



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Comparação de dois métodos de controlo de coccidiose em *broilers*:

Vacinação vs Coccidiostáticos

Márcia Catarina Almeida

Coimbra, julho 2020



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Comparação de dois métodos de controlo de coccidiose em *broilers*:
Vacinação vs Coccidiostáticos**

Coimbra, julho 2020

Márcia Catarina Almeida

Aluno do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Presidente do Júri:

Prof. Doutora Inês Crespo

Arguente:

Prof. Doutor Gonçalo Frouco

Orientador:

Prof. Doutor Sérgio Ramalho Sousa

Orientador Interno

Prof. Doutor Sérgio Ramalho Sousa

Coorientadores Internos

Prof. Doutora Sofia Cancela Duarte

Orientadores Externos

Eng. Ana Cravo, Dr. Rui Sereno,
Dr. Micael Costa

Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Medicina
Veterinária da EUVG

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG), e a todos os professores pelos ensinamentos transmitidos ao longo do curso.

Às Instituições que abertamente me receberam e permitiram a realização deste trabalho (Serra&Silva e Nutrinova).

Um agradecimento especial à Eng. Ana Cravo, a minha orientadora externa, por toda a cooperação, apoio, incentivo, transmissão de conhecimentos e partilha de bons momentos.

Ao Dr. Micael Costa e ao Dr. Rui Sereno que referiram este assunto como possível proposta de trabalho de estágio, por toda a motivação, dedicação, disponibilidade e transmissão de conhecimentos científicos.

Aos meus orientadores internos, Prof. Sérgio Sousa e Prof. Sofia Duarte por terem aceite o desafio de me tutorarem, por toda a atenção, compreensão e trabalho incansável de revisão, imprescindível para a conclusão desta etapa.

Ao Prof. Nuno Carolino que dedicou o seu tempo a tratar os dados estatísticos deste trabalho.

À Mariana, Eng. Ana Nunes e Eng. Andreia, por estarem sempre disponíveis para me ajudar.

Ao Dr. João Caseiro, pela paciência e disponibilidade para partilhar conhecimentos teóricos e práticos.

A toda a equipa do matadouro e do laboratório da Nutrinova por tão bem me receberem mesmo quando eu ocupava espaço.

A todos os criadores dos bandos em estudo que me receberam pacientemente para que eu pudesse fazer todas as recolhas e pesagens.

Ao Dr. Álvaro dos Santos Pereira, Dr. Luís Rodrigues e Eng. Carlos Costa por todos os ensinamentos que me transmitiram.

À Dra. Ana Seica e ao Dr. Alexandre Domingues que permitiram que assistisse à vacinação de alguns bandos e pacientemente me explicaram todo o procedimento.

Às Marias pelos fundamentais momentos de descontração e ao grupinho da Faculdade por todas as horas de estudo e de diversão partilhadas.

Ao Gustavo pela amizade, motivação e paciência.

À Ju e ao Marco por serem exemplos a seguir e estarem sempre presentes e à Camilinha que alegra os meus dias.

Por fim, mas não menos importante, aos meus pais que me permitiram chegar até aqui, por me apoiarem e confiarem em mim ao longo de todo este percurso.

Índice Geral

Agradecimentos	iii
Índice de Figuras	v
Índice de Gráficos	vi
Índice de Tabelas	vii
Lista de Siglas e Abreviaturas	viii
Resumo	2
<i>Abstract</i>	3
1. Introdução	4
2. Materiais e Métodos	6
2.1 Caracterização das explorações	6
2.2 Recolha de dados	7
2.3 Procedimento laboratorial	8
2.4 Análise estatística	8
3. Resultados e discussão	9
3.1 Influência da qualidade das camas	9
3.2 Análise dos pesos	9
3.3 Análise do número de oocistos e influência dos oocistos nos pesos	10
3.4 Análise dos pesos intestinais	12
3.5 Análise da classificação das carcaças	14
3.6 Análise dos dados produtivos	14
4. Conclusões	15
Referências	17
Anexo 1 – Espécies de <i>Eimeria</i>	I
Anexo 2 – Esquema de vacinal dos bandos	II
Anexo 3 – Escalas de classificação das camas	III
Anexo 4 – Método de McMaster	IV
Anexo 5 – Tabelas de análise estatística	V

Índice de Figuras

Figura 1 - Ciclo de vida do género <i>Eimeria</i> .	4
Figura 2 - Espécies de <i>Eimeria</i> e respetivas localizações.	I
Figura 3 - Esquema vacinal dos bandos.	II

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Variação dos pesos das aves consoante a idade em função da medida de controlo.	10
Gráfico 2 - Variação do número de oocistos consoante a idade em função da medida de controlo.	11
Gráfico 3 - Coeficiente de regressão dos pesos aos 21 (A) e 28 dias (B) no número de oocistos.	12
Gráfico 4 - Evolução da espessura do intestino registada aos 21 e 28 dias nos dois grupos de estudo.	13
Gráfico 5 - Classificação das carcaças em função da medida de controlo nos dois grupos em estudo.	14

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Caracterização física das explorações.	6
Tabela 2 - Resultados da análise de variância dos pesos aos 7, 14, 21,28 e 35 dias.	9
Tabela 3 - Resultados da análise de variância do número de oocistos nas diferentes idades.	10
Tabela 4 - Resultados da análise de variância dos pesos do intestino.	13
Tabela 5 - Médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão dos dados produtivos segundo a medida de controlo.	15
Tabela 6 - Médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão dos pesos segundo a medida de controlo. V	
Tabela 7 - Médias dos Quadrados mínimos \pm erro padrão dos oocistos segundo a medida de controlo.V	
Tabela 8 - Médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão das carcaças segundo a medida de controlo.V	

Lista de Siglas e Abreviaturas

B1NVAC - bando da exploração 1 não vacinado.

B1VAC - bando da exploração 1 vacinado.

C1 - carcaça sem pigmentação.

C2 - carcaça pouco pigmentada.

C3 - carcaça pigmentada.

C4 - carcaça muito pigmentada.

E1 - exploração 1.

GL - graus de Liberdade.

IC - índice de conversão.

IEP - índice de eficiência produtiva Europeu.

Kg - quilogramas.

MT - mortalidade.

NVAC - bandos não vacinados.

O7 - quantidade de oocistos por grama de fezes aos 7 dias.

O14 - quantidade de oocistos por grama de fezes aos 14 dias.

O21 - quantidade de oocistos por grama de fezes aos 21 dias.

