

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo desta dissertação será
disponibilizado somente a partir de
03/07/2027.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Faculdade de Medicina Veterinária - Campus de Araçatuba

GUILHERME ZARATIN DUMALAKAS

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA
GERAÇÃO DO GENOMA MITOCONDRIAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Eimeria*
spp. EM GALINHAS DOMÉSTICAS**

Araçatuba
2025



GUILHERME ZARATIN DUMALAKAS

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA
GERAÇÃO DO GENOMA MITOCONDRIAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Eimeria*
spp. EM GALINHAS DOMÉSTICAS**

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

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles

Araçatuba

2025

D885d

Dumalakas, Guilherme Zaratín

Desenvolvimento de um protocolo de sequenciamento de nova geração do genoma mitocondrial para identificação de *Eimeria* spp. em galinhas domésticas / Guilherme Zaratín Dumalakas. -- Araçatuba, 2025

37 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

Orientador: Marcelo Vasconcelos Meireles

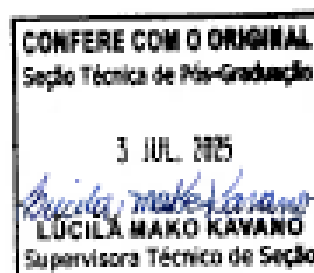
1. Avicultura. 2. Coccidiose. 3. Diagnóstico molecular. I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GUILHERME ZARATIN DUMALAKAS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL, DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA - CÂMPUS DE ARAÇATUBA.

Aos 03 dias do mês de julho do ano de 2025, às 9h, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de GUILHERME ZARATIN DUMALAKAS, intitulada **Desenvolvimento de um Protocolo de Sequenciamento de Nova Geração do Genoma Mitocondrial para Identificação de *Eimeria* spp. em Galinhas Domésticas**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Associado MARCELO VASCONCELOS MEIRELES (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP, Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Participação Presencial) do(a) Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP, Profa. Adjunta VALÉRIA DE SÁ JAYME (Participação Virtual) do(a) Departamento de Medicina Veterinária / Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia / UFG. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora,



Prof. Associado MARCELO VASCONCELOS MEIRELES



Dedico este trabalho à minha família,
amigos, à minha namorada e à minha
finada cadela Rebeca, que sempre
estiveram presentes na minha história e
me motivam a ser sempre melhor a cada
dia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais e avós, que sempre me incentivaram e foram grandes espelhos de pessoas para mim, mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha irmã, por ser sempre a minha companheira e uma força motriz para os meus esforços.

À minha namorada, por sempre estar ao meu lado, independentemente das dificuldades.

Aos meus amigos, aos quais tenho a honra de chamar de irmãos, por todas as histórias compartilhadas, e que me fizeram ser quem eu sou.

Ao meu orientador, por ter me dado a oportunidade de fazer parte da equipe de pesquisa e por todos os ensinamentos passados, tanto no âmbito da pesquisa, quanto como espelho de ética e conduta profissional.

À equipe de pós-graduandos e graduandos do Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária Unesp Araçatuba; se não fosse com o auxílio deles, este trabalho não seria possível.

Aos membros que compõem o Laboratório de Imunologia, ambiente de trabalho que compartilhamos e que se tornou um local aconchegante e prazeroso de trabalhar.

Aos meus avós, Norberto, Rosalina e Dolores, que nunca mediram esforços para estarem presentes em minha vida e me que deram todo o suporte e carinho.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2021/10400-23.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

“Tenha como regra na vida nunca se arrepender e nunca olhar para trás. O arrependimento é um terrível desperdício de energia; você não pode construir sobre ele, e ele é bom apenas para se ficar revolvendo” - Katherine Mansfield

