu

significativamente (P≤0,05) entre os três modelos aplicados (Dahiya et al., 2005; Cravens et al., 2013 e Teirlynck et al., 2011), observou-se a maior média (2.58) para o modelo de Teirlynck et al. (2011).

TABELA 5. Média do escore de lesão macroscópica segundo a metodologia de Cravens et a.l (2013), Dahiya et al. (2005) e Teirlynck et al. (2011), dos diferentes grupos.

Grupos	Metodologia		
	Cravens et al. (2013)	Dahiya et al. (2005)	Teirlynck et al. (2011)
G1	1,33[a]	0,75[a]	2,75[a]
G2	1,23[b]	0,56[b]	2,89[a]
G3	1,73[a]	0,80[a]	3,45[a]
G4	0,84[b]	0,39[b]	1,67[b]
G5	0,78[b]	0,53[b]	2,78[a]
G6	1,17[b]	0,58[b]	2,56[a]
G7	0,95[b]	0,64[b]	1,78[b]
G8	1,62[a]	0,89[a]	3,34[a]
G9	1,00[b]	0,62[b]	2,23[b]
G10	0,86[b]	0,43[b]	2,43[a]
G11	1,12[b]	0,67[b]	2,56[a]
Média	1,15[B]	0,62[C]	2,58[A]

G1-controle negativo; G2- CP13 + *Eimeria* spp.; G3- CP13 + IBVD.; G4- CP13 + *Eimeria* spp. + IBVD; G5- CP14 + *Eimeria* spp.; G6- CP14 + IBVD; G7- CP14 + *Eimeria* spp. + IBVD; G8- CP03 + *Eimeria* spp.; G9- CP03 + IBVD; G10- CP03 + *Eimeria* spp. + IBVD; G11- *Eimeria* spp. [a, b] Diferentes Letras minúsculas na coluna indicam diferença significativa (p ≤0.05) entre os tratamentos. Teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5%. Letras maiúsculas entre as linhas indicam diferença significativa entre os grupos. Teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5%.

Seguindo o modelo descrito por Cravens et al. (2013), ao utilizar cepas distintas de CP (CP13, CP14, CP03) associadas a vacina de *Eimeria* spp., foi encontrado diferença significativa, sendo que G8 (CP03+*Eimeria* spp.) apresentou a maior média (1,62) para as lesões macroscópicas intestinais diferenciando significativamente de G2 (CP13+*Eimeria* spp.) (1,23) e G5 (CP14 + *Eimeria* spp.) (0,78). Todavia, ao associar as cepas de CP com IBDV, observamos que o grupo G3 (CP13+IBVD) apresentou a maior média (1,73) e diferenciou significativamente dos grupos G6 (CP14+IBVD) e G9 (CP03+IBVD) com médias de 1,17 e 1,00 respectivamente.

No modelo Cravens et al., (2013), ao analisarmos a cepa CP13 frente aos fatores predisponentes, *Eimeria* spp., IBDV e *Eimeria* spp+IBDV, observamos que a associação com IBVD (G3) apresentou maior escore de lesão diferenciado dos demais (G2 e G4). Entretanto, este comportamento não foi observado para a cepa CP03, em que, o grupo G8 (CP03+ *Eimeria* spp) apresentou a maior média (1,62), diferindo dos grupos CP03+IBVD e CP03+*Eimeria* spp.+IBDV. Já a cepa CP14 não

apresentou diferença significativa entre nenhum dos fatores avaliados. Indicando que existe uma alteração do comportamento da cepa, do ponto de vista de intensidade do escore de lesão, a depender do fator predisponente envolvido.

Os resultados analisados frente ao modelo de Dahiya et al. (2005) corroboram com o modelo de Cravens et al., (2013), em que o grupo G8 (CP3+*Eimeria* spp.) apresentou a maior média, 0,89, e diferiu significativamente de G2 (CP13+ *Eimeria* spp.) (0,56) e G5 (CP14+ *Eimeria* spp.) (0,53). Para o fator IBDV, o grupo G3 apresentou a maior média (0,80), diferenciando significativamente dos grupos G6 (CP14 + IBVD) (0,58) e G9 (CP03 + IBVD) (0,62). No que tange a avaliação das diferentes cepas de CP, a associação do CP13+ IBVD apresentou maior média, 0,80, enquanto CP03+ *Eimeria* spp. apresentou a maior média (0,89), e a cepa CP14 independente do fator predisponente não diferenciou entre si.

No modelo proposto por Teirlynck et al. (2011), ao avaliarmos o efeito exclusivo do fator *Eimeria* spp. entre os tratamentos, não observamos diferença significativa entre G2 (CP13+*Eimeria* spp.) (2,89), G5 (CP14+ *Eimeria* spp.) (2,78) e G8 (CP03+ *Eimeria* spp.) (3,34). Ao analisarmos a variável IBVD, o grupo G3 (CP13+IBVD) e G6 (CP14+IBVD) não diferiram entre si, e apresentaram as maiores médias, 3,45 e 2,56, respectivamente, todavia, diferiram significativamente do grupo G9 (CP03+IBVD) com média 2,23.

Ao avaliarmos o efeito das cepas de CP, seguindo o modelo de Teirlynck et al. (2011), os grupos G2 (CP13 + *Eimeria* spp.) G3 (CP13 + IBVD), apresentaram maiores médias de lesão, 2,89 e 3,45 respectivamente e diferiram significativamente do grupo CP13+*Eimeria* spp.+ IBVD (1,67). Nos grupos desafiados com CP14 a maior média de lesão encontrada foi no G5 (CP14+*Eimeria* spp.) (2,78) e G6 (CP14 + IBDV) (2,56) os quais diferiram de G7 (1,78). Já no desafio com o CP03 as maiores médias de lesão foram encontradas no grupo CP03+*Eimeria* spp. (3,34) e CP03+*Eimeria* spp.+IBVD (2,43), que diferiu significativamente de CP03+IBVD (2,23), comportamento distinto daquele observado para as cepas CP13 e CP14.

6.3 Quantificação de bactérias aeróbicas e anaeróbicas do fígado

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados das médias da quantificação de bactérias aeróbicas e anaeróbicas no fígado das aves, remetendo ao aumento da permeabilidade e quebra de barreira intestinal.

TABELA 6. Média (*Log* 10) da quantificação bacteriana em aerobiose e anaerobiose presentes no fígado das aves dos diferentes grupos

Grupos	Aeróbicas	Anaeróbicas
G1	0,78	0,75[b]
G2	1,15	2,25[a]
G3	1,48	1,23[b]
G4	1,06	2,61[a]
G5	0,461	2,26[a]
G6	0,86	2,38[a]
G7	0,58	2,65[a]
G8	0,57	1,44[b]
G9	0,22	0,88[b]
G10	0,71	2,46[a]
G11	0,51	0,99[b]

*G1- Controle negativo; G2- CP13+*Eimeria* spp.; G3- CP13+IBVD; G4- CP13+*Eimeria* spp.+IBVD; G5- CP14+*Eimeria* spp.; G6- CP14+IBVD; G7- CP14+ *Eimeria* spp.+IBVD; G8-CP03+*Eimeria* spp.; G9- CP03+IBVD; G10-CP03+*Eimeria* spp.+IBVD; G11- *Eimeria* spp..[a, b] Diferentes letras na coluna indicam diferença significativa (P ≤0.05) entre os grupos. Teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5%.

O grupo G3 (CP13+IBVD) apresentou a maior média na quantificação de bactérias aeróbicas, porém, não foi observada diferença significativa entre os grupos (P= 0.3693).

Em relação às bactérias anaeróbicas, foi observada diferença significativa entre os grupos (P≤0,05). Os grupos desafiados com CP14, G5 (CP14 + *Eimeria* spp.), G6 (CP14 + IBVD) e G7 (CP14+*Eimeria* spp+IBVD) diferiram do controle negativo, o'que sugere que o fator predisponente não influenciou nesta avaliação, sendo que o grupo G7 apresentou a maior média (2,65) entre todos os grupos. Já o CP13 associado ao IBVD (G3) e CP03+*Eimeria* spp.+IBVD (G10) favoreceram o aumento na quantificação de bactérias anaeróbicas no fígado das aves.

6.4 Avaliação microscópica do intestino

6.4.1 Morfometria intestinal

Os resultados obtidos na análise morfométrica (Figura 2), demonstraram que no duodeno houve uma diminuição significativa (P≤0,05) na altura das vilosidades nos grupos G8 (CP03+ *Eimeria* spp.), G10 (CP03+ *Eimeria* spp.+IBVD), todavia sem diferença do grupo G11 (*Eimeria* spp.), com menor média observada no grupo G10, no íleo, além desses grupos mencionados, os grupos G7 (CP14+ *Eimeria* spp.+IBVD) e G9 (CP03+IBVD) também apresentaram diferença significativa do grupo controle, sendo a menor média encontrada no G7. No jejuno, o grupo G10 (CP03+ *Eimeria* spp.+IBVD apresentou a menor média, diferenciando significamente do controle

negativo (G1).

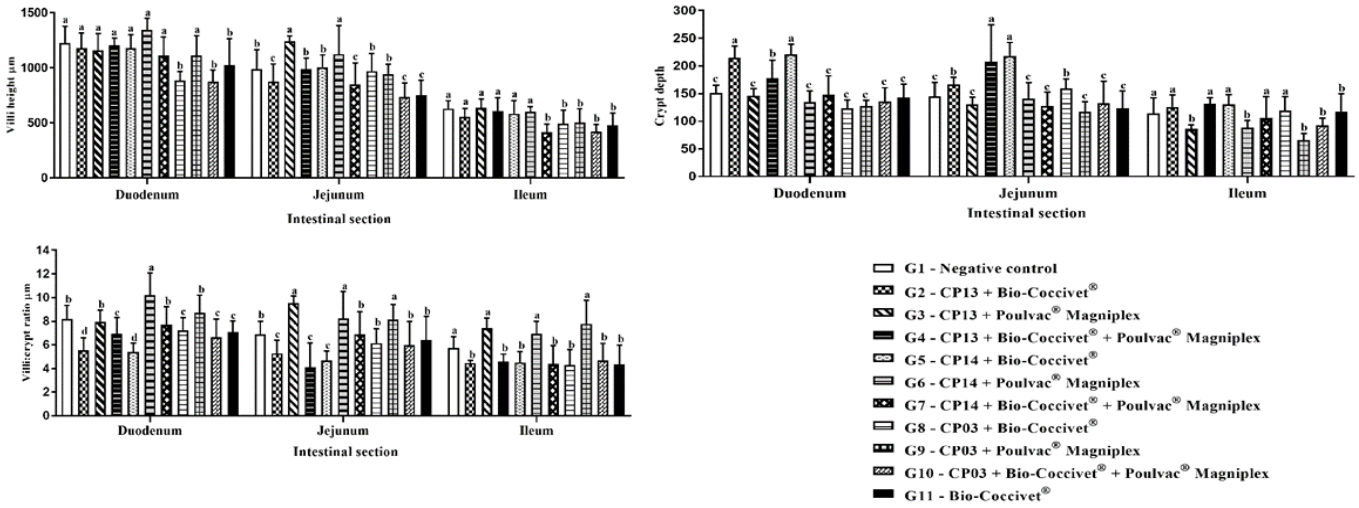


Figura 2. Média da altura das vilosidades, profundidade das criptas e relação vilo/cripta dos diferentes grupos. G1- Controle negativo, G2- CP13+*Eimeria* spp. G3- CP13+IBVD, G4- CP13+ *Eimeria* spp. +IBVD, G5- CP14+ *Eimeria* spp.; G6- CP14+ IBVD, G7- CP14+*Eimeria* spp. + IBVD, G8- CP03+ *Eimeria* spp.; G9- CP03+IBVD; G10- CP03+ *Eimeria* spp. + IBVD, G11- *Eimeria* spp.

No que se refere às criptas, no duodeno, foi encontrado maior profundidade em relação ao controle negativo nas aves desafiadas com CP13 e CP14 associado a *Eimeria* spp. G2 (CP13+*Eimeria* spp.) e G5 (CP14+*Eimeria* spp.), respectivamente. Já no jejuno, o grupo G4 (CP13+*Eimeria* spp.+IBVD) e G5 (CP14+*Eimeria* spp.) apresentaram profundidade das criptas mais acentuadas, diferenciando significativamente dos demais grupos, enquanto que no íleo, o grupo G4 obteve a maior média, todavia, sem diferença do grupo controle.

Na Figura 2, é possível observar que os grupos CP13 e CP14 associado a *Eimeria* spp., G2 e G5, respectivamente, obtiveram menor relação vilosidade/cripta (V:C) no duodeno, diferenciando significativamente do controle. No jejuno, o grupo G4 (CP13+*Eimeria* spp.+IBVD) e G5 (CP14+*Eimeria* spp.), também diferenciou significativamente do grupo controle, porém, no íleo a menor relação V:C foi observada no grupo G11 (*Eimeria* spp.).

6.4.2 Contagem de células caliciformes do íleo e linfócitos intraepiteliais do intestino delgado

Na contagem de células caliciformes do íleo, não foi observado diferença significativa entre os grupos (P>0,05), assim como, na contagem linfócitos intraepiteliais (Tabela 4), no qual, não foi observada diferença significativa nos

segmentos do jejuno e íleo (P>0,05), porém, no duodeno os grupos G5 (CP14+*Eimeria* spp.) e G8 (CP03+ *Eimeria* spp.) não diferenciaram significativamente do grupo G11 (*Eimeria* spp.).

TABELA 7. Média da cotagem de linfócitos intraepiteliais (IELs) do intestino delgado e células caliciformes do íleo das aves dos diferentes grupos

Grupos	Duodeno	Jejuno	Íleo	
	IELs	IELs	IELs	caliciformes
G1	22.6[b]	18,32	9,38	96,65
G2	26.42[b]	25,11	6,11	97,53
G3	21.54[b]	31,83	7,26	90,02
G4	24.76[b]	24,08	6,96	117,95
G5	33.56[a]	25,07	5,51	100,89
G6	28.90[b]	26,19	10,22	100,22
G7	27.12[b]	32,89	12,05	88,57
G8	38.46[a]	35	9,85	104,06
G9	28.34[b]	33,17	8,65	107,95
G10	23.79[b]	36,24	9,54	102,55
G11	39.54[a]	31,44	13,32	114,8

*G1- Controle negativo; G2- CP13+*Eimeria* spp.; G3- CP13+IBVD; G4- CP13+*Eimeria* spp.+IBVD; G5- CP14+*Eimeria* spp.; G6- CP14+IBVD; G7- CP14+ *Eimeria* spp.+IBVD; G8-CP03+*Eimeria* spp.; G9- CP03+IBVD; G10-CP03+*Eimeria* spp.+IBVD; G11- *Eimeria* spp..[a, b] Diferentes letras na coluna indicam diferença significativa (P ≤0.05) entre os grupos. Teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5%.

6.4.3 Escore de lesão microscópico do intestino

Na analise do escore microscópico, seguindo a metodologia de Terciolo et al. (2019), foi observado diferença significativa apenas no jejuno (P≤0,05). O controle negativo obteve a menor média (1,2), diferenciando dos demais grupos, sendo que o grupo G11 (*Eimeria* spp.) apresentou a maior média (8,67) não diferenciando dos grupos G2 (CP13+ *Eimeria* spp.) (5,83) e G8 (CP03+ *Eimeria* spp.) (8,17).

TABELA 8. Média do escore de lesão microscópico do duodeno e jejuno dos grupos administrados *Eimeria* spp.

Grupos	Duodeno	Jejuno
G1	1,20	1,2[c]
G2	3,17	5,83[a]
G5	2,50	4,5[b]
G8	2,83	8,17[a]
G11	2,67	8,67[a]

G1- Controle negativo; G2- CP13+*Eimeria* spp.; G5- CP14+*Eimeria* spp.; G8-CP03+*Eimeria* spp.; G11-*Eimeria* spp..[a, b, c] Diferentes letras na coluna indicam diferença significativa (P ≤0,05) entre os grupos. Teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5%.

7 DISCUSSÃO

A EN é uma das principais doenças de alto impacto econômico na indústria avícola mundial, estima-se que os custos podem chegar a $0,0625/ave, gerando perdas econômicas de aproximadamente $6 bilhões de dólares em todo mundo (WADE e KEYBURN., 2015), devido a redução de 12% do peso corporal e um aumento de 11% na taxa de conversão alimentar em relação as aves saudáveis (TSIOURISET, 2016).

O *Clostridium perfringens* (CP) é o agente responsável pela EN, a infecção desencadeia uma resposta inflamatória no intestino das aves (FASINA e LILLEHO, 2019) proporcionando desequilíbrio energético, alteração no metabolismo e no crescimento músculo esquelético (LU et al., 2021), além de proporcionar disbiose intestinal, que reduz os índices zootécnicos e cria um ambiente ideal para o desenvolvimento de outras infecções (LACEY et al., 2018; KUMAR et al., 2021).

Estudos apontam dificuldades na indução de infecção experimental de EN em frangos, e diversos fatores são utilizados para predispor o desenvolvimento da doença, sendo eles administração de *Eimeria* spp., imunossupressão, dietas com alta concentração de polissacarídeos não amiláceos e estresse térmico (BROOM et al., 2017; CALEFI et al., 2019).

Wilson et al. (2018) demonstraram experimentalmente que apenas a administração de CP às aves não é suficiente para o desenvolvimento de EN. De forma semelhante Stanley et al. (2014) reportaram que o desafio utilizando exclusivamente CP, sem associação com fatores predisponentes, não permite o estabelecimento do patógeno no intestino, expressão de sinais clínicos e mudanças significativas na microbiota das aves. Todavia, a associação de CP+ *Eimeria* spp. e dietas ricas em proteínas é capaz de modificar a microbiota e fornece um ambiente favorável para colonização do CP, aumentando o escore de lesão intestinal.