O28 - quantidade de oocistos por grama de fezes aos 28 dias.

O35 - quantidade de oocistos por grama de fezes aos 35 dias.

P7 - peso médio das aves aos 7 dias, em gramas.

P14 - peso médio das aves aos 14 dias, em gramas.

P21 - peso médio das aves aos 21 dias, em gramas.

P28 - peso médio das aves aos 28 dias, em gramas.

P35 - peso médio das aves aos 35 dias, em gramas.

PD21 - peso de uma porção do duodeno aos 21 dias, em gramas.

PD28 - peso de uma porção do duodeno aos 28 dias, em gramas.

PJ21 - peso de uma porção do jejuno aos 21 dias, em gramas.

PJ28 - peso de uma porção do jejuno aos 28 dias, em gramas.

PMT - peso médio total.

R1 - alimento de primeira fase.

R2 - alimento de segunda fase.

VAC - bandos vacinados.

Comparação de dois métodos de controlo de coccidiose em *broilers*: Vacinação vs Coccidiostáticos

Márcia Almeida^a, Ana Cravo^b, Rui Sereno^c, Micael Costa^c, Nuno Carolino^{a,d,e}, Sofia Duarte^{a,f}, Sérgio Sousa^{a,e}

^a Departamento de Ciências Veterinárias/ Centro de Investigação Vasco da Gama, Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário - Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (marcia.c.almeida@gmail.com; carolinonuno@hotmail.com; s.cancela.duarte@gmail.com; ramalhosousa@gmail.com)

^b Serra&Silva, Corredoura, São Vicente de Lafões, 3680-282, Oliveira de Frades, Portugal (anacravo_@hotmail.com)

^c Nutrinova, Zona Industrial Vilar de Besteiros, Lote 10, 3465-192, Vilar de Besteiros, Portugal (melo.sereno@gmail.com; micael.costa@nutrinova.pt)

^d Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. Polo de Investigação da Fonte Boa Fonte Boa, 2005-048, Vale de Santarém, Portugal

^e Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal (CIISA), Universidade de Lisboa. Lisboa. Portugal

^f LAQV-REQUIMTE, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra – Pólo III, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548 Coimbra, Portugal

Resumo

A coccidiose é uma das doenças mais importantes e prevalentes na produção avícola devido ao grande impacto económico associado à *subperformance* dos animais e interação com a saúde intestinal. Pela pressão da Comissão Europeia para a não utilização de substâncias químicas, a indústria tem necessidade de avaliar possíveis estratégias com vista à redução de contaminantes nos alimentos.

O presente estudo teve como objetivos a comparação de duas medidas de controlo: a utilização de coccidiostáticos no alimento (nicarbazina e narasina no alimento de primeira fase e narasina no alimento de segunda fase) e a vacinação utilizando uma vacina viva atenuada administrada por pulverização no primeiro dia de vida conferindo proteção contra *Eimeria acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis*, *E.praecox* e *E.tenella*.

Foram estudados 837 226 *broilers* da estirpe Cobb500®, distribuídos por nove explorações, divididos em dois grupos de bandos: vacinados (VAC) e não vacinados (NVAC). Semanalmente foram registados os dados produtivos, estado/qualidade das camas e recolheram-se 10 amostras fecais para contagem de oocistos pelo método de McMaster. Aos 21 e 28 dias recolheram-se segmentos intestinais para posterior pesagem; no momento de cada abate dos bandos, a carcaça foi avaliada em termos de qualidade/pigmentação.

Neste estudo, não se verificou efeito da qualidade da cama em nenhum parâmetro independentemente da medida de controlo. A medida de controlo influenciou os pesos em todas as idades ($P < 0,01$), exceto aos 14 dias ($P > 0,10$). Foram contabilizados menos oocistos nas fezes dos NVAC que nas fezes de VAC. A quantidade de oocistos influenciou negativamente os pesos aos 21 e 28 dias de idade. Verificou-se que a espessura do Intestino aumentou com a idade. O peso médio total (PMT) e índice de conversão (IC) obtiveram melhores resultados em VAC que NVAC ($P > 0,01$). A mortalidade (MT) foi superior nos VAC do que NVAV ($P > 0,01$). O valor do índice de eficiência produtiva (IEP) foi superior em VAC ($P < 0,05$).

Como conclusões do estudo, deve ser referido que, para melhorar a eficácia de qualquer medida de controlo, os produtores devem ser incentivados a praticar boas práticas de manejo. Do ponto de vista zootécnico, os resultados sugerem que é vantajoso vacinar *broilers* em relação à utilização dos coccidiostáticos, indicando que a vacinação permitirá alcançar melhor *performance*. Para além disso, estimativas de custos preliminares sugerem que a vacinação poderá ser economicamente vantajosa em relação aos coccidiostáticos. Face à escassez de estudos semelhantes, seria importante realizar estudos adicionais.

Palavras-chave: coccidiose; Coccidiostático; *Eimeria*; *broiler*; vacina

Abstract

Coccidiosis is one of the most important and prevalent diseases in poultry production, due to the considerable economic impact related to animal subperformance and interaction with intestinal health. Given the pressure that is made by the European Commission regarding the non-use of chemical substances, the industry has a necessity to evaluate possible strategies in order to reduce food contaminants.

The present study was aimed to compare two control measures: the use of coccidiostats in the food (nicarbazin and narasin in the starter diet and narasin in the grower diets) and vaccinated using a live attenuated vaccine administered by spray on the first day of life providing protection against Eimeria acervulina, E. maxima, E. mitis, E. praecox and E. tenella.

837 226 Cobb500™ broilers were studied, distributed over nine farms, divided in two groups of flocks: vaccinated (VAC) and non-vaccinated (NVAC). Production data, litter quality and 10 fecal samples were collected for counting oocysts by the MacMaster method. At 21 and 28 days, intestinal segments were collected and weighed. At the time of each slaughter of the flocks, carcass quality/ pigmentation was evaluated.

In this study, there was no effect of litter quality on any parameter regardless of the control measure. The control measure influenced the weights at all ages ($P < 0.01$), except at 14 days ($P > 0.10$). Fewer oocysts were counted in the stools of NVAC than VAC. The number of oocysts had a negative influence on weights at 21 and 28 days of age. It was found that the thickness of the intestine increased with age. The total average weight (PMT) and conversion ratio (IC) obtained better results in VAC than NVAC ($P > 0.01$). Mortality (MT) was higher in VAC than NVAC ($P > 0.01$). The value of the productive efficiency ratio (IEP) was higher in VAC ($P < 0.05$).

