



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

JOSÉ CARLOS SOARES JUNIOR

**IDENTIFICAÇÃO DE EIMERIA NAGAMBIE, EIMERIA
ZARIA E EIMERIA SPP. GENETICAMENTE DISTINTAS
EM SISTEMAS DE CRIAÇÃO ALTERNATIVOS DE
GALINHAS DOMÉSTICAS NO ESTADO DE SÃO PAULO,
BRASIL**

Araçatuba
2023

JOSÉ CARLOS SOARES JUNIOR

**IDENTIFICAÇÃO DE EIMERIA NAGAMBIE, EIMERIA
ZARIA E EIMERIA SPP. GENETICAMENTE DISTINTAS
EM SISTEMAS DE CRIAÇÃO ALTERNATIVOS DE
GALINHAS DOMÉSTICAS NO ESTADO DE SÃO PAULO,
BRASIL**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina Veterinária
de Araçatuba da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” – UNESP, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo
Vasconcelos Meireles

Araçatuba

2023

S676i Soares Junior, José Carlos
Identificação de *Eimeria nagambie*, *Eimeria zaria* e *Eimeria* spp. geneticamente distintas em sistemas de criação alternativos de galinhas domésticas no estado de São Paulo, Brasil. / José Carlos Soares Junior. -- Araçatuba, 2024
27 f. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientador: Marcelo Vasconcelos Meireles

1. *Eimeria* spp. 2. Galinha doméstica. 3. Detecção molecular.
4. Brasil. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Identificação de *Eimeria nagambie*, *Eimeria zaria* e *Eimeria spp.* geneticamente distintas em sistemas de criação alternativos de galinhas domésticas no estado de São Paulo, Brasil

AUTOR: JOSÉ CARLOS SOARES JUNIOR

ORIENTADOR: MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES (Participação Virtual) 
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI (Participação Virtual) 
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Pesquisadora GIANE SERAFIM DA SILVA (Participação Virtual)
Instituto Biológico, Laboratório de Parasitologia Animal / APTA - Votuporanga/SP

Araçatuba, 31 de janeiro de 2023.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Identificação de *Eimeria nagambie*, *Eimeria zaria* e *Eimeria spp.* geneticamente distintas em sistemas de criação alternativos de galinhas domésticas no estado de São Paulo, Brasil

AUTOR: JOSÉ CARLOS SOARES JUNIOR

ORIENTADOR: MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Pesquisadora GIANE SERRAPIM DA SILVA (Participação Virtual)
Instituto Biológico, Laboratório de Parasitologia Animal / APTA - Votuporanga/SP

Araçatuba, 31 de janeiro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Diante da intensa jornada, durante todos os processos de pós-graduação, é impossível imaginar que conseguiria chegar ao final sozinho. Caminhar ao lado de quem amamos faz com que a caminhada fique mais leve, mais tranquila e tenha a força renovada.

Das inúmeras companhias dessa caminhada, agradeço em especial a minha esposa Fernanda, ao meu irmão Juliano e aos meus pais Marcilene e Carlos.

Agradeço também aos amigos que colaboraram com o trabalho que me e socorreram durante as dificuldades na execução do experimento, em ressalva, Camila e Débora, que sempre se mostraram dispostas a ajudar.

Dentre os pesquisadores, com muito carinho agradeço ao Professor Dr. Marcelo Vasconcelos, que mesmo com toda a experiência e anos de atuação, ainda mantém vívida a chama da educação e o prazer por ensinar.

Existe uma frase citada por Paulo Freire, a qual diz “Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas transformam o mundo”. Portanto hoje, agradeço especialmente ao menino do interior, filho de operários, sem uma boa casa ou dinheiro para se vestir e comer, mas que estranhamente tinha o sonho de salvar vidas que não podiam ser salvas; agradeço por ter acreditado que poderia, por ter ficado diversas noites em claro, trabalhado, estudado, se formado e caminhado mesmo que esgotado até aqui. Talvez a maior gratidão desse momento seja poder olhar para trás e saber que deixei o menino voar.