No presente estudo, ao associarmos as diferentes cepas de CP com os fatores predisponentes *Eimeria* spp.; IBVD; *Eimeria* spp.+ IBDV observamos a expressão de sinais clínicos de leve a moderado como letargia, apatia, hiporexia e ausência de mortalidade. Os sinais evidenciaram-se a partir do segundo dia de desafio bacteriano, corroborando com os resultados observados por Latorre et al. (2018), que relataram sinais clínicos semelhantes e nenhuma mortalidade durante o experimento de indução de EN nas aves. No estudo atual, os sinais foram mais evidentes nos grupos G4

(CP13+*Eimeria* spp.+IBVD), G7 (CP14+*Eimeria* spp.+IBVD) e G10 (CP03+*Eimeria* spp.+IBVD) sugerindo que a associação de *Eimeria* spp. + IBVD favoreceu a expressão dos sinais clínicos nas aves desafiadas, independente da cepa utilizada.

Em nosso estudo, para avaliarmos o escore de lesão macroscópica intestinal utilizamos os modelos propostos por Teirlynck et al. (2011), Cravens et al. (2013) e Dahiya et al. (2005), sendo encontrado diferença significativa entre as metodologias aplicadas. Um método de escore de lesão macroscópico deve abranger a gravidade da doença produzida experimentalmente, ter uma faixa razoavelmente ampla para fins de análise estatística, ser simples para que um grande número de aves possa ser examinado em um tempo razoável e ser reproduzível entre os observadores (SHOJADOOST et al., 2012).

Quando analisamos os grupos sobre a perspectiva dos diferentes modelos de escore, observamos similaridade nos resultados para o modelo Cravens et al. (2013) e Dahiya et al. (2005), todavia, no modelo Teirlynck et al. (2011) encontramos diferenças. Ao que parece este modelo foi mais apropriado para as avaliações deste estudo, já que o desafio experimental induziu lesões frequentemente observadas em quadros de disbiose, caracterizando uma condição de enterite necrótica subclínica, semelhante ao encontrado em estudos anteriores (WAEYENBERGHE et al., 2016; SHINI et al., 2021; 2020; KUMAR et al., 2022).

Experimentalmente nem sempre é possível observar lesões macroscópicas de EN (OLKOWSKI et al., 2006), o protocolo de indução influência na inflamação e gravidade das lesões intestinais (BORTOLUZZI et al., 2019), da mesma maneira, a cepa de CP, desempenham um papel importante na intensidade das lesões e gravidade da doença (MOHIUDDIN et al., 2021).

As lesões macroscópicas intestinais observadas em nosso estudo, foram predominantemente leves, e mais expressivas em duodeno e jejuno, corroborando com Liu et al. (2010). De acordo com Huang et al. (2018) os escores de lesão de EN são maiores após um dia do desafio com CP e aos sete dias as lesões são discretas. Lu et al., (2021) demonstra que, após a infecção com CP, o organismo modula estratégias, regulando positivamente componentes, como a proteína estriatina, para manter a integridade intestinal e diminuir os danos causados pela bactéria.

Não foi observado neste estudo diferenças significativas entre os grupos (G1-G11) quando fixamos a variável *Eimeria* spp. e comparamos o efeito das diferentes cepas de CP, indicando que independente da cepa de CP utilizada o resultado ao

associar *Eimeria* spp. será semelhante. Ao fixarmos a variável IBVD encontramos diferença no escore de lesão entre as cepas utilizadas, com destaque para CP13 e CP14 que apresentaram as maiores médias, indicando que existe efeito sinérgico da cepa com a variável IBVD.

Ao avaliarmos o efeito das variáveis (*Eimeri*a spp., IBDV e *Eimeria* spp.+IBVD) frente a cada cepa estudada, observamos que os fatores *Eimeria* spp ou IBVD associados a cepas CP13 e CP14, proporcionaram maior grau de lesão intestinal. Todavia, o grau de lesão mais expressivo, ao empregar CP03, foi encontrado ao associar *Eimeria* spp. ou *Eimeria* spp+IBVD, sugerindo que para cada cepa existirá um fator que intensificará o grau de lesão. A utilização de IBVD não parece favorecer a indução de lesão intestinal pela cepa CP03, o contrário foi observado pelas cepas CP13 e CP14. Estes dados corroboram com Chalmers et al. (2007) que observaram comportamento distinto ao avaliar cinco cepas de CP, sendo que apenas uma delas foi capaz de induzir um quadro compatível com EN.

No presente estudo, o grupo CP14+*Eimeria* spp+IBVD apresentou a maior média de quantificação de bactérias anaeróbicas no fígado, assim pode-se inferir que a utilização exclusiva de *Eimeria* spp. ou combinada a IBVD pode favorecer a translocação bacteriana intestinal. A presença de bactérias no fígado, remete ao comprometimento da saúde intestinal das aves (TEIRLYNCK et al., 2011).

A infecção por *Clostridium perfringens* diminui a expressão de proteínas de *tight junctions* (DANESHMAND et al., 2020) e as toxinas de CP promovem aumento da permeabilidade intestinal favorecendo a translocação bacteriana (SAITOH et al., 2015) e passagem de endotoxinas pela mucosa do trato intestinal para outros órgaos, como por exemplo o fígado (KIU e HALL, 2018). Latorre et al. (2018) observaram maior concentração de bactérias aeróbicas e anaeróbicas no fígado de aves desafiadas com CP em relação ao grupo controle, corroborando parcialmente com nosso estudo, em que encontramos diferença significativa do grupo controle, apenas na contagem de bactérias anaeróbicas.

A presença de bactérias no fígado das aves do grupo controle (G1), pode ter relação com o quadro de disbiose proporcionado pela dieta a base de trigo, já que este componente apresenta alto teor de polissacarídeos não amiláceos (CALY et al 2015; HUANG et al., 2018) e favorece a redução da taxa de passagem do conteúdo intestinal, aumento da viscosidade (ADHIKARI et al., 2020), além de fornecer carboidratos complexos para crescimento do CP (YEGANI e KORVER., 2008).

Redondo et al. (2016) também observaram lesões em aves não desafiadas com CP e alimentadas com dieta rica em proteína.

A altura das vilosidades e a profundidade das criptas tem correlação direta com a integridade intestinal (SANCHES et al., 2020). Sabe-se que as vilosidades intestinais promovem aumento da área de superfície, intensificando o contato com o conteúdo presente no lúmen, que permite uma maior absorção dos nutrientes, sendo que as criptas são responsáveis pela renovação destas células (CRAWLEY et al., 2014). O desafio com CP, pode alterar a morfologia e reduzir a altura das vilosidades intestinais (DANESHMAND et al., 2020), além de proporcionar lesões no ápice das vilosidades ou até mesmo em toda extensão (SHINI et al., 2021), o que implica em menor absorção de nutrientes, reduzindo o crescimento das aves.

No que tange a altura das vilosidades no duodeno, os grupos G8 (CP03 + *Eimeria* spp.) e G10 (CP03 + *Eimeria* spp.+IBVD) promoveram uma diminuição expressiva na altura das vilosidades intestinais, não diferindo significativamente do grupo G11 (*Eimeria* spp.). No jejuno os grupos G2 (CP13+*Eimeria* spp.) G7 (CP14+*Eimeria* spp.+IBVD) e G10 (CP03 + *Eimeria* spp.+IBVD), apresentaram menores alturas das vilosidades, também não diferindo do grupo G11 (*Eimeria* spp.). Indicando um possível efeito da infecção por *Eimeira* spp. sobre as vilosidades.

O CP causa danos a morfologia intestinal, proporcionando diminuição das vilosidades, aumento da profundidade das criptas e diminuição da relação vilo/cripta, aumentando os gastos metabólicos do *turnover* do epitélio intestinal, reduzindo a capacidade de absorção de nutrientes pelo intestino (CRIADO-MESAS et al., 2021).

Neste estudo, no duodeno, a profundidade das criptas foi mais acentuada nos grupos G2 (CP13+ *Eimeria* spp.) e G5 (CP14+ *Eimeria* spp) assim como a relação V:C, foi menor nesses grupos. Já no jejuno, os grupos G4 (CP13+ *Eimeria* spp.+ IBVD) e G5 (CP14+ *Eimeria* spp.), apresentaram maior profundidade das criptas e menor relação V:C, diferindo significativamente do grupo G11 (*Eimeria* spp), todavia, no íleo, não foi observado diferença significativa entre os grupos G5 e G11, indicando que a influência dos CPs foi maior nos segmentos do duodeno e jejuno. Esses resultados corroboram com o encontrado por M'Sadeq et al. (2015b), que observaram, vilosidades intestinais reduzidas pelo desafio com CP e *Eimeria* spp., assim como, menor relação V:C e aumento na profundidade das criptas. Golder et al. (2011) encontraram profundidade das criptas mais acentuadas no grupo com EN (*Eimeria* spp. e CP) em relação ao grupo controle negativo.

Nossos resultados corroboram com aqueles observados por Gholamiandehkordi et al. (2007) que encontraram menor relação V:C em aves desafiadas com CP e *Eimeria* spp. Indicando que os danos diretos causados pelos oocistos nos enterócitos comprometeram a morfologia intestinal. A relação vilosidade/cripta prediz a taxa de renovação da mucosa intestinal, sendo um importante indicador de saúde intestinal, uma alta relação indica uma menor renovação intestinal, constituindo-se de vilosidades mais longas e funcionalmente ativas, juntamente como criptas delgadas (M'Sadeq et al., 2015b).

Os danos intestinais causados por *Eimeria* spp. comprometem a integridade do epitélio intestinal e promovem um aumento na produção de muco e extravasamento de plasma para o lúmen intestinal que são fonte de nutrientes para crescimento do CP (ANTONISSEN et al., 2016), potencializando as lesões de EN (BORTOLUZZI et al., 2019).

A liberação de citocinas pró-inflamatórias em quadros de EN subclínica (CRIADO-MESAS et al., 2021) mobilizam heterófilos e linfócitos para o local da inflamação (COOPER e SONGER, 2009). Assim, os linfócitos intraepiteliais intestinais (iIELs), componente de defesa da imunidade do hospedeiro, desempenham um papel importante na proteção frente infecção intestinal e atuam como moduladores na apresentação de antígenos (IERARDI et al., 2017). Os iIELs estão dispostos entre as células epiteliais, sendo um iIELs para cada 10 enterócitos, conferindo um dos maiores sistemas imunológicos (KAER e OLIVARES-VILLAGOMEZ, 2018).

Ficou evidente neste estudo que a utilização exclusiva de *Eimeria* ssp. (G11) ou associada a CP14 (G5) e CP03 (G8) estimulou a população de linfócitos iIELs em duodeno. Ruhnke et al. (2017), observaram aumento no número de linfócitos intraepiteliais no intestino de frangos de corte desafiados com CP e *Eimeria* spp. Por outro lado, observamos que os grupos que receberam IBVD (G3, G4, G6, G7, G9 e G10) apresentaram uma menor contagem de iIELs no duodeno, não diferindo do controle negativo. Este comportamento pode ser explicado pelo dano proporcionado pelo IBVD sobre o sistema imune que leva a diminuição expressiva da população de linfócitos, por afetar o desenvolvimento e maturação e indução de apoptose dos linfócitos (LIAN et al., 2022).

As células epiteliais caliciformes são especializadas na produção de muco que recobrem as células epiteliais intestinais, fornecendo proteçao contra a adesão de patógenos à mucosa intestinal (ABD EL-HACK et al., 2022), diminuindo processos

inflamatórios, penetração de bactérias nas criptas e translocação para o interior das células epiteliais (JOHANSSON et al., 2008). Em casos de enterite necrótica, pode ocorrer aumento da secreção de muco (ZAYTSOFF et al., 2020), contudo, no presente estudo não foi observado diferença significativa na contagem de células caliciformes entre os grupos, corroborando com Collier et al. (2008), em que a contagem de células caliciformes não diferiu das aves do grupo controle negativo, em relação ao grupo com EN. De forma semelhante Golder et al. (2011), não observaram aumento de células caliciformes nas aves controle e desafiadas, e relacionou este fato a virulência da cepa, que não foi capaz de desencadear a proliferação de células caliciformes.

O sistema de escore de lesão microscópico auxilia na avaliação dos danos intestinais sutis, podendo ser utilizado como alternativa para verificar a diferença entre os grupos, mesmo sem lesões macroscópicas de EN visíveis no intestino (GHOLAMIANDEHKORDI et al., 2007).

No presente estudo, foi observada diferença significativa apenas no jejuno, sendo que o grupo contendo apenas *Eimeria* spp. não diferenciou de CP13+ *Eimeria* spp. e CP03+ *Eimeria* spp., sugerindo que as lesões no escore lesional microscópico estão relacionadas a administração da *Eimeria* spp. e não ao desafio por CP nas aves, além disso, foi observado presença oocistos de *Eimeria* spp. predominantemente no jejunal, reforçando a hipótese que a *Eimeria* spp. influenciou no aumento das lesões micróscopica.

As principais alterações microscópicas encontradas foram edema, congestão e infiltrado inflamatório. Sanches et al. (2020), não observaram lesões macroscópicas de enterite necrótica em aves desafiadas com CP e 15x a dose recomendada pelo fabricante da vacina frente *Eimeria* spp. já na avaliação microscópica, foi identificado congestão, infiltrado de células inflamatórias na lâmina própria e células inflamatórias no epitélio, semelhante ao encontrado em nosso estudo.

Diferentes estudos (COLLIER et al., 2008; CALEFI et al., 2019; SHOJADOOST et al., 2012) apontam que a dieta com alta concentração de polissacarídeos não amiláceos, estresse ambiental, doenças imunossupressoras e infecção por *Eimeria* spp. são fatores predisponentes importantes para o desenvolvimento de EN em frangos de corte. Contudo, a patogênese da doença ainda não é completamente esclarecida (ADHIKARI et al., 2020). Investigar a infecção por CP associado aos fatores predisponentes poderia auxiliar no esclarecimento da patogênese da enterite necrótica, bem como permitir estabelecer estratégias para o controle da doença

(STANLEY et al., 2014). No presente estudo ficou evidente que existirá um efeito sinérgico entre a cepa empregada e os fatores predisponentes, todavia, não ficou claro qual fator predisponente é mais eficaz em potencializar as lesões, sugerindo que para cada protocolo experimental seja avaliada, previamente, a associação da cepa aos fatores.

8 CONCLUSÕES

No estudo atual, foi demonstrado que há um efeito sinérgico entre a cepa empregada e os fatores predisponentes, entretanto, não ficou bem estabelecido qual fator predisponente é mais eficaz em potencializar as lesões, assim, é necessario que cada protocolo experimental seja avaliada, previamente, a associação da cepa aos fatores.

Entre os três modelos de escores macroscópicos foi observado diferença significativa, sendo que o modelo descrito por Teirlynck et al. (2011), representou melhor as lesões encontradas em nosso estudo.

Foi observado presença de bactérias aeróbicas e anaeróbicas no fígado em todos os grupos, com diferença significativa apenas na quantificação de bactérias anaeróbicas. Em relação a cepa CP14 não foi observado diferença influencia dos fatores IBVD e *Eimeria* spp., já a cepa CP13 associado ao IBVD e CP03 associado a *Eimeria* spp. e IBVD favoreceram o aumento na quantificação de bactérias anaeróbicas no fígado das aves.

Na análise morfométrica, no duodeno, jejuno e íleo foi observado que a *Eimeria* spp. teve um efeito na diminuição na altura das vilosidades. Nas análise das criptas e relação vilosidade/cripta no duodeno e jejuno, foi observado maiores profundidades e menor relação V/C nas cepas CP13 e CP14.

Na contagem dos linfócitos intraepiteliais, o fator *Eimeria* spp. também teve um efeito no aumento da contagem.

9 BIBLIOGRAFIA

ABILDGAARD, L.; SONDERGAARD, T.E.; ENGBERG, R.M.; SCHRAMM, A.; HOJBERG, O. *In vitro* production of necrotic enteritis toxin B, NetB, by netB-positive and netB-negative Clostridium perfringens originating from healthy and diseased broiler chickens. *Veterinary Microbiology*, v.29, n.144, pág.231-235, 2010.

ABD EL-HACK, M.E.; EL-SAADONY, M.T.;Y ELBESTAWY, A.R.; EL-SHALL, N.A.; SAAD, A.M.; SALEM, H.M.; EL-TAHAN, A.M.; KHAFAGA, A.F.; TAHA, A.E.; ABUQAMAR, S.F.; EL-TARABILY, K.A. Necrotic enteritis in broiler chickens: disease characteristics and prevention using organic antibiotic alternatives-a comprehensive review. **Poultry Science**, v.101, n.2, 101590, 2022.

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. Resumo do setor de Aves/O Brasil Avícola, 2018

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual, 2021.

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, pág.515-534, 2020.

ALBORNOZ, L.A.L.; NAKANO, V.; AVILA-CAMPOS, M.J.Clostridium perfringens e a enterite necrótica em frangos: principais fatores de virulência, genéticos e moleculares Clostridium perfringens and necrotic enteritis in poultry: virulence, genetic and molecular factors. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.51, n.3, p.178-193, 2014.

ANNETT, C.B.; VISTE, J.R.; CHIRINO-TREJO, M.; CLASSEN, H.L.; MIDDLETON, D.M.; SIMKO, E. Necrotic enteritis: Effect of barley, wheat and corn diets on proliferation of *Clostridium perfringens* type A. **Avian Pathology**, v.31, n.6, pág.598-601, 2002.

ANTONISSEN, G.; EECKHAUTA, V.; DRIESSCHEA, K.V.; ONRUSTA, L.; HAESEBROUCKA, F.; DUCATELLEA, R.; MOOREC, R.J.; IMMERSEEL, F.V. Microbial shifts associated with necrotic enteritis. **Avian Pathology**, v.45, n.3, 308-312, 2016.

BORTOLUZZI, C.; VIEIRA, B.S.; HOFACRE, C.; APPLEGATE, T.J. Effect of different challenge models to induce necrotic enteritis on the growth performance and intestinal microbiota of broiler chickens. **Immunology, Health and Disease**, v.98, pág. 2800-2812, 2019.

BROOM, L.J. Necrotic enteritis current knowledge and diet-related mitigation. **World's Poultry Science Journal**, v.73, n.2, pág.281-292, 2017.