As conclusions of the study, it should be noted that in order to improve the effectiveness of any control, producers should be encouraged to implement good management practices. From a zootecnical point of view, results suggest that it is advantageous to vaccinate broilers in relation to the use of coccidiostats, indicating that vaccination allow better performance. Furthermore, preliminary cost estimates suggest that vaccination may be economically advantageous in relation to coccidiostats. Due to data scarcity of similar studies, additional studies would be important.

Keywords: coccidiosis; Coccidiostat; Eimeria; broiler; vaccine

1. Introdução

Em Portugal, a produção avícola é um sector de grande importância, estando condensada na região Centro, seguida do Ribatejo. Segundo o Instituto Nacional de Estatística, o consumo anual de carne de aves foi estimado em 44,4kg *per capita* tendo sido a carne mais consumida pelos portugueses em 2019 (INE, 2020).

A coccidiose é uma das principais doenças reconhecidas no sector avícola. É causada por parasitas intracelulares obrigatórios do género *Eimeria*, filo Apicomplexa, que colonizam e infetam o trato intestinal dos animais. Atualmente, encontram-se descritas nove espécies de *Eimeria* em galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*) com especificidade para diferentes porções do intestino, mas apenas sete são consideradas: *Eimeria acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella*. As mais comuns em *broilers* (frango criado para a produção de carne de crescimento rápido) são *Eimeria acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella* (Giles *et al.*, 2020; Györke *et al.*, 2013; Swayne *et al.*, 2020).

O ciclo biológico de *Eimeria* (Figura 1) compreende uma fase exógena, a esporogonia, que se inicia quando o oocisto não esporulado é libertado para o meio ambiente ficando exposto a condições favoráveis de humidade relativa, temperatura e oxigénio, sofrendo esporulação. O oocisto esporulado é a forma infetante para o hospedeiro e, quando ingerido, dá início à fase endógena do ciclo. Estes são digeridos e libertam esporozoítos que invadem as células hospedeiras numa zona específica do intestino, dependendo da espécie de *Eimeria* (Anexo 1), dando início à esquizogonia. Depois de várias gerações de reprodução assexuada, inicia-se a gametogonia formando-se o zigoto que, uma vez transformado em oocisto (não esporulado), é libertado para o meio ambiente juntamente com as fezes, iniciando-se um novo ciclo exógeno (Abdisa *et al.*, 2019; Giorgi *et al.*, 2014; Jacobs *et al.*, 2016; Wondimu *et al.*, 2019).

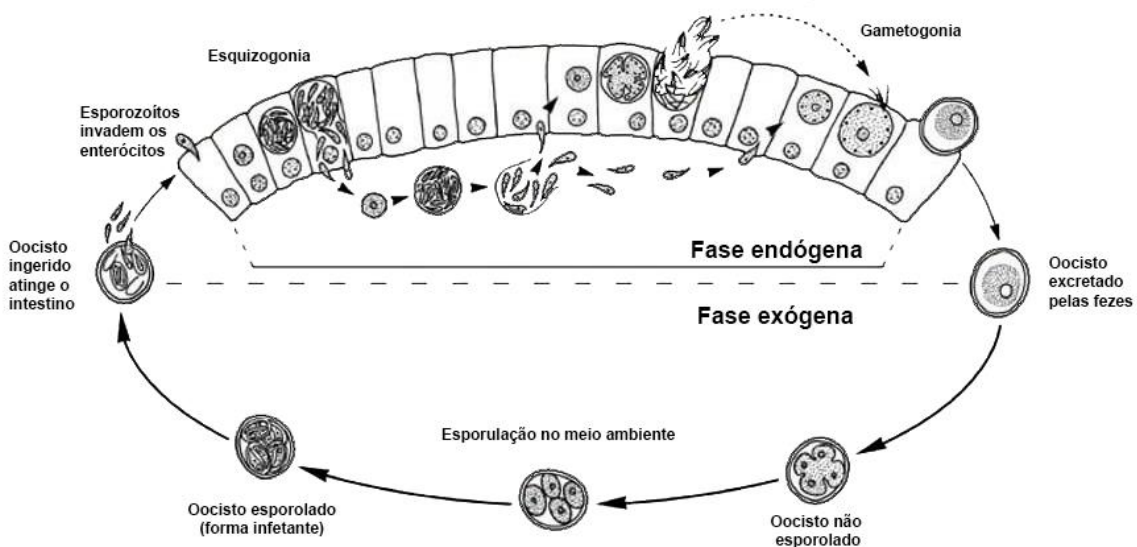


Figura 1- Ciclo de vida do género *Eimeria* (Adaptado de Villalon, 2020).

A coccidiose afeta aves jovens entre três a 18 semanas de idade. A imunidade desenvolve-se rapidamente após a primeira exposição a determinada espécie, ficando protegidos contra infecções futuras. No entanto, como não existe imunidade cruzada entre espécies de *Eimeria*, o mesmo animal mais tarde pode sofrer infecção por outras espécies. É possível ocorrerem infecções concomitantes com duas ou mais espécies de *Eimeria* (Abdisa *et al.*, 2019; Galha *et al.*, 2008; Gharekhani *et al.*, 2014; Györke *et al.*, 2013).

Apesar de estarem bem descritos os sinais clínicos de animais infetados por *Eimeria* (e.g. animais deprimidos, má absorção, diarreia, fezes hemorrágicas), a infecção pode ser assintomática (subclínica) e provocar heterogeneidade do bando e má conversão alimentar, causando perdas económicas significativas (Abdisa *et al.*, 2019; Györke *et al.*, 2013; Lorenzoni, 2010; Taylor *et al.*, 2015).

A coccidiose é uma doença conhecida há muitos anos, com grande impacto económico na avicultura em todo o mundo. De acordo com Scouter e col. (2020), a infecção por *Eimeria*, tipicamente caracterizada por lesões gastrointestinais, pode comprometer o bem-estar animal e eficiência produtiva, levando a perdas económicas relevantes. O custo mundial é estimado em cerca de dois mil milhões de libras anualmente (De Gussem, 2007; Soutter *et al.*, 2020).

Tanto quanto se sabe, à data de realização deste estudo, não estão disponíveis estudos do impacto económico em Portugal. No entanto, no Paquistão, o total de perdas económicas por tratamento, profilaxia e suporte terapêutico da coccidiose no sector avícola foi estimado em cerca de 45 405 dólares americanos anuais (Rashid *et al.*, 2019).