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

SOARES JUNIOR, J. C. **Identificação de *Eimeria nagambie*, *Eimeria zaria* e *Eimeria* spp. geneticamente distintas em sistemas de criação alternativos de galinhas domésticas no estado de São Paulo, Brasil.** 2023. 27 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

Coccidiose é o termo usado para a infecção por *Eimeria* spp. e representa uma das enfermidades de maior importância econômica para a indústria avícola. Apresenta alta prevalência em criações industriais de frangos de corte, onde há uma alta probabilidade de infecção por pelo menos uma espécie de *Eimeria*. Além das sete espécies de *Eimeria* já conhecidas, recentemente foram identificadas três novas espécies que parasitam a galinha doméstica: *Eimeria lata*, *Eimeria nagambie* e *Eimeria zaria*, que inicialmente foram denominadas como unidades taxonômicas operacionais (OTU) X, Y e Z, respectivamente. Diante da ausência de estudos atualizados realizados no Brasil referentes a essas novas espécies, o objetivo deste trabalho foi identificar *E. lata*, *E. nagambie* e *E. zaria* em galinhas criadas em sistemas extensivo e semi-intensivo no estado de São Paulo. Foram utilizadas 93 amostras de DNA genômico extraído de fezes de galinhas domésticas de 35 criações semi-intensivas e 58 criações extensivas localizadas em 12 municípios de diversas regiões do Estado de São Paulo. Essas amostras foram classificadas como grupo 1 (G1) e estavam armazenadas por aproximadamente quatro anos. Adicionalmente, foram utilizadas 168 amostras fecais colhidas no ano de 2021 em criações de galinhas domésticas de sistemas extensivos (143) e semi-intensivos (25), classificadas como grupo 2 (G2), em sete municípios do Estado de São Paulo. As amostras do G2 foram submetidas ao exame microscópico direto; aquelas negativas e todas as amostras do G1 foram examinadas por PCR gênero-específica. As amostras positivas para *Eimeria* spp. foram examinadas por PCR espécie-específica (*E. lata*, *E. nagambie* e *E. zaria*) seguida de clonagem molecular e sequenciamento genético. Os resultados confirmaram, pela primeira vez em território brasileiro, a presença de *E. nagambie* (15/79; 18,9%), *E. zaria* (19/79; 24%) e de novas variantes genéticas relacionadas a *E. lata* e *E. maxima* (6/79; 7,6%) em galinhas domésticas.

Palavras-chave: *Eimeria* spp.. Galinha doméstica. Detecção molecular. Brasil.

SOARES JUNIOR, J. C. **Identification of *Eimeria nagambie*, *Eimeria zaria*, and genetically diverse *Eimeria* spp. in alternative poultry production systems in the state of São Paulo, Brazil** 2023. 27 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

Coccidiosis is the term used for infection by *Eimeria* spp. and represents one of the most economically important diseases for the poultry industry. It has a high prevalence in industrial broiler chicken farms, where there is a high probability of infection by at least one species of *Eimeria*. In addition to the seven species of *Eimeria* already known, three new species from domestic chicken were recently identified: *Eimeria lata*, *Eimeria nagambie*, and *Eimeria zaria*. Given the lack of updated studies carried out in Brazil regarding these new species, this study aimed to identify *E. lata*, *E. nagambie* and *E. zaria* in chickens reared from extensive and semi-intensive systems in the state of São Paulo. Ninety-three samples of genomic DNA extracted from feces of domestic chickens from 35 semi-intensive and 58 extensive farms located in 12 municipalities in different regions of the State of São Paulo were classified as group 1 (G1) and have been stored at -20°C for approximately four years. Additionally, 168 fecal samples classified as group 2 (G2) were collected in the year 2021 from domestic chickens raised in extensive (143) and semi-intensive (25) systems, in seven municipalities in the State of São Paulo. Samples from G2 were submitted to *Eimeria* oocyst screening by microscopic examination; those negative and all samples from G1 were examined by genera-specific PCR. Positive samples for *Eimeria* spp. were examined by species-specific PCR (*E. lata*, *E. nagambie*, and *E. zaria*) followed by molecular cloning and genetic sequencing. The results confirmed, for the first time in Brazilian territory, the presence of *E. nagambie* (15/79; 18.9%), *E. zaria* (19/79; 24%) and new genetic variants related to *E. lata* and *E. maxima* (6/79; 7.6%) in domestic chickens.

Keywords: *Eimeria* spp.. Domestic chicken. Molecular detection. Brazil.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. – Pesquisa de *Eimeria lata*, *Eimeria nagambie* e *Eimeria zaria* por PCR espécie-específica em amostras de galinha doméstica provenientes de sistemas de criação extensivos ou semi-intensivos no estado de São Paulo*.
.....17

Tabela 2. – Similaridade genética das sequências do gene ITS-1 de *Eimeria* identificadas em galinhas domésticas neste estudo com sequências de *Eimeria* spp. publicadas no GenBank17

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	ácido desoxirribonucleico
OTU	unidade taxonômica operacional
PCR	reação em cadeia pela polimerase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3 RESULTADOS.....	17
4 DISCUSSÃO.....	19
5 CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS	23
ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA.....	27

1 INTRODUÇÃO

A coccidiose, denominação usada para a enfermidade causada por protozoários do gênero *Eimeria*, é uma das enfermidades de maior importância econômica para a indústria avícola, com prejuízo global anual estimado em mais de 3 bilhões de dólares (DALLOUL; LILLEHOJ, 2006). Blake *et al.* (2020) estimaram prejuízo global anual de 10,4 bilhões de libras esterlinas, considerando os valores de 2016, ao analisar os dados do Brasil, Egito, Estados Unidos, Guatemala, Índia, Nigéria, Nova Zelândia e Estados Unidos.