RESUMO

O objetivo deste estudo foi desenvolver um método de sequenciamento de nova geração (NGS) visando o genoma mitocondrial, para detecção e identificação de *Eimeria* spp. em amostras fecais de galinhas domésticas. O protocolo de PCR foi padronizado usando *primers* gênero-específicos que anelam em sequências da região putativa do rRNA (*primer* senso) e do citocromo B (*primer* antisenso), no genoma mitocondrial de *Eimeria* spp. Os amplicons da PCR foram analisados por NGS realizado na plataforma Illumina MiSeq, de acordo com o protocolo de metagenômica 16S da Illumina (Illumina, 2013), com leituras de 150 bp e usando o kit MiSeq™ V2 (Illumina). Após a padronização, o protocolo de NGS foi validado pela análise de 91 amostras de DNA extraídas de amostras fecais de galinhas domésticas criadas em granjas comerciais de frangos de corte (CBCF) ou em sistemas alternativos de produção de aves (APPS), previamente examinadas para a presença de *Eimeria* spp. por NGS de amplicons do gene 18S rRNA. O NGS identificou *Eimeria* spp. na seguinte ordem de prevalência: 1) CBCFs: *Eimeria maxima* (44/45; 98%); *Eimeria acervulina* (39/45; 87%); *Eimeria tenella* (13/45; 29%); *Eimeria mitis* (6/45; 13%); e *Eimeria praecox* (5/45; 11%). 2) APPS: *E. mitis* (27/46; 59%); *E. acervulina* (23/46; 50%); *Eimeria nagambie* (18/46; 39%); *E. maxima* (13/46; 28%); *E. praecox* (11/46; 23%); *Eimeria lata* (10/46; 22%); *E. tenella* (9/46; 20%); *Eimeria brunetti* (8/46; 17,4%); *Eimeria zaria* (7/46; 15%); *Eimeria* sp. (6/46; 13%); e *Eimeria necatrix* (6/46; 13%). A identificação das dez espécies de *Eimeria* da galinha doméstica, juntamente com uma nova unidade taxonômica operacional (OTU) de *Eimeria*, demonstra que o NGS detecta e diferencia com sucesso as espécies e novas OTUs de *Eimeria* em amostras fecais de galinhas, o que é essencial para estabelecer medidas de controle para a coccidiose na indústria avícola.

Palavras-chave: avicultura; coccidiose; diagnóstico molecular.

ABSTRACT

This study aimed to develop a next generation sequencing (NGS) method for sequencing amplicons produced via PCR that targets the mitochondrial genome, allowing the detection and identification of *Eimeria* spp. in fecal samples from domestic chickens. A PCR protocol was standardized using genus-specific primers that anneal to putative rRNA (forward primer) and cytochrome B (reverse primer) sequences within the mitochondrial genome of *Eimeria* spp. PCR amplicons were analyzed using NGS on the Illumina MiSeq platform according to the Illumina 16S metagenomic protocol (Illumina, 2013), with 150 bp paired-end reads and a MiSeq™ Reagent kit v2 (Illumina). Following assay standardization, next generation sequencing was validated through the analysis of 91 DNA samples extracted from fecal samples of domestic chickens raised in commercial broiler chicken farms (CBCF) or alternative poultry production systems (APPS), which had previously been examined for the presence of *Eimeria* spp. by NGS of 18S rRNA gene amplicons. The NGS identified *Eimeria* spp. in the following order of prevalence.: 1) CBCFs: *Eimeria maxima* (44/45; 98%); *Eimeria acervulina* (39/45; 87%); *Eimeria tenella* (13/45; 29%); *Eimeria mitis* (6/45; 13%); and *Eimeria praecox* (5/45; 11%). 2) APPS: *E. mitis* (27/46; 59%); *E. acervulina* (23/46; 50%); *Eimeria nagambie* (18/46; 39%); *E. maxima* (13/46; 28%); *E. praecox* (11/46; 23%); *Eimeria lata* (10/46; 22%); *E. tenella* (9/46; 20%) *Eimeria brunetti* (8/46; 17.4%); *Eimeria zaria* (7/46; 15%); *Eimeria* sp. (6/46; 13%); and *Eimeria necatrix* (6/46; 13%). The identification of the ten *Eimeria* species of domestic chickens, along with a novel *Eimeria* operational taxonomic unit (OTU), demonstrates that NGS successfully detects and differentiates *Eimeria* species and new OTUs from domestic chicken fecal samples, which is essential for establishing control measures for coccidiosis in the poultry industry.