Para além dos custos diretos relacionados com a infecção por *Eimeria*, foi também demonstrado que esta pode exacerbar o impacto de infeções secundárias por outros agentes patogénicos (e.g. *Clostridium perfringens*) (Adhikari *et al.*, 2020; Calik *et al.*, 2019; Soutter *et al.*, 2020).

O controlo de *Eimeria* na avicultura é conseguido maioritariamente através da adição de coccidiostáticos no alimento composto, como nicarbazina e substâncias ionóforas (e.g. narasina, monesina, salinomicina de sódio). Contudo, a administração de coccidiostáticos tem sido questionada, nomeadamente devido à identificação de desenvolvimento de resistências e perda de sensibilidade. A ocorrência generalizada de resistências foi descrita nos Estados Unidos da América (EUA), América do Sul, Europa e China (Peek & Landman, 2011; Soutter *et al.*, 2020). Para além disso, as crescentes regulamentações nas restrições do uso de aditivos alimentares poderão levar a restrições adicionais na utilização de coccidiostáticos, tornando premente a procura de estratégias alternativas e igualmente eficazes no controlo da coccidiose (Peek & Landman, 2011).

Fatores como o mau manejo, alta densidade animal e/ou *stress* favorecem a incidência da infecção nas explorações. Por isso, será importante adotar estratégias de manejo, higienização e desinfecção nas explorações a fim de auxiliar as restantes formas de prevenção e controlo (Abdisa *et al.*, 2019; Barbour *et al.*, 2015; Taylor *et al.*, 2015; Tewari & Maharana, 2011; Wondimu *et al.*, 2019).

As estratégias de profilaxia com recurso a vacinação têm ganho relevância nestes últimos anos, uma vez que as vacinas conferem imunidade de proteção induzida, permitindo ultrapassar questões relacionadas com desenvolvimento de resistências. Vários estudos têm apresentado resultados positivos, nomeadamente com base em estratégias de rotatividade entre coccidiostáticos e vacinação. Contudo, a implementação generalizada da vacinação tem sido dificultada pelo seu elevado custo (Barbour *et al.*, 2015; Blake *et al.*, 2017; Chapman, 2014; Soutter *et al.*, 2020).

Atualmente, estão comercialmente disponíveis várias vacinas vivas atenuadas e não atenuadas para várias espécies de *Eimeria*. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo comparar, em condições de campo, diferentes estratégias de prevenção da coccidiose, nomeadamente utilização de coccidiostáticos e a utilização de vacinas em explorações de *broilers* em regime intensivo.

2. Materiais e Métodos

Este estudo foi desenhado tendo em conta o bem-estar animal e considerando a política dos 3R's. Foi aprovado pelo Conselho Científico da EUVG, respeitando o Regulamento Geral de Proteção de dados EC679/2016 e demais legislação vigente e aplicável.

2.1 Caracterização das explorações

Este estudo integrou nove explorações de frangos de engorda, localizadas na zona centro de Portugal, em regime intensivo. Os pintos, provenientes dos centros de incubação, foram distribuídos pelas explorações no primeiro dia de idade. As características físicas das explorações onde decorreu o estudo encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1- Caracterização física das explorações.

Exploração	Dimensão (m ²)	Sistema de ventilação	Tipo de bebedouro	Tipo de comedouro
E1	1960	Túnel	Pipeta	Pratos
E2	1200	Transversal	Pipeta	Pratos
E3	1191	Transversal	Pipeta	Pratos
E4	990	Transversal	Pipeta	Pratos
E5	733	Transversal	Pipeta	Pratos
E6	560	Transversal	Pipeta	Pratos
E7	700	Transversal	Pipeta	Pratos
E8	2000	Transversal	Plasson	Pratos
E9	1360	Transversal	Pipeta	Pratos

Foram estudados quatro bandos de cada exploração, uma amostragem de 837 226 *broilers* da estirpe Cobb500®, de um total de 36 bandos (produzidos entre março e dezembro de 2019) distribuídos por dois grupos: grupo de bandos vacinados (VAC; n=12 bandos) e grupo de bandos não vacinados (NVAC; n=24 bandos).

As medidas de controlo estudadas foram a vacinação (correspondente aos bandos VAC) e os coccidiostáticos (correspondente aos bandos NVAC).

Os bandos VAC foram distribuídos por quatro explorações, sendo que cada uma delas teve três criações vacinadas para *Eimeria* com uma vacina viva atenuada (Hipra, 2019), que confere proteção contra *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.mitis*, *E. praecox* e *E. tenella*. A vacina foi administrada no primeiro dia de vida, no cais do centro de incubação, por meio de pulverização. Apresentava um corante violeta pálido e aroma de baunilha para estimular a ingestão da mesma, sendo administrada num local com luz. O alimento composto das diferentes fases, destes bandos, não continha coccidiostáticos.

No caso dos bandos NVAC o alimento composto das diferentes fases incluía coccidiostático. Sendo que no alimento de primeira fase (R1) foi introduzido 45 mg/kg de narasina e 45 mg/kg de nicarbazina e no alimento de segunda fase (R2) 60 mg/kg de narasina.

Todos os bandos foram vacinados para a doença de Newcastle (paramixovírus) e bronquite infecciosa (coronavírus) por aspersão, tendo sido alguns deles também vacinados para doença de Gumboro (birnavírus) (Anexo 2).

Todas as explorações dispunham de silos para armazenamento do alimento, com origem em diferentes empresas de produção de alimento composto (A, B, C e D). Os bandos foram alimentados com alimento comercial de primeira fase (R1) até aproximadamente aos 15 dias de idade e a partir dessa idade, com alimento de segunda fase (R2) até ao momento de abate.

2.2 Recolha de dados

Os bandos foram devidamente codificados para permitir a rastreabilidade de toda a amostra. Os pavilhões foram divididos em dez faixas perpendiculares.

Aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias foi realizado a todos os bandos:

- 1- Recolha de uma amostra fecal aleatoriamente ao longo de cada faixa do pavilhão para sacos de plástico devidamente identificados (código do bando + idade do bando no dia da respetiva recolha + número da faixa). Essas amostras foram transportadas com termoacumuladores de gelo, armazenadas e refrigeradas a 5-7 °C;
- 2- Registo dos dados produtivos (peso, mortalidade e medicações). Com uma balança de suspensão fez-se pesagem de cinco animais em cada faixa. A mortalidade foi adquirida pelos registos do criador.
- 3- Observação e classificação da qualidade da cama em cada faixa do pavilhão utilizando escalas de classificação (Anexo 3).