O prejuízo econômico da infecção por *Eimeria* spp. é decorrente de lesões intestinais, caracterizadas por encurtamento das vilosidades intestinais, com consequente diminuição da absorção de nutrientes, lise de enterócitos, aumento da permeabilidade intestinal, perda de fluidos e eletrólitos e aumento da susceptibilidade a outras doenças. Em infecções por espécies de maior patogenicidade, como *Eimeria necatrix* e *Eimeria tenella*, há lesões graves na mucosa intestinal, com ocorrência de hemorragia e alta mortalidade (ALLEN; FETTERER, 2002; LILLEHOJ, H.; LILLEHOJ, E., 2000).

Sete espécies de *Eimeria* são reconhecidas como parasitos da galinha doméstica: *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria mitis*, *Eimeria maxima*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria praecox* e *Eimeria tenella* (VRBA; POPLSTEIN; PAKANDL, 2011). No entanto, estudos moleculares revelaram a ocorrência de diversidade genética em populações de *Eimeria* em diferentes países (CLARK; TOMLEY; BLAKE, 2017; MORRIS *et al.*, 2007), particularmente com o uso da reação em cadeia pela polimerase (PCR) e sequenciamento genético de amplicons referentes aos genes ITS1-5S-ITS2, COX1 e 18S rRNA (CLARK; TOMLEY; BLAKE, 2017; SCHWARZ *et al.*, 2009).

As variantes genéticas (pX e pY) de *Eimeria* foram descritas em frangos de corte previamente vacinados contra a coccidiose, usando a eletroforese capilar de amplicons obtidos por PCR (gene ITS2) (MORRIS *et al.*, 2007). Posteriormente, três variantes genéticas de *Eimeria* foram detectadas em diversos países, principalmente no hemisfério sul, e foram denominadas como unidades taxonômicas operacionais (OTUs) X, Y e Z (CANTACESSI *et al.*, 2008).

As três OTUs já foram observadas em criações comerciais na Nigéria (CLARK *et al.*, 2016), enquanto em criações comerciais na Zâmbia, Tanzânia e Gana houve detecção das OTUs X e Z (FORNACE *et al.*, 2013). A OTU Y é a variante genética mais frequente na Austrália, onde também foi relatada alta prevalência de infecção pelas OTUs X e Z em frangos de corte (GOODWIN; MORGAN, 2015; MORGAN; GODWIN, 2017).

A rápida disseminação das três OTUs e a falta de informações referentes à sua patogenia e epidemiologia suscitou preocupações em relação à prevalência e importância epidemiológica dessas variantes genéticas, inclusive sobre a efetividade das atuais medidas de controle contra a coccidiose, particularmente sobre a efetividade dos esquemas de vacinação contra a eimeriose (VENKATAS; ADELEKE, 2019), pois as vacinas disponíveis contra a eimeriose aviária não contêm as três OTUs já descritas, as quais apresentam reconhecida capacidade de infectar aves previamente vacinadas contra a eimeriose (BLAKE *et al.*, 2021; GODWIN; MORGAN, 2015).

As OTUs X, Y e Z já foram relacionadas a problemas econômicos relacionados à queda de parâmetros produtivos em frangos de corte e de postura em Gana, Tanzânia e Zâmbia (FORNACE *et al.*, 2013) e à mortalidade em frangos de corte previamente vacinados contra a eimeriose (MORRIS *et al.*, 2007). Apesar de ainda serem escassas as informações relacionadas às três OTUs, todas elas apresentam tropismo pela parte média do duodeno até a parte distal do íleo (BLAKE *et al.*, 2021; CANTACESSI *et al.*, 2008). Na dependência do número de oocistos inoculados, a redução no ganho de peso pode chegar a 28,8% e 31,1% em infecções pelas OTUs X e Z, respectivamente (BLAKE *et al.*, 2021).

