UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE
MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANATOMIA DOS
ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES

CRISTIANO BATISTA RIBAS

**Estudo das alterações histopatológicas e ultraestruturais do intestino delgado
de frangos infectados experimentalmente com *Eimeria* spp. e *Clostridium*
perfringens para desenvolvimento de enterite necrótica**

SÃO PAULO

2020

CRISTIANO BATISTA RIBAS

Estudo das alterações histopatológicas e ultraestruturais do intestino delgado de frangos infectados experimentalmente com *Eimeria* spp. e *Clostridium perfringens* para desenvolvimento de enterite necrótica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira

SÃO PAULO

2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3918
FMVZ

Ribas, Cristiano Batista

Estudo das alterações histopatológicas e ultraestruturais do intestino delgado de frangos infectados experimentalmente com *Eimeria* spp. e *Clostridium perfringens* para desenvolvimento de enterite necrótica / Cristiano Batista Ribas. – 2020.
51 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Plantino Ferreira.

1. *Clostridium perfringens*. 2. *Eimeria* spp. 3. Enterite necrótica. 4. Frango. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO DA ULTRAESTRUTURA DO INTESTINO DE AVES INFECTADAS COM CLOSTRIDIUM E EIMERIA PARA DESENVOLVIMENTO DE ENTERITE NECRÓTICA", protocolada sob o CEUA nº 9780241018 (ID 006244), sob a responsabilidade de **Antonio José Plantino Ferreira e equipe; Cristiano Batista Ribas** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 07/03/2019.

We certify that the proposal "STUDY OF THE ULTRASTRUCTURE OF THE INTESTINE OF BIRDS INFECTED WITH CLOSTRIDIUM AND EIMERIA FOR THE DEVELOPMENT OF NECROTIC ENTERITIS", utilizing 40 Birds (males and females), protocol number CEUA 9780241018 (ID 006244), under the responsibility of **Antonio José Plantino Ferreira and team; Cristiano Batista Ribas** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/07/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 03/2018 a 03/2020

Área: [Ornitopatologia](#)

Origem: [Animais provenientes de estabelecimentos comerciais](#)

Espécie: [Aves](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [1 a 35 dias](#)

N: [40](#)

Linhagem: [Ross](#)

Peso: [50 a 3000 g](#)

Local do experimento: Centro Experimental de Patologia Aviária - CEPA, FMVZ-USP.

São Paulo, 04 de fevereiro de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RIBAS, Cristiano Batista

Título: ***Estudo das alterações histopatológicas e ultraestruturais do intestino delgado de frangos infectados experimentalmente com Eimeria spp. e Clostridium perfringens para desenvolvimento de enterite necrótica***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a **Deus**, nosso criador pelo dom da vida.

À minha família que me apoiou e incentivou nesta importante etapa pessoal e intelectual da minha vida, meu pai **Vladimir**, minha mãe **Maria Inez** e meus irmãos **Guilherme** e **Letícia**. Faltam palavras para agradecer o apoio, incentivo, parceria, confiança e o auxílio que vocês disponibilizaram para que eu pudesse chegar até aqui. Vocês são o meu principal motivo para continuar firme independente do que acontecer e saibam que grande parte do que sou hoje é graças a vocês.

Ao meu orientador **Antonio José Piantino Ferreira**, a quem admiro tanto como pessoa como profissional e sou grato pela orientação e pela convivência, sempre disposto a sanar dúvidas e me auxiliar no que fosse necessário. Muito Obrigado!

À professora **Maria Angélica Miglino**, por quem detenho grande admiração como pessoa e profissional, por ter dado a oportunidade e depositado sua confiança no meu trabalho e na minha pessoa nesse período.

Ao professor **José Roberto Kfoury Júnior**, juntamente com a minha admiração, sempre oferecendo dicas e conselhos, mostrando uma calma e serenidade louváveis além da capacidade de manter a paciência em situações que eu julgava impossíveis.

À Dra. **Rose Eli Rici** por todo o auxílio na parte de imagens, profissionalismo e dedicação juntamente ao **CADI-FMVZ**, sempre com apoio na efetuação do trabalho.

À **Claudete Serrano Astolfi Ferreira**, pelos ensinamentos e treinamentos no funcionamento do laboratório e das técnicas aprendidas, sempre com paciência e compreensão.

Ao **Ronaldo Agostinho da Silva** que por mais ranzinza sempre se disponibilizou a ajudar tanto no laboratório como com conselhos.

Aos colegas que me auxiliaram durante todo o período em que foi realizado meu estudo, desde o processo seletivo até os dias próximos à conclusão.

Ao **Laboratório de Ornitopatologia da Universidade de São Paulo** pelo auxílio e ensinamentos fornecidos.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo** que sediou minha pesquisa.

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

Finalmente e não menos importante agradeço ao **Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres** pela credibilidade a mim concedida para a realização da minha dissertação de mestrado.

“Aprenda como se você fosse viver para sempre. Viva como se você fosse morrer amanhã”.

Santo Isidoro de Sevilha

Resumo

RIBAS, C. B. **Estudo das alterações histopatológicas e ultraestruturais do intestino delgado de frangos infectados experimentalmente com *Eimeria* spp. e *Clostridium perfringens* para desenvolvimento de enterite necrótica.** 51 f. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A enterite necrótica é uma enfermidade causada por *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*). Infecções por *Eimeria* spp. pode agravar o quadro clínico desta doença, pois provocam lesões na mucosa intestinal proporcionando um ambiente mais favorável para o crescimento de *C. perfringens*. Demonstrar as alterações no intestino delgado provocadas por *C. perfringens*, *Eimeria* spp. ou a associação desses patógenos para a reprodução experimental da enterite necrótica em frangos foram os objetivos deste estudo. Um total de 48 animais foram utilizados, sendo divididos em 4 grupos com 12 animais em cada: Grupo Controle (T1); Grupo infectado por *Eimeria* spp.(T2); Grupo infectado por *C. perfringens* (T3) e Grupo infectado com *Eimeria* spp. e *C. perfringens* (T4). A infecção com *Eimeria* spp. foi realizada aos 14 dias de idade para os grupos T2 e T4 e com *C. perfringens* aos 19 dias de idade para os grupos T3 e T4. Foram realizadas coletas semanais de fragmentos do terço médio de duodeno, jejuno e íleo aos 22, 28, 35 e 42 dias de vida para análises histopatológicas e de microscopia eletrônica de varredura. Os grupos infectados apresentaram alterações nas vilosidades, principalmente em seus ápices. A presença de muco, danos ao epitélio de revestimento, acúmulo de detritos celulares, fusão de vilosidades e presença de edema foram os achados comuns aos grupos infectados. O grupo T4, com coinfecção de patógenos, apresentou alterações mais severas, precoces e duradouras quando comparadas a infecções com apenas *Eimeria* spp. ou *C. perfringens*.

Palavras-chave: *Clostridium perfringens*. *Eimeria* spp.. Enterite Necrótica. Frango.

ABSTRACT

RIBAS, C. B. **Study of the histopathologic and ultrastructural alterations in the small intestine of poult infected experimentally with *Clostridium perfringens* and *Eimeria* spp. for the development of necrotic enteritis.** 51 f. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências) –Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Necrotic enteritis is a disease caused by *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*). Infections by *Eimeria* spp. can worsen the clinical picture of this disease, as they cause lesions in the intestinal mucosa providing a more favorable environment for the growth of *C. perfringens*. Demonstrate the changes in the small intestine caused by *C. perfringens*, *Eimeria* spp. or the association of these pathogens for the experimental reproduction of necrotic enteritis in chickens were the objectives of this study. A total of 48 animals were used, being divided into 4 groups with 12 animals in each: Control Group (T1); Group infected with *Eimeria* spp. (T2); Group infected with *C. perfringens* (T3) and Group infected with *Eimeria* spp. and *C. perfringens* (T4). Infection with *Eimeria* spp. was performed at 14 days of age for groups T2 and T4 and with *C. perfringens* at 19 days of age for groups T3 and T4. Weekly collections of fragments of the middle third of the duodenum, jejunum and ileum were performed at 22, 28, 35 and 42 days of life for histopathological and scanning electron microscopy analysis. The infected groups showed changes in the villi, mainly in their apices. The presence of mucus, damage to the lining epithelium, accumulation of cellular debris, fusion of villi and the presence of edema were the common findings of the infected groups. The T4 group, with co-infection of pathogens, showed more severe, early and lasting changes when compared to infections with only *Eimeria* spp. or *C. perfringens*.

Keywords: *Clostridium perfringens*. Broiler Chicken. *Eimeria* spp.. Necrotic Enteritis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Delineamento experimental representando o número de animais utilizados e seus respectivos grupos.....	19
Figura 2 - Fotomicrografias em coloração de Hematoxilina & Eosina do Intestino Delgado, porções Duodeno, Jejuno e Íleo em intervalos semanais do Grupo Controle Negativo: T1.....	23
Figura 3 - Fotomicrografias demonstrando a presença merogonias e gametogonias de <i>Eimeria</i> spp. em células do epitélio da mucosa de duodeno de animais com 22 dias em diferentes objetivas. Figura A em objetiva de 10X e figura B em objetiva de 20X.	24
Figura 4 - Fotomicrografias em coloração de Hematoxilina & Eosina do Intestino Delgado, porções Duodeno, Jejuno e Íleo em intervalos semanais do Grupo <i>Eimeria</i> spp.: T2.....	25
Figura 5 - Fotomicrografias em coloração de Hematoxilina & Eosina do Intestino Delgado, porções Duodeno, Jejuno e Íleo em intervalos semanais do Grupo <i>Clostridium perfringens</i> : T3.	27
Figura 6- Fotomicrografias em coloração de Hematoxilina & Eosina do Intestino Delgado, porções Duodeno, Jejuno e Íleo em intervalos semanais do Grupo <i>Eimeria</i> spp. associado ao <i>Clostridium perfringens</i> : T4.....	29
Figura 7- Fotomicrografias em coloração de Hematoxilina & Eosina de Duodenos com intervalos semanais dos Grupos T1:Controle Negativo, T2: <i>Eimeria</i> spp., T3: <i>C. perfringens</i> e T4: <i>Eimeria</i> spp. associado ao <i>C. perfringens</i> . Imagens A, E e I representam amostras controle, imagens B, F e J pertencem ao grupo infectado com <i>Eimeria</i> spp., imagens C, G e K pertencem ao grupo infectado por <i>C. perfringens</i> e as imagens D, H e L pertencem ao grupo em que ocorreu a coinfecção com <i>Eimeria</i> spp. e <i>C. perfringens</i> . Imagens A, B, C e D são de coletas realizadas com animais aos 28 dias de vida, imagens E, F, G e H são das coletas realizadas aos 35 dias de vida dos animais e imagens I, J, K e L são imagens de animais com 42 dias de vida.	30
Figura 8 - Fotomicrografias em coloração de Hematoxilina & Eosina de Jejunos com intervalos semanais dos Grupos T1:Controle Negativo, T2: <i>Eimeria</i> spp., T3: <i>C. perfringens</i> e T4: <i>Eimeria</i> spp. associado ao <i>C. perfringens</i> . Imagens A, E, I e M	

representam amostras controle, imagens B, F, J e N pertencem ao grupo infectado com *Eimeria* spp., imagens C, G, K e O pertencem ao grupo infectado por *C. perfringens* e as figuras D, H, L e P pertencem ao grupo em que ocorreu a coinfeção com *Eimeria* spp. e *C. perfringens*. Imagens A, B, C e D são de coletas realizadas com animais aos 22 dias de vida, imagens E, F, G e H são das coletas realizadas aos 28 dias de vida dos animais, imagens I, J, K e L são imagens de animais com 35 dias de vida e M, N, O e P são imagens aos 42 dias.....31