CALEFI, A.S.; QUINTEIRO-FILHO, W.M.; DE SIQUEIRA, A.; LIMA, A.P.N.; CRUZ, D.S.G.; HAZARBASSANOV, N.Q.; SALVAGNI, F.A.; BORSOI, A.; GOMES, C.O.; MAIORKA, P.C. Heat stress, Eimeria spp. and C. perfringens infections alone or in combination modify gut Th1/Th2 cytokine balance and avian necrotic enteritis pathogenesis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.210, pág.28-37, 2019.

CALY, D.L.; D'INCA, R., AUCLAIR, E.; DRIDER, D. Review: alternatives to Antibiotics to Prevent Necrotic Enteritis in Broiler Chickens: A Microbiologist's Perspective. **Frontiers Microbiology**, v.6, n.1336, 2015.

CHAKARBARTI G.; MCCLANE BA. The importance of calcium influx, calpain and calmodulin for the activation of CaCo-2 cell death pathways by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Cellular Microbiology*, v.7, n.1, pág.129-146, 2005.

CHALMERS, G.; BRUCE, H.L.; TOOLE, D.L.; BARNUM, D.A.; BOERLIN, P. Necrotic Enteritis Potential in a Model System Using *Clostridium perfringens* Isolated from Field Outbreaks. **Avian diseases**, v.51, pág.834-839, 2007.

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

COLE, A.R.; MOSS, D.S.; TITBALL, R.W.; BASAK, A.K. **Molecular architecture and functional analysis of NetB, pore-forming toxin from** *Clostridium perfringens.* **Journal of Biological Chemistry**, v.288, pág.3512-3522, 2013.

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 & Immunopathology**, v.122, pág.104-115, 2008.

COOPER, K.K.; SONGER, J.G. Necrotic enteritis in chickens: A paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. **Anaerobe,** v.15, p.55-60, 2009.

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

COOPER, K.K; SONGER, J.G. Virulence of *Clostridium perfringens* in an experimental model of poultry necrotic enteritis. *Veterinary Microbiology*, vol.142, n.3, pág.23-328, 2010.

CRAVENS, R.L.; GOSS, G.R.; CHI, F.; DE BOER, E.D.; DAVIS, S.W.; HENDRIX, S.M.; RICHARDSON, J.A.; JOHNSTON, S.L. The effects of necrotic enteritis, aflatoxin B1, and virginiamycin on growth performance, necrotic enteritis lesion scores, and mortality in young broilers. **Poultry Science**, v.92, n.8, p.1997-2004, 2013.

CRAWLEY, S.W.; MOOSEKER, M.S.; TYSKA, M.J. Shaping the intestinal brush border. **Journal of Cell Biology**, v.207, n.4, pág.441-451, 2014.

CRIADO-MESAS, L.; ABDELLI, N.; NOCE, A.; FARRÉ, M.; PÉREZ, J.F.; SOLÀ-ORIOL, D.; MARTIN-VENEGAS, R.; FOROUZANDEH, A.; GONZÁLEZ-SOLÉ, F.; FOLCH, J.M. Transversal gene expression panel to evaluate intestinal health in broiler chickens in diferente challenging conditions. **Nature**, v.11, n.6315, 2021.

CRISPO, M.; SIMONE, T.S.; UZAL, F.A.; BICKFORD, A.A.; SHIVAPRASAD, H.L. Nonenteric lesions of necrotic enteritis in commercial chickens in California: 25 cases (2009–2018). **Avian Diseases**, v.64, n.3, pág.356-364, 2020.

DAHIYA, J.P.; HOEHLER, D.; WILKIE, D.C.; VAN KESSEL, A.G.; DREW, M.D.

Dietary Glycine Concentration Affects Intestinal *Clostridium perfringens* and *Lactobacilli* Populations in Broiler Chickens. **Poultry Science**, v.84, pág.1875-1885, 2005.

DANESHMAND, A.; KERMANSHAHI, H.; SEKHAVATI, M.H.; JAVADMANESH, A.; AHMADIAN, M.; ALIZADEH, M.; ALDAWOODI, A. Effects of cLFchimera peptide on intestinal morphology, integrity, microbiota, and immune cells in broiler chickens challenged with necrotic enteritis. **Nature research**, v.10, n. 17704, 2020.

DU, E.; WANG, W.; ZHUI, L. G.; GUO, S.; GUO Y. Effects of thymol and carvracol supplementationn on intestinal integrity and imune responses of broiler chickens challenged with Clostridium perfringens. **Journal of Animal Science and Biotechnology***,* v.7; p.19, 2016.

DUCATELLE, R.; GOOSSENS, E.; DE MEYER, F.; EECKHAUT, V.; ANTONISSEN, G.; HAESEBROUCK, F.; VAN IMMERSEEL, F. Biomarkers for monitoring intestinal health in poultry: present status and future perspectives. **Veterinary Research**, v. 49, n. 1, p. 43, 2018.

DÜRRE, P. From Pandora's Box to cornucopia: Clostridia -a historical perspective. In: Bahl, H, Dürre, P, editors Clostridia: biotechnology and medical applications. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH; 20011. 1–17.

FASINA, Y.O.; LILLEHOJ, H.S. Characterization of intestinal immune response to Clostridium perfringens infection in broiler chickens.**Poultry Science**, v.98, pág.188-198, 2019.

FERREIRA, J. C.; PENHA FILHO, R. A.; KUAYE, A. P. Y.; ANDRADE, L. N.; BERCHIERI JUNIOR, A.; DARINI, A. L. C. Identification and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae isolated from healthy poultry in Brazil. Infection, *Genetics and Evolution*, v.60, p. 66-70, 2018.

FORDER, R.E.A.; NATTRASS, G.S.; GEIER, M.S.; HUGHES, R.J.; HYND, P.I. Quantitative analyses of genes associated with mucin synthesis of broiler chickens with induced necrotic enteritis. **Poultry Science**, v. 91, pág.1335-1341, 2012.

GHOLAMIANDEHKORDI, A.R.; TIMBERMONT, L.; LANCKRIET, A.; BROECK, W.V.D.; PEDERSEN, K.; DEWULF, J.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model, **Avian Pathology**, v.36, n.5, pág.375-382, 2007.

GOHARI, I.M.; NAVARRO, M.A.; LI, J.; SHRESTHA, A.; UZAL, F.; MCCLANE, B.A. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence*, v.12, n.1, pág.723-753, 2021.

GOLDER, H.M.; GEIER, M.S.; FORDER, R.E.A.; HYND, P.I.; HUGHES, R.J. Effects of necrotic enteritis challenge on intestinal micro-architecture and mucin profile, British. **Poultry Science**, v.52, n.4, pág.500-506, 2011.

HERMANS, P.G.; MORGAN, K.L. Prevalence and associated risk factors of necrotic enteritis on broiler farms in the United Kingdom; a cross-sectional survey. *Avian Pathology*, v.36, n.1, pág.43-51,2007.

HORNINK, G. G.; KAWAZOE, U. **Coccidiose aviária: um parasito de galinha doméstica**. [s.l.] Universidade Federal de Alfenas, 2020.

HUANG, T.; GAO, B.; CHEN, W-L.; XIANG, R.; YUAN M-G, XU Z-H.; PENG, X-Y. Temporal Effects of High Fishmeal Diet on Gut Microbiota and Immune Response in *Clostridium perfringens*-Challenged Chickens. **Frontiers in Microbiology**, v.9, n.2754, 2018.

HUSTÁ, M.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F.; GOOSSENS, E. A. Rapid and Simple Assay Correlates *In Vitro* NetB Activity with *Clostridium perfringens* Pathogenicity in Chickens. **Microorganisms**, v.9, n.1708, 2021.

IERARDI, E.; LOSURDO, G.; IANNONE, A.; PISCITELLI, D.; AMORUSO, A.; BARONE, M.; PRINCIPI, M.; PISANI, A.; DI LEO, A. Lymphocytic duodenitis or microscopic enteritis and gluten-related conditions: what needs to be explored?.**Annals of Gastroenterology**, v.30, pág.380-392, 2017.

IMMERSEEL, F. V.; LHYS, U.; PEDERSEN, K.; PRESCOTT, J. F. Recent breakthroughs have unveiled the many knowledge gaps in *Clostridium perfringens* associated necrotic enteritis in chickens: the first International Conference on Necrotic Enteritis in Poultry. **Avian Pathology***,* v. 45, n. 3, p. 269–270, 2016.

IMMERSEEL, F.V.; BUCK, J.D.B.; PASMANS, F.; HUYGHEBAERT, G.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian Pathology**, v.33, n.6, 537-p.549, 2004.

IMMERSEEL, F. V.; ROOD, J. I.; MOORE, R. J.; TITBALL, R. W. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. *Trends in Microbiology*, v.17, n.01, p. 32-36, 2008.

INAGAKI-OHARA, K.; DEWI, F.N.; HISAEDA, H.; SMITH, A.L.; JIMI, F.; MIYAHIRA, M.; ABDEL-ALEEM, A.S.F.; HORII, Y.; NAWA, Y. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes Sustain the Epithelial Barrier Function against *Eimeria vermiformis* Infection. **Infection and Immunity**, v.74, n.9, pág.5292-5301, 2006.

JOHANSSON, M.E.V.; PHILLIPSON, M.; PETERSSON, J.; VELCICH, A.; HOLM, L.; HANSSON, G.C. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **PNAS** v.105, n.39, pág.15064-15069, 2008.

KAER, L.V.; OLIVARES-VILLAGOMEZ, D. Development, homeostasis, and functions of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Journal of Immunology**, v.200, n.7, pág.2235–2244, 2018.

KALDHUSDALA, M.; BENESTADA, S.L.; LØVLANDB, A. Review: Epidemiologic aspects of necrotic enteritis in broiler chickens - disease occurrence and production performance. **Avian Pathology**, vol.45, n.3, pág.271-274, 2016.

KEYBURN, A.L.; SHEEDY, S.A.; FORD, M.E.; WILLIAMSON, M.M.; AWAD, M.M.; ROOD, J.I.; MOORE, R.J. Alpha-Toxin of Clostridium perfringens Is Not an Essential Virulence Factor in Necrotic Enteritis in Chickens, **Infection and Immunity**, v.74, n.11, pág. 6496–6500, 2006.

KEYBURN, A.L.; YAN, X.X.; BANNAM, T.L.; VAN IMMERSEEL, F.ROOD, J.I.; MOORE, R.J. Association between avian necrotic enteritis and Clostridium perfringens strains expressing NetB toxin. *Veterinary Research*, v.41, n.21, 2010.

KIU, R.; BROWN, J.; BEDWELL, H.; LECLAIRE, C.; CAIM, S.; PICKARD, D.; DOUGAN, G.; DIXON, R.A.; HALL, L.J. Genomic analysis on broiler-associated *Clostridium perfringens* strains and exploratory caecal microbiome investigation reveals key factors linked to poultry necrotic enteritis*.* **Animal Microbiome**, v.1, n.12, 2019.

KIU, R.; HALL, L.J. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. **Emerging Microbes and Infection***,* v.7, n.141, 2018.

KRENTZ, T.; ALLEN, S. REVIEW Bacterial translocation in critical illness. **Journal of Small Animal Practice,** v.58, n.4, 2017.

KUMAR, A.; TOGHYANI, M.; KHERAVII, S.K.; PINEDA, L.; HAN, Y.; SWICK, R.A.; WU, S.B.Potential of blended organic acids to improve performance and health of broilers infected with necrotic enteritis. **Animal Nutrition**, v.7, pág.440-449, 2021.

KUMAR, A.; TOGHYANI, M.; KHERAVII, S.K.; PINEDA, L.; YANMING HAN, Y.; SWICK, R.A.; WU, S-B. Organic acid blends improve intestinal integrity, modulate short-chain fatty acids profiles and alter microbiota of broilers under necrotic enteritis challenge. **Animal Nutrition**, v.8, 82-90, 2022.

LACEY, J.A.; JOHANESEN, P.A.; LYRAS, D.; MOORE, R.J. Genomic diversity of necrotic enteritis-associated strains of *Clostridium perfringens*: a review, **Avian Pathology**, v.45, n.3, pág.302-307, 2016.

LACEY, J.A.; STANLEY, D.; KEYBURN, A.L.; FORDB, M.; CHENB, H.; JOHANESENA, P.; LYRASA, D.; MOOREA, R.J. Clostridium perfringens-mediated necrotic enteritis is not influenced by the pre-existing microbiota but is promoted by large changes in the postchallenge microbiota. **Veterinary Microbiology**, v.227, 119-126, 2018.

LATORRE, J.D.; ADHIKARI, B.; PARK, S.H.; TEAGUE, K.D.; GRAHAM, L.E.;MAHAFFEY, B.D.; BAXTER, M.F.A.; HERNANDEZ-VELASCO, X.; KWON, Y.M.; RICKE, S.C.; BIELKE, L.R.; HARGIS, B.M.; TELLEZ, G. Evaluation of the Epithelial Barrier Function and Ileal Microbiome in an Established Necrotic Enteritis Challenge Model in Broiler Chickens. **Frontiers in Veterinary Science**, v.5, n.199, 2018.

LATORRE, J.D.; HERNANDEZ-VELASCO, X.; KUTTAPPAN, V.A.; WOLFENDEN, R.E.; VICENTE, J.L.; WOLFENDEN, A.D.; BIELKE, L.R.; PRADO-REBOLLEDO, O.F.; MORALES, E.; HARGIS, B.M.; TELLEZ, G. Selection of Bacillus spp. for cellulase and xylanase production as direct-fed microbials to reduce digesta viscosity and *Clostridium perfringens* proliferation using an in vitro digestive model in different poultry diets. **Journal Frontiers in Veterinary Science**, v.2, n.25, 2015.

LEE, K.W.; LILLEHOJ, H.S.; JEOUNG, W.; JEOUNG, H.Y.; AN, D.J. Avian necrotic enteritis: experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. **Poultry Science**, v.90, pág.1381-1390, 2011.

LEE, K-W.; KIM, W.H.; LI, C.; LILLEHOJ, H.S. Detection of Necrotic Enteritis B–like Toxin Secreted by *Clostridium perfringens* Using Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Avian Diseases**, v.64, pág.490-495, 2020.

LEPP, D.; ROXAS, B.; PARREIRA, V.R.; MARRI, P.R.; ROSEY, E.L.; GONG, J.; SONGER, J.G.; VEDANTAM, G.; PRESCOTT, J.F. Identification of Novel Pathogenicity Loci in *Clostridium perfringens* Strains That Cause Avian Necrotic Enteritis. **PLoS ONE**, v.5, n.5, 2010.

LI, J.; UZAL, F.A.; MCCLANE, B.A. Clostridium perfringens sialidases: Potential contributors to intestinal pathogenesis and therapeutic targets. *Toxins***,** v.8, n.341, 2016.

LIAN, J.; WANG, Z.; XU, Z.; PANG, Y.; LENG, M.; TANG, S.; XINHENG ZHANG, X.; QIN, J.; CHEN, F.; LIN, W. Pathogenicity and molecular characterization of infectious bursal disease vírus in China. **Poultry Science**, v.101, n.101502, 2022.

LIU, D.; GUO, Y.; WANG, Z.; YUAN, J. Exogenous lysozyme influences *Clostridium perfringens* colonization and intestinal barrier function in broiler chickens, **Avian Pathology**, v.39, n.1, pág.17-24, 2010.

LU, M.; YUAN, B.; YAN, X.; SUN, Z.;, LILLEHOJ, H.S.; YOUNGSUB LEE, Y.; CALDER BALDWIN-BOTT, C.; LI, C. Clostridium perfringens-Induced Host-Pathogen Transcriptional Changes in the Small Intestine of Broiler Chickens. **Pathogens**, v.10, 2021.

MAHAFFEY, B.D.; BAXTER, M.F.A.; HERNANDEZ-VELASCO, X.; KWON, Y.M.; RICKE, S.C.; BIELKE, L.R.; HARGIS, B.M.; TELLEZ, G. Evaluation of the Epithelial Barrier Function and Ileal Microbiome in an Established Necrotic Enteritis Challenge Model in Broiler Chickens. **Frontiers in Veterinary Science**, v.5, n.199, 2018.

MCREYNOLDS, J.L.; BYRD, J.A.; ANDERSON, R.C.; MOORE, R.W.; EDRINGTON, T.S.; GENOVESE, K.J.; POOLE, T.L.; KUBENA, L.F.; NISBET, D.J. Evaluation of Immunosuppressants and Dietary Mechanisms in an Experimental Disease Model for Necrotic Enteritis. **Poultry Science,** v.83, pág.1948-1952, 2004.

MOHIUDDIN, M.; YUAN, W.; SONG, Z.; LIAO, S.; QI, N.; LI, J.; LV, M.; WU, C.; LIN, X.; HU, J.; CAI, H.; SUN, M. Experimental induction of necrotic enteritis with or without predisposing factors using *netB* positive *Clostridium perfringens* strains. **Gut Pathogens**, v.13, n.68, 2021.

MOORE, R.J. Necrotic enteritis predisposing factors in broiler chickens, **Avian Pathology**, v.45, n.3, pág.275-281, 2016.

bM'SADEQ, S.A.; WU, S-B.; CHOCT, M.; FORDER, R.; SWICK, R.A. Use of yeast cell wall extract as a tool to reduce the impact of necrotic enteritis in broilers. **Poultry Science**, v.94, pág.898-905, 2015.

M'SADEQ, S.A.; WU, S.; SWICK, R.A.; CHOCT, M. Towards the control of necrotic enteritis in broiler chickens with in-feed antibiotics phasing-out worldwide. **Animal Nutrition**, v.1, pág.1-11, 2015.

NAGAHAMA, M.; OCHI, S.; ODA, M.; MIYAMOTO, K.; MASAYA TAKEHARA, M.; KOBAYASHI, K. Recent insights into Clostridium perfringens beta toxin. *Toxins*, v.7, n.2, pág.396-406, 2015.

NAVARRO, M.A.; MCCLANE, B.A.; UZAL, F.A. Mechanisms of action and cell death associated with *Clostridium perfringens* toxins. *Toxins*, v.10, n.5, 2018.