Keywords: coccidiosis; molecular diagnosis; poultry farming.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico de <i>Eimeria</i> spp.	15
Figura 2 - Região de anelamento dos <i>primers</i> senso e antisenso no genoma mitocondrial de <i>E. tenella</i> (NC_088458.1).....	22
Figura 3 - Sítios de degeneração dos <i>primers</i> Mitr-RNA-F (A) e Mit-COB-R (B) em sequências de <i>Eimeria</i> spp. da galinha doméstica.....	23
Figura 4 - Total de sequências obtidas por NGS nos núcleos comerciais de frangos de corte.....	26
Figura 5 - Total de sequências obtidas por NGS nas amostras dos sistemas de criação alternativos.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> usados para detectar e identificar <i>Eimeria</i> spp. em galinhas domésticas por PCR e NGS.....	22
Tabela 2 - Comparação dos resultados do NGS de amplicons do genoma mitocondrial com o resultado de amostras previamente examinadas por NGS de amplicons do gene 18S rRNA	28
Tabela 3 - Similaridade genética entre as sequências obtidas por PCR e NGS com sequências de <i>Eimeria</i> spp. registradas no <i>GenBank</i>	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
NCFC	Núcleos Comerciais de Frangos de Corte
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
SCA	Sistemas de Criações Alternativas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1	ETIOLOGIA	14
1.2	CICLO BIOLÓGICO E PATOGENIA	15
1.3	DIAGNÓSTICO	16
1.4	PREVENÇÃO E TRATAMENTO	16
1.5	JUSTIFICATIVAS E OBJETIVO	17
2	CAPÍTULO 1 - DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO DO GENOMA MITOCONDRIAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>EIMERIA</i> SPP. EM GALINHAS DOMÉSTICAS	18
2.1	RESUMO	18
2.2	ABSTRACT	19
2.3	INTRODUÇÃO	20
2.4	MATERIAL E MÉTODOS	21
2.4.1	Padronização da PCR para Amplificação de um Fragmento Parcial do DNA Mitochondrial de <i>Eimeria</i> spp.	21
2.4.2	Sequenciamento de Nova Geração	24
2.4.3	Comparação dos resultados deste estudo com os resultados obtidos previamente por NGS de amplicons do gene 18S rRNA	25
2.5	RESULTADOS	26
2.5.1	Sequenciamento de Nova Geração das Amostras dos NCFC e SCA	26
2.6	DISCUSSÃO	30
2.7	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO GERAL

A eimeriose da galinha doméstica é comumente denominada como coccidiose aviária, que é uma doença que acomete o trato intestinal das galinhas domésticas. Atualmente são conhecidas 10 espécies de *Eimeria* que infectam a galinha doméstica: *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria lata*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria nagambie*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria praecox*, *Eimeria tenella* e *Eimeria zaria* (Blake *et al.*, 2021).

Os custos globais decorrentes da eimeriose são estimados em £10,4 bilhões anuais (Blake *et al.*, 2020), sendo uma das enfermidades que possui maior impacto econômico na avicultura comercial. Pelo fato de *Eimeria* spp. apresentar tropismo por células epiteliais do intestino, a eimeriose resulta em interferência na digestão e absorção de nutrientes, além de predispor as aves a infecções bacterianas secundárias (Allen; Fetterer, 2002).

Os sinais clínicos da eimeriose são variáveis, de acordo com o grau de infecção, e são caracterizados por perda de peso, diarreia e mortalidade; no caso de aves de postura e matrizes na fase de produção, há queda na produção de ovos (Allen; Fetterer, 2002).

Com base nesses fatores, é de suma importância o conhecimento sobre a etiologia, epidemiologia, o diagnóstico, a profilaxia e o controle da eimeriose em criações industriais de galinhas domésticas no Brasil.