Figura 9 - Fotomicrografias em coloração de Hematoxilina & Eosina de Íleos com intervalos semanais dos Grupos T1:Controle Negativo, T2:*Eimeria* spp., T3:*C. perfringens* e T4:*Eimeria* spp. associado ao *C. perfringens*. Imagens A, E, I e M representam amostras controle, imagens B, F, J e N pertencem ao grupo infectado com *Eimeria* spp., imagens C, G, K e O pertencem ao grupo infectado por *C. perfringens* e as figuras D, H, L e P pertencem ao grupo em que ocorreu a coinfeção com *Eimeria* spp. e *C. perfringens*. Imagens A, B, C e D são de coletas realizadas com animais aos 22 dias de vida, imagens E, F, G e H são das coletas realizadas aos 28 dias de vida dos animais, imagens I, J, K e L são imagens de animais com 35 dias de vida e M, N, O e P são imagens aos 42 dias.....32

Figura 10 - Duodenos analisados em Microscopia Eletrônica de Varredura dos Grupos T1:Controle Negativo, T2:*Eimeria* spp., T3:*C. perfringens* e T4:*Eimeria* spp. associado ao *C. perfringens*. Imagens A e B representam amostras controle, imagens C e D pertencem ao grupo infectado com *Eimeria* spp., imagens E e F pertencem ao grupo infectado por *C. perfringens* e as imagens G e H pertencem ao grupo em que ocorreu a coinfeção com *Eimeria* spp. e *C. perfringens*.....34

Figura 11 - Jejunos analisados em Microscopia Eletrônica de Varredura dos Grupos T1:Controle Negativo, T2:*Eimeria* spp., T3:*C. perfringens* e T4:*Eimeria* spp. associado ao *C. perfringens*. Imagens A e B representam amostras controle, imagens C e D pertencem ao grupo infectado com *Eimeria* spp., imagens E e F pertencem ao grupo infectado por *C. perfringens* e as imagens G e H pertencem ao grupo em que ocorreu a coinfeção com *Eimeria* spp. e *C. perfringens*.....36

Figura 12- Íleos analisados em Microscopia Eletrônica de Varredura dos Grupos T1:Controle Negativo, T2:*Eimeria* spp., T3:*C. perfringens* e T4:*Eimeria* spp. associado ao *C. perfringens*. Imagens A e B representam amostras controle, imagens C e D pertencem ao grupo infectado com *Eimeria* spp., imagens E e F pertencem ao grupo infectado por *C. perfringens* e as imagens G e H pertencem ao grupo em que ocorreu a coinfeção com *Eimeria* spp. e *C. perfringens*.....37

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	HIPÓTESE	13
3.	OBJETIVOS	13
3.1	OBJETIVO GERAL	13
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3.2.1	Identificar as alterações na mucosa intestinal do duodeno, jejuno e íleo causadas pela coinfeção de <i>Eimeria</i> spp. e <i>C. perfringens</i> em frangos infectados experimentalmente.....	14
3.2.2	Caracterizar as alterações macroscópicas e microscópicas através de microscopia eletrônica de varredura.....	14
4.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
4.1	AGENTE ETIOLÓGICO: <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>	14
4.2	EIMERIOSE E SEU PAPEL NA ENTERITE NECRÓTICA	15
4.3	PATOGENIA DA ENTERITE NECRÓTICA	16
4.4	ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DA EN.....	17
5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
5.1	ANIMAIS UTILIZADOS:	18
5.2	FONTE INFECTANTE	19
5.3	COLETA DE AMOSTRAS	19
5.4	HISTOPATOLOGIA.....	20
5.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	20
6.	RESULTADOS.....	21
6.1	COLETA DAS AMOSTRAS E ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS	21
6.2	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	21
6.3	ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS	33
7.	DISCUSSÃO	38
8.	CONCLUSÕES	45
9.	REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

Possuindo uma produção de 12,86 milhões de toneladas no ano de 2018, a produção brasileira de carne de frango se destaca como a segunda maior do mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, liderando com 19,361 milhões de toneladas de carne de frango produzidas. A exportação nacional gerou 6,571 bilhões de dólares com a comercialização de 4,101 milhões de toneladas (31,9% da produção), o números, demonstrando a importância econômica da produção avícola para o país (ABPA, 2019).

Problemas entéricos em frangos de corte estão entre os principais causadores de perdas econômicas, sendo caracterizados pela diminuição do consumo de ração, redução do peso corporal, lote desuniforme, falhas no empenamento, depressão, apatia e diarreia resultante da má digestão/síndrome de má absorção (NUÑEZ et al., 2015). Existem vários agentes entéricos que podem levar a baixa digestão/síndrome de má absorção que se encontram presentes em amostras teciduais de necropsia de animais acometidos, tais agentes também foram encontrados em amostras de animais hígidos (FINKLER et al., 2016).

A enterite necrótica é caracterizada como uma enterotoxemia aguda causada pela produção de toxinas por *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) A e C (LOS SANTOS et al., 2008). Segundo Albornoz et al., (2014) *C. perfringens* pode produzir mais de 15 toxinas constituindo seu principal fator de virulência. Os danos causados são caracterizados por lesões ulcerativas e necrose focal a confluyente da mucosa do intestino delgado (LOS SANTOS et al., 2008), porém apenas a presença de *C. perfringens* não se torna suficiente para o desenvolvimento da enterite necrótica (IMMERSEEL et al., 2004). A proliferação de cepas patogênicas com consequente aumento de toxinas produzidas, principalmente NetB, são fundamentais para a manifestação da enfermidade (MOORE, 2016). Diversos fatores predisponentes estão envolvidos em sua ocorrência (IMMERSEEL et al., 2004), além da presença de *Eimeria* spp. fatores ambientais como qualidade de cama, densidade populacional e local de criação alteram a multiplicação e concentração das bactérias presentes no ambiente que os animais se encontram aumentando a pressão de infecção (LOS SANTOS et al., 2008).

O impacto causado na população aviária varia conforme cada caso, dependendo das condições de cada aviário, de modo geral pode ser dividido em duas formas de ocorrência: forma aguda e subclínica (IMMERSEEL et al., 2004). A mortalidade se apresenta diferente em cada ocorrência, podendo variar de 10% até 40% do lote em casos agudos, causando baixa mortalidade em casos subclínicos, entretanto devido aos danos na mucosa gera aumento da taxa de conversão alimentar do lote com baixo aproveitamento e menor ganho de peso pela diminuição da digestão e absorção do alimento (ALBORNOZ et al., 2014).

Tendo em vista que esta é uma doença emergente, devido à redução do uso dos anticoccidianos – ionóforos- e antibióticos como promotores de crescimento para adequação ao mercado internacional (BRASIL, 2018), se fez necessário entender o impacto dos agentes na mucosa intestinal quando ocorre a infecção de forma isolada ou em associação. Este trabalho busca demonstrar as alterações no intestino delgado provocadas pela associação de *Eimeria* spp. e *C. perfringens* para a reprodução experimental da enterite necrótica em frangos.

2. HIPÓTESE

As alterações histopatológicas e ultraestruturais em decorrência da coinfecção de *Eimeria* spp. com *C. perfringens* demonstram ser mais graves e prejudiciais quando comparadas com as alterações histopatológicas e ultraestruturais resultantes de infecções por *Eimeria* spp. e *C. perfringens*.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este projeto tem por objetivo identificar as lesões na mucosa intestinal causadas por *Eimeria* spp. e *C. perfringens* na enterite necrótica, e comparar os danos dos agentes, em associação através de microscopia eletrônica de varredura e exame histopatológico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Identificar as alterações na mucosa intestinal do duodeno, jejuno e íleo causadas pela coinfeção de *Eimeria* spp. e *C. perfringens* em frangos infectados experimentalmente.

3.2.2 Caracterizar as alterações macroscópicas e microscópicas através de microscopia eletrônica de varredura.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 AGENTE ETIOLÓGICO: *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

O primeiro isolamento de *C. perfringens* então sob a denominação *Bacillus welchii* foi realizado a partir de lesões intestinais de uma franga Orpington negra, sendo considerada a razão da morte da ave em 1930 na Austrália (BENNETTS, 1930). Parish, (1961) descreveu a doença na Inglaterra como uma doença de galos, classificando a doença como uma enterotoxemia com formas crônicas e agudas provavelmente causada por *Clostridium welchii*, a denominação do *C. perfringens* na época. *C. perfringens* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica, esporulada e toxigênica (LOS SANTOS et al., 2008). Habitante onipresente do intestino e do solo, especialmente quando estrumado, é um patógeno entérico versátil de diferentes aves e se especializou para a destruição rápida dos tecidos aviários e a obtenção de nutrientes. É responsável por várias doenças em humanos, animais domésticos e silvestres, sendo talvez a bactéria patogênica de maior incidência e parte do seu sucesso se deve ao fato de ser um dos patógenos bacterianos de crescimento mais rápido conhecido (COOPER & SONGER, 2009; PRESCOTT et al., 2016a).

Por ser um habitante comensal da flora intestinal, *C. perfringens* necessita que fatores predisponentes alterem as condições do ambiente entérico, propiciando sua multiplicação e o desencadeamento da enterite necrótica através da produção de suas toxinas (AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977c; YEGANI & KORVER, 2008; MOORE, 2016). Segundo McDevitt et al., (2006) a alteração das condições normais do trato gastrointestinal das aves que promove o crescimento exacerbado das colônias de *C. perfringens* pode ser causado por fatores de risco agindo de forma isolada ou em conjunto. Associado ao fato de que vários fatores predisponentes

podem causar mais de um efeito no trato gastrointestinal refletindo então na complexidade da completa compreensão da patogenia e dificuldades em controlar todos os possíveis fatores (MOORE, 2016). Dentre os fatores predisponentes envolvidos estão diversos fatores nutricionais, condições estressantes, danos ao epitélio de revestimento da mucosa intestinal por coccidiose, aumento da viscosidade do conteúdo intestinal, aumento do tempo de passagem intestinal, polissacarídeos não amiloidais indigeríveis, rompimento físico do revestimento gastrointestinal, falhas no sistema de produção e condições climáticas como alta densidade (MCDEVITT et al., 2006; MOORE, 2016).