NEVEL, C.J.V.; DECUYPERE, J.A.; DIERICK, N.A.; MOLLY, K. Incorporation of galactomannans in the diet of newly weaned piglets: effect on bacteriological and some morphological characteristics of the small intestine. **Archives of Animal Nutrition**, 59, 123-138, 2005.

OLKOWSKI, A.A.; WOJNAROWICZ, C.; CHINIO-TREJO, M.; DREW, M.D. Responses of broiler chickens orally challenged with Clostridium perfringens isolated from field cases of necrotic enteritis. **Research in Veterinary Science**, v.81, 2006

PALLIYEGURU, M.W.C.D.; ROSE, S.P. Sub-clinical necrotic enteritis: its aetiology and predisposing factors in commercial broiler production. **Journal World's Poultry Science**, v.70, n.80, pág.3-16, 2019.

PARENT, E.; ARCHAMBAULT, M.; CHARLEBOIS, A.; BERNIER-LACHANCE, J.; MARTINE BOULIANNE, M. A chicken intestinal ligated loop model to study the virulence of *Clostridium perfringens* isolates recovered from antibiotic-free chicken flocks. **Avian Pathology**, v.46, n.2, 138-149, 2017.

PARK, Y.; MOON, S.-J.; LEE, S.-W. Lineage re-commitment of CD4CD8αα intraepithelial lymphocytes in the gut. **BMB Reports**, v. 49, n. 1, p. 11, jan. 2016.

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

aPRESCOTT, J.F.; PARREIRA, V.R.; GOHARI, I.M.; LEPP, D. GONG, J. 2016. The pathogenesis of necrotic enteritis in chickens: what we know and what we need to know: a review. **Avian Pathology**, v.45, pág.288-294, 2016.

PRESCOTT, J.F.; SMYTH, J.A.; SHOJADOOST, B.; VINCE, A. Experimental reproduction of necrotic enteritis in chickens: A review. **Avian Pathology**, v.45, n.3, pág.317-322, 2016.

REDONDO, L.M.; REDONDO, E.A.; DELGADO, F.; SALA, L.F.; MIYAKAWA, M.E.F.An Experimental Reproduction of Necrotic Enteritis in Broiler Chickens. **Journal of Veterinary Science & Medicine,** v.4, n.1, 2016.

REVITT-MILLS, S.A.; VIDOR, C.J.; WATTS, T.D.; LYRAS, D.; ROOD, J.I.; ADAMS, V. Virulence plasmids of the pathogenic clostridia. **Microbiol Spectrum**, v.7, n.3, 2018.

ROOD, J.I.; ADAMS, V.; LACEY, J.; LYRAS, D.; MCCLANE, B.A.; MELVILLE, S.B.; MOORE, R.J.; POPOFF, M.R.; SARKER, M.R.; SONGER, J.G.; UZAL, F.A.; IMMERSEEL, F.V. Expansion of the Clostridium perfringens toxin-based typing scheme. **Anaerobe**, v.53, p.5-10, 2018.

ROSE, M.E.; HESKETH, P.; OGILVIE, B.M. Peripheral blood leucocyte response to coccidial infection: a comparison of the response m rats and chickens and its correlation with resistance to reinfection. **Immunology**, v.36, n.71, 1979.

RUHNKE, I.; ANDRONICOS, N.M.; SWICK, R.A.; HINE, B.; SHARMA, N.; KHERAVII, S.K.; WU, S-B.; HUNT, P. Immune responses following experimental infection with *Ascaridia galli* and necrotic enteritis in broiler chickens, **Avian Pathology**, v.46, n.6, pág.602-609, 2017.

SAITOH, Y.; SUZUKI, H.; TANI, K.; NISHIKAWA, K.; IRIE, K.; OGURA, Y.; TAMURA, A.; TSUKITA, S.; FUJIYOSHI, Y. Structural insight into tight junction disassembly by *Clostridium perfringens* enterotoxin. **SCIENCE,** v.347, n.6223, pág.775-778, 2015.

SANCHES, A.W.D.; BELOTE, B.L.; HÜMMELGEN, P.; HEEMANN, A.C.W.; SOARES, I.; TUJIMOTO-SILVA, A.; TIRADO, A.G.C.; CUNHA, A.F.; SANTIN, E. Basal and Infectious Enteritis in Broilers Under the I See Inside Methodology: A Chronological Evaluation. **Frontiers in Veterinary Science**, v.6, n.512, 2020.

SAVVA, C.G.; FERNANDES DA COSTA, S.P.; BOKORI-BROWN, M.; NAYLOR, C.E.; COLE, A.R.; MOSS, D.S.; TITBALL, R.W.; BASAK, A.K. Molecular architecture and functional analysis of NetB, pore-forming toxin from *Clostridium perfringens.* **Journal of Biological Chemistry**, v.288, pág.3512-3522, 2013.

SESTI, L. Biosseguridade em granjas de frangos de corte: conceitos e princípios gerais. V SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA Chapecó**,** *Anais* Chapecó: Núcleo Oeste de médicos veterinários**,** pág.55-72, 2004.

SILVA, R.O.S.; OLIVEIRA JUNIOR, C.A.; GUEDES, R.M.C.; LOBATO, F.C.F. *Clostridium perfringens:* a review of the disease in pigs, horses and broiler chickens. **Ciência Rural,** v.45, n.6, p.1027-1034, 2015.

SOUZA, M.; BAPTISTA, A.A.S.; VALDIVIEZO, M.J.J.; JUSTINO, L.; MENCK-COSTA, M.F.; FERRAZ, C.R.; GLORIA, E.M.; VERRI JR, W.A.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. *Lactobacillus* spp. reduces morphological changes and oxidative stress induced by deoxynivalenol on the intestine and liver of broilers. **Toxicon**, v.185, pág.203-212, 2020.

SOUZA, M.; CICERO, C.E.; MENCK-COSTA, M.F.; JUSTINO, L.; GEREZ, J.R.; BAPTISTA, A.A.S.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Histological evaluation of the intestine of broiler chickens: comparison of three sampling methods. **Semina**, v.42, n.6, p.3247-3258, 2021.

SHINI, S.; ALAND, C.R.; BRYDEN, W.L. Avian intestinal ultrastructure changes provide insight into the pathogenesis of enteric diseases and probiotic mode of action. **Nature research**, v.11, n.167, 2021.

SHOJADOOST, B.; VINCE, A.R.; PRESCOTT, J.F. The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by Clostridium perfringens: a critical review. **Veterinary Research**, v.43, n.74, 2012.

SHRESTHA, A.; UZAL, F.A.; MCCLANE, B.A. The interaction of *Clostridium perfringens* enterotoxin with receptor claudins, **Anaerobe**, v.41, pág.18-26, 2016.

SMITH, J. A. Broiler Production Without Antibiotics: United States Field Perspectives, *Animal Feed Science and Technology*, p.1-18, 2018.

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

SMYTH, J.A. Pathology and diagnosis of necrotic enteritis: is it clearcut?. **Avian Pathology**, v.45, n.3, pág.282-287, 2016.

STANLEY, D.; KEYBURN, A.L.; DENMAN, S.E.; MOORE, R.J. Alterações na microflora cecal de galinhas após desafio com *Clostridium perfringens* para induzir enterite necrótica. **Veterinary Microbiology**, v.159, pág.155-162, 2012.

STANLEY, D.; WU, S-B.; RODGERS, N.; SWICK, R.A.; MOORE, R.J. Differential Responses of Cecal Microbiota to Fishmeal, *Eimeria* and *Clostridium perfringens* in a Necrotic Enteritis Challenge Model in Chickens. **PLoS ONE**, v. 9, n.8, 2014.

TEIRLYNCK, E.; GUSSEM, M. D. E.; DEWULF, J.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. Morphometric evaluation of “dysbacteriosis” in broilers. **Avian Pathology***,* v. 40, n. 2, p. 139-144, 2011.

TIMBERMONT, L.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; IMMERSEEL, F.V. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. **Avian Pathology**, v.40, n.4, p.341-347, 2011.

TERCIOLO, C., BRACARENSE, A.P., SOUTO, P.C.M.C., COSSALTER, A.M., DOPAVOGUI, L., LOISEAU, N., OLIVEIRA, C.A.F., PINTON, P., OSWALD, I.P., 2019. ZACHARY, J. F. Mechanisms of Microbial Infections. In: **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 132-241.e1.

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

TSIOURIS, V. Poultry management: a useful tool for the control of necrotic enteritis in poultry, **Avian Pathology**, vol.45, n.3, pág.323-325, 2016.

VAN DAMME, L.; COX, N.; CALLENS, C.; HAESEBROUCK, F.; DARGATZ, M.; DUCATELLE, R.; Van Immerseel, F.; Goossens, E. *C. perfringens* challenge reduces matrix metalloproteinase activity in the jejunal mucosa of Eimeria-infected broiler chickens. **Veterinary Research**, v.51, n.100, 2020.

WADE, B.; KEYBURN, A. The true cost of necrotic enteritis. **World Poultry**, v.31, pág.16-17, 2015. Disponivel em: https://www.poultryworld.net/Meat/Articles/2015/10/The-true-cost-of-necrotic-enteritis-2699819W/

WAEYENBERGHE, L.V.; GUSSEM, M.D.; VERBEKE, J.; DEWAELE, I.; GUSSEM, J.D. Timing of predisposing factors is important in necrotic enteritis models, **Avian Pathology**, v.45, n.3, pág.370-375, 2016.

WILLIAMS, R.B.; MARSHALL, R.N.; LA RAGIONE, R.M.; J. CATCHPOLE, J. A new method for the experimental production of necrotic enteritis and its use for studies on the relationships between necrotic enteritis, coccidiosis and anticoccidial vaccination of chickens. *Parasitology research*, v.90, pág.19-26, 2003.

WILSON, K.M.; CHASSER, K.M.; DUFF, A.F.; BRIGGS,W.N.; J. D. LATORRE, J.D.; J. R. BARTA, J.R.; BIELKE, L.R. Comparison of multiple methods for induction of necrotic enteritis in broilers. **Journal of Applied Poultry Research,** v.27, pág.577-589, 2018.

YANG, Q.; LIU, J.; WANG, X.; ROBINSON, K.; WHITMORE, M.A.; STEWART, S.N.; ZHAO, J.;ZHANG, G. Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With the Severity of Necrotic Enteritis. **Frontiers in Microbiology**, v.12, 2021.

YANG, W.Y.; CHOU, C.H.; WANG, C. Characterization of toxin genes and quantitative analysis of netB in necrotic enteritis (NE)-producing and non-NE-producing Clostridium perfringens isolated from chickens. **Anaerobe**, v.54, pág.115-120, 2018.

YEGANI, M.; KORVER, D.R. Review Factors Affecting Intestinal Health in Poultry. **Poultry Science**, v.87, 2052-2063, 2008.

ZACHARY, J. F. Mechanisms of Microbial Infections. In: **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 132-241.e1.

ZAHOOR, I.; GHAYAS, A.; BASHEER, A. Genetics and genomics of susceptibility and immune response to necrotic enteritis in chicken: a review. **Molecular Biology Reports**, vol.45, pág.31-37, 2018.

ZAYTSOFF, S.J.M.; LYONS, S.M.; GARNER, A.M.; UWIERA, R.R.E.; ZANDBERG, W.F.; ABBOTT, D.W.; INGLIS, G.D. Host responses to Clostridium perfringens challenge in a chicken model of chronic stress, **Gut Pathogens**, v.12, n.24, 2020.

ZHOU, H.; LEPP, D.; PEI, Y.; LIU, M.; YIN, X.; MA, R.; PRESCOTT, J.F.; GONG, J. Influence of pCP1NetB ancillary genes on the virulence of *Clostridium perfringens* poultry necrotic enteritis strain CP1. **Gut Pathogens**, v.9, n.6, 2017.

ZHOU, C.; QIU, Y.; YANG, H. CD4CD8αα IELs: They Have Something to Say. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

10 TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho científico a ser enviado para revista *Animals* edição especial “Stress Management in Poultry"

https://www.mdpi.com/journal/animals/special_issues/Stress_Management#keywords

Fator de impacto 2.752

ISSN 2076-2615 Medicina veterinária-B3

Avaliação de fatores predisponentes de enterite necrotica em frangos de corte experimentalmente desafiados

Larissa Justino[1], Ana A. S. Baptista[2], Marielen de Souza[2], João V. M. Berbert[2], Maisa F. Menck-Costa[3], Bárbara G. Pires[4], Giovana B. Cavassani[2], Bárbara T. Kanabata[2], Ana P. F. R. L. Bracarense[4], Adriano S. Okamoto[1], Raphael L. Andreatti Filho[1*]

[1]Departamento de Clínica Veterinária, Laboratório de Ornitopatologia, Centro de Patologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- UNESP, Botucatu, 18618-681, São Paulo, Brasil; larissa.justino@unesp.br (L.J.); raphael.andreatti@unesp.br (R.L.A.F.); adriano.okamoto@unesp.br (A.S.O.)

[2]Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Medicina Aviária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 86057-970, Paraná, Brasil; anaangelita@uel.br (A.A.S.B.); marielen.souza@uel.br (M.S.); joao.vitor.berbert@uel.br (J.V.M.B.); giovana.bazzo.c@uel.br (G.B.C.); barbara.kanabata@uel.br (B.T.K.)

[3]Departamento de Microbiologia, Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 86057-970, Paraná, Brasil; maisa.menckcosta@uel.br (M.F.M-C.)

[4]Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Laboratório de Patologia Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 86057-970, Paraná, Brasil; barbara.giglio@uel.br (B.G.P.); anapaula@uel.br (A.P.F.R.L.B.)
*Correspondence: raphael.andreatti@unesp.br;

Resumo simples

A proibição do uso de antibiótico promotores de crescimento na alimentação animal, proporcionou aumento no número de casos de enterite necrótica (EN) em frangos de corte, gerando alto impacto na indústria avícola, causada pela bactéria *Clostridium perfringens* (CP). Experimentalmente é relatado dificuldades na indução da EN, por ser uma doença multifatorial e a patogênese não ser totalmente compreendida, prejudicando o desenvolvimento de estudo *in vivo* para encontrar estratégias de controle e prevenção da EN, surgindo vários protocolos na literatura utilizando fatores para auxiliar na indução da doença, assim, o objetivo deste estudo foi avaliar fatores predisponentes como imunossupressão (administração de vacina de Gumboro) e/ou administração *Eimeria* spp. (vacina frente coccidiose), em frangos de corte (n=94) alimentados com dieta a base de trigo e desafiado com três cepas diferentes de CP. Na microscopia, observamos que a *Eimeria* spp. teve um efeito negativo na morfometria intestinal e no aumento de linfócitos intraepiteliais, todavia na macroscopia não ficou evidente qual fator é mais eficaz em potencializar as lesões, sugerindo que existirá um efeito sinérgico entre a cepa empregada e os fatores predisponentes, assim, cada protocolo experimental é necessário avaliada, previamente, a associação da cepa aos fatores.

Resumo

A enterite necrótica (EN) é uma das principais doenças de alto impacto no setor avícola, sendo o *Clostridium perfringens* (CP), o agente etiológico. Experimentalmente

é encontrado dificuldades na indução da EN, por se tratar de uma doença multifatorial, o uso de fatores predisponentes vem sendo empregado, diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar os fatores que predispõem a EN em frangos de corte (n=94) alimentados com dieta a base de trigo, associados a indução de imunossupressão (vírus vacinal da Doença de Gumboro- IBDV) e/ou infecção por *Eimeria* spp. (vacina contra a coccidiose) combinado ao desafio (10^7 UFC/mL) com três cepas de CP tipo G (CP13, CP14 e CP03). O intestino foi submetido a avaliação macroscópica frente a três escores de lesão, sendo observado diferença nos resultados do escore entre os grupos frente aos diferentes escores, porém, não ficou claro qual fator predisponente associado ao CP induziu mais lesões. Já na microscopia, observamos que a *Eimeria* spp teve um efeito negativo na morfometria intestinal e no aumento de linfócitos intraepiteliais. Em conclusão, ficou evidente que existirá um efeito sinérgico entre a cepa empregada e os fatores predisponentes, todavia, não ficou claro qual fator predisponente é mais eficaz em potencializar as lesões, sugerindo que para cada protocolo experimental seja avaliada, previamente, a associação da cepa aos fatores.

Palavras chaves: Aves; Enterite necrótica; Fatores predisponentes; *Clostridium perfringens*

1. Introdução

A proibição do uso de antibióticos promotores de crescimento na produção animal, com a finalidade de reduzir a seleção de bactérias multirresistentes a antimicrobianos (IMMERSEEL et al., 2016), acarretou em aumento do número de casos de enterite necrótica (EN) em frangos de corte, causada pela bactéria *Clostridium perfringens* (CP) (TIMBERMONT et al., 2011). Esta doença proporciona alto impacto na indústria avícola, os custos podem chegar a $0,0625/ave, gerando perdas econômicas de aproximadamente $6 bilhões de dólares em todo mundo (MOORE, 2016). Estes prejuízos são decorrentes dos gastos com alimentação, alojamento, medicamentos e condenações no abate (ABD EL-HACK et al., 2022), sendo um dos principais problemas as perdas pela redução dos índices zootécnicos, com diminuição de 12% do peso corporal e um aumento de 11% na taxa de conversão alimentar em relação a aves saudáveis (TSIOURIS, 2016), além disso, é considerada a segunda bactéria mais comum em casos de doenças transmitidas por alimentos em países desenvolvidos (SHRESTHA et al., 2016).

As lesões causadas pelo CP, resultam da capacidade de produção, de cerca de 20 toxinas e fatores de virulência adicionais, incluindo enterotoxina, toxina semelhante à enterite B necrótica (NetB) e toxina beta-2 (REVITT-MILLS et al., 2019). Durante muitos anos, o CP foi classificado baseando-se em grupos toxigênicos de acordo com a produção das toxinas, sendo o tipo A, produtor de alfa-toxina o mais comum em casos de enterite necrótica nas aves (ALBORNOZ et al., 2014). A nova

classificação tem objetivo de facilitar o estudo epidemiológico e diagnóstico da doença, baseia-se na produção de toxina e a enfermidade proporcionada pela cepa, assim, o causador de EN foi classificado como tipo G de acordo com a produção de toxinas α e NetB (ROOD et al., 2018). Estudos já demonstraram que o gene da toxina NetB é expresso em isolados de CP presentes em quadros de enterite necrótica, reforçando seu papel na patogênese da doença (KIU et al., 2019).