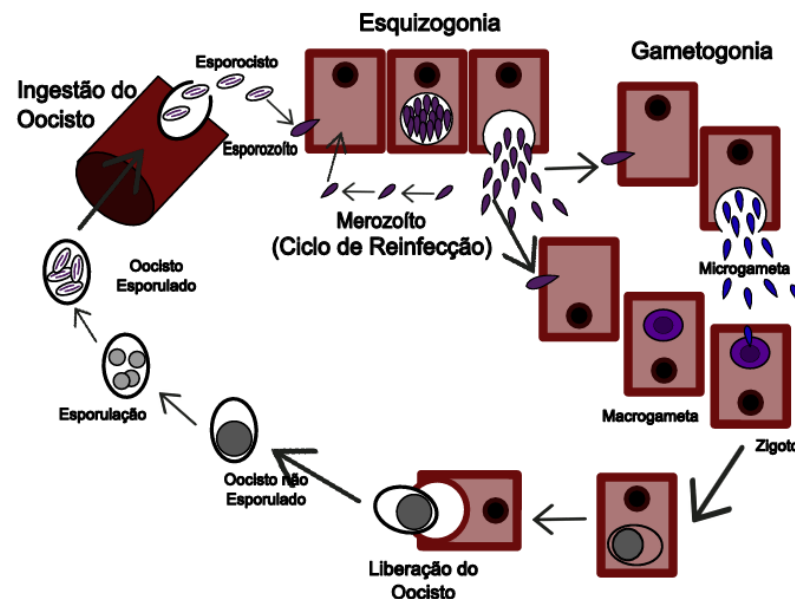
1.1 ETIOLOGIA

Os coccídios causadores da eimeriose aviária são classificados no Filo Apicomplexa, classe Conoidasida, subclasse Coccidea, ordem Eucoccidiorida, subordem Eimeriorina, família Eimeriidae e gênero *Eimeria* (Burrell *et al.*, 2020). Dentre as 10 espécies de *Eimeria* da galinha doméstica, três foram recentemente identificadas: *Eimeria lata*, *Eimeria nagambie* e *Eimeria zaria* (Blake *et al.*, 2021). Todas as 10 espécies já foram identificadas no Brasil, inclusive as três novas espécies recentemente classificadas (Itoyama, 2025; Soares Júnior *et al.*, 2023).

1.2 CICLO BIOLÓGICO E PATOGENIA

O ciclo biológico de *Eimeria* spp. inicia com a ingestão de oocistos esporulados. O esporozoíto presente dentro dos esporocistos penetram nos enterócitos, onde ocorrem as fases assexuada (esquizogonia) e sexuada (gametogonia) (Figura 1), que resultam em lise celular.

Figura 1 - Ciclo biológico de *Eimeria* spp.



Fonte: Itoyama, 2025.

O tropismo tecidual varia de acordo com a espécie de *Eimeria*: duodeno: *E. acervulina* e *E. praecox*; jejuno e íleo: *E. maxima*, *E. mitis* e *E. necatrix*; íleo e reto: *E. brunetti*; e ceco: *E. necatrix* e *E. tenella*. *Eimeria necatrix* possui uma particularidade em seu ciclo biológico, pois a sua fase assexuada ocorre no jejuno e íleo e a fase sexuada ocorre no ceco (Bafundo; McCullough, 2025).

A lise celular, a inflamação e a disbiose decorrentes da infecção por *Eimeria* resultam em má absorção de nutrientes, queda de ganho de peso, diarreia, e eventual mortalidade. Há também predisposição a infecções concomitantes, sendo a mais relevante a enterite necrótica causada por *Clostridium perfringens* (Mathis *et al.*, 2025).