4.2 EIMERIOSE E SEU PAPEL NA ENTERITE NECRÓTICA

As lesões causadas por *Eimeria* spp. variam de acordo com a espécie envolvida na infecção, de modo geral apresentam lesões como encurtamento das vilosidades intestinais, acompanhado pelo espessamento e descamação das células epiteliais que pode atingir até a metade do comprimento da vilosidade (AL-SHEIKHLY & AL-SAIEG, 1980). Sharma et al., (2013) relataram alterações patomorfológicas associadas com casos de coccidiose descrevendo, além da descamação do epitélio de revestimento e alterações no comprimento e espessura das vilosidades, a presença dos oocistos na lâmina própria, infiltração de células mononucleares, proliferação de tecido conjuntivo, ocorrência de fusão de vilosidades, epitélio submucoso impactado com oocistos perdidos e detritos necróticos do epitélio. Sua severidade varia conforme a espécie envolvida, a magnitude de lesões e o local de infecção. Os casos de coccidiose podem resultar em perda de fluidos, má absorção de nutrientes, inflamação da parede intestinal com pontos hemorrágicos, descamação do epitélio de revestimento ou destruição das vilosidades resultando em extensa hemorragia e morte (CHAPMAN, 2014).

A coccidiose é o fator primário mais relevante e predisponente da enterite necrótica devido a lesão provocada na mucosa, expondo locais propícios para colonização inicial de *C. perfringens*, permitindo o contato com a matriz extracelular que atuam na aderência da bactéria, extravasa soro para o lúmen que atua como meio de cultura para o crescimento bacteriano e induz produção de muco rico em proteínas que sustenta a proliferação de *C. perfringens* (WILLIAMS, 2005; MOORE,

2016). A campo, casos de coccidiose regularmente aparentam preceder ou ocorrer concomitantemente com surtos de enterite necrótica (BENNETTS, 1930; HELMBOLDT & BRYANT, 1971; LONG, 1973; AL-SHEIKHLY & AL-SAIEG, 1980; SHANE et al., 1985; TIMBERMONT et al., 2011). Infecções com *Eimeria* spp. frequentemente são usados em modelos experimentais da doença e geralmente torna a indução experimental da doença razoavelmente confiável e é claramente um forte fator predisponente para enterite necrótica (MOORE, 2016).

4.3 PATOGENIA DA ENTERITE NECRÓTICA

A enterite necrótica ocorre principalmente em frangos de corte entre a segunda e sexta semana de idade (LONG, 1973). Muitos sinais clínicos da enterite necrótica são comuns às diversas doenças aviárias, como a presença de depressão, relutância para movimentar-se, falhas no empenamento, podendo apresentar sonolência, diarreias, inapetência, anorexia e desidratação (COOPER & SONGER, 2009). A infecção pode estar presente como a forma da doença clínica, também denominada aguda ou uma condição subclínica (TIMBERMONT et al., 2011). A doença clínica progride por cerca de 7 dias, com a mortalidade diária raramente excedendo 1%, podendo ultrapassar os 50% em casos hiperagudos em que ocorrem alta incidência de morte súbita nos animais em poucas horas (HELMBOLDT & BRYANT, 1971; TIMBERMONT et al., 2011). A forma subclínica não apresenta sinais evidentes nem picos de mortalidade, sendo observado danos crônicos à mucosa intestinal que levam à perdas produtivas pela redução da performance graças a diminuição da digestão e absorção (IMMERSEEL et al., 2004; TIMBERMONT et al., 2011).

Os mecanismos de virulência de *C. perfringens* estão relacionados principalmente à produção de toxinas e enzimas codificadas por genes localizados no cromossomo ou em plasmídeos, assim pode produzir mais de 15 toxinas que podem causar lesões necróticas na parede intestinal, alterações renais, destruição do tecido muscular e danificar células nervosas que podem levar o hospedeiro à morte (ALBORNOZ et al., 2014). Cepas de *C. perfringens* são classificadas em cinco toxinotipos (A, B, C, D, E) baseados na produção de quatro toxinas principais (α , β , ϵ e ι) (PETIT et al., 1999).

Enterite necrótica e a forma subclínica da infecção por *C. perfringens* em aves domésticas são causados pela toxina tipo A e em menor escala C, a toxina alfa é uma fosfolipase tipo C que hidrolisa fosfolipídios e promove a desorganização da membrana, hidrólise de lecitina resulta na ativação de proteína c quinase e subsequente estimulação da cascata do ácido araquidônico que por sua vez induz a síntese de mediadores inflamatórios, causam contrações dos vasos sanguíneos, agregação plaquetária e disfunção miocárdica, levando à morte aguda (IMMERSEEL et al., 2004). As toxinas β induzem necrose hemorrágica na mucosa intestinal em testes com alça intestinal, embora essas sejam toxinas citotóxicas, seu modo de ação não foi elucidado. Como a toxina β 1 apresenta uma homologia significativa no nível de aminoácido com alfatoxina, gamatoxina e leucocidina do *Staphylococcus aureus*, que formam multímeros (proteínas em estrutura quaternária) e poros nas membranas celulares eucarióticas, é razoável esperar um modo de ação similar da toxina β 1 (PETIT et al., 1999).

Keyburn et al., (2008) relataram a identificação e caracterização inicial da toxina NetB que aparentava ser carregada apenas por *C. perfringens* tipo A capazes de causar Enterite Necrótica (EN), a análise in vivo evidenciou que a NetB é um fator essencial da patogenia da EN em galinhas. Com a descoberta da toxina formadora de poros NetB e a demonstração do seu papel essencial e crítico na habilidade de isolados de *C. perfringens* de causarem EN foi uma mudança do paradigma do entendimento da patogenia da EN, a NetB é membro da família de β toxinas formadoras de poros que incluem um número de toxinas clostridiais e de outras bactérias bem caracterizadas (PRESCOTT et al., 2016a). Esse fator desempenha papel central no desenvolvimento da EN em galinhas, mas lesões intestinais primárias devido a outros fatores predisponentes são mandatórios para a manifestação clínica (ALNASSAN et al., 2014).

4.4 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DA EN

As lesões da EN estão entre as mais severas das doenças entéricas (LONG et al., 1974). Lesões macroscópicas geralmente estão restritas ao intestino delgado, mas podem ocorrer em outros órgãos como os cecos, o fígado e no rim

(IMMERSEEL et al., 2004; TIMBERMONT et al., 2011). Tais lesões são caracterizadas através da necrose confluyente da mucosa, pelo afinamento das paredes intestinais, friabilidade e distensão intestinal com acúmulo gasoso, cobertura da superfície mucosa das áreas afetadas com uma pseudomembrana bronze-alaranjada, ocorrendo de forma multifocal desde o duodeno até o íleo podendo acometer os cecos (BROUSSARD et al., 1986; TIMBERMONT et al., 2011). Lesões microscópicas são caracterizadas pela necrose extensa das vilosidades e invasão de células mononucleares na lâmina própria (BROUSSARD et al., 1986). Kaldhusdal et al., (1995) relataram as lesões de aves afetadas em surtos de enterite necrótica em aviários da Suécia e Noruega, em exame histopatológico as aves apresentaram áreas com descamação do epitélio de revestimento intestinal juntamente com necrose do estroma das vilosidades, lesões menos extensivas estavam limitadas a necrose focal comprometendo poucas células epiteliais e estromais no ápice das vilosidades, infecções epiteliais e subepiteliais médias a moderadas com coccídeos foram detectados na maioria das aves, porém raramente em associação com lesões da enterite necrótica.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS UTILIZADOS:

Conforme aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, nº 9780241018, foram utilizados 48 frangos da linhagem Ross de um dia de idade obtidos da Aviagen, Rio Claro – SP. Estas aves foram subdivididas em 4 grupos com 12 aves em cada, os grupos foram divididos em: Grupo Controle; Grupo infectado por *Eimeria* spp.; Grupo infectado por *C. perfringens* e Grupo *C. perfringens* associado à *Eimeria* spp. designados T1, T2, T3 e T4 respectivamente, conforme apresentado na Figura 1. O fornecimento de alimento e água foi realizado *ad libitum*. A infecção por *Eimeria* spp. foi efetuada via oral aos 14 dias de vida das aves, enquanto a infecção via oral por *C. perfringens* ocorreu aos 20 dias. Foram coletados 3 animais por grupo aos 22, 28, 35 e 42 dias de vida para acompanhar o desenvolvimento de lesões na mucosa intestinal e após as infecções para avaliar as lesões. A eutanásia foi realizada através de administração de Cloridrato de Tiletamina e Cloridrato de Zolazepam em sobredose

três vezes superiores a dose terapêutica com posterior deslocamento cervical (CONCEA, 2015).

Figura 1- Delineamento experimental representando o número de animais utilizados e seus respectivos grupos.

Fonte: Adaptado de <https://www.istockphoto.com/br/vetor/ilustra%C3%A7%C3%A3o-de-frango-desenho-gravura-arte-de-linha-realista-gm641743676-116247741>, acesso em 15/04/2019.

5.2 FONTE INFECTANTE

A infecção com *Eimeria* spp. foi realizada através do fornecimento de 1 mL de vacina viva comercial (Bio-Coccivet R®) contendo *E. acervulina* (50.000 oocistos por mL), *E. máxima* (33.000 oocistos por mL), *E. praecox* (35.000 oocistos por mL), *E. tenella* (50.000 oocistos por mL) e *E. mitis* (40.000 oocistos por mL), administrada via oral para cada animal dos grupos T2 e T4. A infecção com *C. perfringens* foi realizada através do fornecimento de 1 mL de caldo de BHI (Brain Heart Infusion) contendo $2,3 \times 10^9$ unidades formadoras de colônia por mL, o caldo BHI foi semeado e incubado por 48 horas em jarra de anaerobiose, com o agente proveniente de estoque do Laboratório de Ornitopatologia (LABOR) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

5.3 COLETA DE AMOSTRAS

Após a eutanásia os animais foram submetidos a incisões na pele e parede da cavidade celomática para acesso dos órgãos de interesse. Os intestinos foram retirados da cavidade e segmentados. Foram coletadas porções de 5 cm do terço médio do duodeno, jejuno e íleo. As porções passaram pela lavagem do conteúdo luminal com solução fisiológica 0,9%, sendo então subdivididas em duas metades,

uma porção destinada à histopatologia acondicionada em frascos de coleta universal de 80mL contendo paraformaldeído 4% tamponado (PFA) e a outra porção destinada à microscopia eletrônica de varredura e transmissão fixada inicialmente em placas de cera odontológica com alfinetes presos nas extremidades dos fragmentos e submergidos em paraformaldeído 4% tamponado por 48 horas.

5.4 HISTOPATOLOGIA

Para análise do exame histopatológico, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% (PFA) por 48h, desidratadas por imersão em série crescente de álcoois e agitação orbital, iniciando com uma seção de álcool 70% por 30 minutos e posteriormente com seções de 30 minutos em álcool 80 e 90% e duas seções com duração de 30 minutos em álcool absoluto. O material foi diafanizado em Xilol I e II por 30 minutos cada e incluído em parafina. Microsecções de 5 µm (Leica RM2265 - Fully Motorized Rotary Microtome) foram transferidas para lâminas de vidro e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE).

5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A análise de microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliação de estrutura física e arquitetônica tecidual. Para este fim, as amostras foram fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% por 72 horas. As amostras foram seccionadas e lavadas em ultrassom por um período de 24 minutos, sendo 2 lavagens com duração de 2 minutos e 4 lavagens de 5 minutos, em água destilada que foi trocada a cada 5 minutos. As amostras foram acondicionadas overnight em álcool 70%. Posteriormente as amostras foram desidratadas em séries crescentes de álcoois em 2 seções de 5 minutos cada em álcool 80%, 2 em álcool 90% e três em álcool absoluto, sendo estas com duração de 10 minutos cada. O álcool da imersão foi trocado a cada seção. As amostras foram transferidas para a câmara de secagem do aparelho de ponto crítico (LEICA EM CPD 300*), em seguida aderidas sobre a superfície de stubs, utilizando cola de carbono, metalizados com ouro e a observação e fotografias dos resultados se deu através de microscópio eletrônico ME Leo 435 VP.