Aos 21 e 28 dias realizou-se necrópsia de cinco animais saudáveis com pesos semelhantes (um animal por cada duas faixas). Estas necrópsias tiveram como objetivo a recolha de segmentos do intestino para pesagem de porções intestinais utilizando uma balança com quatro casas decimais, tendo sido retirado de cada animal três centímetros de duodeno (uma porção após curvatura do duodeno, início

da porção ascendente, junto ao pâncreas) e três centímetros de jejuno (porção craneal ao divertículo de Meckel). Em cada porção fez-se corte longitudinal e com um esguicho de água retirou-se o conteúdo intestinal, reservou-se durante 15 minutos em papel absorvente e por fim registou-se o peso de cada porção.

A partir dos 27-28 dias, quando os animais atingiram pesos superiores a 1,250 kg, fez-se acompanhamento dos bandos no matadouro. No momento do abate de cada bando foi avaliado, visualmente, a qualidade/pigmentação de 100 animais consecutivos do meio do abate, tendo sido classificados numa escala de um (C1; carcaça sem pigmentação) a quatro (C4; carcaça muito pigmentada).

No fecho do bando, foram recolhidos os dados de rendimento e organização de todos os dados em tabelas Excel® para posterior análise estatística.

2.3 Procedimento laboratorial

As amostras de fezes foram processadas no Laboratório da empresa Nutrinova. Foi realizado, o método coprológico quantitativo de McMaster modificado por Gibbons e col. (2015) em conformidade com procedimentos protocolares listados em anexo (Anexo 4).

2.4 Análise estatística

Os dados foram compilados e editados em Excel®, e todos os parâmetros foram submetidos a análises preliminares. Inicialmente, através do PROC MEANS e do PROC FREQ do programa Statistical Analysis System® (SAS® 9.4; SAS Institute Inc., Cary, CN, EUA) procedeu-se à determinação de algumas estatísticas descritivas para caracterizar os dados disponíveis.

Os pesos às diferentes idades, o número de oocistos, os pesos das porções intestinais, as carcaças e os dados de rendimento gerais foram analisados com um modelo misto ($y = X\beta + Z\gamma + e$), através do PROC MIXED do programa SAS®, que incluiu inicialmente os efeitos fixos da medida de controlo, qualidade das camas e número de oocistos no dia da pesagem (covariável); o bando foi considerado como repetição. y representa os valores da variáveis de resposta (peso médio das aves aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias, em gramas (respetivamente, P7, P14, P21, P28 e P35); quantidade de oocistos por grama de fezes aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias (respetivamente, O7, O14, O21, O28 e O35); peso de uma porção do duodeno aos 21 e 28 dias, em gramas (respetivamente, PD21 e PD28); peso de uma porção do jejuno aos 21 e 28 dias, em gramas (PJ21, PJ28); carcaça sem pigmentação (C1); carcaça pouco pigmentada (C2); carcaça pigmentada (C3); carcaça muito pigmentada (C4); peso médio total (PMT); índice de conversão (IC); mortalidade (MT); índice de eficiência produtiva europeu (IEP), β são os efeitos fixos considerados, γ o efeito do bando, e “e” representa o erro residual; X e Z são as matrizes de incidência que relacionam, respetivamente, os efeitos fixos (β) e o efeito do bando (γ) com os registos da variável de resposta (y). O vetor “e” contém os erros associados às avaliações. O modelo final apenas inclui os efeitos significativos ou em último caso o efeito da medida de controlo.

Posteriormente, foram estimadas as médias dos quadrados mínimos (lsmeans) segundo os diversos níveis de cada efeito fixos classificados que influenciaram significativamente as variáveis de resposta.

3. Resultados e discussão

A coccidiose provoca redução da produtividade das aves sendo necessário encontrar uma forma de prevenção eficaz e economicamente acessível (De Gussem, 2007). Anteriormente, em algumas explorações em estudo foram registadas quebras na produção relacionadas com a presença de *Eimeria*. A informação sobre este tema é escassa em Portugal. O presente estudo teve como objetivo fornecer mais informação sobre o impacto da infeção de *Eimeira* no desempenho das aves, comparando dois métodos de controlo. Dessa forma, com o objetivo de comparar a vacinação de bandos com o tratamento tradicional, considerou-se importante testar a vacina comercial em estudo, recentemente introduzida no mercado, e que confere proteção contra as espécies de *Eimeria* mais comuns em *broilers*.

3.1 Influência da qualidade das camas

Nenhum parâmetro foi influenciado pela qualidade das camas, independentemente da medida de controlo. O mesmo se verificou no estudo de Williams & Gobbi (2002). O mau manuseio interfere com a qualidade da cama propiciando a um ambiente favorável à esporulação dos oocistos, e por essa razão, o efeito da qualidade das camas foi incluído no estudo (Barbour *et al.*, 2015).

3.2 Análise dos pesos

Os resultados obtidos da análise de variância do tipo três para determinar os fatores que influenciam os pesos nas diferentes idades (Tabela 2), demonstraram que a medida de controlo influenciou significativamente o peso em todas as idades ($P < 0,01$), exceto aos 14 dias (P14; $P > 0,10$). O número de oocistos influenciou significativamente o P21 e P28 ($P < 0,05$).

Tabela 2 - Resultados da análise de variância dos pesos aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias.

Efeito	GL	Valores de F				
		P7	P14	P21	P28	P35
Medida de controlo	2	7,84**		14,83**	13,13**	20,23**
Nº oocistos	1			4,88*	4,00*	

* Significativo para $P < 0,05$; ** Significativo para $P < 0,01$; GL - graus de liberdade

Para quantificar as diferenças dos pesos nas diferentes idades em função da medida de controlo, foram estimadas as médias dos quadrados mínimos. No Gráfico 1, estão representadas essas diferenças que se encontram descritas, de forma detalhada, no Anexo 5.