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

O controle da coccidiose em criações de frangos é realizado pela adição na ração de drogas anticoccidianas à ração ou pela administração de vacinas contendo as espécies mais importantes para cada tipo de criação. Atualmente, observa-se no mercado consumidor de produtos de origem animal a crescente demanda por produtos livres de qualquer produto químico, o que poderá resultar em banimento do

uso de anticoccidianos em rações, levando à substituição do uso de medicações pela vacinação, como observado nos Estados Unidos (BLAKE; MARUGAN-HERNANDEZ; TOMLEY, 2021).

A mudança de realidade que o mercado vem apresentando, enfatiza a importância de pesquisas que determinem a prevalência das diferentes espécies e variantes genéticas de *Eimeria* spp. uma vez que, para a prevenção da eimeriose por meio de vacinação, é fundamental conhecer as espécies de *Eimeria* presentes nas diferentes regiões e tipos de criação, já que a resposta imune induzida contra *Eimeria* spp. é espécie-específica (McDONALD; SHIRLEY, 2009).

É evidente a necessidade de pesquisas que abordem a prevalência das diferentes espécies de *Eimeria*, assim como de suas variantes genéticas em território nacional. Da mesma forma, informações atualizadas sobre a prevalência das diferentes espécies de *Eimeria* em criações industriais e alternativas são fundamentais.

Portanto, este trabalho teve como objetivo pesquisar a ocorrência da infecção por *E. lata*, *E. nagambie* e *E. zaria* em galinhas domésticas criadas em sistemas de alternativos (extensivos e semi-intensivos) no estado de São Paulo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

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

Foram avaliadas 261 amostras originárias de sistemas de criação alternativos de galinhas (extensivos: 101 amostras; semi-intensivos: 60 amostras). Do total, 93 amostras eram de DNA genômico armazenadas a -20°C por aproximadamente quatro anos, que foram utilizadas em pesquisa prévia relacionada a *Cryptosporidium* spp. (SANTANA *et al.*, 2018). Essas amostras foram extraídas de fezes de galinhas domésticas, colhidas por conveniência e de acordo com a disponibilidade, de sistemas de produção extensivos (58) e semi-intensivos (35) localizados em doze municípios de diferentes regiões do estado de São Paulo. Por sua vez, as demais 168 amostras tratava-se de fezes colhidas em criações de galinhas domésticas criadas em sistemas de produção extensivos (143) e semi-intensivos (25) em sete municípios do Estado de São Paulo, em 2021. Essas amostras foram constituídas por um *pool* de fezes recém-eliminadas, de até cinco aves, colhidas com o auxílio de espátula de madeira descartável e preservadas em dicromato de potássio 2,5% a 4°C .

As amostras de fezes foram submetidas ao exame microscópico direto sem purificação prévia. Aquelas positivas para *Eimeria* spp. foram submetidas ao processo de concentração e purificação dos oocistos por centrífugo-flutuação em solução de Sheather. O sedimento resultante do processo de purificação foi submetido à extração de DNA usando o GenElute® *Stool DNA Isolation Kit* (Sigma Aldrich). As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C .

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

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

Em todas as amostras positivas pela PCR gênero-específica ou pelo exame microscópico, foi realizada a PCR para amplificação de um fragmento da região ITS2 do gene do RNA ribossômico, usando os primers descritos por Fornace et al. (2013), para detecção específica de *E. lata* (134 pb), *E. nagambie* (347 pb) e *E. zaria* (154 pb). Cada reação foi constituída por um volume total de 20 µl contendo 10 µl de JumpStart Taq ReadyMix (Sigma Aldrich), 2 µl de DNA alvo, 200 nM de primers e água ultrapura, nas condições de desnaturação inicial do DNA a 94° C por 2 minutos, seguida de 39 ciclos, cada ciclo consistindo em desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 60° C por 30 segundos, extensão a 72° C por 30 segundos e extensão final a 72° por 7 minutos.

Adicionalmente, as amostras positivas pela PCR espécie-específica para *E. lata* pelo protocolo de Fornace et al. (2013) foram submetidas a outro protocolo de PCR espécie-específica para *E. lata* (1018 pb), usando os primers OTU-Xf2 e OTU-Xr2 (BLAKE et al., 2021), nas seguintes condições de reação: desnaturação inicial do DNA a 94° C por 2 minutos, seguida de 39 ciclos, cada ciclo consistindo em desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 58° C por 30 segundos, extensão a 72° C por 60 segundos e um ciclo de extensão final a 72° por 7 minutos.

Como controle positivo das reações foi usado o DNA genômico extraído de amostras previamente diagnosticadas como positivas para a PCR espécie-específica para *E. lata*, *E. nagambie* e *E. zaria*. As reações foram realizadas no termociclador SimpliAmp® (Thermo Fisher Scientific), em microtubos de PCR de 0,2 ml. Água ultrapura foi usada como controle negativo.