6. RESULTADOS

6.1 COLETA DAS AMOSTRAS E ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS

Durante o processo de coleta das aves foram observadas as condições dos órgãos dos animais para a existência de alterações macroscópicas e a presença de lesões teciduais condizentes com os agentes infecciosos de cada grupo. O grupo controle negativo (T1) não apresentou lesões macroscópicas nem alterações microscópicas. O grupo infectado com *Eimeria* spp. (T2) apresentou as lesões multifocais distribuídas pelo intestino delgado com presença de material pseudomembranoso no lúmen aderido à parede intestinal uma das características do agente. O grupo infectado com *C. perfringens* (T3) possuía intensa hiperemia, apresentando inflamação no tecido juntamente com porções multifocais e confluentes de necrose tecidual. O grupo em que foi realizado a coinfecção de *Eimeria* spp. e *C. perfringens* (T4) apresentou macroscopicamente as lesões características com a presença de detritos epiteliais, muco e conteúdo intestinal aderido na parede intestinal causado pelo parasita com a presença de hiperemia, regiões de necrose, inflamação e a formação do material pseudomembranoso característicos de infecções por *Eimeria* spp., mesmo que de maneira mais discreta que nos grupos em que foi realizado a infecção isoladamente.

As alterações macroscópicas apresentaram difusão semelhante pelas porções do intestino delgado nos grupos infectados. Aos 22 dias se concentravam principalmente no duodeno com presença discreta no jejuno, propagando-se totalmente pelo jejuno e parcialmente ao íleo aos 28 dias. Posteriormente afetou maiores porções do íleo aos 35 dias tornando-se difusa pela extensão do intestino delgado, porém os animais do grupo em que se realizou a infecção com *Eimeria* spp. apresentaram redução de lesões nas amostras de 42 dias, principalmente no duodeno e terço inicial do jejuno.

6.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

As alterações microscópicas observadas nos grupos que sofreram a infecção com os agentes foram caracterizadas principalmente por alterações nas vilosidades, especialmente no ápice das vilosidades. De modo geral em todos os grupos

infectados havia presença de muco entre as vilosidades, danos ao epitélio de revestimento da mucosa intestinal, acúmulo de detritos celulares do epitélio junto ao muco, fusão de vilosidades, presença de edema nas vilosidades demonstrados posteriormente na comparação das porções do intestino delgado entre os grupos e as idades coletadas.

No grupo controle negativo (T1) se pode acompanhar o desenvolvimento normal do intestino delgado em suas três porções (Figura 2), além de poder observar as características normais do tecido. As propriedades da mucosa e submucosa intestinal variam conforme a porção do intestino delgado. No duodeno as vilosidades demonstradas nas imagens A, B, C e D respectivamente aos 22, 28, 35 e 42 dias de vida dos animais, apresentam maior comprimento tornando-se gradualmente mais curtas e espessas, as criptas intestinais se tornam mais rasas e nota-se um aumento gradual do número de células caliciformes no jejuno e íleo conforme se aproxima do intestino grosso.

O jejuno do grupo T1 pode ser observado nas imagens E, F, G e H, foi coletado nos mesmos dias que duodeno e íleo e demonstra as características normais do tecido, em relação ao duodeno suas vilosidades são ligeiramente mais curtas, possuem maior número de células caliciformes e possuem criptas intestinais mais rasas. O íleo do grupo controle, imagens I, J, K e L apresenta, em relação ao duodeno e jejuno, vilosidades mais curtas, largas e dobramentos para aumentar a superfície de absorção, além da presença de maior número de células caliciformes.

Quando comparadas a evolução do desenvolvimento das vilosidades, pode se constatar que o duodeno apresenta um aumento na espessura de suas vilosidades, enquanto o jejuno aumenta o comprimento das vilosidades quando comparada as primeiras coletas e o íleo apresenta maiores dobramentos na vilosidade quando comparada ao animal mais jovem.

Figura 2 - Fotomicrografias em coloração de Hematoxilina & Eosina do Intestino Delgado, porções Duodeno, Jejuno e Íleo em intervalos semanais do Grupo Controle Negativo: T1.

Fonte: RIBAS, C. B. (2019).

No grupo infectado por *Eimeria* spp. (T2) a identificação de merogonias e gametogonias dos parasitas em células do epitélio revestimento da mucosa intestinal confirmou o sucesso da infecção do grupo T2 (Figura 3), com a presença intracelular dos parasitas se estendendo por toda a vilosidade (demonstrado nas imagens A e B) chegando até as criptas intestinais, a descamação do epitélio de revestimento, acúmulo de detritos, muco, a fusão de vilosidades e o encurtamento das vilosidades em todas as porções intestinais de interesse deste estudo.

Figura 3 - Fotomicrografias demonstrando a presença merogonias e gametogonias de *Eimeria* spp. em células do epitélio da mucosa de duodeno de animais com 22 dias em diferentes objetivas. Figura A em objetiva de 10X e figura B em objetiva de 20X.

Fonte: RIBAS, C. B. (2019).

A evolução dos danos causados no intestino delgado no grupo T2 durante o processo pode ser observado na Figura 4, com as imagens A, B, C, D demonstrando os duodenos aos 22, 28, 35 e 42 dias respectivamente. O pico de danos no duodeno ocorreu aos 28 dias com grande extensão das vilosidades apresentando descamação dos epitélios e a fusão das vilosidades. Esses mesmos danos ocorreram no jejuno com notável acúmulo de muco, conteúdo intestinal e detritos junto ao ápice das vilosidades aos 28 e 35 dias principalmente. Nesta porção a alteração mais notável que ocorreu, além das descritas anteriormente nos duodenos, foi a intensa fusão de vilosidades aos 35 e 42 dias no jejuno como pode ser observado nas imagens E, F, G e H da Figura 4. No íleo do grupo T2 a presença do parasita teve aumento significativo aos 28 dias e o encurtamento e achatamento das vilosidades prevaleceu de formas mais intensa a partir dos 35 dias como podemos observar nas fotos I, J, K e L.

Figura 4 - Fotomicrografias em coloração de Hematoxilina & Eosina do Intestino Delgado, porções Duodeno, Jejuno e Íleo em intervalos semanais do Grupo *Eimeria* spp.: T2.

Fonte: RIBAS, C. B. (2019).

Em relação ao grupo com a infecção utilizando *C. perfringens* (T3), na Figura 5 podemos observar as alterações ocorridas nas porções do intestino delgado durante o período do experimento. O duodeno (Imagens A, B, C e D) aos 22 dias apresenta nas vilosidades infiltração de células mononucleares característico de inflamações, destruição do epitélio de revestimento no ápice expondo a musculatura lisa da vilosidade, presença de muco e detritos no lúmen e entre as vilosidades. O edema e a inflamação de vilosidades em toda sua extensão ocorreu de forma mais intensa juntamente com a destruição do ápice das vilosidades aos 28 dias. Enquanto aos 35 dias o edema das vilosidades reduziu, ainda existe infiltração de células mononucleares, entre as vilosidades existe acúmulo de muco mais intenso associado com descamação e destruição das extremidades das vilosidades resultantes de processos necróticos e na coleta final aos 42 dias as vilosidades ainda apresentam o espessamento do epitélio de revestimento além dos danos descritos anteriormente.

O jejuno dos animais pertencentes ao grupo T3 (Imagens E, F, G e H) apresenta os mesmos danos previamente descritos no duodeno, apenas com o pico de danos ocorrendo mais tardiamente, aos 35 e 42 dias apresenta edema intenso das vilosidades, produção de muco, infiltração de células mononucleares e descamação do epitélio de revestimento das vilosidades principalmente próximo ao ápice das vilosidades. Quanto ao íleo do grupo T3 (Imagens I, J, K e L), esta porção apresentou as mesmas alterações características que o duodeno e jejuno, entretanto com maior intensidade de danos aos 35 e 42 dias de forma semelhante ao jejuno.

Uma característica comum as três porções do intestino delgado apresentadas por este grupo foi o aumento da superfície das vilosidades em parte devido ao edema, e parte como resposta adaptativa para melhorar a absorção de nutrientes da alimentação com aumento e acentuação de sulcos e dobramentos em sua extensão. Essas alterações podem ser observadas de maneira mais notável nas imagens B, C no caso do duodeno, nas imagens F e H do jejuno e todas as imagens (I, J, K e L) do íleo apresentam essa alteração.

Figura 5 - Fotomicrografias em coloração de Hematoxilina & Eosina do Intestino Delgado, porções Duodeno, Jejuno e Íleo em intervalos semanais do Grupo *Clostridium perfringens*: T3.

Fonte: RIBAS, C. B. (2019).

O grupo em que foi realizado a coinfeção de *Eimeria* spp. e *C. perfringens* (T4), conforme demonstrado pelas imagens da Figura 6, apresentou uma mescla das alterações de ambos os agentes com a persistência dos danos similares aos causados pela infecção isolada de *Eimeria* spp., no duodeno (Imagens A, B, C e D) caracterizou-se pelo edema mais brando e tardio quando comparado às infecções experimentais realizadas nos grupos T2 e T3. A invasão de células mononucleares ocorreu de forma similar, aos 22 dias (imagem A) pode ser observada maior destruição das vilosidades constando com rompimento do ápice, descamação extensa do epitélio de revestimento e fusão de vilosidades. Nas demais coletas apresentaram intensa produção de muco, espessamento e dobramento do epitélio de revestimento na porção média das vilosidades, descamação do epitélio de revestimento desde a base e a ruptura de vilosidades de maneira mais intensa a partir dos 28 dias.

Os jejunos dos animais deste grupo (Imagens E, F, G e H) apresentaram edema, espessamento, dobramento e achatamento intensos de vilosidades aos 22 e 28 dias como alterações mais notáveis, em geral no jejuno houve produção de muco intensa, descamação do epitélio de revestimento e ruptura apical das vilosidades em todas as coletas.

O íleo deste grupo apresentou uma evolução peculiar de lesões que podem ser observada nas Imagens I, J, K e L, além do edema da vilosidade, infiltração intracelular pelas merogonias e gametogonias, infiltração de células mononucleares, produção de muco e detritos provenientes da descamação do epitélio de revestimento presente em todas as coletas, apresentou aos 22 dias perda do epitélio de revestimento apical mais intensa, aos 28 dias fusão de vilosidades, presença de maior quantidade de muco mesclado aos detritos de descamação e conteúdo intestinal, aos 35 e 42 dias o afinamento do epitélio de revestimento da vilosidade em sua extensão quase total.

A comparação entre duodenos pertencentes aos grupos deste estudo podem ser observados na Figura 7, onde estão presentes imagens dos 4 grupos entre 28 e 42 dias, sendo o período que apresentou a maior intensidade de alterações. A coluna com as imagens A, E e I pertencem ao controle negativo e servem como base de referência para um animal normal, nas colunas em sequência estão dispostos os grupos T2 (imagens B, F e J), T3 (imagens C, G e K) e T4 (imagens D, H e L).