As cepas patogênicas podem acometer frangos de corte com quatro semanas de idade e desenvolver a forma clínica ou subclínica de enterite necrótica nas aves, esta última ganha destaque devido ao impacto econômico na avicultura, em razão ao baixo desempenho zootécnico (GOHARI et al., 2021) além de condenações de fígado durante o abate (KALDHUSDALA et al., 2016), pois, a infecção por CP pode ocasionar quebra de barreira intestinal e lesões em órgãos extra intestinais, como o fígado (KIU e HALL, 2018), gerando quadros de colangiohepatite nas aves (CRISPO et al., 2020). Na forma clínica pode ser observado depressão severa, diminuição do apetite, diarreia escura e penas eriçadas, além de alta mortalidade (IMMERSEEL et al., 2004), em casos graves também pode resultar em óbito de 10-40% das aves acometidas (ZAHOOR et al., 2016).

As lesões macroscópicas observadas na EN são de características fibrino necrosantes, espessamento da mucosa pelo acúmulo de fibrina e detritos necróticos, presença de úlceras, hemorragias, descamação da mucosa, perda de tônus e gás com odor fétido (SMYTH, 2016; PALLIYEGURU e ROSE, 2014). Para pontuar a gravidade e extensão das lesões macroscópica de EN, são encontrados vários modelos descritos na literatura (SMYTH e MARTIN, 2010; DAHIYA et al., 2005; CRAVENS et al., 2013; PRESCOTT et al., 1978; TRUSCOTT e AL-SHEIKHLY., 1977), porém, para que ocorra essas lesões, são necessários fatores predisponentes (SILVA et al., 2015), por se tratar de uma doença multifatorial, sendo relatado na literatura dificuldade no desenvolvimento da doença e conclusões conflitantes entre os pesquisadores (BROOM et al., 2017).

Para indução da EN, pode ser administrado nas aves 10 vezes a dose recomendada do fabricante da vacina de coccidiose, em até cinco dias antes do desafio com CP para que o dano intestinal coincida com o desafio com CP, e imunossupressão através do uso de vacina da doença de Gumboro 10 vezes a dose recomendada pelo fabricante (SHOJADOOST et al., 2012), pois, fatores estressores podem reduzir a capacidade de resposta imune adaptativa, dificultando a eliminação

da infecção ocasionada pelo CP, aumentando assim, a população de CP no intestino das aves (CALEFI et al., 2019).

A alteração da microbiota, também proporciona condições favoráveis para o crescimento do CP, sendo um importante fator predisponente. Experimentalmente, pode ser fornecido dietas com alta concentração de polissacarídeos não amiláceos, como farinha de peixe, trigo e cevada (COOPER e SONGER, 2009), que aumentam a viscosidade da digesta e prolongam o tempo de trânsito intestinal (ANNETT et al., 2002; LATORRE et al., 2015). Os fatores predisponentes são importantes para desenvolvimento da doença, porém, devem estar aliados ao desafio com CP virulentos, para um eficiente desenvolvimento da doença (PRESCOTT et al., 2016a).

Estudos para compreensão da patogênese da EN vêm sendo desenvolvidos por mais de uma década, na perspectiva de encontrar estratégias de prevenção e controle (YANG et al., 2018), todavia, os fatores predisponentes essenciais para o surgimento da doença, não estão totalmente elucidados, devido a diversas variáveis que podem levar ao aparecimento da doença (TSIOURIS, 2016). Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar os fatores predisponentes para induzir a enterite necrótica, como vacina de Coccidiose e/ou Gumboro associado ao desafio com três diferentes cepas de CP em frangos de corte alimentados com dieta a base de trigo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Clostridium perfringens e Determinação de Grupo Toxigênico

As amostras de *Clostridium perfringens* CP13 e CP14 utilizadas neste estudo foram provenientes da bacterioteca do Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Universidade Estadual Paulista (Botucatu, Brasil), e o CP03, do Laboratório de Medicina Aviária da Universidade Estadual de Londrina (Londrina, Brasil).

Para classificação do grupo toxigênico foi realizada PCR das amostras. Para tanto, as cepas de CP foram cultivadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Difco), a 37ºC, 18-24h, em anaerobiose utilizando GasPak™ (BD), posteriormente foi realizada a extração do DNA utilizando Kit PureLink™ Genomic DNA Mini (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. A PCR foi realizada utilizando os primers *netB*, de acordo com Keyburn et al., (2010) e *plc* de acordo com Rood et al. (2018). As amplificações foram realizadas em termociclador Techne (STONE, Inglaterra) e os produtos amplificados foram observados em gel de agarose (1,5%) corados com gelred biotium em transiluminador Loccus.

2.2. Ensaio in vivo

Foram utilizados para este estudo, n=94, frangos de corte, mistos, linhagem Ross® 308, com um dia de vida (ddv). Os animais foram alojados no Infectório do Laboratório de Medicina Aviária da Universidade Estadual de Londrina, onde receberam água e alimento *ad libitum* e aquecimento conforme as exigências fisiológicas. Os animais permaneceram em gaiolas experimentais (0,9 m x 1,20m e 0,5 de altura) até 14 ddv, posteriormente foram alojadas em gaiolas, adicionadas em seu interior maravalha, previamente fumigada com paraformaldeído, para mimetizar as condições de reinfecção que acontecem nas granjas de frangos. O projeto foi enviado e aprovado pelo ao comitê de ética da Universidade Estadual de Londrina (CEUA), Nº protocolo 019.2021.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 11 grupos, com até nove animais por tratamento.

TABELA 1- Descrição dos grupos experimentais

Grupos	Descrição	N
G1	Controle negativo (aves não desafiadas)	6
G2	CP13 + *Eimeria* spp.	9
G3	CP13 + IBDV	9
G4	CP13 + *Eimeria* spp. + IBDV	9
G5	CP14 + *Eimeria* spp.	9
G6	CP14 + IBDV	9
G7	CP14 + *Eimeria* spp. + IBDV	9
G8	CP03 + *Eimeria* spp.	9
G9	CP03 + IBDV	9
G10	CP03 + *Eimeria* spp. + IBDV	7
G11	*Eimeria* spp.	9

*CP- *Clostridium perfringens*; IBDV- *Infectious bursal disease virus*

A dieta experimental para todas as aves foi a base de milho e farelo soja até sete ddv e posteriormente foi fornecido dieta a base de trigo (62,75%) e farelo de soja (29,6%) seguindo a formulação proposta por Du et al. (2016) com o propósito de proporcionar condições favoráveis para o desenvolvimento de *Clostridium perfringens.*

2.3. Administração da vacina de coccidiose e Gumboro e desafio com *Clostridium perfringens*

Aos 13 ddv as aves dos grupos G2, G4, G5, G7, G8, G10 e G11 receberam via gavagem a vacina comercial Bio-Coccivet® (Biovet, São Paulo, Brasil), constituída de oocistos esporulados e vivos de *E. acervulina, E. brunetti, E. máxima, E. necatrix, E. praecox, E. tenella e E. mitis* adotando como dose 10 vezes a recomendação do

fabricante (SHOJADOOST et al., 2012). Aos 14 ddv as aves dos grupos G3, G4, G6, G7, G9 e G10 receberam, via subcutânea a vacina Poulvac® Magniplex (Zoetis, São Paulo, Brasil), frente a Doença Infecciosa da Bursa, liofilizada de vírus vivo com baixa atenuação (cepa forte), 10 vezes a dose recomendada pelo fabricante (COOPER e SONGER, 2009).

As cepas de CP foram cultivadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Difco™, São Paulo, SP) e incubadas em anaerobiose utilizando o kit comercial GasPak™ *overnight* a 37ºC (VAN DAMME et al., 2020), posteriormente uma alíquota da cultura (sendo realizado um *pool* do inóculo administrado no período da manhã e da tarde) foi reservada para realização de microdiluição seriada seguida de plaqueamento por *spread plate* em Agar Shahadi-Ferguson Perfringens (SFP) (Difco™, São Paulo, Brasil), para quantificação do inóculo.

Foi realizado o inóculo do CP no 15º até 19º ddv via gavagem, duas vezes ao dia, um mL em cada momento, para indução de EN. As aves do G1 receberam um mL de caldo BHI estéril, e os grupos G2, G3 e G4 foram desafiadas com $3,2x10^7$ (UFC/mL) com CP13, G5, G6 e G7 com $4,3x10^7$ (UFC/mL) do CP14 e G8, G9 e G10 com $3,51x10^7$ (UFC/mL) do CP03.

2.4. Escore de lesão macroscópica intestinal

Aos 20 ddv as aves foram eutanasiadas por deslocamento cervical, a fim de determinar o perfil de lesão macroscópica intestinal de todas as aves (n=94). A aparência macroscópica do intestino foi avaliada por dois patologistas experientes de forma as cegas, aplicando-se três metodologias de escores, propostas por Cravens et al. (2013), Dahiya et al. (2005), e Teirlynck et al. (2011).

2.5. Coleta do fígado para quantificação de bactérias em aerobiose e anaerobiose

Aos 20 ddv, foi realizada a colheita do fígado das aves (n=94) na perspectiva de avaliar se houve quebra de barreira e translocação intestinal de bactérias aeróbicas e anaeróbicas, realizado de acordo com Latorre et al. (2018), com algumas modificações. Uma porção do lobo caudal direito do fígado foi colhido de forma asséptica e acondicionados em recipiente estéreis, em seguida adicionou-se caldo BHI, na proporção 1:10, e posteriormente 100µl da amostra foi plaqueada por *spread plate* para quantificação em ágar MacConkey (MC) incubada 37°C/24h em aerobiose e no ágar SFP em anaerobiose a 37°C/24h. A translocação bacteriana foi expressa em unidades formadoras de colônias (UFC/g).

2.6. Análise histológica

As amostras (n=6/grupo) de intestino foram coletados pela técnica de *Swiss roll*, e posteriormente submersos em formol tamponado (10%) por 24h, em seguida, foram acondicionados em etanol (70%) até a preparação histológica conforme Souza et al. (2021). Os cortes de tecido de 5 µm foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e avaliados altura das vilosidades, profundidade das criptas, relação vilosidade/cripta do intestino delgado e contagem de linfócitos intraepiteliais, também foi realizado a coloração com Alcian Blue, para contagem de células caliciformes do íleo, todas as análises foram realizadas de acordo com Souza et al. (2020).

As alterações histológicas foram avaliadas por meio de uma escala de pontuação de lesão, considerando a intensidade da lesão conforme descrito por Terciolo et al. (2019). O escore da lesão foi estabelecido considerando o grau de gravidade (fator de gravidade) e a extensão de cada lesão (de acordo com a intensidade ou frequência observada, pontuada de 0 a 3). Para cada lesão, o escore da extensão foi multiplicado pelo fator de gravidade. Os seguintes critérios morfológicos e lesionais foram incluídos no escore: achatamento dos enterócitos, atrofia e fusão das vilosidades, edema intersticial, dilatação dos vasos linfáticos, perda de enterócitos apicais, vacuolização celular e detritos necróticos.

2.7. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para um delineamento em blocos casualizados, com dois blocos, 11 grupos e seis repetições, seguido do teste post-hoc de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa RStudio versão 2021.09.1-372 (Boston, MA, EUA).

3. Resultados

3.1. Infecção experimental

As amostras de *Clostridium perfringens* utilizadas neste estudo foram confirmadas como tipo G, positiva para *netB* e alfa toxina.

A partir do segundo dia de desafio observou-se aglomeração das aves nas gaiolas, diarreia, hiporexia, apatia, depressão, principalmente nos grupos G4 (CP13+IBDV+*Eimeria* spp.), G7 (CP14+IBDV+*Eimeria* spp.) e G10 (CP03+IBDV+*Eimeria* spp.). Também foi observado desuniformidade das aves

desafiadas em relação aos animais do grupo controle negativo (Figura.1), sendo esta característica mais evidente nas aves do G3 (CP13+IBDV) e G10 (CP03+IBDV+*Eimeria* spp.).



Figura 1. Presença de desuniformidade entre os grupos em relação ao controle negativo. G1-Controle negativo; G2- CP13+*Eimeria* spp.; G3- CP13+IBVD; G4- CP13+*Eimeria* spp.+IBVD; G5- CP14+*Eimeria* spp.; G6- CP14+IBVD; G7- CP14+ *Eimeria* spp.+IBVD; G8-CP03+*Eimeria* spp.; G9-CP03+IBVD; G10-CP03+*Eimeria* spp.+IBVD; G11- *Eimeria* spp.

3.2. Avaliação macroscópica do intestino

O escore de lesões intestinais macroscópicas (Tabela 2) diferiu significativamente (P≤0,05) entre os três modelos aplicados (Dahiya et al., 2005; Cravens et al., 2013 e Teirlynck et al., 2011), observou-se a maior média (2.914) para o modelo de Teirlynck et al. (2011).

TABELA 2. Média do escore de lesão macroscópica segundo a metodologia de Cravens et al. (2013), Dahiya et al. (2005) e Teirlynck et al. (2011), dos diferentes grupos.

Grupos	Metodologia		
	Cravens et al. (2013)	Dahiya et al. (2005)	Teirlynck et al. (2011)
G1	1,33^{a}	0,75^{a}	2,75^{a}
G2	1,23^{b}	0,56^{b}	2,89^{a}
G3	1,73^{a}	0,80^{a}	3,45^{a}
G4	0,84^{b}	0,39^{b}	1,67^{b}
G5	0,78^{b}	0,53^{b}	2,78^{a}
G6	1,17^{b}	0,58^{b}	2,56^{a}
G7	0,95^{b}	0,64^{b}	1,78^{b}
G8	1,62^{a}	0,89^{a}	3,34^{a}
G9	1,00^{b}	0,62^{b}	2,23^{b}
G10	0,86^{b}	0,43^{b}	2,43^{a}
G11	1,12^{b}	0,67^{b}	2,56^{a}
Média	1,15^{B}	0,62^{C}	2,58^{A}

G1- Controle negativo; G2- CP13+*Eimeria* spp.; G3- CP13+IBDV; G4- CP13+*Eimeria* spp.+IBDV; G5- CP14+*Eimeria* spp.; G6- CP14+IBDV; G7- CP14+ *Eimeria* spp.+IBDV; G8-CP03+*Eimeria* spp.; G9-CP03+IBDV; G10-CP03+*Eimeria* spp.+IBDV; G11- *Eimeria* spp.. $^{a, b}$ letras minúsculas na coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0.05$) entre os grupos. Letras maiúsculas entre as linhas indicam diferença significativa entre os grupos. Teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5%

Seguindo o modelo descrito por Cravens et al. (2013), ao utilizar cepas distintas de CP (CP13, CP14, CP03) associadas a vacina de *Eimeria* spp., foi encontrado diferença significativa, sendo que G8 (CP03+*Eimeria* spp.) apresentou a maior média (1,62) para as lesões macroscópicas intestinais diferenciando significativamente de G2 (CP13+*Eimeria* spp.) (1,23) e G5 (CP14 + *Eimeria* spp.) (0,78). Todavia, ao associar as cepas de CP com IBDV, observamos que o grupo G3 (CP13+IBDV) apresentou a maior média (1,73), e diferenciou significativamente dos grupos G6 (CP14+IBDV) e G9 (CP03+IBDV) com médias de 1,17 e 1,00 respectivamente.

No modelo Cravens et al., (2013), ao analisarmos a cepa CP13 frente aos fatores predisponentes, *Eimeria* spp., IBDV e *Eimeria* spp+IBDV, observamos que a associação com IBDV (G3) apresentou maior escore de lesão diferenciado dos demais (G2 e G4). Entretanto, este comportamento não foi observado para a cepa CP03, em que, o grupo G8 (CP03+ *Eimeria* spp) apresentou a maior média (1,62), diferindo dos grupos CP03+IBVD e CP03+*Eimeria* spp.+IBDV. Já a cepa CP14 não

apresentou diferença significativa entre nenhum dos fatores avaliados. Indicando que existe uma alteração do comportamento da cepa, do ponto de vista de intensidade do escore de lesão, a depender do fator predisponente envolvido.

Os resultados analisados frente ao modelo de Dahiya et al. (2005) corroboram com o modelo de Cravens et al., (2013), em que o grupo G8 (CP3+*Eimeria* spp.) apresentou a maior média, 0,89, e diferiu significativamente de G2 (CP13+ *Eimeria* spp.) (0,56) e G5 (CP14+ *Eimeria* spp.) (0,53). Para o fator IBDV, o grupo G3 apresentou a maior média (0,80), diferenciando significativamente dos grupos G6 (CP14 + IBVD) (0,58) e G9 (CP03 + IBVD) (0,62). No que tange a avaliação das diferentes cepas de CP, a associação do CP13+ IBVD apresentou maior média, 0,80, enquanto CP03+ *Eimeria* spp. apresentou a maior média (0,89), e a cepa CP14 independente do fator predisponente não diferenciou entre si.

No modelo proposto por Teirlynck et al. (2011), ao avaliarmos o efeito exclusivo do fator *Eimeria* spp. entre os tratamentos, não observamos diferença significativa entre G2 (CP13+*Eimeria* spp.) (2,89), G5 (CP14+ *Eimeria* spp.) (2,78) e G8 (CP03+ *Eimeria* spp.) (3,34). Ao analisarmos a variável IBVD, o grupo G3 (CP13+IBVD) e G6 (CP14+IBVD) não diferiram entre si, e apresentaram as maiores médias, 3,45 e 2,56, respectivamente, todavia, diferiram significativamente do grupo G9 (CP03+IBVD) com média 2,23.