Os amplicons provenientes das PCRs para *E. lata* (FORNACE et al., 2013) e *E. zaria*, com tamanho de 134 pb e 154 pb, respectivamente, foram purificados usando o QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) e clonados usando o TransformAid® Bacterial Transformation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) e o CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Os amplicons referentes a *E. zaria*, com tamanho de 347 pb, foram submetidos ao sequenciamento direto.

Os produtos das PCRs e os plasmídeos purificados usando o ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific) e o GenElute® HP Five-Minute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich), respectivamente, e sequenciados nas duas direções usando o ABI Prism® Dye Terminator 3.1, no sequenciador automático

ABI 3730XL (Applied Biosystems), no Centro de Sequenciamento e Genômica Funcional da UNESP, Campus de Jaboticabal. As sequências foram analisadas utilizando o CodonCode Aligner versão 9.0.1 (CodonCode Corporation), o BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999) e o Basic Local Alignment Search Tool - BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

3 RESULTADOS

A PCR gênero-específica revelou que 33,3% (31/93) das amostras de DNA genômico eram positivas para *Eimeria* spp., enquanto o exame microscópico das 168 amostras de fezes resultou em 29,2% (48) de positividade para oocistos de *Eimeria* spp. Todas as amostras positivas para *Eimeria* spp. por microscopia ou PCR gênero-específica foram analisadas pelas PCRs espécie-específicas e seus resultados estão apresentados na Tabela 1.

Todas as amostras positivas para *E. lata* pelo protocolo de Fornace et al. (2013) (6/79; 7,5%) foram negativas quando submetidas a outro protocolo específico para *E. lata* (BLAKE et al., 2021). Portanto, essas amostras foram classificadas como *Eimeria* sp.

O sequenciamento genético dos plasmídeos das PCRs específicas para *E. lata* (FORNACE et al., 2013) e *E. zaria* identificou, respectivamente, quatro sequências distintas que apresentaram maior similaridade genética com *E. maxima*, *E. lata* ou com diversas sequências de *Eimeria* sp., e duas sequências com 100% de similaridade genética com sequências de *E. zaria* (Tabela 2). Os amplicons da PCR específica para *E. nagambie* apresentaram duas sequências genéticas distintas: uma com similaridade genética de 98,27%, classificada como *Eimeria* sp., e outra com similaridade genética de 100%, classificada como *E. nagambie* (Tabela 2).

Tabela 1. Pesquisa de *Eimeria* spp., *Eimeria lata*, *Eimeria nagambie* e *Eimeria zaria* em amostras de galinha doméstica provenientes de sistemas de criação alternativos no estado de São Paulo*.

PCR gênero-específica ou microscopia		PCR espécie-específica	
<i>Eimeria</i> spp.	<i>Eimeria</i> sp.*	<i>E. nagambie</i>	<i>E. zaria</i>
Amostras positivas/total de amostras (% positivas)	Amostras positivas/total de amostras (% positivas)	Amostras positivas/ total de amostras (% positivas)	Amostras positivas/ total de amostras (% positivas)
79/261 (30,7)	6/79 (7,5)	15/79 (18,8)	19/79(24)

* Amostras positivas para *E. lata* pelo protocolo de (Fornace et al., 2013), porém negativas para *E. lata* pelo sequenciamento genético e pelo protocolo de PCR espécie-específica de Blake et al. (2021b). As amostras foram classificadas como *Eimeria* sp.

Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 2. Similaridade genética das sequências do gene ITS-1 de *Eimeria* identificadas em galinhas domésticas neste estudo com sequências de *Eimeria* spp. publicadas no *GenBank*.

Espécie alvo da PCR espécie-específica (Fornace et al., 2013)	Sequências deste estudo		Similaridade genética com sequências publicadas no <i>GenBank</i>		
	Espécie identificada por sequenciamento genético	Número das sequências identificadas	Espécie	Código no <i>GenBank</i>	Similaridade genética (%)
<i>E. lata</i>	<i>Eimeria</i> sp.	1	<i>Eimeria</i> sp.	LN609848	99,35
		2	<i>Eimeria</i> sp.	LN609922	97,81
		3	<i>E. lata</i>	AM922252	98,81
		4	<i>E. maxima</i>	FJ230377	98,54
<i>E. nagambie</i>	<i>E. nagambie</i>	1	<i>E. nagambie</i>	AM922253	100
	<i>Eimeria</i> sp.	2	<i>E. nagambie</i>	AM922253	98,27
<i>E. zaria</i>	<i>E. zaria</i>	1	<i>E. zaria</i>	HE997165	100
		2	<i>E. zaria</i>	LT549041	100

Fonte: Elaboração do autor.