1.3 DIAGNÓSTICO

Os métodos usados para o diagnóstico espécie-específico da eimeriose variam desde o exame microscópico, para a detecção de oocistos (Long *et al.*, 1976), a análise de lesões macroscópicas e do tropismo tecidual (Johnson; Reid, 1970), e o uso de técnicas moleculares, que identificam o gênero e a espécie de *Eimeria* (Fatoba; Adeleke, 2018; Vrba; Blake; Poplstein, 2010).

O diagnóstico espécie-específico de *Eimeria* spp. em galinhas domésticas é realizado comumente por PCRs espécie-específicas (Blake *et al.*, 2021; Vrba *et al.*, 2010). Mais recentemente, o sequenciamento de nova geração tem sido usado para o diagnóstico espécie-específico e para a detecção de variantes genéticas e de novas unidades taxonômicas operacionais (OTUs) de *Eimeria* spp. (Hauck *et al.*, 2019; Hinsu *et al.*, 2018).

1.4 PREVENÇÃO E TRATAMENTO

O principal método de profilaxia contra a coccidiose aviária é o uso de anticoccidianos na ração, desde o primeiro dia de vida, com retirada do produto da ração considerando o período de carência antes do abate (Chapman, 2009; Chapman; Rathinam; 2022). No entanto, esse método de profilaxia tem sido questionado em função da eventual presença de resíduos na carne de frango ou pelo desenvolvimento de resistência às drogas, além da pressão de consumidores por produtos livres de medicamentos (Blake; Marugan-Hernandez; Tomley, 2021; Shirlei; Smith; Blake, 2007).

As vacinas para a profilaxia da coccidiose, compostas por cepas patogênicas (selvagens) ou por cepas de *Eimeria* que apresentam um ciclo mais curto, denominadas como cepas precoces, são usadas principalmente em aves reprodutoras (bisavós, avós e matrizes), em sistemas alternativos de produção (*free-range* e *cage-free*) e em algumas criações de aves de postura comercial mantidas em gaiolas (Chapman *et al.*, 2002). Em frangos de corte, principalmente no Brasil, o uso de vacinas ainda é restrito a algumas empresas.

1.5 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVO

No Brasil, as vacinas contra a eimeriose são utilizadas principalmente em aves de vida longa, particularmente em aves reprodutoras (bisavós, avós e matrizes). Apesar de os anticoccidianos ainda serem predominantes na profilaxia da coccidiose em frangos de corte, há uma pressão crescente de países importadores em relação a resíduos de medicamentos em carcaças. Além disso, observa-se a crescente demanda da sociedade por produtos livres de qualquer produto químico, o que eventualmente pode resultar em banimento do uso de anticoccidianos em aves destinadas à exportação e ao consumo interno e na substituição do uso de anticoccidianos pela vacinação, como observado nos Estados Unidos (Blake *et al.*, 2021). Essa nova realidade do mercado enfatiza a importância de pesquisas que determinem a prevalência das diferentes espécies e potenciais novas unidades taxonômicas operacionais de *Eimeria* para sua futura inclusão em vacinas. Portanto, este trabalho teve como objetivo desenvolver um novo protocolo de NGS para detecção e identificação de *Eimeria* spp. e de eventuais novas OTUs de *Eimeria* da galinha doméstica.