Ao avaliarmos o efeito das cepas de CP, seguindo o modelo de Teirlynck et al. (2011), os grupos G2 (CP13 + *Eimeria* spp.) G3 (CP13 + IBVD), apresentaram maiores médias de lesão, 2,89 e 3,45 respectivamente e diferiram significativamente do grupo CP13+*Eimeria* spp.+ IBVD (1,67). Nos grupos desafiados com CP14 a maior média de lesão encontrada foi no G5 (CP14+*Eimeria* spp.) (2,78) e G6 (CP14 + IBDV) (2,56) os quais diferiram de G7 (1,78). Já no desafio com o CP03 as maiores médias de lesão foram encontradas no grupo CP03+*Eimeria* spp. (3,34) e CP03+*Eimeria* spp.+IBVD (2,43), que diferiu significativamente de CP03+IBVD (2,23), comportamento distinto daquele observado para as cepas CP13 e CP14.

3.3. Quantificação de bactérias aeróbicas e anaeróbicas do fígado

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados das médias da quantificação de bactérias aeróbicas e anaeróbicas no fígado das aves, remetendo ao aumento da permeabilidade e quebra de barreira intestinal.

TABELA 3. Média (*Log 10*) da quantificação bacteriana em aerobiose e anaerobiose presentes no fígado das aves dos grupos

Grupos	Aeróbicas	Anaeróbicas
G1	0,78	0,75[b]
G2	1,15	2,25[a]
G3	1,48	1,23[b]
G4	1,06	2,61[a]
G5	0,461	2,26[a]
G6	0,86	2,38[a]
G7	0,58	2,65[a]
G8	0,57	1,44[b]
G9	0,22	0,88[b]
G10	0,71	2,46[a]
G11	0,51	0,99[b]

G1- Controle negativo; G2- CP13+*Eimeria* spp.; G3- CP13+IBVD; G4- CP13+*Eimeria* spp.+IBVD; G5- CP14+*Eimeria* spp.; G6- CP14+IBVD; G7- CP14+ *Eimeria* spp.+IBVD; G8-CP03+*Eimeria* spp.; G9-CP03+IBVD; G10-CP03+*Eimeria* spp.+IBVD; G11- *Eimeria* spp.. [a, b] Letras minúsculas na coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0.05$) entre os grupos. Teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5%

O grupo G3 (CP13+IBVD) apresentou a maior média na quantificação de bactérias aeróbicas, porém, não foi observada diferença significativa entre os grupos (P= 0.3693).

Em relação às bactérias anaeróbicas, foi observada diferença significativa entre os grupos (P≤0,05). Os grupos desafiados com CP14, G5 (CP14 + *Eimeria* spp.), G6 (CP14 + IBVD) e G7 (CP14+*Eimeria* spp+IBVD) diferiram do controle negativo, o'que sugere que o fator predisponente não influenciou nesta avaliação, sendo que o grupo G7 apresentou a maior média (2,65) entre todos os grupos. Já o CP13 associado ao IBVD (G3) e CP03+*Eimeria* spp.+IBVD (G10) favoreceram o aumento na quantificação de bactérias anaeróbicas no fígado das aves.

3.4. Avaliação histológica do intestino

Os resultados obtidos na análise morfométrica (Figura 2), demonstraram que no duodeno houve uma diminuição significativa (P≤0,05) na altura das vilosidades nos grupos G8 (CP03+ *Eimeria* spp.), G10 (CP03+ *Eimeria* spp.+IBVD), todavia sem diferença do grupo G11 (*Eimeria* spp.), com menor média observada no grupo G10, no íleo, além desses grupos mencionados, os grupos G7 (CP14+ *Eimeria* spp.+IBVD) e G9 (CP03+IBVD) também apresentaram diferença significativa do grupo controle, sendo a menor média encontrada no G7. No jejuno, o grupo G10 (CP03+ *Eimeria* spp.+IBVD apresentou a menor média, diferenciando significativamente do controle negativo (G1).

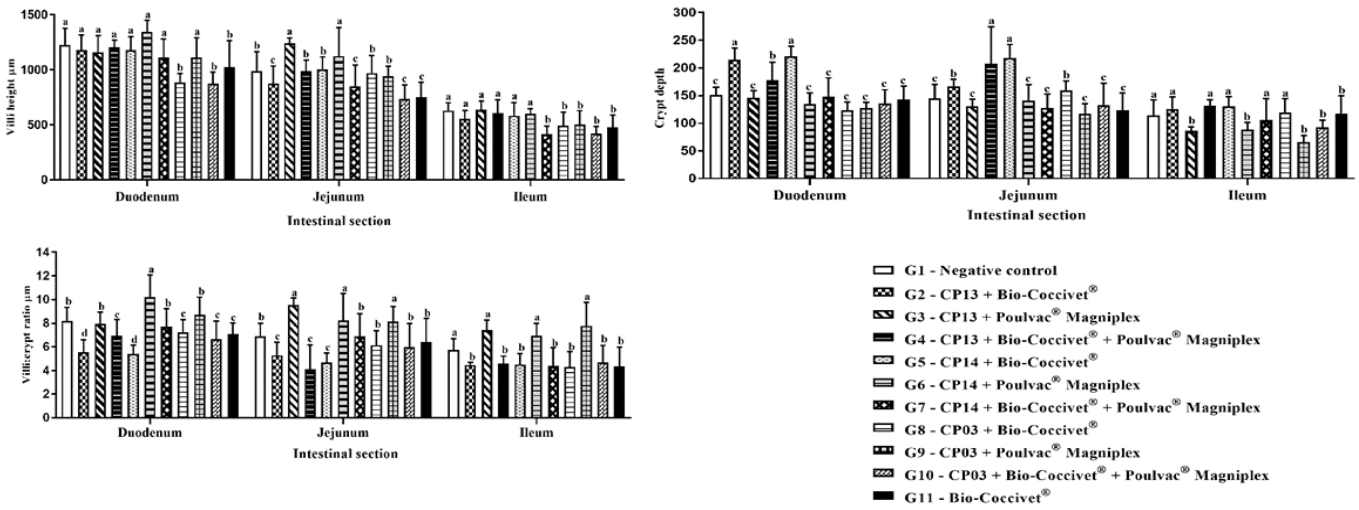


Figura 2. Média da altura das vilosidades, profundidade das criptas e relação vilo/cripta dos diferentes grupos. G1- Controle negativo, G2- CP13+*Eimeria* spp. G3- CP13+IBVD, G4- CP13+ *Eimeria* spp. +IBVD, G5- CP14+ *Eimeria* spp.; G6- CP14+ IBVD, G7- CP14+*Eimeria* spp. + IBVD, G8- CP03+ *Eimeria* spp.; G9- CP03+IBVD; G10- CP03+ *Eimeria* spp. + IBVD, G11- *Eimeria* spp.

No que se refere às criptas, no duodeno, foi encontrado maior profundidade em relação ao controle negativo nas aves desafiadas com CP13 e CP14 associado a *Eimeria* spp. G2 (CP13+*Eimeria* spp.) e G5 (CP14+*Eimeria* spp.), respectivamente. Já no jejuno, o grupo G4 (CP13+*Eimeria* spp.+IBVD) e G5 (CP14+*Eimeria* spp.) apresentaram profundidade das criptas mais acentuadas, diferenciando significativamente dos demais grupos, enquanto que no íleo, o grupo G4 obteve a maior média, todavia, sem diferença do grupo controle.

Na Figura 2, é possível observar que os grupos CP13 e CP14 associado a *Eimeria* spp., G2 e G5, respectivamente, obtiveram menor relação vilosidade/cripta (V:C) no duodeno, diferenciando significativamente do controle. No jejuno, o grupo G4 (CP13+*Eimeria* spp.+IBVD) e G5 (CP14+*Eimeria* spp.), também diferenciou significativamente do grupo controle, porém, no íleo a menor relação V:C foi observada no grupo G11 (*Eimeria* spp.).

Na contagem de células caliciformes do íleo, não foi observado diferença significativa entre os grupos (P>0,05), assim como, na contagem linfócitos intraepiteliais (Tabela 4), no qual, não foi observada diferença significativa nos segmentos do jejuno e íleo (P>0,05), porém, no duodeno os grupos G5 (CP14+*Eimeria* spp.) G8 (CP03+ *Eimeria* spp.) não diferenciaram significativamente do grupo G11 (*Eimeria* spp.).

TABELA 4. Média da contagem de linfócitos intraepiteliais do intestino delgado nos diferentes grupos

Grupos	Linfócitos intraepiteliais		
	Duodeno	Jejuno	Íleo
G1	22.6[b]	18,32	9,38
G2	26.42[b]	25,11	6,11
G3	21.54[b]	31,83	7,26
G4	24.76[b]	24,08	6,96
G5	33.56[a]	25,07	5,51
G6	28.90[b]	26,19	10,22
G7	27.12[b]	32,89	12,05
G8	38.46[a]	35,00	9,85
G9	28.34[b]	33,17	8,65
G10	23.79[b]	36,24	9,54
G11	39.54[a]	31,44	13,32

G1- Controle negativo; G2- CP13+*Eimeria* spp.; G3- CP13+IBVD; G4- CP13+*Eimeria* spp.+IBVD; G5- CP14+*Eimeria* spp.; G6- CP14+IBVD; G7- CP14+ *Eimeria* spp.+IBVD; G8-CP03+*Eimeria* spp.; G9-CP03+IBVD; G10- CP03+*Eimeria* spp.+IBVD; G11- *Eimeria* spp.. [a, b] Letras minúsculas na coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0.05$) entre os grupos. Teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5%

4. DISCUSSÃO

4.1. Indução experimental de enterite necrótica e sinais clínicos

A Enterite necrótica (EN) é considerada uma das principais doenças entéricas de alto impacto econômico na avicultura industrial, os custos podem chegar a $0,0625/ave, gerando perdas econômicas de aproximadamente $6 bilhões de dólares em todo mundo (WADE e KEYBURN., 2015; ZAHOOR et al., 2018).

Clostridium perfringens (CP) é o agente responsável por EN a infecção desencadeia uma resposta inflamatória no intestino das aves (FASINA e LILLEHO, 2019) proporcionando desequilíbrio energético, alteração no metabolismo e no crescimento músculo esquelético (LU et al., 2021), além de proporcionar disbiose intestinal, que diminuem os índices zootécnicos e cria um ambiente ideal para o desenvolvimento de outras infecções (LACEY et al., 2018; KUMAR et al., 2021).

Estudos apontam dificuldades na indução de infecção experimental de EN em frangos, e diversos fatores são utilizados para predispor o desenvolvimento da doença, sendo eles administração de *Eimeria* spp., imunossupressão, dietas com alta concentração de polissacarídeos não amiláceos (BROOM et al., 2017) e estresse térmico (CALEFI et al., 2019).

Wilson et al. (2018) demonstraram experimentalmente que apenas a administração de CP às aves não é suficiente para o desenvolvimento de EN. De forma semelhante Stanley et al. (2014) reportaram que o desafio utilizando

exclusivamente CP, sem associação com fatores predisponentes, não permite o estabelecimento do patógeno no intestino, expressão de sinais clínicos e mudanças significativas na microbiota das aves. Todavia, a associação de CP+ *Eimeria* spp. e dietas ricas em proteínas é capaz de modificar a microbiota e fornece um ambiente favorável para colonização do CP, aumentando o escore de lesão intestinal.

No presente estudo, ao associarmos as diferentes cepas de CP com os fatores predisponentes

Eimeria spp.; IBVD; *Eimeria* spp.+IBDV observamos a expressão de sinais clínicos de leve a moderado como letargia, apatia, hiporexia e ausência de mortalidade. Os sinais evidenciaram-se a partir do segundo dia de desafio bacteriano, corroborando com os resultados observados por Latorre et al. (2018), que relataram sinais clínicos semelhantes e nenhuma mortalidade durante o experimento de indução de EN nas aves. No presente estudo os sinais foram mais evidentes nos grupos G4 (CP13+*Eimeria* spp.+IBVD), G7 (CP14+*Eimeria* spp.+IBVD) e G10 (CP03+*Eimeria* spp.+IBVD) sugerindo que a associação de *Eimeria* spp. + IBVD favoreceu a expressão dos sinais clínicos nas aves desafiadas, independente da cepa utilizada.

4.2. Lesões macroscópicas intestinais avaliados com três modelos distintos de escore

Em nosso estudo, para avaliarmos o escore de lesão macroscópica intestinal utilizamos os modelos propostos por Teirlynck et al. (2011), Cravens et al. (2013) e Dahiya et al. (2005), sendo encontrado diferença significativa entre as metodologias aplicadas. Um método de escore de lesão macroscópico deve abranger a gravidade da doença produzida experimentalmente, ter uma faixa razoavelmente ampla para fins de análise estatística, ser simples para que um grande número de aves possa ser examinado em um tempo razoável e ser reproduzível entre os observadores (SHOJADOOST et al., 2012).

Quando analisamos os grupos sobre a perspectiva dos diferentes modelos de escore, observamos similaridade nos resultados para o modelo Cravens et al. (2013) e Dahiya et al. (2005), todavia, no modelo Teirlynck et al. (2011) encontramos diferenças. Ao que parece este modelo foi mais apropriado para as avaliações deste estudo, já que o desafio experimental induziu lesões frequentemente observadas em quadros de disbiose, caracterizando uma condição de enterite necrótica subclínica, semelhante ao encontrado em estudos anteriores (WAEYENBERGHE et al., 2016; SHINI et al., 2021; ZAYTSOFF et al., 2020; KUMAR et al., 2022).

Experimentalmente nem sempre é possível observar lesões macroscópicas de

EN (OLKOWSKI et al., 2006), o protocolo de indução influência na inflamação e gravidade das lesões intestinais (BORTOLUZZI et al., 2019), da mesma maneira, a cepa de CP, desempenha um papel importante na intensidade das lesões e gravidade da doença (MOHIUDDIN et al., 2021).

As lesões macroscópicas intestinais observadas em nosso estudo, foram predominantemente leves, e mais expressivas em duodeno e jejuno, corroborando com Liu et al. (2010). De acordo com Huang et al. (2018) os escores de lesão de EN são maiores após um dia do desafio com CP e aos sete dias as lesões são discretas. Lu et al., (2021) demonstra que, após a infecção com CP, o organismo modula estratégias, regulando positivamente componentes, como a proteína estriatina, para manter a integridade intestinal e diminuir os danos causados pela bactéria.

Não foi observado neste estudo diferenças significativas entre os grupos (G1-G11) quando fixamos a variável *Eimeria* spp. e comparamos o efeito das diferentes cepas de CP, indicando que independente da cepa de CP utilizada o resultado ao associar *Eimeria* spp. será semelhante. Ao fixarmos a variável IBVD encontramos diferença no escore de lesão entre as cepas utilizadas, com destaque para CP13 e CP14 que apresentaram as maiores médias, indicando que existe efeito sinérgico da cepa com a variável IBVD.

Ao avaliarmos o efeito das variáveis (*Eimeri*a spp., IBDV e *Eimeria* spp.+IBVD) frente a cada cepa estudada, observamos que os fatores *Eimeria* spp ou IBVD associados a cepas CP13 e CP14, proporcionaram maior grau de lesão intestinal. Todavia, o grau de lesão mais expressivo, ao empregar CP03, foi encontrado ao associar *Eimeria* spp. ou *Eimeria* spp+IBVD, sugerindo que para cada cepa existirá um fator que intensificará o grau de lesão. A utilização de IBVD não parece favorecer a indução de lesão intestinal pela cepa CP03, o contrário foi observado pelas cepas CP13 e CP14. Estes dados corroboram com Chalmers et al. (2007) que observaram comportamento distinto ao avaliar cinco cepas de CP, sendo que apenas uma delas foi capaz de induzir um quadro compatível com EN.

4.3. Quantificação de bactérias aeróbicas e anaeróbicas

No presente estudo, o grupo CP14 + *Eimeria* spp + IBVD apresentou a maior média de quantificação de bactérias anaeróbicas no fígado, assim pode-se inferir que a utilização exclusiva de *Eimeria* spp. ou combinada a IBVD pode favorecer a translocação bacteriana intestinal. A presença de bactérias no fígado, remete ao comprometimento da saúde intestinal das aves (TEIRLYNCK et al., 2011).

A infecção por *Clostridium perfringens* diminui a expressão de proteínas de *tight junctions* (DANESHMAND et al., 2020) e as toxinas de CP promovem aumento da permeabilidade intestinal e consequentemente favorecem a translocação bacteriana (SAITOH et al., 2015) e passagem de endotoxinas pela mucosa do trato intestinal para os sítios extra intestinais, como por exemplo o fígado (KIU e HALL, 2018). Latorre et al. (2018) observaram maior concentração de bactérias aeróbicas e anaeróbicas no fígado de aves desafiadas com CP em relação ao grupo controle, corroborando parcialmente com nosso estudo, em que encontramos diferença significativa do grupo controle, apenas na contagem de bactérias anaeróbicas.

A presença de bactérias no fígado das aves do grupo controle (G1), pode ter relação com o quadro de disbiose proporcionado pela dieta a base de trigo, já que este componente apresenta alto teor de polissacarídeos não amiláceos (CALY et al 2015; HUANG et al., 2018) e favorece a redução da taxa de passagem do conteúdo intestinal, aumento da viscosidade (ADHIKARI et al., 2020), além de fornecer carboidratos complexos para crescimento do CP (YEGANI e KORVER., 2008). Redondo et al. (2016) também observaram lesões em aves não desafiadas com CP e alimentadas com dieta rica em proteína.

4.4. Morfometria intestinal

A altura das vilosidades e a profundidade das criptas tem correlação direta com a integridade intestinal (SANCHES et al., 2020). Sabe-se que as vilosidades intestinais promovem aumento da área de superfície, intensificando o contato com o conteúdo presente no lúmen, que permite uma maior absorção dos nutrientes, sendo que as criptas são responsáveis pela renovação destas células (CRAWLEY et al., 2014). O desafio com CP, pode alterar a morfologia e reduzir a altura das vilosidades intestinais (DANESHMAND et al., 2020), além de proporcionar lesões no ápice das vilosidades ou até mesmo em toda extensão (SHINI et al., 2021), o que implica em menor absorção de nutrientes, reduzindo o crescimento das aves.