Figura 6- Fotomicrografias em coloração de Hematoxilina & Eosina do Intestino Delgado, porções Duodeno, Jejuno e Íleo em intervalos semanais do Grupo *Eimeria* spp. associado ao *Clostridium perfringens*: T4.

Fonte: RIBAS, C. B. (2019).

Figura 7- Fotomicrografias em coloração de Hematoxilina & Eosina de Duodenos com intervalos semanais dos Grupos T1:Controle Negativo, T2:*Eimeria* spp., T3:*C. perfringens* e T4:*Eimeria* spp. associado ao *C. perfringens*. Imagens A, E e I representam amostras controle, imagens B, F e J pertencem ao grupo infectado com *Eimeria* spp., imagens C, G e K pertencem ao grupo infectado por *C. perfringens* e as imagens D, H e L pertencem ao grupo em que ocorreu a coinfeção com *Eimeria* spp. e *C. perfringens*. Imagens A, B, C e D são de coletas realizadas com animais aos 28 dias de vida, imagens E, F, G e H são das coletas realizadas aos 35 dias de vida dos animais e imagens I, J, K e L são imagens de animais com 42 dias de vida.

Fonte: RIBAS, C. B. (2019)

As alterações comuns aos três grupos incluem a danos ao epitélio, adaptação do epitélio para aumentar área de absorção, produção de muco e formação de placas de detritos com muco.

De forma similar a comparação entre Jejunos pertencentes aos grupos podem ser observados na Figura 8, onde estão presentes imagens dos 4 grupos entre 22 e 42 dias, pode se notar variação de período em que se apresentou a maior intensidade de alterações entre os grupos. Novamente o grupo controle se torna a base para a comparação e o entendimento, conforme citado anteriormente ocorreram variações entre os picos de alterações dos grupos. Os grupos T2, T3 e T4 apresentaram evolução e picos de danos diversos, o grupo T4 apresentou a evolução e pico mais rápido entre os três grupos 22 e 28 dias, com redução dos danos observados aos 35 e 42 dias, enquanto ambos os grupos T2 e T3 apresentaram uma evolução mais lenta e duradoura com os picos de danos aos 42 e 35 dias respectivamente.

Figura 8 - Fotomicrografias em coloração de Hematoxilina & Eosina de Jejunos com intervalos semanais dos Grupos T1:Controle Negativo, T2:*Eimeria* spp., T3:*C. perfringens* e T4:*Eimeria* spp. associado ao *C. perfringens*. Imagens A, E, I e M representam amostras controle, imagens B, F, J e N pertencem ao grupo infectado com *Eimeria* spp., imagens C, G, K e O pertencem ao grupo infectado por *C. perfringens* e as figuras D, H, L e P pertencem ao grupo em que ocorreu a coinfeção com *Eimeria* spp. e *C. perfringens*. Imagens A, B, C e D são de coletas realizadas com animais aos 22 dias de vida, imagens E, F, G e H são das coletas realizadas aos 28 dias de vida dos animais, imagens I, J, K e L são imagens de animais com 35 dias de vida e M, N, O e P são imagens aos 42 dias.

Fonte: RIBAS, C. B. (2019)

A comparação entre a os Íleos dos grupos apresenta configuração similar a utilizada para ilustrar a porção do Jejunum devido ao grupos novamente apresentarem variação na evolução e pico de danos variáveis. A figura 9, assim como as duas anteriores expõe o grupo controle negativo como base para comparação e compreensão das alterações apresentadas. O grupo T2 apresentou alterações leves aos 22 dias com intensificação da presença de parasitas aos 28 dias e dos danos aos 35 dias, o grupo T3 teve evolução mais tardia e com os principais danos ocorrendo aos 35 e 42 dias e finalmente o grupo T4 apresentou a combinação dos danos aos 22 e 28 dias com moderada intensidade e causou alteração na forma das vilosidades aos 35 e 42 ao apresentar afinamento das vilosidades.

Figura 9 - Fotomicrografias em coloração de Hematoxilina & Eosina de Íleos com intervalos semanais dos Grupos T1: Controle Negativo, T2: *Eimeria* spp., T3: *C. perfringens* e T4: *Eimeria* spp. associado ao *C. perfringens*. Imagens A, E, I e M representam amostras controle, imagens B, F, J e N pertencem ao grupo infectado com *Eimeria* spp., imagens C, G, K e O pertencem ao grupo infectado por *C. perfringens* e as figuras D, H, L e P pertencem ao grupo em que ocorreu a coinfeção com *Eimeria* spp. e *C. perfringens*. Imagens A, B, C e D são de coletas realizadas com animais aos 22 dias de vida, imagens E, F, G e H são das coletas realizadas aos 28 dias de vida dos animais, imagens I, J, K e L são imagens de animais com 35 dias de vida e M, N, O e P são imagens aos 42 dias.

Fonte: RIBAS, C. B. (2019)

6.3 ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS

A realização da microscopia eletrônica de varredura nos permite visualizar as alterações ultraestruturais do epitélio viloso. A figura 10 demonstra as características apresentada no Duodeno, o grupo controle (imagens A e B) exibe a arquitetura original e a integridade do epitélio da vilosidade como base para a identificação e comparação dos danos apresentados pelos demais grupos, nas imagens C e D pertencentes ao Grupo T2 podemos observar a perda da integridade do epitélio de revestimento do ápice com descamação e acúmulo destes detritos provenientes do epitélio descamado, muco e conteúdo intestinal entre as vilosidades, na imagem C essas alterações se apresentam de forma menos intensa quando comparada às alterações presentes na imagem D.

No grupo T3, a imagem E apresenta perda da integridade do epitélio de revestimento da vilosidade distribuído pela vilosidade de forma mais extensa e irregular com a exposição da camada submucosa do epitélio em diversos pontos, acúmulos de resíduos celulares e de células mononucleares indicando ação de resposta imune se encontram presentes entre as vilosidades, enquanto na imagem F pode ser observado a descamação por completo do epitélio de revestimento do ápice das vilosidades, consequente aumento dos detritos e maior exposição da camada submucosa do tecido. O grupo T4 apresenta na imagem G uma superfície do epitélio de revestimento irregular, de aspecto poroso e descamação discreta no ápice, além de mostrar sinais de espessamento com presença mais proeminente de sulcos no epitélio, enquanto a imagem H apresenta aumento da presença de detritos entre as vilosidades resultante da maior descamação do epitélio de revestimento apical das vilosidades, a irregularidade do epitélio de revestimento se acentuou.

A arquitetura do Jejunó pode ser observada nas imagens do grupo controle negativo T1 (A e B) da Figura 11, servindo de base para comparação com as alterações apresentadas pelas amostras dos demais grupos (T2, T3 e T4). Mesmo no grupo T1 podemos observar a presença de restos celulares, muco, descamação e conteúdo intestinal que em pequena escala pode ser considerado normal. A situação das imagens C apresenta um aumento de detritos e conteúdo aderido às vilosidades e principalmente há presença de células mononucleares aderidas ao ápice.

Figura 10 - Duodenos analisados em Microscopia Eletrônica de Varredura dos Grupos T1:Controle Negativo, T2:*Eimeria* spp., T3:*C. perfringens* e T4:*Eimeria* spp. associado ao *C. perfringens*. Imagens A e B representam amostras controle, imagens C e D pertencem ao grupo infectado com *Eimeria* spp., imagens E e F pertencem ao grupo infectado por *C. perfringens* e as imagens G e H pertencem ao grupo em que ocorreu a coinfeção com *Eimeria* spp. e *C. perfringens*.

Fonte: RIBAS, C. B. (2019).

A evolução e intensificação dos danos causados pela infecção podem ser observados na imagem D, com maior destruição do ápice da vilosidade e pela presença de uma camada de detritos celulares, muco e células mononucleares cobrindo o ápice e ocupando o espaço entre algumas vilosidades. O grupo T3 apresenta na imagem E descamação significativa no ápice das vilosidades, forma irregular do ápice, presença de detritos, muco, e células mononucleares entre as vilosidades, além dessas alterações podemos observar a perda de porções do ápice na imagem F. As alterações observadas nas imagens pertencentes ao grupo T4 em que foi realizada a coinfeção e pode ser observado (G) maior número de sulcos e dobramentos nas vilosidades, além da já estabelecida descamação do ápice nos demais grupos, na imagem H podemos observar a descamação novamente, consequente exposição da camada submucosa da vilosidade, e presença de detritos celulares.

A arquitetura da porção final do Intestino Delgado pode ser observada na Figura 12, com as imagens A e B pertencendo ao grupo T1: Controle Negativo e servindo como exemplo de arquitetura e características normais para comparação com os demais Íleos dos outros três grupos. As vilosidades do Controle Negativo apresentam-se quase totalmente lisas, com poucos dobramentos e sulcos, apresentam materiais aderidos às vilosidades, embora discretos. Próximo ao ápice existem pontos de descamação, embora seja uma ocorrência normal em quantidades moderadas. O grupo T2 apresenta acentuação dos sulcos e dobramentos próximo ao ápice, formando uma superfície mais irregular e com aumento de material aderido à vilosidade na imagem C. A imagem D apresenta as mesmas características apresentadas na imagem C, com notável descamação do ápice de diversas vilosidades em decorrência da evolução da infecção.

O grupo T3 apresenta descamação e acentuação dos sulcos e dobramentos mais notáveis na imagem E do que o grupo T2 na imagem C, entretanto não apresenta conteúdo aderido em excesso na vilosidade. A imagem F demonstra a evolução da descamação e amplas porções da submucosa da vilosidade exposta ao ambiente intestinal, o acúmulo de detritos e a dificuldade de identificação de estruturas também são notáveis. O grupo T4 apresentou descamação mais discreta que as infecções separadas, menor acúmulo de detritos, entretanto maior número de células mononucleares podem ser observadas entre as vilosidades.

Figura 11 - Jejunos analisados em Microscopia Eletrônica de Varredura dos Grupos T1:Controle Negativo, T2:*Eimeria* spp., T3:*C. perfringens* e T4:*Eimeria* spp. associado ao *C. perfringens*. Imagens A e B representam amostras controle, imagens C e D pertencem ao grupo infectado com *Eimeria* spp., imagens E e F pertencem ao grupo infectado por *C. perfringens* e as imagens G e H pertencem ao grupo em que ocorreu a coinfeção com *Eimeria* spp. e *C. perfringens*.

Fonte: RIBAS, C. B. (2019).

Figura 12- Íleos analisados em Microscopia Eletrônica de Varredura dos Grupos T1:Controle Negativo, T2:*Eimeria* spp., T3:*C. perfringens* e T4:*Eimeria* spp. associado ao *C. perfringens*. Imagens A e B representam amostras controle, imagens C e D pertencem ao grupo infectado com *Eimeria* spp., imagens E e F pertencem ao grupo infectado por *C. perfringens* e as imagens G e H pertencem ao grupo em que ocorreu a coinfeção com *Eimeria* spp. e *C. perfringens*.

Fonte: RIBAS, C. B. (2019).