REFERÊNCIAS

- AFGAN, E.; BAKER, D.; BATUT, B.; VAN DEN BEEK, M.; BOUVIER, D.; CECH, M.; CHILTON, J.; CLEMENTS, D.; CORAOR, N.; GRÜNING, B. A.; GUERLER, A.; HILLMAN-JACKSON, J.; HILTEMANN, S.; JALILI, V.; RASCHE, H.; SORANZO, N.; GOECKS, J.; TAYLOR, J.; NEKRUTENKO, A.; BLANKENBERG, D. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. **Nucleic Acids Research**, London, v. 46, n. W1, p. W537-W544, 2018. DOI: 10.1093/nar/gky379.
- ALLEN, P. C.; FETTERER, R. H. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington-DC, v. 15, n. 1, p. 58-65, 2002. DOI: 10.1128/CMR.15.1.58-65.2002.
- BAFUNDO, K. W.; MCCULLOUGH, K. M. Endogenous development and histopathological differences among the chicken *Eimeria*: a review. **Avian Diseases**, Jacksonville, v. 69, n. 1, p. 6-15, 2025. DOI: 10.1637/aviandiseases-D-24-00075.
- BLAKE, D. P.; KNOX, J.; DEHAECK, B.; HUNTINGTON, B.; RATHINAM, T.; RAVIPATI, V.; AYOADE, S.; GILBERT, W.; ADEBAMBO, A. O.; JATAU, I. D.; RAMAN, M.; PARKER, D.; RUSHTON, J.; TOMLEY, F. M. Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. **Veterinary Research**, London, v. 51, n. 1, e115, p. 1-14, 2020. DOI: 10.1186/s13567-020-00837-2.
- BLAKE, D. P.; VRBA, V.; XIA, D.; JATAU, I. D.; SPIRO, S.; NOLAN, M. J.; UNDERWOOD, G.; TOMLEY, F. M. Genetic and biological characterisation of three cryptic *Eimeria* operational taxonomic units that infect chickens (*Gallus gallus domesticus*). **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 51, n. 8, p. 621-634, 2021. DOI: 10.1016/j.ijpara.2020.12.004.
- BLAKE, D.P.; MARUGAN-HERNANDEZ, V.; TOMLEY, F. M. Spotlight on avian pathology: *Eimeria* and the disease coccidiosis. **Avian Pathology**, London, v. 50, n. 3, p. 209-213, 2021. DOI: 10.1080/03079457.2021.1912288.
- BURRELL, A.; TOMLEY, F. M.; VAUGHAN, S.; MARUGAN-HERNANDEZ, V. Life cycle stages, specific organelles and invasion mechanisms of *Eimeria* species. **Parasitology**, London, v. 147, n. 3, p. 263-278, 2020. DOI: 10.1017/S0031182019001562.
- CHAPMAN H. D. A landmark contribution to poultry science - prophylactic control of coccidiosis in poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 88, n. 4, p. 813-815, 2009. DOI: 10.3382/ps.2008-00316.
- CHAPMAN H. D.; CHERRY, T. E.; DANFORTH, H. D.; RICHARDS, G.; SHIRLEY, N. W.; WILLIAMS, R. B. Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 617-619, 2002. DOI: 10.1016/s0020-7519(01)00362-9.

CHAPMAN, H. D.; RATHINAM, T. Focused review: the role of drug combinations for the control of coccidiosis in commercially reared chickens. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, Amsterdam, v. 18, p. 32-42, 2022. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2022.01.001.

CHEN, S.; ZHOU, Y.; CHEN, Y.; GU, J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. **Bioinformatics**, Oxford, v. 34, n. 17, p. i884-i890, 2018. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty560.

EDGAR, R. C.; HAAS, B. J.; CLEMENTE, J. C.; QUINCE, C.; KNIGHT, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, Oxford, v. 27, n. 16, p. 2194-2200, 2011. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr381.

FATOBA, A. J.; ADELEKE, M. A. Diagnosis and control of chicken coccidiosis: a recent update. **Journal of Parasitic Diseases**, New Dehli, v. 42, n. 4, p. 483-493, 2018. DOI: 10.1007/s12639-018-1048-1.

GABY, J. C.; BUCKLEY, D. H. The use of degenerate primers in qPCR analysis of functional genes can cause dramatic quantification bias as revealed by investigation of nifH primer performance. **Microbial Ecology**, New York, v. 74, n. 3, p. 701-708, 2017. DOI: 10.1007/s00248-017-0968-0.

GALAXY COMMUNITY. The Galaxy platform for accessible, reproducible, and collaborative biomedical analyses: 2022 update. **Nucleic Acids Research**, London, v. 50, n. W1, p. W345-W351, 2022. DOI: 10.1093/nar/gkac247.

GODWIN, R. M.; MORGAN, J. A. T. A molecular survey of *Eimeria* in chickens across Australia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 214, n. 1-2, p. 16-21, 2015. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.09.030.