No que tange à altura das vilosidades no duodeno, os grupos G8 (CP03 + *Eimeria* spp.) e G10 (CP03 + *Eimeria* spp.+IBVD) promoveram uma diminuição expressiva na altura das vilosidades intestinais, não diferindo significativamente do grupo G11 (*Eimeria* spp.). No jejuno os grupos G2 (CP13+*Eimeria* spp.) G7 (CP14+*Eimeria* spp.+IBVD), G10 (CP03 + *Eimeria* spp.+IBVD), apresentaram menores alturas das vilosidades, também não diferindo do grupo G11 (*Eimeria* spp.). Indicando um possível efeito da infecção por *Eimeira* spp. sobre as vilosidades.

O CP causa danos a morfologia intestinal, proporcionando diminuição das vilosidades, aumento da profundidade das criptas e diminuição da relação vilo/cripta, aumentando os gastos metabólicos do *turnover* do epitélio intestinal, reduzindo a capacidade de absorção de nutrientes pelo intestino (CRIADO-MESAS et al., 2021), o que explica o crescimento reduzido nessas aves em relação ao controle negativo.

Neste estudo, no duodeno, a profundidade das criptas foi mais acentuada nos grupos G2 (CP13+ *Eimeria* spp.) e G5 (CP14+ *Eimeria* spp) assim como a relação V:C, foi menor nesses grupos. Já no jejuno, os grupos G4 (CP13+ *Eimeria* spp.+ IBVD) e G5 (CP14+ *Eimeria* spp.), apresentaram maior profundidade das criptas e menor relação V:C, diferindo significativamente do grupo G11 (*Eimeria* spp), todavia, no íleo, não foi observado diferença significativa entre os grupos G5 e G11, indicando que a influência dos CPs foi maior nos segmentos do duodeno e jejuno. Esses resultados corroboram com o encontrado por M'Sadeq et al. (2015b), que observaram, vilosidades intestinais reduzidas pelo desafio com CP e *Eimeria* spp., assim como, menor relação V:C e aumento na profundidade das criptas. Golder et al. (2011) encontraram profundidade das criptas mais acentuadas no grupo com EN (*Eimeria* spp. e CP) em relação ao grupo controle negativo.

Nossos resultados corroboram com aqueles observados por Gholamiandehkordi et al. (2007) que encontraram menor relação V:C em aves desafiadas com *Eimeria* spp. e CP. Indicando que os danos diretos causados pelos oocistos nos enterócitos comprometeram a morfologia intestinal. A relação vilosidade/cripta prediz a taxa de renovação da mucosa intestinal, sendo um importante indicador de saúde intestinal, uma alta relação indica uma menor renovação intestinal, constituindo-se de vilosidades mais longas e funcionalmente ativas, juntamente como criptas delgadas (M'Sadeq et al., 2015b).

Os danos intestinais causados por *Eimeria* spp. comprometem a integridade do epitélio intestinal e promovem um aumento na produção de muco e extravasamento de plasma para o lúmen intestinal que são fonte de nutrientes para crescimento do CP (ANTONISSEN et al., 2016), potencializando as lesões de EN (BORTOLUZZI et al., 2019).

4.5. Linfócitos intraepiteliais

A liberação de citocinas pró-inflamatórias em quadros de EN subclínica (CRIADO-MESAS et al., 2021) mobilizam heterófilos e linfócitos para o local da inflamação (COOPER e SONGER, 2009). Assim, os linfócitos intraepiteliais intestinais

(iIELs), componente de defesa da imunidade inata do hospedeiro, desempenham um papel importante de proteção frente infecção intestinal e atuam como moduladores na apresentação de antígenos (IERARDI et al., 2017). Os iIELs estão dispostos entre as células epiteliais, sendo um iIELs para cada 10 enterócitos, conferindo um dos maiores compartimentos imunológicos (KAER e OLIVARES-VILLAGOMEZ, 2018).

Ficou evidente neste estudo que a utilização exclusiva de *Eimeria* ssp. (G11) ou associada a CP14 (G5) e CP03 (G8) estimulou a população de linfócitos iIELs em duodeno. Ruhnke et al. (2017), observaram aumento no número de linfócitos intraepiteliais no intestino de frangos de corte desafiados com CP e *Eimeria* spp. Por outro lado, observamos que os grupos que receberam IBVD (G3, G4, G6, G7, G9 e G10) apresentaram uma menor contagem de iIELs no duodeno, não diferindo do controle negativo. Este comportamento pode ser explicado pelo dano proporcionado pelo IBVD sobre o sistema imune que leva a diminuição expressiva da população de linfócitos, por afetar o desenvolvimento e maturação e indução de apoptose dos linfócitos (LIAN et al., 2022).

4.6. Células caliciformes

As células epiteliais caliciformes são especializadas na produção de muco que recobre as células epiteliais intestinais, representando uma das primeiras linhas de defesa frente aos patógenos, pois, impedem a aderência dos patógenos à mucosa intestinal (ABD EL-HACK et al., 2022), diminuindo processos inflamatórios, penetração de bactérias nas criptas e translocação para o interior das células epiteliais (JOHANSSON et al., 2008). Em casos de enterite necrótica, pode ocorrer aumento da secreção de muco (ZAYTSOFF et al., 2020), contudo, no presente estudo não foi observado diferença significativa na contagem de células caliciformes entre os grupos, corroborando com Collier et al. (2008), em que a contagem de células caliciformes não diferiu das aves do grupo controle negativo, em relação ao grupo com EN. De forma semelhante Golder et al. (2011), não observaram aumento de células caliciformes nas aves controle e desafiadas, e relacionou este fato a virulência da cepa, que não foi capaz de desencadear a proliferação de células caliciformes.

4.7. Escore micróscopico

O sistema de escore de lesão microscópico auxilia na avaliação dos danos intestinais sutis, podendo ser utilizado como alternativa para verificar a diferença entre os grupos, mesmo sem lesões macroscópicas de EN visíveis no intestino (GHOLAMIANDEHKORDI et al., 2007).

No presente estudo, foi observada diferença significativa apenas no jejuno, sendo que o grupo contendo apenas *Eimeria* spp. não diferenciou de CP13+ *Eimeria* spp. e CP03+ *Eimeria* spp., sugerindo que as lesões no escore lesional microscópico estão relacionadas a administração da *Eimeria* spp. e não ao desafio por CP nas aves, além disso, foi observado presença oocistos de *Eimeria* spp. predominantemente no jejunal, reforçando a hipótese que a *Eimeria* spp. influenciou no aumento das lesões microscópica.

As principais alterações microscópicas encontradas foram edema, congestão e infiltrado inflamatório. Sanches et al. (2020), não observaram lesões macroscópicas de enterite necrótica em aves desafiadas com CP e 15 vezes a dose recomendada pelo fabricante da vacina frente *Eimeria* spp. já na avaliação microscópica, foi identificado congestão, infiltrado de células inflamatórias na lâmina própria e células inflamatórias no epitélio, semelhante ao encontrado em nosso estudo.

Diferentes estudos (COLLIER et al., 2008; CALEFI et al., 2019; SHOJADOOST et al., 2012) apontam que a dieta com alta concentração de polissacarídeos não amiláceos, estresse ambiental, doenças imunossupressoras e infecção por *Eimeria* spp. são fatores predisponentes importantes para o desenvolvimento de EN em frangos de corte. Contudo, a patogênese da doença ainda não é completamente esclarecida (ADHIKARI et al., 2020). Investigar a infecção por CP associado aos fatores predisponentes poderia auxiliar no esclarecimento da patogênese da enterite necrótica, bem como permitir estabelecer estratégias para o controle da doença (STANLEY et al., 2014).

5. Conclusão

No presente estudo ficou evidente que existirá um efeito sinérgico entre a cepa empregada e os fatores predisponentes, todavia, não ficou claro qual fator predisponente é mais eficaz em potencializar as lesões, sugerindo que para cada protocolo experimental seja avaliada, previamente, a associação da cepa aos fatores.

Acknowledgments: Os autores agradecem ao Laboratório de medicina (UEL) e Laboratório de Patologia Animal (UEL) pelo apoio financeiro.

Conflicts of Interest: Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Referências

ABD EL-HACK, M.E.; EL-SAADONY, M.T.; Y ELBESTAWY, A.R.; EL-SHALL, N.A.;

SAAD, A.M.; SALEM, H.M.; EL-TAHAN, A.M.; KHAFAGA, A.F.; TAHA, A.E.; ABUQAMAR, S.F.; EL-TARABILY, K.A. Necrotic enteritis in broiler chickens: disease characteristics and prevention using organic antibiotic alternatives-a comprehensive review. **Poultry Science**, v.101, n.2, 101590, 2022.

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, pág.515-534, 2020.

ALBORNOZ, L.A.L.; NAKANO, V.; AVILA-CAMPOS, M.J.Clostridium perfringens e a enterite necrótica em frangos: principais fatores de virulência, genéticos e moleculares Clostridium perfringens and necrotic enteritis in poultry: virulence, genetic and molecular factors. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.51, n.3, p.178-193, 2014.

ANNETT, C.B.; VISTE, J.R.; CHIRINO-TREJO, M.; CLASSEN, H.L.; MIDDLETON, D.M.; SIMKO, E. Necrotic enteritis: Effect of barley, wheat and corn diets on proliferation of *Clostridium perfringens* type A. **Avian Pathology**, v.31, n.6, pág.598-601, 2002.

ANTONISSEN, G.; EECKHAUTA, V.; DRIESSCHEA, K.V.; ONRUSTA, L.; HAESEBROUCKA, F.; DUCATELLEA, R.; MOOREC, R.J.; IMMERSEEL, F.V. Microbial shifts associated with necrotic enteritis. **Avian Pathology**, v.45, n.3, 308-312, 2016.

BORTOLUZZI, C.; VIEIRA, B.S.; HOFACRE, C.; APPLEGATE, T.J. Effect of different challenge models to induce necrotic enteritis on the growth performance and intestinal microbiota of broiler chickens. **Immunology, Health and Disease**, v.98, pág. 2800-2812, 2019.

BROOM, L.J. Necrotic enteritis current knowledge and diet-related mitigation. **World's Poultry Science Journal**, v.73, n.2, pág.281-292, 2017.

CALEFI, A.S.; QUINTEIRO-FILHO, W.M.; DE SIQUEIRA, A.; LIMA, A.P.N.; CRUZ, D.S.G.; HAZARBASSANOV, N.Q.; SALVAGNI, F.A.; BORSOI, A.; GOMES, C.O.; MAIORKA, P.C. Heat stress, Eimeria spp. and C. perfringens infections alone or in combination modify gut Th1/Th2 cytokine balance and avian necrotic enteritis pathogenesis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.210, pág.28-37, 2019.

CALY, D.L.; D'INCA, R., AUCLAIR, E.; DRIDER, D. Review: alternatives to Antibiotics to Prevent Necrotic Enteritis in Broiler Chickens: A Microbiologist's Perspective. **Frontiers Microbiology**, v.6, n.1336, 2015.

CHALMERS, G.; BRUCE, H.L.; TOOLE, D.L.; BARNUM, D.A.; BOERLIN, P. Necrotic Enteritis Potential in a Model System Using *Clostridium perfringens* Isolated from Field Outbreaks. **Avian diseases**, v.51, pág.834-839, 2007.

COLE, A.R.; MOSS, D.S.; TITBALL, R.W.; BASAK, A.K. **Molecular architecture and functional analysis of NetB, pore-forming toxin from** *Clostridium perfringens.*

Journal of Biological Chemistry, v.288, pág.3512-3522, 2013.

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 & Immunopathology**, v.122, pág.104-115, 2008.

COOPER, K.K.; SONGER, J.G. Necrotic enteritis in chickens: A paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. **Anaerobe,** v.15, p.55-60, 2009.

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

CRAVENS, R.L.; GOSS, G.R.; CHI, F.; DE BOER, E.D.; DAVIS, S.W.; HENDRIX, S.M.; RICHARDSON, J.A.; JOHNSTON, S.L. The effects of necrotic enteritis, aflatoxin B1, and virginiamycin on growth performance, necrotic enteritis lesion scores, and mortality in young broilers. **Poultry Science**, v.92, n.8, p.1997-2004, 2013.

CRAWLEY, S.W.; MOOSEKER, M.S.; TYSKA, M.J. Shaping the intestinal brush border. **Journal of Cell Biology**, v.207, n.4, pág.441-451, 2014.

CRIADO-MESAS, L.; ABDELLI, N.; NOCE, A.; FARRÉ, M.; PÉREZ, J.F.; SOLÀ-ORIOL, D.; MARTIN-VENEGAS, R.; FOROUZANDEH, A.; GONZÁLEZ-SOLÉ, F.; FOLCH, J.M. Transversal gene expression panel to evaluate intestinal health in broiler chickens in diferente challenging conditions. **Nature**, v.11, n.6315, 2021.

CRISPO, M.; SIMONE, T.S.; UZAL, F.A.; BICKFORD, A.A.; SHIVAPRASAD, H.L. Nonenteric lesions of necrotic enteritis in commercial chickens in California: 25 cases (2009–2018). **Avian Diseases**, v.64, n.3, pág.356-364, 2020.

DAHIYA, J.P.; HOEHLER, D.; WILKIE, D.C.; VAN KESSEL, A.G.; DREW, M.D. Dietary Glycine Concentration Affects Intestinal *Clostridium perfringens* and *Lactobacilli* Populations in Broiler Chickens. **Poultry Science**, v.84, pág.1875-1885, 2005.

DANESHMAND, A.; KERMANSHAHI, H.; SEKHAVATI, M.H.; JAVADMANESH, A.; AHMADIAN, M.; ALIZADEH, M.; ALDAWOODI, A. Effects of cLFchimera peptide on intestinal morphology, integrity, microbiota, and immune cells in broiler chickens challenged with necrotic enteritis. **Nature research**, v.10, n. 17704, 2020.

DIERICK, E.; DUCATELLE, R.; IMMERSEEL, F.; GOOSSENS, V. E. The administration schedule of coccidia is a major determinant in broiler necrotic enteritis models. **Poultry Science**, v.100, n.100806, 2021.

DU, E.; WANG, W.; ZHUI, L. G.; GUO, S.; GUO Y. Effects of thymol and carvracol supplementationn on intestinal integrity and imune responses of broiler chickens challenged with Clostridium perfringens. **Journal of Animal Science and Biotechnology***,* v.7; p.19, 2016.

DUCATELLE, R.; GOOSSENS, E.; DE MEYER, F.; EECKHAUT, V.; ANTONISSEN, G.; HAESEBROUCK, F.; VAN IMMERSEEL, F. Biomarkers for monitoring intestinal

health in poultry: present status and future perspectives. **Veterinary Research**, v. 49, n. 1, p. 43, 2018.

FASINA, Y.O.; LILLEHOJ, H.S. Characterization of intestinal immune response to Clostridium perfringens infection in broiler chickens.**Poultry Science**, v.98, pág.188-198, 2019.

FORDER, R.E.A.; NATTRASS, G.S.; GEIER, M.S.; HUGHES, R.J.; HYND, P.I. Quantitative analyses of genes associated with mucin synthesis of broiler chickens with induced necrotic enteritis. **Poultry Science**, v. 91, pág.1335-1341, 2012.

GHOLAMIANDEHKORDI, A.R.; TIMBERMONT, L.; LANCKRIET, A.; BROECK, W.V.D.; PEDERSEN, K.; DEWULF, J.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model, **Avian Pathology**, v.36, n.5, pág.375-382, 2007.

GOHARI, I.M.; NAVARRO, M.A.; LI, J.; SHRESTHA, A.; UZAL, F.; MCCLANE, B.A. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence*, v.12, n.1, pág.723-753, 2021.

GOLDER, H.M.; GEIER, M.S.; FORDER, R.E.A.; HYND, P.I.; HUGHES, R.J. Effects of necrotic enteritis challenge on intestinal micro-architecture and mucin profile, British. **Poultry Science**, v.52, n.4, pág.500-506, 2011.

HUANG, T.; GAO, B.; CHEN, W-L.; XIANG, R.; YUAN M-G, XU Z-H.; PENG, X-Y. Temporal Effects of High Fishmeal Diet on Gut Microbiota and Immune Response in *Clostridium perfringens*-Challenged Chickens. **Frontiers in Microbiology**, v.9, n.2754, 2018.

HUSTÁ, M.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F.; GOOSSENS, E. A. Rapid and Simple Assay Correlates *In Vitro* NetB Activity with *Clostridium perfringens* Pathogenicity in Chickens. **Microorganisms**, v.9, n.1708, 2021.

IERARDI, E.; LOSURDO, G.; IANNONE, A.; PISCITELLI, D.; AMORUSO, A.; BARONE, M.; PRINCIPI, M.; PISANI, A.; DI LEO, A. Lymphocytic duodenitis or microscopic enteritis and gluten-related conditions: what needs to be explored?.**Annals of Gastroenterology**, v.30, pág.380-392, 2017.

IMMERSEEL, F. V.; LHYS, U.; PEDERSEN, K.; PRESCOTT, J. F. Recent breakthroughs have unveiled the many knowledge gaps in *Clostridium perfringens* associated necrotic enteritis in chickens: the first International Conference on Necrotic Enteritis in Poultry. **Avian Pathology***,* v. 45, n. 3, p. 269–270, 2016.

IMMERSEEL, F.V.; BUCK, J.D.B.; PASMANS, F.; HUYGHEBAERT, G.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian Pathology**, v.33, n.6, 537-p.549, 2004.

INAGAKI-OHARA, K.; DEWI, F.N.; HISAEDA, H.; SMITH, A.L.; JIMI, F.; MIYAHIRA, M.; ABDEL-ALEEM, A.S.F.; HORII, Y.; NAWA, Y. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes Sustain the Epithelial Barrier Function against Eimeria vermiformis Infection. **Infection and Immunity**, v.74, n.9, pág.5292-5301, 2006.

JOHANSSON, M.E.V.; PHILLIPSON, M.; PETERSSON, J.; VELCICH, A.; HOLM, L.; HANSSON, G.C. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon

is devoid of bacteria. **PNAS** v.105, n.39, pág.15064-15069, 2008.