7. DISCUSSÃO

O protocolo de infecção foi planejado e executado com base em protocolos que comprovadamente demonstraram facilitar o desafio com *C. perfringens* (COWEN et al., 1987; DAHIYA et al., 2006; GHOLAMIANDEHKORDI et al., 2007; COLLIER et al., 2008; LEE et al., 2011; PRESCOTT et al., 2016b). Fazendo uso de um dos fatores mais comumente envolvido na avicultura, a ocorrência de *Eimeria* spp. como fator predisponente da enterite necrótica (BENNETTS, 1930; HELMBOLDT & BRYANT, 1971; LONG, 1973; AL-SHEIKHLY & AL-SAIEG, 1980; SHANE et al., 1985; BROUSSARD et al., 1986; BABA et al., 1997; WILLIAMS, 2002; WILLIAMS et al., 2003; DHILLON et al., 2004; YEGANI & KORVER, 2008; COOPER & SONGER, 2009; TIMBERMONT et al., 2011; TSIOURIS et al., 2013; KALDHUSDAL et al., 2016). O qual se torna especialmente relevante quando levamos em consideração que recentes proibições de antibióticos e agentes promotores de crescimento que atuavam de forma preventiva em doses não terapêuticas responsáveis por manter sob controle esses agentes. (WILLIAMS, 2002; WILLIAMS et al., 2003; LOVLAND et al., 2004; DAHIYA et al., 2006; MCDEVITT et al., 2006; GHOLAMIANDEHKORDI et al., 2007; HERMANS & MORGAN, 2007; COLLIER et al., 2008; YEGANI & KORVER, 2008; COOPER & SONGER, 2009; IMMERSEEL et al., 2009; LEE et al., 2011; SHOJADOOST et al., 2012; PRESCOTT et al., 2016b;). Protocolos que utilizam apenas *C. perfringens* demonstraram-se inconstantes quando comparados aos relatos de casos e a utilização de fatores predisponentes para o desenvolvimento da enterite necrótica indicando que danos prévios e um ambiente favorável produzem resultados mais confiáveis (AL-SHEIKHLY; TRUSCOTT, 1977c; COWEN et al., 1987; CREYNOLDS et al., 2004; MCDEVITT et al., 2006; IMMERSEEL et al., 2009; MSHOJADOOST et al., 2012; KALDHUSDAL et al., 2016; PRESCOTT et al., 2016b).

O desafio com *Eimeria* spp. foi realizado com espécies que habitam todo o trato intestinal, 5 dias previamente ao desafio utilizando clostrídios com o objetivo de coincidir os danos causados pela coccidiose com o desafio com bactéria (BABA et al., 1997; MATTIELLO et al., 2000; WILLIAMS et al., 2003; SHOJADOOST et al., 2012; ALNASSAN et al., 2014; PRESCOTT et al., 2016b). Buscando assim promover um ambiente favorável em toda a extensão do trato gastrointestinal para a implantação, colonização e o desenvolvimento das colônias de *C. perfringens* (AL-SHEIKHLY; AL-SAIEG, 1980; MCDEVITT et al., 2006; COOPER; SONGER, 2009; IMMERSEEL et

al., 2009; SHOJADOOST et al., 2012; M'SADEQ et al., 2015; MOORE, 2016; PRESCOTT et al., 2016b). O dano físico no epitélio ocorre durante as fases de esquizogonia e gametogonia do ciclo do parasita (LILLEHOJ & LILLEHOJ, 2000; MATTIELLO et al., 2000; COOPER & SONGER, 2009; IMMERSEEL et al., 2009; TIMBERMONT et al., 2011). Permitindo o acesso das bactérias a lamina basal, além da exposição de moléculas da matriz extracelular que desempenham importante papel na aderência da bactéria (AL-SHEIKHLY & AL-SAIEG, 1980; COOPER & SONGER, 2009; IMMERSEEL et al., 2009; SHOJADOOST et al., 2012; ALNASSAN et al., 2014; M'SADEQ et al., 2015; MOORE, 2016). O extravasamento de proteínas plasmáticas para o lúmen atua como uma fonte de nutrição rica em proteínas para o seu crescimento e induz a produção de muco fornecendo outra fonte rica em proteínas para a proliferação de *C. perfringens* (WILLIAMS et al., 2003; COOPER & SONGER, 2009; LEE et al., 2011; TIMBERMONT et al., 2011; SHOJADOOST et al., 2012; SHARMA et al., 2013; TSIOURIS et al., 2013; ALNASSAN et al., 2014; M'SADEQ et al., 2015; MOORE, 2016).

O desafio exercido nas aves gerou a forma subclínica da doença em que não ocorreu picos de mortalidade e os sinais clínicos são inespecíficos e ligados ao desempenho produtivo reduzido (PARISH, 1961; SHANE et al., 1985; TIMBERMONT et al., 2011; M'SADEQ et al., 2015; PRESCOTT et al., 2016a). Durante a coleta do material foram observadas a presença de alterações macroscópicas condizentes com o respectivo agente conforme é descrito na literatura e foi detalhado a seguir. Os animais dos grupos afetados apresentavam sinais inespecíficos como depressão, prostração, relutância para se mover, falhas no empenamento, diarreicas e sonolência (PARISH, 1961; HELMBOLDT & BRYANT, 1971; LONG, 1973; AL-SHEIKHLY & AL-SAIEG, 1980; SHANE et al., 1985; COOPER & SONGER, 2009; TIMBERMONT et al., 2011; SHARMA et al., 2013; ALNASSAN et al., 2014; M'SADEQ et al., 2015; PRESCOTT et al., 2016a). Os animais afetados por *Eimeria* spp. apresentaram lesões multifocais distribuídas pelo intestino delgado, petéquias, pontos esbranquiçados na mucosa, espessamento da parede intestinal, edema, hiperemia, a presença de muco misturado com detritos celulares e conteúdo intestinal (AL-SHEIKHLY & AL-SAIEG, 1980; SHANE et al., 1985; SHARMA et al., 2013; WU et al., 2014). Enquanto os animais do grupo infectado com *C. perfringens* apresentaram intensa hiperemia, edema, presença de muco, material pseudomembranoso recobrimdo a mucosa e

pontos focais de necrose (IMMERSEEL et al., 2004; COOPER & SONGER, 2009; TIMBERMONT et al., 2011; WU et al., 2014; PRESCOTT et al., 2016a). O grupo em que foi realizada a coinfeção pode ser observada a presença de alterações similares das infecções isoladas, lesões multifocais, petéquias, pontos esbranquiçados, espessamento da parede intestinal, edema, hiperemia, acúmulo de muco, detritos celulares, conteúdo intestinal, material pseudomembranoso recobrimdo a mucosa e pontos focais de necrose, entretanto, aparentemente acometendo o duodeno de forma mais branda (AL-SHEIKHLY; AL-SAIEG, 1980; IMMERSEEL et al., 2004; LONG et al., 1974; PRESCOTT et al., 2016a; SHANE et al., 1985; SHARMA et al., 2013; TIMBERMONT et al., 2011; WU et al., 2014).

As alterações observadas durante a análise microscópica utilizando a coloração de hematoxilina e eosina (HE), uma técnica comparativamente simples com a capacidade de demonstrar com clareza um grande número de estruturas teciduais (SHANE et al., 1985; BANCROFT & LAYTON, 2013). A hematoxilina é utilizada para a visualização do núcleo celular, com a possibilidade de visualização de detalhes intranucleares e a eosina para demarcação do citoplasma, parede celular e fibras de tecido conjuntivo visando demonstrar as alterações na integridade tecidual, (AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977b; SHANE et al., 1985; KALDHUSDAL et al., 1995; BANCROFT & LAYTON, 2013; SHARMA et al., 2013).

As alterações histopatológicas causadas por *Eimeria* spp. variam de acordo com a espécie, a intensidade e o local da infecção (TYZZER, 1929; TYZZER et al., 1932; AL-SHEIKHLY & AL-SAIEG, 1980; MATTIELLO et al., 2000; CHAPMAN, 2014). O desafio em geral resultou em enterite restrita com consequente perda de líquidos e má absorção nutricional, na ocorrência de inflamação da parede intestinal com a presença de focos hemorrágicos, intensa descamação do epitélio com a destruição parcial de vilosidades (TYZZER et al., 1932; AL-SHEIKHLY & AL-SAIEG, 1980; YEGANI & KORVER, 2008; SHARMA et al., 2013; CHAPMAN, 2014). Esses danos teciduais comprometem o processo digestivo, com a redução de absorção de nutrientes resultando em animais com menor ganho de peso e mais suscetíveis a outros agentes infecciosos (TYZZER, 1929; YEGANI & KORVER, 2008; SHARMA et al., 2013; CHAPMAN, 2014). O uso de diferentes de *Eimeria* spp. resultou na variação dos danos nas porções do intestino delgado devido as características de cada espécie

(TYZZER, 1929; TYZZER et al., 1932; AL-SHEIKHLY; AL-SAIEG, 1980; MATTIELLO et al., 2000; CHAPMAN, 2014).

O duodeno apresentou descamação do ápice aos 22 dias de idade, resultando na fusão de vilosidades aos 28 dias de idade e apresentou recuperação aos 35 e 42 dias de vida, indicando a capacidade auto limitante da infecção (WILLIAMS et al., 2003; SHARMA et al., 2013). Sendo essa porção o local de desenvolvimento de *E. acervulina* e *E. praecox* que podem se estender até a porção média do intestino dos animais em infecções mais severas (TYZZER, 1929; TYZZER et al., 1932; JOHNSON & REID, 1970; CHAPMAN, 2014). O jejuno apresentou edema e infiltração de células mononucleares aos 22 dias de idade, aos 28 dias de vida apresentou redução do edema com a permanência das infiltrações de células mononucleares e com acúmulo de detritos celulares e muco no ápice das vilosidades, progredindo aos 35 e 42 dias de idade para a descamação e rompimento do ápice e consequente aumento na camada de detritos celulares e células mononucleares presentes nas vilosidades (WILLIAMS et al., 2003; SHARMA et al., 2013). *E. maxima*, *E. necatrix* e *E. praecox* são as espécies que normalmente habitam o Jejuno, juntamente com a *E. acervulina* em casos severos (TYZZER, 1929; TYZZER et al., 1932; JOHNSON & REID, 1970; AL-SHEIKHLY & AL-SAIEG, 1980; CHAPMAN, 2014). O íleo apresentou a infiltração de células nucleares de forma semelhante as porções anteriores do intestino delgado, iniciando aos 22 dias de idade, acúmulo de muco ocorreu de mais notável aos 28 dias e além da erosão e descamação das extremidades das vilosidades aos 35 e 42 dias de idade, pode ser observado o encurtamento e achatamento das vilosidades (TYZZER, 1929; TYZZER et al., 1932; AL-SHEIKHLY; AL-SAIEG, 1980; YEGANI & KORVER, 2008). As espécies que habitam o íleo são *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis* e *E. necatrix* (TYZZER, 1929; TYZZER et al., 1932; JOHNSON & REID, 1970; CHAPMAN, 2014).