GODWIN, R. M.; MORGAN, J. A. T. A simple, one-tube assay for the simultaneous detection and diagnosis of ten Australian poultry *Eimeria*. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 35, n. 4, p. 494-502, 2014. DOI: 10.1002/elps.201300286.

HAUCK, R.; CARRISOSA, M.; MCCREA, B. A.; DORMITORIO, T.; MACKLIN, K. S. Evaluation of next-generation amplicon sequencing to identify *Eimeria* spp. of chickens. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 63, n. 4, p. 577-583, 2019. DOI: 10.1637/aviandiseases-D-19-00104.

HEIN, H. E. *Eimeria acervulina*, *E. brunetti*, and *E. maxima*: pathogenic effects of single or mixed infections with low doses of oocysts in chickens. **Experimental Parasitology**, New York, v. 39, n. 3, p. 415-421, 1976. DOI: 10.1016/0014-4894(76)90045-x.

HINSU, A. T.; THAKKAR, J. R.; KORINGA, P. G.; VRBA, V.; JAKHESARA, S. J.; PSIFIDI, A.; GUITIAN, J.; TOMLEY, F. M.; RANK, D. N.; RAMAN, M.; JOSHI, C. G.; BLAKE, D. P. Illumina next generation sequencing for the analysis of *Eimeria* populations in commercial broilers and indigenous chickens. **Frontiers in Veterinary Science**, Lausanne, v. 5, e176, p. 1-9, 2018. DOI: 10.3389/fvets.2018.00176.

ILLUMINA. **16S metagenomic sequencing library preparation**. San Diego, 2013. 28 f.

Disponível em:

https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf. Acesso em: 11 jul. 2023.

IMAI, R. K.; BARTA, J. R. Distribution and abundance of *Eimeria* species in commercial turkey flocks across Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 60, n. 2, p. 153-159, 2019.

ITOYAMA, B. F. **Morphological and molecular characterization of a pure isolate of *Eimeria lata*, identified for the first time in domestic chickens in Brazil**. 2025. 69 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2025.

JOHNSON, J.; REID, W. M. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 28, n. 1, p. 30-36, 1970. DOI: 10.1016/0014-4894(70)90063-9.

JOYNER, L. P.; NORTON, C. C. *Eimeria mitis* in mixed infections with *E. acervulina* and *E. brunetti* in the fowl. **Parasitology**, London, v. 86, pt. 3, p. 381-390, 1983. DOI: 10.1017/s0031182000050575.

KREHENWINKEL, H.; WOLF, M.; LIM, J. Y.; ROMINGER, A. J.; SIMISON, W. B.; GILLESPIE, R. G. Estimating and mitigating amplification bias in qualitative and quantitative arthropod metabarcoding. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, e17668, p. 1-12, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-17333-x.

KRUTH, P. S.; LANE, T.; BARTA, J. R. Organellar genome dynamics of exogenous stages of *Eimeria tenella*. **Parasites & Vectors**, London, v. 17, n. 1, e428, p. 1-14, 2024. DOI: 10.1186/s13071-024-06498-w.

KWOK, S.; KELLOG, D. E.; MCKINNEY, N.; SPASIC, D.; GODA, L.; LEVENSON, C.; SNINSKY, J. J. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, n. 4, p. 999-1005, 1990. DOI: 10.1093/nar/18.4.999.

LONG, P. L.; MILLARD, B. J.; JOYNER, L. P.; NORTON, C. C. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. **Folia Veterinaria Latina**, Milano, v. 6, n. 3, p. 201-217, 1976.

LANG, M.; ORGOGOZO, V. Identification of homologous gene sequences by PCR with degenerate primers. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 772, p. 245-256, 2011. DOI: 10.1007/978-1-61779-228-1_14.