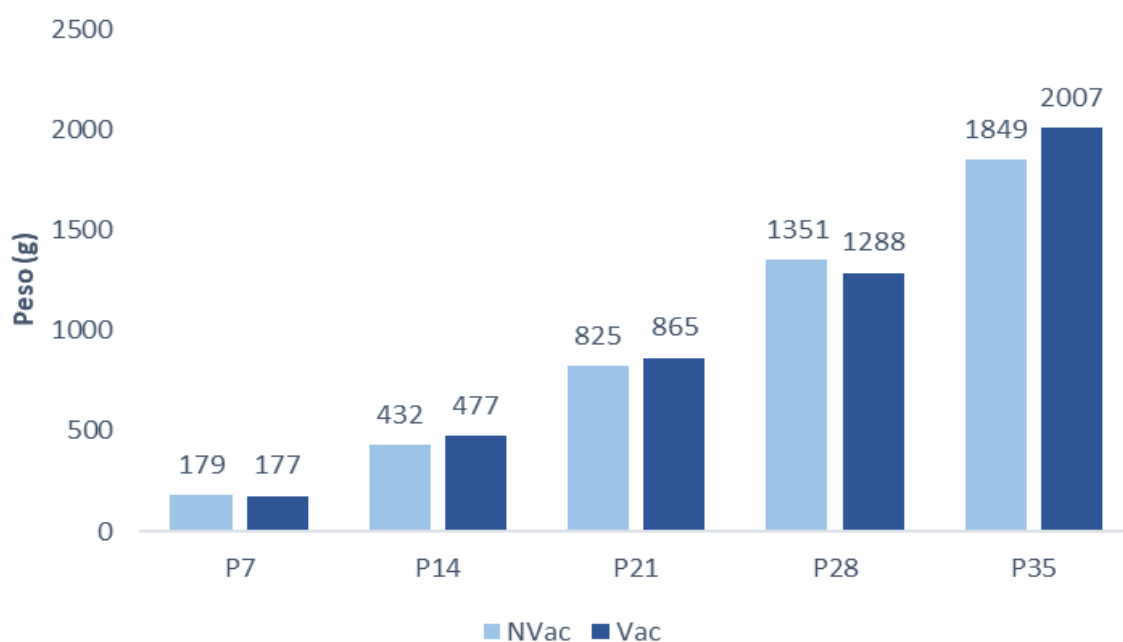


Gráfico 1 – Variação do peso das aves consoante a idade em função da medida de controlo (NVAC: bandos não vacinados; VAC: bandos vacinados).

O Gráfico 1 indica que o P7 foi superior nos bandos NVAC; o P14 revela uma recuperação dos bandos VAC, não sendo estatisticamente significativo ($P < 0,05$); o P21 dos bandos VAC foi superior comparativamente com os bandos NVAC ($P < 0,01$); P28 dos bandos NVAC foi superior ($P < 0,01$) e o P35 dos bandos VAC foi notoriamente mais elevado do que dos bandos NVAC ($P < 0,01$). Não foram encontrados muitos estudos que incluíssem os pesos das aves tão detalhadamente. No entanto, estes resultados não estão de acordo com o estudo de Williams (1994) que refere uma média dos pesos das aves de bandos VAC sempre melhor que dos bandos NVAC ($P < 0,0001$) e de Williams & Gobbi (2002) que concluíram que os animais vacinados foram mais pesados a partir dos 21 dias. Tais diferenças talvez se possam justificar pelo presente ser um trabalho com dados recolhidos em condições de campo, ao contrário dos estudos citados que foram realizados em condições controladas.

3.3 Análise do número de oocistos e influência dos oocistos nos pesos

Na Tabela 3, apresentam-se os resultados da análise de variância do número de oocistos, que revelaram, no presente estudo, que a medida de controlo influenciou significativamente a quantidade de oocistos em todas as idades (O7, O14, O21, O28, O35) ($P < 0,01$).

Tabela 3 - Resultados da análise de variância do número de oocistos nas diferentes idades.

Efeito	GL	Valores de F				
		O7	O14	O21	O28	O35
Medida de controlo	2	30,08**	16,7**	9,12**	38,18**	22,46**

* Significativo para $P < 0,05$; ** Significativo para $P < 0,01$

Para quantificar as diferenças dos oocistos nas diferentes idades em função da medida de controlo, foram estimadas as médias dos quadrados mínimos. No Gráfico 2, estão representadas essas diferenças que se apresentam, de forma detalhada, no Anexo 6.

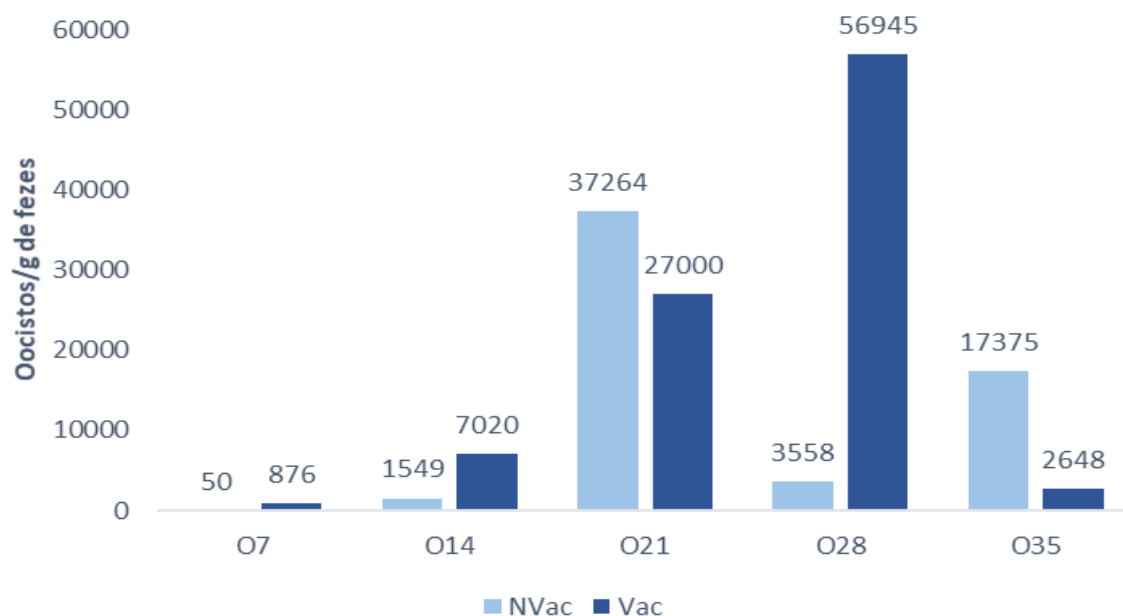


Gráfico 2 – Variação do número de oocistos consoante a idade em função da medida de controlo (NVAC: bandos não vacinados; VAC: bandos vacinados).