As alterações causadas por *C. perfringens* foram caracterizadas de modo geral pela infiltração de células mononucleares, intenso edema de vilosidades, produção de muco, descamação e destruição das extremidades das vilosidades intensa causadas por extensa necrose que levam a formação do tecido pseudomembranoso que se adere a parede intestinal (PARISH, 1961; LONG, 1973; LONG et al., 1974; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977a; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977b; BROUSSARD et al., 1986; KALDHUSDAL et al., 1995; OLKOWSKI et al., 2008;

COOPER & SONGER, 2009). Edema e infiltração de células mononucleares são indicadores de resposta inflamatória dos animais, associados com o acúmulo de muco, a descamação e destruição do epitélio e até mesmo da própria vilosidade levam ao comprometimento das funções fisiológicas do intestino delgado (LONG, 1973; LONG et al., 1974; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977b; KALDHUSDAL et al., 1995; YEGANI & KORVER, 2008; TIMBERMONT et al., 2011).

Foi observado no duodeno aos 22 dias de idade a infiltração de células mononucleares, edema discreto, acúmulo de muco entre as vilosidades e descamação do epitélio no ápice das vilosidades (LONG et al., 1974; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977a; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977b; KALDHUSDAL et al., 1995; YEGANI & KORVER, 2008; COOPER & SONGER, 2009; TIMBERMONT et al., 2011;). Progredindo aos 28 dias para um intenso edema, infiltração de células mononucleares e intensa destruição do ápice (PARISH, 1961; HELMBOLDT & BRYANT, 1971; LONG, 1973; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977a; COOPER & SONGER, 2009; TIMBERMONT et al., 2011). Aos 35 dias ocorreu a diminuição significativa do edema e da infiltração celular, entretanto a descamação epitelial e a presença de detritos entre vilosidades é mais notável indicando que mesmo após a redução da resposta inflamatória os danos ao epitélio de revestimento das vilosidades ainda são severos (PARISH, 1961; HELMBOLDT & BRYANT, 1971; LONG, 1973; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977a; TIMBERMONT et al., 2011). Aos 42 dias o epitélio apresenta sinais de recuperação, mas ainda pode ser observado a presença de células inflamatórias infiltradas na mucosa alterando a estrutura normal das vilosidades indicando que a infecção ainda permanece mesmo que em menor escala (PARISH, 1961; HELMBOLDT & BRYANT, 1971; LONG et al., 1974; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977a; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977b; KALDHUSDAL et al., 1995; YEGANI & KORVER, 2008; COOPER & SONGER, 2009; TIMBERMONT et al., 2011). A infecção ocorreu de forma semelhante no jejuno e íleo com maior intensidade das alterações ocorrendo entre 35 e 42 dias de idade, os danos foram os mesmos descritos previamente no duodeno, além disso, pode ser observado alteração expressiva na forma das vilosidades apresentado dobramentos e sulcos em extensão (PARISH, 1961; HELMBOLDT & BRYANT, 1971; LONG, 1973 & LONG et al., 1974; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977a; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977b;

KALDHUSDAL et al., 1995; COOPER & SONGER, 2009; YEGANI & KORVER, 2008; TIMBERMONT et al., 2011;).

A coinfeção apresentou uma combinação de lesões no intestino delgado, o edema da resposta inflamatória foi mais brando, porém a infiltração de células mononucleares, os danos ao epitélio e na vilosidade ocorreram com maior intensidade atingindo uma maior extensão e de forma mais precoce e duradoura do que quando comparada as infecções isoladas (BENNETTS, 1930; PARISH, 1961; HELMBOLDT & BRYANT, 1971; LONG, 1973; LONG et al., 1974; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977a; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977b; AL-SHEIKHLY & AL-SAIEG, 1980; SHANE et al., 1985; BROUSSARD et al., 1986; COWEN et al., 1987; KALDHUSDAL et al., 1995; BABA et al., 1997; WILLIAMS, 2002; WILLIAMS et al., 2003; DHILLON et al., 2004; DAHIYA et al., 2006; GHOLAMIANDEHKORDI et al., 2007; COLLIER et al., 2008; YEGANI & KORVER, 2008; COOPER & SONGER, 2009; LEE et al., 2011; TIMBERMONT et al., 2011; TSIOURIS et al., 2013; KALDHUSDAL et al., 2016; PRESCOTT et al., 2016b). As alterações histopatológicas de forma geral foram caracterizadas por intensos danos no epitélio de revestimento da mucosa da vilosidade e na própria vilosidade, ocorrendo com maior intensidade entre os 22 e 35 dias no período que corresponde entre 3 e 5 semanas de vida dos animais (PARISH, 1961; LONG et al., 1974; TIMBERMONT et al., 2011). Casos de enterite necrótica em aviários comerciais comumente apresentam a presença de *Eimeria* spp., demonstrando que casos de coccidiose desempenham papel importante como fator predisponente e agravante na ocorrência de enterites necróticas (BENNETTS, 1930; HELMBOLDT & BRYANT, 1971; LONG et al., 1974; AL-SHEIKHLY & AL-SAIEG, 1980; SHANE et al., 1985; BROUSSARD et al., 1986; KALDHUSDAL et al., 1995; BABA et al., 1997; WILLIAMS, 2002; WILLIAMS et al., 2003; DHILLON et al., 2004; WILLIAMS, 2005; YEGANI & KORVER, 2008; COOPER & SONGER, 2009; TIMBERMONT et al., 2011; TSIOURIS et al., 2013; KALDHUSDAL et al., 2016; MOORE, 2016).

As alterações presentes no duodeno se caracterizaram pelo edema mais discreto e tardio quando comparado as infecções dos patógenos separados e com as demais porções do intestino delgado, em contrapartida danos no epitélio e na própria estrutura da vilosidade foram notavelmente mais severos, intensos e persistiram até a data final de coleta, aos 42 dias de idade (PARISH, 1961; HELMBOLDT & BRYANT,

1971; LONG, 1973; LONG et al., 1974; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977a; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977b; AL-SHEIKHLY & AL-SAIEG, 1980; SHANE et al., 1985; KALDHUSDAL et al., 1995; BABA et al., 1997; WILLIAMS, 2002; WILLIAMS et al., 2003; COLLIER et al., 2008; YEGANI & KORVER, 2008; COOPER & SONGER, 2009; LEE et al., 2011; TIMBERMONT et al., 2011; TSIOURIS et al., 2013; KALDHUSDAL et al., 2016; PRESCOTT et al., 2016b). O jejuno apresenta alterações de forma similar a infecção com *Eimeria* spp., com a reação inflamatória no jejuno se concentrando aos 22 e 28 dias, com edema e infiltração de células mononucleares intensos, enquanto os danos nas vilosidades com o espessamento, achatamento, descamação do epitélio de revestimento e ruptura dos ápices ocorreu de forma similar a infecção com *C. perfringens* (PARISH, 1961; HELMBOLDT & BRYANT, 1971; LONG, 1973; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977a; WILLIAMS et al., 2003; TIMBERMONT et al., 2011; SHARMA et al., 2013). Além de apresentar as alterações descritas anteriormente, no íleo elas ocorreram de maneira mais precoce do que quando realizado o desafio com os patógenos isolados, mudanças na forma da vilosidades puderam ser observadas em todas as coletas (PARISH, 1961; HELMBOLDT & BRYANT, 1971; LONG, 1973; LONG et al., 1974; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977a; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977b; AL-SHEIKHLY & AL-SAIEG, 1980; SHANE et al., 1985; KALDHUSDAL et al., 1995; BABA et al., 1997; WILLIAMS, 2002; WILLIAMS et al., 2003; COLLIER et al., 2008; YEGANI & KORVER, 2008; COOPER & SONGER, 2009; LEE et al., 2011;; TIMBERMONT et al., 2011; TSIOURIS et al., 2013; KALDHUSDAL et al., 2016; PRESCOTT et al., 2016b).

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura foi utilizada para avaliar a arquitetura das porções estudadas do intestino delgado, juntamente com o objetivo de confirmar os resultados obtidos através da histopatologia que utilizou a coloração de HE (AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977b; SHANE et al., 1985; KALDHUSDAL et al., 1995; DAS et al., 2008; OLKOWSKI et al., 2008; SHARMA et al., 2013). A visualização das alterações em certos locais do exame histopatológico podem se apresentar discretas ou parciais a situação geral, tais alterações podem ser visualizadas de forma melhor quando utilizada a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977b; KALDHUSDAL et al., 1995; DAS et al., 2008; OLKOWSKI et al., 2008).

Assim, podemos observar que nossos protocolos de indução da eimeriose, clostridiose e da enterite necrótica corroboram em alguns aspectos com os protocolos utilizados, confiáveis e que comumente estão presentes em aviários (BENNETTS, 1930; HELMBOLDT & BRYANT, 1971; LONG, 1973; AL-SHEIKHLY & AL-SAIEG, 1980; SHANE et al., 1985; BROUSSARD et al., 1986; COWEN et al., 1987; KALDHUSDAL et al., 1995; BABA et al., 1997; WILLIAMS, 2002; WILLIAMS et al., 2003; DHILLON et al., 2004; DAHIYA et al., 2006; GHOLAMIANDEHKORDI et al., 2007; COLLIER et al., 2008; YEGANI & KORVER, 2008; COOPER & SONGER, 2009; LEE et al., 2011; TIMBERMONT et al., 2011; TSIOURIS et al., 2013; KALDHUSDAL et al., 2016; MOORE, 2016; PRESCOTT et al., 2016b). Quanto aos danos causados pelos patógenos eles foram condizentes com o que está estabelecido na literatura, tanto para infecções isoladas como para a coinfeção (PARISH, 1961; HELMBOLDT & BRYANT, 1971; LONG, 1973; LONG et al., 1974; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977a; AL-SHEIKHLY & TRUSCOTT, 1977b; AL-SHEIKHLY & AL-SAIEG, 1980; SHANE et al., 1985; KALDHUSDAL et al., 1995; BABA et al., 1997; WILLIAMS, 2002; WILLIAMS et al., 2003; COLLIER et al., 2008; DAS et al., 2008; YEGANI & KORVER, 2008; COOPER & SONGER, 2009; LEE et al., 2011; TIMBERMONT et al., 2011; SHARMA et al., 2013; TSIOURIS et al., 2013; KALDHUSDAL et al., 2016; PRESCOTT et al., 2016b).

8. CONCLUSÕES

É possível concluir que a indução da enterite necrótica nos animais foi alcançada, indicado pela presença das lesões macroscópicas, microscópicas e ultraestruturais características de cada patógeno apresentadas pelos animais. A diferença entre os grupos é notável, comprovado pelos resultados apresentados nas fotomicrografias, a interação entre os dois agentes infecciosos apresenta resultados mais danosos, precoces e persistentes em relação à infecção com os agentes de forma individual. Tais achados foram reforçados pelos resultados das análises ultraestruturais, que permitiram a melhor visualização da amplitude e magnitude dos danos e evidenciar melhor as diferenças entre os grupos.

Os danos causados pelos agentes isolados geram prejuízos consideráveis à integridade e consequente função da mucosa, quando em conjunto tais danos se

tornam preocupantes pois refletem, além das perdas econômicas pelo baixo desempenho produtivo, em fator de risco para ocorrência de outras enfermidades. Considerando os diversos fatores envolvidos para o desencadeamento da doença, sua complexidade e suas severas consequências tanto para os animais, quanto do ponto de vista econômico, o entendimento melhor dos danos causados e quais situações devem ser evitadas para minimizar os impactos torna-se uma ferramenta importante para produtores e empresas.