Dentre as 79 amostras positivas para *Eimeria* spp., 55/79 (69,6%) foram colhidas em sistemas de criação extensivos e 24/79 (30,4%) foram colhidas em sistemas semi-intensivos. A presença de infecção por mais de uma espécie de *Eimeria* foi diagnosticada pela PCR espécie-específica em 2/15 (13,3%) e 8/25 (32%) sistemas de produção semi-intensivos e extensivos, respectivamente.

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos evidenciam, pela primeira vez, a presença de *Eimeria* sp., *E. nagambie* e *E. zaria* em criações de galinhas domésticas no Brasil e a detecção de *E. nagambie* na América do Sul, continente em que Clark *et al.* (2016) relataram a infecção por *E. lata* e *E. zaria*, mais precisamente na Venezuela. A infecção por *E. lata* e *E. zaria* já havia sido reportada em alguns países da África (CLARK *et al.*, 2016) e nos Estados Unidos (HAUCK *et al.*, 2019; TERRA *et al.*, 2021).

Neste trabalho, optou-se somente pela pesquisa de espécies de *Eimeria* que ainda não foram detectadas no Brasil, já que a ocorrência das demais espécies já foi documentada em diversos trabalhos realizados em sistemas de criação industriais e alternativos (CARVALHO *et al.*, 2011; LUCHESE *et al.*, 2007; MEIRELES; ROBERTO; RIERA, 2004; MORAES *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2003; TERRA *et al.*, 2001). No entanto, é importante frisar que outras espécies de *Eimeria* estavam presentes nos lotes pesquisados, pois a positividade para *Eimeria* spp. foi de 30,3% (79/261), incluindo nesse resultado as amostras positivas para *E. lata*, *E. zaria* e *E. nagambie*, e de 50,7% (40/79) em amostras que não foram positivas pelas PCRs espécie-específicas.

O protocolo de PCR espécie-específica para *E. lata* descrito por Fornace *et al.* (2013) resultou em 6/79 (7,6%) amostras positivas. No entanto, o sequenciamento genético dessas amostras identificou possíveis novas variantes genéticas geneticamente similares a *E. maxima*, *E. lata* e *Eimeria* sp. (Tabela 2), o que evidencia amplificação inespecífica. Para confirmar que essas amostras de fato não correspondiam a *E. lata*, elas foram submetidas à PCR específica para *E. lata* descrita por Blake *et al.* (2021) e todas foram negativas, o que confirma a identificação de variantes genéticas relacionadas a *E. maxima* e *E. lata* e a ausência, ou presença abaixo do limiar de detecção da PCR, de *E. lata* nas amostras. Da mesma forma, uma sequência amplificada pela PCR espécie-específica para *E. nagambie* apresentou 98,27% de similaridade genética com outra sequência dessa espécie (AM922253).

O gene ITS2 apresenta polimorfismo intra-espécies e a não há uma definição precisa da diferença entre duas sequências para realizar a classificação como espécie ou uma possível variante genética, particularmente em fragmentos com um pequeno número de bases. A similaridade genética de 98,27% não exclui a possibilidade de que essa sequência seja de *E. nagambie*, no entanto, também não é

possível afirmar a identificação dessa espécie somente pela comparação genética da região amplificada.

Em criações industriais de galinha doméstica no Brasil, há informações referentes à ocorrência das sete espécies de *Eimeria* que são reconhecidas como válidas: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella* (LUCHESE *et al.*, 2007; MEIRELES; ROBERTO; RIERA, 2004; MORAES *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2003; TERRA *et al.*, 2001). Porém nesses trabalhos não foi avaliada a presença das três espécies classificadas recentemente por Blake *et al.* (2021b). Em nosso trabalho, realizado em criações semi-intensivas e extensivas, houve a detecção de *Eimeria* sp., *E. nagambie* e *E. zaria*, com ocorrência de 4,3% (6/141), 10,7% (15/141) e 12,8 (18/141), respectivamente. *E. lata*, *E. nagambie* e *E. zaria* foram identificadas em criações semi-intensivas nos Estados Unidos por Terra *et al.* (2021), sendo a primeira descrição em sistemas de criação desse tipo; em criações industriais, também nos Estados Unidos, essas três espécies foram identificadas anteriormente por Hauck *et al.* (2019).

Com os resultados da PCR espécie-específica, foi possível identificar que, dentre as amostras positivas, 9/79 (11,9%) testaram positivo para mais de uma espécie, reforçando a afirmação feita por Carvalho *et al.* (2011), de que é frequente a ocorrência de infecções por *Eimeria* em galinha doméstica por várias espécies simultaneamente.