Neste estudo, os bandos VAC apresentaram uma maior O7 e O14 que os bandos NVAC, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($P < 0,01$). O mesmo foi verificado em estudos anteriores (Williams *et al.*, 1999; Gautier *et al.*, 2020), considerando-se normal devido à exposição a *Eimeria* proporcionada pela vacinação. Aos 21 dias, verificou-se o primeiro pico de excreção de oocistos nos bandos NVAC, com valores superiores aos VAC, esta diferença não teve significado estatístico ($P = 0,3141$). Aos 28 dias o número de oocistos (O28) nos bandos NVAC apresentaram uma queda abrupta e, em contraciclo, nos bandos VAC apresentaram um pico ($P < 0,01$). Estes resultados são consistentes com o estudo de Jenkins e col. (2017) que reportaram que, independentemente da medida de controlo, a concentração de oocistos apresentou o pico máximo por volta das duas/quatro semanas. No entanto, alguns trabalhos anteriores indicam ausência de excreção de oocistos em bandos NVAC ou aparecimento dos primeiros oocistos por volta dos 28 dias (Parent *et al.*, 2018; Williams & Gobbi, 2002; Williams, 1994). O mesmo se verificou no estudo de Gautier e col. (2020) que relataram a baixa prevalência de oocistos em bandos NVAC durante toda a experiência, e ainda a presença de mais oocistos em bandos VAC comparativamente a bandos NVAC, com significado estatístico de $P < 0,05$. Estas diferenças podem ser justificadas por serem estudos realizados em condições controladas, sem desafio de campo. Outros estudos, apesar de não terem utilizado a mesma vacina, apresentaram resultados idênticos com o pico excreção de oocistos nos bandos VAC por volta dos 28 dias (Parent *et al.*, 2018; Williams *et al.*, 1999). Por outro lado, Williams & Gobbi (2002) obtiveram resultados diferentes

com o pico de excreção de bandos VAC aos 22 dias, registrando uma queda a partir desse pico, o que também se verifica no presente estudo em que aos 28 dias, após o pico de excreção, começa a verificar-se uma queda de excreção de oocistos pelos VAC, sendo que aos 35 dias os valores de oocistos são mínimos. Neste estudo, os bandos NVAC apresentaram o segundo pico de excreção aos 35 dias enquanto que os VAC apresentaram O35 baixas, diferença essa que não se verificou significativa ($P=0,1845$). Williams e col. (1999) relataram o primeiro pico dos bandos NVAC aos 35 dias. Por outro lado, no estudo de Gautier e col. (2020), a excreção foi maior aos 35 dias em bandos VAC que em NVAC ($P<0,05$).

Para quantificar a variação dos pesos em função do número de oocistos, estimou-se o respectivo coeficiente de regressão, representado graficamente no Gráfico 3.

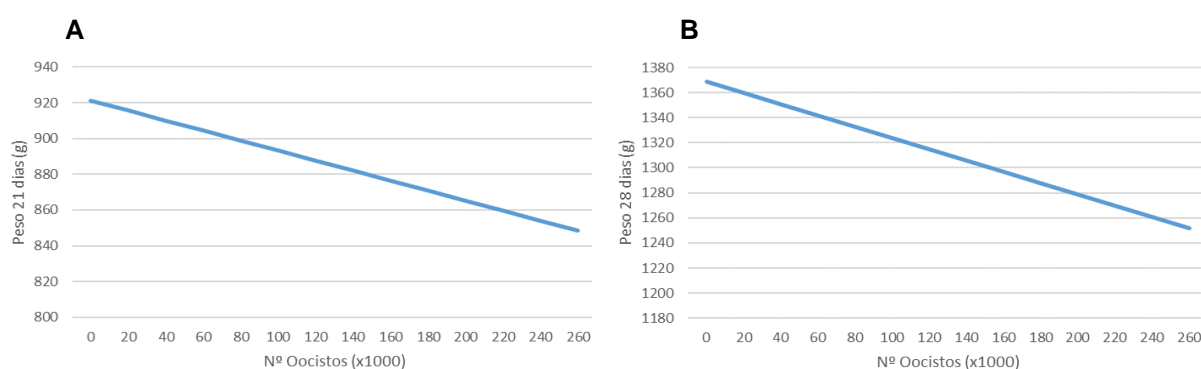


Gráfico 3 - Coeficiente de regressão dos pesos aos 21 (A) e 28 dias (B) no número de oocistos.

Através da análise da influência dos oocistos nos pesos, verificou-se que P21 e P28 são influenciados pelo número de oocistos, sendo que por cada 10^3 oocistos a mais por grama de fezes o P21 diminui 0,28g e o P28 diminui 0,451g. A vacinação tem como objetivo fornecer exposição precoce a *Eimeria*, provocando infecções leves de coccidiose por volta dos 14 a 28 dias de idade, e por isso verifica-se uma crescente excreção de oocistos em VAC até aos 28 dias de idade. Contudo, a exposição a elevada carga parasitária pode induzir danos no epitélio intestinal, reduzindo a capacidade de absorção, e dessa forma, prejudicando o desempenho das aves, explicando a variação dos pesos (Gautier *et al.*, 2020; Luquetti *et al.*, 2016).

3.4 Análise dos pesos intestinais

A análise de variância do tipo três (Tabela 4) demonstrou que, no presente estudo, a medida de controlo influenciou significativamente o peso das diferentes porções do intestino (duodeno e jejuno), exceto o PD21 (peso de uma porção do duodeno aos 21 dias, em gramas). Sendo que o PD28 e PJ21 (peso de uma porção do jejuno aos 21 dias, em gramas) teve significado de $P<0,05$ e PJ28 de $P<0,01$.

Tabela 4 - Resultados da análise de variância dos pesos do intestino (PD21: peso de uma porção do duodeno aos 21 dias, em gramas; PJ21: peso de uma porção do jejuno aos 21 dias, em gramas).

Efeito	GL	Valores de F			
		PD21	PD28	PJ21	PJ28
Medida de controlo	2		3,64*	4,62*	11,71**

* Significativo para $P < 0,05$; ** Significativo para $P < 0,01$

Os pesos das porções intestinais (duodeno e jejuno), consoante a idade e em função da medida de controlo estão representados graficamente no Gráfico 4.