MATHIS, G. F.; LUMPKINS, B.; CERVANTES, H. M.; FITZ-COY, S. H.; JENKINS, M. C.; JONES, M. K.; PRICE, K. R.; DALLOUL, R. A. Coccidiosis in poultry: disease mechanisms, control strategies, and future directions. **Poultry Science**, Cambridge, v. 104, n. 5, e104663, p. 1-9, 2025. DOI: 10.1016/j.psj.2024.104663.

MCDUGALD, L. R.; SILVA, J. M.; SOLIS, J.; BRAGA, M. A survey of sensitivity to anticoccidial drugs in 60 isolates of coccidia from broiler chickens in Brazil and Argentina. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 31, n. 2, p. 287-292, 1987.

MORAES, J. C.; FRANÇA, M.; SARTOR, A. A.; BELLATO, V.; MOURA, A. B.; MAGALHÃES, M. L. B.; SOUZA, A. P.; MILETTI, L. C. Prevalence of *Eimeria* spp. in broilers by multiplex PCR in the southern region of Brazil on two hundred and fifty farms. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 59, n. 2, p. 277-281, 2015. DOI: 10.1637/10989-112014-Reg.

POND, S. L. K.; FROST, S. D. W.; MUSE, S. V. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 676-679, 2004. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti079.

POSAKONY, J. W.; ENGLAND, J. M.; ATTARDI, G. Mitochondrial growth and division during the cell cycle in HeLa cells. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 74, n. 2, p. 468-491, 1977. DOI: 10.1083/jcb.74.2.468.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009. DOI: 10.1128/AEM.01541-09.

SHIRLEY, M. W.; SMITH, A. L.; TOMLEY, F. M. The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. **Advances in Parasitology**, London, v. 60, p. 285-330, 2005. DOI: 10.1016/S0065-308X(05)60005-X.

SHIRLEY, M. W.; SMITH, A. L.; BLAKE, D. P. Challenges in the successful control of the avian coccidia. **Vaccine**, Amsterdam, v. 25, n. 30, p. 5540-5547, 2007. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.12.030

SNYDER, R. P.; GUERIN, M. T.; HARGIS, B. M.; IMAI, R.; KRTUH, P. S.; PAGE, G.; REJMAN, E.; BARTA, J. R. Exploiting digital droplet PCR and next generation sequencing technologies to determine the relative abundance of individual *Eimeria* species in a DNA sample. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 296, e109443, p. 1-11, 2021. DOI: 10.1016/j.vetpar.2021.109443.

SOARES JÚNIOR, J. C.; ITOYAMA, B. F.; BERETTA, B. M. S.; HOSSOTANI, C. M. S.; SILVA, M. S. C.; SILVA, G. S.; NAKAMURA, A. A.; LOPES, F. L.; MEIRELES, M. V. Identification of *Eimeria* spp. in domestic chickens raised in alternative poultry production systems in the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 32, n. 4, e011123, p. 1-9, 2023. DOI: 10.1590/S1984-29612023075.

SRIVASTAVA, S. K.; PARKER, C.; O'BRIEN, C. N.; TUCKER, M. S.; THOMPSON, P. C.; ROSENTHAL, B. M.; DUBEY, J. P.; KHAN, A.; JENKINS, M. C. Chromosomal scale assembly reveals localized structural variants in avian caecal coccidian parasite *Eimeria tenella*. **Scientific Reports**, London, v. 13, n. 1, e22802, p. 1-12, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-50117-0.

TERRA, M. T. B.; PACHECO, W. J.; HARRISON, M.; MCCREA, B. A.; HAUCK, R. A survey of coccidia and nematodes in pastured poultry in the state of Georgia. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 65, n. 2, p. 250-256, 2021. DOI: 10.1637/aviandiseases-D-20-00120.

VRBA, V.; BLAKE, D. P.; POPLSTEIN, M. Quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of all seven *Eimeria* species that infect the chicken. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 174, n. 3-4, p. 183-190, 2010. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.09.006.

WILLIAMS, R. B. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 29, n. 8, p. 1209-1229, 1999. DOI: 10.1016/s0020-7519(99)00086-7.