9. REFERÊNCIAS

- 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. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 51, n. 3, p. 178-193, 2014.
- ALNASSAN, A. A.; Kotsch, M.; Shehata, A. A.; Krüger, M.; Dauschies, A.; e Bangoura, B. Necrotic enteritis in chickens: development of a straightforward disease model system. **Vet Rec**, v. 174, n. 22, p. 555-61, 2014.
- AL-SHEIKHLY, F.; TRUSCOTT, R. B. The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of broth cultures of *Clostridium perfringens* into the duodenum. **Avian diseases**, p. 230-240, 1977a.
- AL-SHEIKHLY, F.; TRUSCOTT, R. B. The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of crude toxins of *Clostridium perfringens* into the duodenum. **Avian diseases**, p. 241-255, 1977b.
- AL-SHEIKHLY, F.; TRUSCOTT, R. B. The interaction of *Clostridium perfringens* and its toxins in the production of necrotic enteritis of chickens. **Avian Diseases**, p. 256-263, 1977c.
- AL-SHEIKHLY, F.; AL-SAIEG, A. Role of coccidia in the occurrence of necrotic enteritis of chickens. **Avian diseases**, p. 324-333, 1980.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual ABPA**, 2019. São Paulo, 2019. 176 pg.
- BABA, E.; IKEMOTO, T.; FUKATA, T.; SASAI, K.; ARAKAWA, A.; MCDUGALD, L. R. Clostridial population and the intestinal lesions in chickens infected with *Clostridium perfringens* and *Eimeria necatrix*. **Veterinary microbiology**, v. 54, p. 301-308, 1997.
- BANCROFT, J. D.; LAYTON, C.. The hematoxylin and eosin, connective and mesenchymal tissues with their stains. **Bancroft's theory and practice of histological techniques**. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, p. 173-212, 2013.
- BENNETTS, H. W. *Bacillus Welchii* and Bowel Lesions.: WITH SPECIAL REFERENCE TO A CASE OF COCCIDIOSIS. **Australian Veterinary Journal**, v. 6, n. 4, p. 153-154, 1930.
- BRASIL. Portaria Nº 171, de 13 de dezembro de 2018. Informa sobre a intensão de proibição de uso de antimicrobianos com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho de alimentos e abre prazo manifestação. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 19 dez. 2018. Disponível em: <http://www.in.gov.br>. Acesso em: 23 jan. 2019.
- BROUSSARD, C. T.; HOFACRE, C. L.; PAGE, R. K.; FLETCHER, O. J. Necrotic enteritis in cage-reared commercial layer pullets. **Avian Diseases**, p. 617-619, 1986.

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

COLLIER, C. T.; HOFACRE, C. L.; PAYNE, A. M.; ANDERSON, D. B.; KAISER, P.; MACKIE, R. I.; GASKINS, H. R. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 122, n. 1-2, p. 104-115, 2008.

CONCEA. Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA. 2015.

COOPER, K. K.; SONGER, J. G. Necrotic enteritis in chickens: a paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. **Anaerobe**, v. 15, n. 1-2, p. 55-60, 2009.

COWEN, B. S.; Schwartz, L. D.; Wilson, R. A.; Ambrus, S. I. Experimentally induced necrotic enteritis in chickens. **Avian Diseases**, p. 904-906, 1987.

DAHIYA, J. P.; WILKIE, D. C.; VAN KESSEL, A. G.; DREW, M. D. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. **Animal Feed Science and Technology**, v. 129, n. 1-2, p. 60-88, 2006.

DAS, A.; MAZUMDER, Y.; DUTTA, B. K.; SHOME, B. R.; BUJARBARUAH, K. M.; KUMAR, A. *Clostridium perfringens* type A from broiler chicken with necrotic enteritis. **International Journal of Poultry Science**, 7(6), p. 601-609, 2008.

DHILLON, A. S.; ROY, P.; LAUERMAN, L.; SCHABERG, D.; WEBER, S.; BANDLI, D.; WIER, F. High mortality in egg layers as a result of necrotic enteritis. **Avian diseases**, v. 48, n. 3, p. 675-680, 2004.

FINKLER, F.; LIMA, D. A.; CERVA, C.; MORAES, L.B.; CIBULSKI, S. P.; TEIXEIRA, T. F.; SANTOS, H. F.; ALMEIDA, L. L.; ROEHE, P. M.; FRANCO, A. C. Chicken parvovirus and its associations with malabsorption syndrome. **Research in veterinary science**, v. 107, p. 178-181, 2016.

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

HELMBOLDT, C. F.; BRYANT, E. S. The pathology of necrotic enteritis in domestic fowl. **Avian Diseases**, p. 775-780, 1971.

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, p. 43-51, 2007.

IMMERSEEL, F.V.; BUCK, J. D.; 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, p. 537-549, 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. 1, p. 32-36, 2009.

JOHNSON, J.; REID, W. M. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. **Experimental parasitology**, v. 28, n. 1, p. 30-36, 1970.

KALDHUSDAL, M.; BENESTAD, S. L.; LØVLAND, A. Epidemiologic aspects of necrotic enteritis in broiler chickens—disease occurrence and production performance. **Avian Pathology**, v. 45, n. 3, p. 271-274, 2016.

KALDHUSDAL, M.; EVENSEN, Ø.; LANDSVERK, T. *Clostridium perfringens* necrotizing enteritis of the fowl: A light microscopic, immunohistochemical and ultrastructural study of spontaneous disease. **Avian Pathology**, v. 24, n. 3, p. 421-433, 1995.

KEYBURN, A. L.; BOYCE, J. D.; VAZ, P.; BANNAM, T. L.; FORD, M. E.; PARKER, D.; DI RUBBO, A.; ROOD, J. I.; MOORE, R. J. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 2, p. e26, 2008.

LEE, K. W.; LILLEHOJ, H. S.; JEONG, W.; JEOUNG, H. Y.; & AN, D. J. Avian necrotic enteritis: experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. **Poultry Science**, v. 90, n. 7, p. 1381-1390, 2011.

LILLEHOJ, H. S.; LILLEHOJ, E. P. Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. **Avian diseases**, p. 408-425, 2000.

LONG, J. R. Necrotic enteritis in broiler chickens I. A review of the literature and the prevalence of the disease in Ontario. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 37, n. 3, p. 302, 1973.

LONG, J. R.; BARNUM, D. A.; PETTIT, J. R. Necrotic enteritis in broiler chickens II. Pathology and proposed pathogenesis. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 38, n. 4, p. 467, 1974.

LOS SANTOS, J. R. G.; CONCEIÇÃO, F. R.; GIL-TURNES, C. Enterite necrótica aviária. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, 2008.

LOVLAND, A.; KALDHUSDAL, M.; REDHEAD, K.; SKJERVE, E.; LILLEHAUG, A. Maternal vaccination against subclinical necrotic enteritis in broilers. **Avian Pathology**, v. 33, n. 1, p. 81-90, 2004.

MATTIELLO, R.; BOVIEZ, J. D.; MCDOUGALD, L. R. *Eimeria brunetti* and *Eimeria necatrix* in chickens of Argentina and confirmation of seven species of *Eimeria*. **Avian diseases**, p. 711-714, 2000.

MCDEVITT, R. M.; BROOKER, J. D.; ACAMOVIC, T.; SPARKS, N. H. C. Necrotic enteritis; a continuing challenge for the poultry industry. **World's Poultry Science Journal**, v. 62, n. 2, p. 221-247, 2006.

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, n. 12, p. 1948-1952, 2004.

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

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, n. 1, p. 1-11, 2015.

NUÑEZ, L.F.N.; SANTANDER PARRA, S. H.; METTIFOGO, E.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; PIANTINO FERREIRA, A. J. Isolation and molecular characterisation of chicken parvovirus from Brazilian flocks with enteric disorders. **British poultry science**, v. 56, n. 1, p. 39-47, 2015.

OLKOWSKI, A. A.; WOJNAROWICZ, C.; CHIRINO-TREJO, M.; LAARVELD, B.; SAWICKI, G. Sub-clinical necrotic enteritis in broiler chickens: novel etiological consideration based on ultra-structural and molecular changes in the intestinal tissue. **Research in veterinary science**, v. 85, n. 3, p. 543-553, 2008.

PARISH, W. E. Necrotic enteritis in the fowl (*Gallus gallus domesticus*): I. Histopathology of the disease and isolation of a strain of *Clostridium welchii*. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 71, p. 377-IN33, 1961.

PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M. R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. **Trends in microbiology**, v. 7, n. 3, p. 104-110, 1999.

PRESCOTT, J. F.; PARREIRA, V. R.; MEHDIZADEH GOHARI, I.; LEPP, D.; GONG, J. The pathogenesis of necrotic enteritis in chickens: what we know and what we need to know: a review. **Avian Pathology**, v. 45, n. 3, p. 288-294, 2016a.

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, p. 317-322, 2016b.

SHANE, S. M.; GYIMAH, J. E.; HARRINGTON, K. S.; SNIDER III, T. G. Etiology and pathogenesis of necrotic enteritis. **Veterinary Research Communications**, v. 9, p. 269-287, 1985.

SHARMA, S.; AZMI, S.; IQBAL, A.; NASIRUDULLAH, N.; MUSHTAQ, I. Pathomorphological alterations associated with chicken coccidiosis in Jammu division of India. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 39, n. 2, p. 147-151, 2015.

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. 1, p. 74, 2012.

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.

TSIOURIS, V.; GEORGOPOULOU, I.; BATZIOS, C.; PAPPASIOANNOU, N.; DIAKOU, A.; PETRIDOU, E.; DUCATELLE, R.; FORTOMARIS, P. The role of an attenuated anticoccidial vaccine on the intestinal ecosystem and on the pathogenesis of experimental necrotic enteritis in broiler chickens. **Avian pathology**, v. 42, n. 2, p. 163-170, 2013.

TYZZER, E. E. Coccidiosis in gallinaceous birds. **American Journal of Epidemiology**, v. 10, n. 2, p. 269-383, 1929.

TYZZER, E. E.; THEILER, H.; JONES, E. E. Coccidiosis in gallinaceous birds: II. A comparative study of species of *Eimeria* of the chicken. **American Journal of Epidemiology**, v. 15, n. 2, p. 319-393, 1932.

WILLIAMS, R. B. Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to success. **Avian Pathology**, v. 31, n. 4, p. 317-353, 2002.

WILLIAMS, R. B.; MARSHALL, R. N.; LA RAGIONE, R. M.; 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, n. 1, p. 19-26, 2003.

WILLIAMS, R. B. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. **Avian pathology**, v. 34, n. 3, p. 159-180, 2005.

WU, S. B.; STANLEY, D.; RODGERS, N.; SWICK, R. A.; MOORE, R. J. Two necrotic enteritis predisposing factors, dietary fishmeal and *Eimeria* infection, induce large changes in the caecal microbiota of broiler chickens. **Veterinary microbiology**, v. 169, n. 3-4, p. 188-197, 2014.

YEGANI, M.; KORVER, D. R. Factors affecting intestinal health in poultry. **Poultry science**, v. 87, n. 10, p. 2052-2063, 2008.