A identificação da espécie de *Eimeria* pode ser presumida por análise da morfologia e morfometria dos oocistos e das lesões macroscópicas, porém a identificação definitiva da espécie só é possível por PCR espécie-específica ou por PCR gênero-específica seguida de sequenciamento genético. Neste trabalho, foram utilizados, pela primeira vez, em amostras provenientes de criações brasileiras, protocolos de PCR espécie-específicos para *E. lata*, *E. nagambie* e *E. zaria*, o que justifica a falta de informações sobre essas espécies em trabalhos publicados anteriormente.

Este trabalho é pioneiro na identificação de *E. nagambie*, *E. zaria* e *Eimeria* sp. em território brasileiro. Considerando a importância econômica da coccidiose em criações de galinhas domésticas, os resultados obtidos nos levam a concluir que pesquisas adicionais, relacionadas à prevalência da infecção por *E. lata*, *E. nagambie* e *E. zaria* em criações de galinha doméstica, em especial em criações intensivas, são necessárias, visto que essas três novas espécies de *Eimeria*, assim como as outras

espécies da galinha doméstica, podem representar importantes perdas econômicas para a indústria avícola.

Este trabalho apresenta como limitação a ausência de um controle positivo da PCR para *E. lata*. Inicialmente foi usado DNA identificado como proveniente de *E. lata* pela PCR desenvolvida por Fornace *et al.* (2013). Posteriormente, algumas dessas amostras foram identificadas como *Eimeria* sp. Portanto, as PCRs para *E. lata* foram realizadas sem um controle positivo, o que limita conclusões definitivas sobre o resultado dessas reações.

5 CONCLUSÃO

Eimeria nagambie, *E. zaria* e sequências genéticas de *Eimeria* spp. geneticamente relacionadas a *E. lata* e *E. maxima* foram identificadas pela primeira vez no Brasil em sistemas de criação semi-intensivos e extensivos de galinhas domésticas.

REFERÊNCIAS

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.

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, p. 115, 2020. DOI: 10.1186/s13567-020-00837-2.

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.

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.

CANTACESSI, C.; RIDDELL, S.; MORRIS, G. M.; DORAN, T.; WOODS, W. G.; OTRANTO, D.; GASSER, R. B. Genetic characterization of three unique operational taxonomic units of *Eimeria* from chickens in Australia based on nuclear spacer ribosomal DNA. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 152, n. 3-4, p. 226-234, 2008. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.12.028.

CARVALHO, F. S.; WENCESLAU, A. A.; TEIXEIRA, M.; CARNEIRO, J. A. M.; MELO, A. D. B.; ALBUQUERQUE, G. R. Diagnosis of *Eimeria* species using traditional and molecular methods in field studies. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 176, n. 2-3, p. 95-100, 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.11.015.

CLARK, E. L.; MACDONALD, S. E.; THENMOZHI, V.; KUNDU, K.; GARG, R.; KUMAR, S.; AYOADE, S.; FORNACE, K. M.; JATAU, I. D.; MOFTAH, A.; NOLAN, M. J.; SUDHAKAR, N. R.; ADEBAMBO, A. O.; LAWAL, I. A.; ÁLVAREZ ZAPATA, R.; AWUNI, J. A.; CHAPMAN, H. D.; KARIMURIBO, E.; MUGASA, C. M.; NAMANGALA, B.; RUSHTON, J.; SUO, X.; THANGARAJ, K.; RAO, A. S. R.; TEWARI, A. K.; BANERJEE, P. S.; RAJ, G. D.; RAMAN, M.; TOMLEY, F. M.; BLAKE, D. P. Cryptic *Eimeria* genotypes are common across the southern but not northern hemisphere. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v. 46, n. 9, p. 537-544, 2016. DOI: 10.1016/j.ijpara.2016.05.006.

CLARK, E. L.; TOMLEY, F. M.; BLAKE, D. P. Are *Eimeria* genetically diverse, and does it matter? *Trends in Parasitology*, Oxford, v. 33, n. 3, p. 231-241, 2017. DOI: 10.1016/j.pt.2016.08.007.

DALLOUL, R. A.; LILLEHOJ, H. S. Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, Oxford, v. 5, n. 1, p. 143-163, 2006. DOI: 10.1586/14760584.5.1.143.

FORNACE, K. M.; CLARK, E. L.; MACDONALD, S. E.; NAMANGALA, B.; KARIMURIBO, E.; AWUNI, J. A.; THIEME, O.; BLAKE, D. P.; RUSHTON, J. Occurrence of *Eimeria* species parasites on small-scale commercial chicken farms in Africa and indication of economic profitability. *PLoS One*, San Francisco, v. 8, n. 12, artigo e84254, 8 p., 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0084254.