KAER, L.V.; OLIVARES-VILLAGOMEZ, D. Development, homeostasis, and functions of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Journal of Immunology**, v.200, n.7, pág.2235–2244, 2018.

KALDHUSDALA, M.; BENESTADA, S.L.; LØVLANDB, A. Review: Epidemiologic aspects of necrotic enteritis in broiler chickens - disease occurrence and production performance. **Avian Pathology**, vol.45, n.3, pág.271-274, 2016.

KEYBURN, A.L.; SHEEDY, S.A.; FORD, M.E.; WILLIAMSON, M.M.; AWAD, M.M.; ROOD, J.I.; MOORE, R.J. Alpha-Toxin of Clostridium perfringens Is Not an Essential Virulence Factor in Necrotic Enteritis in Chickens, **Infection and Immunity**, v.74, n.11, pág. 6496–6500, 2006.

KIU, R.; BROWN, J.; BEDWELL, H.; LECLAIRE, C.; CAIM, S.; PICKARD, D.; DOUGAN, G.; DIXON, R.A.; HALL, L.J. Genomic analysis on broiler-associated *Clostridium perfringens* strains and exploratory caecal microbiome investigation reveals key factors linked to poultry necrotic enteritis*.* **Animal Microbiome**, v.1, n.12, 2019.

KIU, R.; HALL, L.J. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. **Emerging Microbes and Infection***,* v.7, n.141, 2018.

KRENTZ, T.; ALLEN, S. REVIEW Bacterial translocation in critical illness. **Journal of Small Animal Practice,** v.58, n.4, 2017.

KUMAR, A.; TOGHYANI, M.; KHERAVII, S.K.; PINEDA, L.; HAN, Y.; SWICK, R.A.; WU, S.B.Potential of blended organic acids to improve performance and health of broilers infected with necrotic enteritis. **Animal Nutrition**, v.7, pág.440-449, 2021.

KUMAR, A.; TOGHYANI, M.; KHERAVII, S.K.; PINEDA, L.; YANMING HAN, Y.; SWICK, R.A.; WU, S-B. Organic acid blends improve intestinal integrity, modulate short-chain fatty acids profiles and alter microbiota of broilers under necrotic enteritis challenge. **Animal Nutrition**, v.8, 82-90, 2022.

LACEY, J.A.; JOHANESEN, P.A.; LYRAS, D.; MOORE, R.J. Genomic diversity of necrotic enteritis-associated strains of *Clostridium perfringens*: a review, **Avian Pathology**, v.45, n.3, pág.302-307, 2016.

LACEY, J.A.; STANLEY, D.; KEYBURN, A.L.; FORDB, M.; CHENB, H.; JOHANESENA, P.; LYRASA, D.; MOOREA, R.J. Clostridium perfringens-mediated necrotic enteritis is not influenced by the pre-existing microbiota but is promoted by large changes in the postchallenge microbiota. **Veterinary Microbiology**, v.227, 119-126, 2018.

LATORRE, J.D.; ADHIKARI, B.; PARK, S.H.; TEAGUE, K.D.; GRAHAM, L.E.;MAHAFFEY, B.D.; BAXTER, M.F.A.; HERNANDEZ-VELASCO, X.; KWON, Y.M.; RICKE, S.C.; BIELKE, L.R.; HARGIS, B.M.; TELLEZ, G. Evaluation of the Epithelial Barrier Function and Ileal Microbiome in an Established Necrotic Enteritis Challenge Model in Broiler Chickens. **Frontiers in Veterinary Science**, v.5, n.199, 2018.

LATORRE, J.D.; HERNANDEZ-VELASCO, X.; KUTTAPPAN, V.A.; WOLFENDEN, R.E.; VICENTE, J.L.; WOLFENDEN, A.D.; BIELKE, L.R.; PRADO-REBOLLEDO,

O.F.; MORALES, E.; HARGIS, B.M.; TELLEZ, G. Selection of Bacillus spp. for cellulase and xylanase production as direct-fed microbials to reduce digesta viscosity and *Clostridium perfringens* proliferation using an in vitro digestive model in different poultry diets. **Journal Frontiers in Veterinary Science**, v.2, n.25, 2015.

LEE, K.W.; LILLEHOJ, H.S.; JEOUNG, W.; JEOUNG, H.Y.; AN, D.J. Avian necrotic enteritis: experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. **Poultry Science**, v.90, pág.1381-1390, 2011.

LEE, K-W.; KIM, W.H.; LI, C.; LILLEHOJ, H.S. Detection of Necrotic Enteritis B–like Toxin Secreted by *Clostridium perfringens* Using Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Avian Diseases**, v.64, pág.490-495, 2020.

LEPP, D.; ROXAS, B.; PARREIRA, V.R.; MARRI, P.R.; ROSEY, E.L.; GONG, J.; SONGER, J.G.; VEDANTAM, G.; PRESCOTT, J.F. Identification of Novel Pathogenicity Loci in *Clostridium perfringens* Strains That Cause Avian Necrotic Enteritis. **PLoS ONE**, v.5, n.5, 2010.

LIAN, J.; WANG, Z.; XU, Z.; PANG, Y.; LENG, M.; TANG, S.; XINHENG ZHANG, X.; QIN, J.; CHEN, F.; LIN, W. Pathogenicity and molecular characterization of infectious bursal disease vírus in China. **Poultry Science**, v.101, n.101502, 2022.

LIU, D.; GUO, Y.; WANG, Z.; YUAN, J. Exogenous lysozyme influences *Clostridium perfringens* colonization and intestinal barrier function in broiler chickens, **Avian Pathology**, v.39, n.1, pág.17-24, 2010.

LU, M.; YUAN, B.; YAN, X.; SUN, Z.;, LILLEHOJ, H.S.; YOUNGSUB LEE, Y.; CALDER BALDWIN-BOTT, C.; LI, C. Clostridium perfringens-Induced Host-Pathogen Transcriptional Changes in the Small Intestine of Broiler Chickens. **Pathogens**, v.10, 2021.

MAHAFFEY, B.D.; BAXTER, M.F.A.; HERNANDEZ-VELASCO, X.; KWON, Y.M.; RICKE, S.C.; BIELKE, L.R.; HARGIS, B.M.; TELLEZ, G. Evaluation of the Epithelial Barrier Function and Ileal Microbiome in an Established Necrotic Enteritis Challenge Model in Broiler Chickens. **Frontiers in Veterinary Science**, v.5, n.199, 2018.

MCREYNOLDS, J.L.; BYRD, J.A.; ANDERSON, R.C.; MOORE, R.W.; EDRINGTON, T.S.; GENOVESE, K.J.; POOLE, T.L.; KUBENA, L.F.; NISBET, D.J. Evaluation of Immunosuppressants and Dietary Mechanisms in an Experimental Disease Model for Necrotic Enteritis. **Poultry Science,** v.83, pág.1948-1952, 2004.

MOHIUDDIN, M.; YUAN, W.; SONG, Z.; LIAO, S.; QI, N.; LI, J.; LV, M.; WU, C.; LIN, X.; HU, J.; CAI, H.; SUN, M. Experimental induction of necrotic enteritis with or without predisposing factors using *netB* positive *Clostridium perfringens* strains. **Gut Pathogens**, v.13, n.68, 2021.

MOORE, R.J. Necrotic enteritis predisposing factors in broiler chickens, **Avian Pathology**, v.45, n.3, pág.275-281, 2016.

bM'SADEQ, S.A.; WU, S-B.; CHOCT, M.; FORDER, R.; SWICK, R.A. Use of yeast cell wall extract as a tool to reduce the impact of necrotic enteritis in broilers. **Poultry Science**, v.94, pág.898-905, 2015.

M'SADEQ, S.A.; WU, S.; SWICK, R.A.; CHOCT, M. Towards the control of necrotic enteritis in broiler chickens with in-feed antibiotics phasing-out worldwide. **Animal**

Nutrition, v.1, pág.1-11, 2015.

NEVEL, C.J.V.; DECUYPERE, J.A.; DIERICK, N.A.; MOLLY, K. Incorporation of galactomannans in the diet of newly weaned piglets: effect on bacteriological and some morphological characteristics of the small intestine. **Archives of Animal Nutrition**, 59, 123-138, 2005.

OLKOWSKI, A.A.; WOJNAROWICZ, C.; CHINIO-TREJO, M.; DREW, M.D. Responses of broiler chickens orally challenged with Clostridium perfringens isolated from field cases of necrotic enteritis. **Research in Veterinary Science**, v.81, 2006

PALLIYEGURU, M.W.C.D.; ROSE, S.P. Sub-clinical necrotic enteritis: its aetiology and predisposing factors in commercial broiler production. **Journal World's Poultry Science**, v.70, n.80, pág.3-16, 2019.

PARENT, E.; ARCHAMBAULT, M.; CHARLEBOIS, A.; BERNIER-LACHANCE, J.; MARTINE BOULIANNE, M. A chicken intestinal ligated loop model to study the virulence of *Clostridium perfringens* isolates recovered from antibiotic-free chicken flocks. **Avian Pathology**, v.46, n.2, 138-149, 2017.

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

aPRESCOTT, J.F.; PARREIRA, V.R.; GOHARI, I.M.; LEPP, D. GONG, J. 2016. The pathogenesis of necrotic enteritis in chickens: what we know and what we need to know: a review. **Avian Pathology**, v.45, pág.288-294, 2016.

PRESCOTT, J.F.; SMYTH, J.A.; SHOJADOOST, B.; VINCE, A. Experimental reproduction of necrotic enteritis in chickens: A review. **Avian Pathology**, v.45, n.3, pág.317-322, 2016.

REDONDO, L.M.; REDONDO, E.A.; DELGADO, F.; SALA, L.F.; MIYAKAWA, M.E.F.An Experimental Reproduction of Necrotic Enteritis in Broiler Chickens. **Journal of Veterinary Science & Medicine,** v.4, n.1, 2016.

REVITT-MILLS, S.A.; VIDOR, C.J.; WATTS, T.D.; LYRAS, D.; ROOD, J.I.; ADAMS, V. Virulence plasmids of the pathogenic clostridia. **Microbiol Spectrum**, v.7, n.3, 2018.

ROOD, J.I.; ADAMS, V.; LACEY, J.; LYRAS, D.; MCCLANE, B.A.; MELVILLE, S.B.; MOORE, R.J.; POPOFF, M.R.; SARKER, M.R.; SONGER, J.G.; UZAL, F.A.; IMMERSEEL, F.V. Expansion of the Clostridium perfringens toxin-based typing scheme. **Anaerobe**, v.53, p.5-10, 2018.

ROSE, M.E.; HESKETH, P.; OGILVIE, B.M. Peripheral blood leucocyte response to coccidial infection: a comparison of the response m rats and chickens and its correlation with resistance to reinfection. **Immunology**, v.36, n.71, 1979.

RUHNKE, I.; ANDRONICOS, N.M.; SWICK, R.A.; HINE, B.; SHARMA, N.; KHERAVII, S.K.; WU, S-B.; HUNT, P. Immune responses following experimental infection with *Ascaridia galli* and necrotic enteritis in broiler chickens, **Avian Pathology**, v.46, n.6, pág.602-609, 2017.

SAITOH, Y.; SUZUKI, H.; TANI, K.; NISHIKAWA, K.; IRIE, K.; OGURA, Y.; TAMURA, A.; TSUKITA, S.; FUJIYOSHI, Y. Structural insight into tight junction

disassembly by *Clostridium perfringens* enterotoxin. **SCIENCE,** v.347, n.6223, pág.775-778, 2015.

SANCHES, A.W.D.; BELOTE, B.L.; HÜMMELGEN, P.; HEEMANN, A.C.W.; SOARES, I.; TUJIMOTO-SILVA, A.; TIRADO, A.G.C.; CUNHA, A.F.; SANTIN, E. Basal and Infectious Enteritis in Broilers Under the I See Inside Methodology: A Chronological Evaluation. **Frontiers in Veterinary Science**, v.6, n.512, 2020.

SAVVA, C.G.; FERNANDES DA COSTA, S.P.; BOKORI-BROWN, M.; NAYLOR, C.E.; COLE, A.R.; MOSS, D.S.; TITBALL, R.W.; BASAK, A.K. Molecular architecture and functional analysis of NetB, pore-forming toxin from *Clostridium perfringens.* **Journal of Biological Chemistry**, v.288, pág.3512-3522, 2013.

SHINI, S.; ALAND, C.R.; BRYDEN, W.L. Avian intestinal ultrastructure changes provide insight into the pathogenesis of enteric diseases and probiotic mode of action. **Nature research**, v.11, n.167, 2021.

SHOJADOOST, B.; VINCE, A.R.; PRESCOTT, J.F. The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by Clostridium perfringens: a critical review. **Veterinary Research**, v.43, n.74, 2012.

SHRESTHA, A.; UZAL, F.A.; MCCLANE, B.A. The interaction of *Clostridium perfringens* enterotoxin with receptor claudins, **Anaerobe**, v.41, pág.18-26, 2016.

SILVA, R.O.S.; OLIVEIRA JUNIOR, C.A.; GUEDES, R.M.C.; LOBATO, F.C.F. *Clostridium perfringens:* a review of the disease in pigs, horses and broiler chickens. **Ciência Rural,** v.45, n.6, p.1027-1034, 2015.

SMYTH, J.A. Pathology and diagnosis of necrotic enteritis: is it clearcut?. **Avian Pathology**, v.45, n.3, pág.282-287, 2016.

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

SOUZA, M.; BAPTISTA, A.A.S.; VALDIVIEZO, M.J.J.; JUSTINO, L.; MENCK-COSTA, M.F.; FERRAZ, C.R.; GLORIA, E.M.; VERRI JR, W.A.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. *Lactobacillus* spp. reduces morphological changes and oxidative stress induced by deoxynivalenol on the intestine and liver of broilers. **Toxicon**, v.185, pág.203-212, 2020.

SOUZA, M.; CICERO, C.E.; MENCK-COSTA, M.F.; JUSTINO, L.; GEREZ, J.R.; BAPTISTA, A.A.S.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Histological evaluation of the intestine of broiler chickens: comparison of three sampling methods. **Semina**, v.42, n.6, p.3247-3258, 2021.

STANLEY, D.; KEYBURN, A.L.; DENMAN, S.E.; MOORE, R.J. Alterações na microflora cecal de galinhas após desafio com *Clostridium perfringens* para induzir enterite necrótica. **Veterinary Microbiology**, v.159, pág.155-162, 2012.

STANLEY, D.; WU, S-B.; RODGERS, N.; SWICK, R.A.; MOORE, R.J. Differential Responses of Cecal Microbiota to Fishmeal, *Eimeria* and *Clostridium perfringens* in a Necrotic Enteritis Challenge Model in Chickens. **PLoS ONE**, v. 9, n.8, 2014.

TEIRLYNCK, E.; GUSSEM, M. D. E.; DEWULF, J.; HAESEBROUCK, F.;

DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. Morphometric evaluation of “dysbacteriosis” in broilers. **Avian Pathology***,* v. 40, n. 2, p. 139-144, 2011.

TIMBERMONT, L.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; IMMERSEEL, F.V. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. **Avian Pathology**, v.40, n.4, p.341-347, 2011.

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

TSIOURIS, V. Poultry management: a useful tool for the control of necrotic enteritis in poultry, **Avian Pathology**, vol.45, n.3, pág.323-325, 2016.

VAN DAMME, L.; COX, N.; CALLENS, C.; HAESEBROUCK, F.; DARGATZ, M.; DUCATELLE, R.; Van Immerseel, F.; Goossens, E. *C. perfringens* challenge reduces matrix metalloproteinase activity in the jejunal mucosa of Eimeria-infected broiler chickens. **Veterinary Research**, v.51, n.100, 2020.

WADE, B.; KEYBURN, A. The true cost of necrotic enteritis. **World Poultry**, v.31, pág.16-17, 2015. Disponivel em: https://www.poultryworld.net/Meat/Articles/2015/10/The-true-cost-of-necrotic-enteritis-2699819W/

WAEYENBERGHE, L.V.; GUSSEM, M.D.; VERBEKE, J.; DEWAELE, I.; GUSSEM, J.D. Timing of predisposing factors is important in necrotic enteritis models, **Avian Pathology**, v.45, n.3, pág.370-375, 2016.

WILSON, K.M.; CHASSER, K.M.; DUFF, A.F.; BRIGGS,W.N.; J. D. LATORRE, J.D.; J. R. BARTA, J.R.; BIELKE, L.R. Comparison of multiple methods for induction of necrotic enteritis in broilers. **Journal of Applied Poultry Research,** v.27, pág.577-589, 2018.

YANG, Q.; LIU, J.; WANG, X.; ROBINSON, K.; WHITMORE, M.A.; STEWART, S.N.; ZHAO, J.;ZHANG, G. Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With the Severity of Necrotic Enteritis. **Frontiers in Microbiology**, v.12, 2021.

YANG, W.Y.; CHOU, C.H.; WANG, C. Characterization of toxin genes and quantitative analysis of netB in necrotic enteritis (NE)-producing and non-NE-producing Clostridium perfringens isolated from chickens. **Anaerobe**, v.54, pág.115-120, 2018.

YEGANI, M.; KORVER, D.R. Review Factors Affecting Intestinal Health in Poultry. **Poultry Science**, v.87, 2052-2063, 2008.

ZAHOOR, I.; GHAYAS, A.; BASHEER, A. Genetics and genomics of susceptibility and immune response to necrotic enteritis in chicken: a review. **Molecular Biology Reports**, vol.45, pág.31-37, 2018.

ZAYTSOFF, S.J.M.; LYONS, S.M.; GARNER, A.M.; UWIERA, R.R.E.; ZANDBERG, W.F.; ABBOTT, D.W.; INGLIS, G.D. Host responses to Clostridium perfringens challenge in a chicken model of chronic stress, **Gut Pathogens**, v.12, n.24, 2020.

ZHOU, H.; LEPP, D.; PEI, Y.; LIU, M.; YIN, X.; MA, R.; PRESCOTT, J.F.; GONG, J. Influence of pCP1NetB ancillary genes on the virulence of *Clostridium perfringens* poultry necrotic enteritis strain CP1. **Gut Pathogens**, v.9, n.6, 2017.