GODWIN, R. M.; MORGAN, J. A. 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.

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.

LILLEHOJ, H. S.; LILLEHOJ, E. P. Avian coccidiosis: a review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Diseases*, Ithaca, v. 44, n. 2, p. 408-425, 2000.

LUCHESE, F. C.; PERIN, M.; AITA, R. S.; MOTTIN, V. D.; MOLENTO, M. B.; MONTEIRO, S. G. Prevalência de espécies de *Eimeria* em frangos de criação industrial e alternativa. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 44, p. 81-86, 2007.

McDONALD, V.; SHIRLEY, M. W. Past and future: vaccination against *Eimeria*. *Parasitology*, London, v. 136, n. 12, p. 1477-1489, 2009. DOI: 10.1017/S0031182009006349.

MEIRELES, M. V.; ROBERTO, L. O.; RIERA, R. F. Identification of *Eimeria mitis* and *Eimeria praecox* in broiler feces using polymerase chain reaction. *Brazilian Journal of Poultry Science*, Campinas, v. 6, n. 4, p. 249-252, 2004. DOI: 10.1590/S1516-635X2004000400010.

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.

MORGAN, J. A. T., GODWIN, R. M. Mitochondrial genomes of Australian chicken *Eimeria* support the presence of ten species with low genetic diversity among strains. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 243, p. 58-66, 2017. DOI: 10.1016/j.vetpar.2017.05.025.

MORRIS, G. M.; WOODS, W. G.; RICHARDS, D. G.; GASSER, R. B. Investigating a persistent coccidiosis problem on a commercial broiler-breeder farm utilising PCR-coupled capillary electrophoresis. *Parasitology Research*, Berlim, v. 101, n. 3, p. 583-589, 2007. DOI: 10.1007/s00436-007-0516-9.

SANTANA, B. N.; KURAHARA, B.; NAKAMURA, A. A.; CAMARGO, V. S.; FERRARI, E. D.; SILVA, G. S.; WALTER, B. N.; MEIRELES, M. V. Detection and characterization of *Cryptosporidium* species and genotypes in three chicken production systems in Brazil using different molecular diagnosis protocols. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, v. 151, p. 73-78, 2018. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2018.01.007.

SANTOS, R. F. S.; KAVAVATA, G. M.; ALMEIDA, S. M.; HISANO, M., CALIXTO, L. F. L.; MEIRELES, M. V. Ocorrência de *Eimeria* sp. em frangos de corte no estado de São Paulo. *Ars Veterinaria*, Jaboticabal, v. 19, n. 3, p. 230-234, 2003.

SCHWARZ, R. S.; JENKINS, M. C.; KLOPP, S.; MISKA, K. B. Genomic analysis of *Eimeria* spp. populations in relation to performance levels of broiler chicken farms in Arkansas and North Carolina. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 95, N. 4, p. 871-880, 2009. DOI: 10.1645/GE-1898.1.

TERRA, A. T.; COSTA, P. S.; FIGUEIREDO, P. C.; CARVALHO, E. C. Q. Frequência de espécies do gênero *Eimeria* em frangos de corte abatidos industrialmente no município de Monte Alegre do Sul, Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 10, n. 2, p. 87-90, 2001.

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.

VENKATAS, J.; ADELEKE, M. A. Emerging threat of *Eimeria* operational taxonomic units (OTUs) on poultry production. *Parasitology*, London, v. 146, n. 13, p. 1615-1619, 2019. DOI: 10.1017/S0031182019001100.

VRBA, V.; POPLSTEIN, M.; PAKANDL, M. The discovery of the two types of small subunit ribosomal RNA gene in *Eimeria mitis* contests the existence of *E. mivati* as an independent species. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 183, n. 1-2, p. 47-53, 2011. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.06.020.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Detecção e caracterização molecular das espécies e variantes genéticas de Eimeria em criações extensivas, semi-intensivas e intensivas de galinhas de corte e postura no Estado de São Paulo**", Processo FOA nº 0778-2021, sob responsabilidade de Marcelo Vasconcelos Meireles apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 17 de Dezembro de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 31 de Julho de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 31 de Agosto de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Detection and molecular characterization of the species and genetic variants of Eimeria in extensive, semi-intensive and intensive production systems in the state of São Paulo**", Protocol FOA nº 0778-2021, under the supervision of Marcelo Vasconcelos Meireles presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 17, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 31, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: August 31, 2023.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br