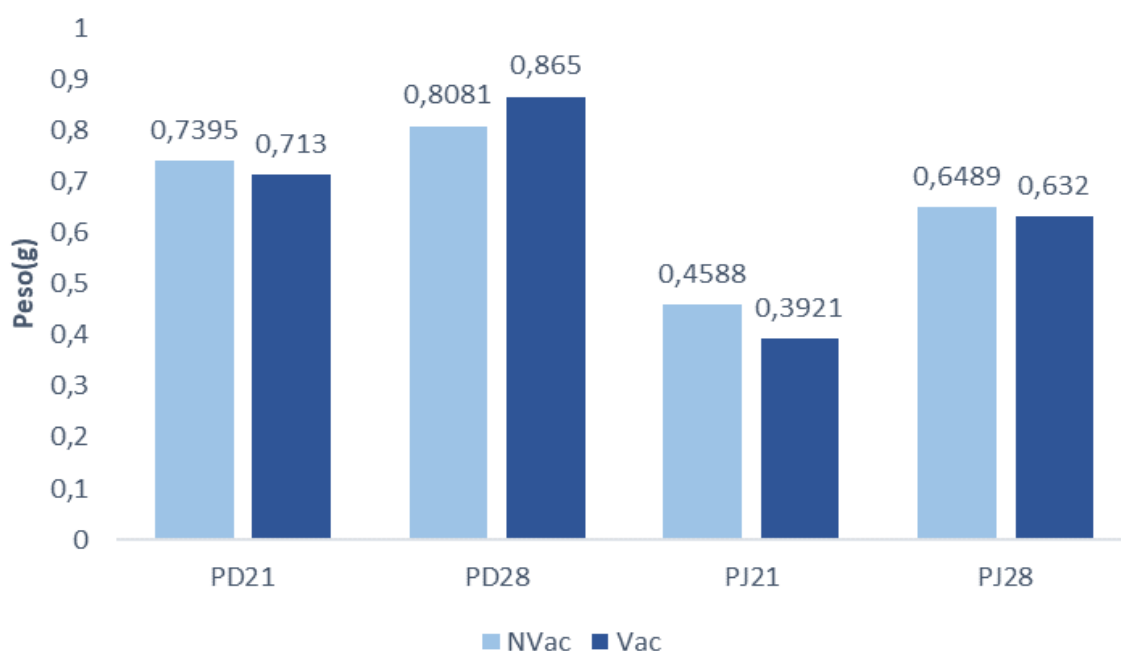


Gráfico 4 - Evolução do peso do intestino registada aos 21 e 28 dias nos dois grupos de estudo (NVAC: bandos não vacinados; VAC: bandos vacinados).

Como era de esperar, a espessura do intestino aumenta consoante a idade. O PD21 foi ligeiramente superior em bandos NVAC que em bandos VAC, no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($P=0,5297$). O PD28 foi superior nos animais VAC, mas sem significado estatístico ($P=0,2849$). Já o PJ21 foi superior em bandos NVAC, com significado estatístico ($P < 0,05$). O PJ28 foi igualmente superior em NVAC, mas sem significado estatístico ($P=0,6177$).

Esta análise representa os níveis de desenvolvimento intestinal. O facto de haver uma tendência para os pesos das porções intestinais dos VAC ser inferior poderá ser justificado pela influência da infeção leve provocada pela vacina, que induz redução no desempenho e saúde intestinal dos animais. Embora não tenha sido encontrado nenhum estudo com esta análise, outros estudos revelaram que o desafio provocado pela vacina influenciou a morfologia jejunal e ileal (Calik *et al.*, 2019; Ritzi *et al.*, 2016).

3.5 Análise da classificação das carcaças

No Gráfico 5 está representada graficamente a quantidade de animais por tipo de carcaça, consoante a medida de controlo. A informação encontra-se detalhada na Tabela 8 (Anexo 5).

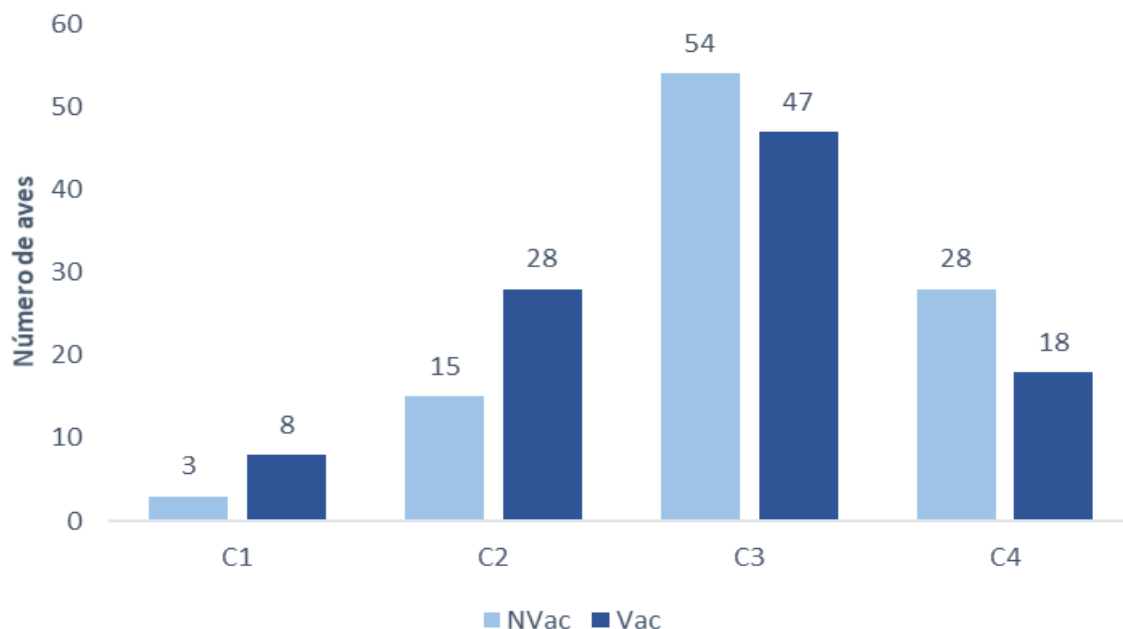


Gráfico 5 - Classificação das carcaças em função da medida de controlo nos dois grupos em estudo (C1: carcaça sem pigmentação, C2: carcaça pouco pigmentada, C3: carcaça pigmentada, C4: carcaça muito pigmentada, NVAC: bandos não vacinados; VAC: bandos vacinados).

Relativamente às carcaças do tipo C1, foram classificadas oito carcaças de animais de VAC e apenas três de NVAC, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($P < 0,01$). Quanto às carcaças do tipo C2, classificaram-se 28 carcaças de VAC e 15 de NVAC, tendo sido estatisticamente significativo ($P < 0,01$). Até à data, não foram encontrados estudos com esta análise. A classificação das carcaças foi realizada tendo em conta a pigmentação. Os dados deste estudo indicam que as carcaças provenientes de bandos NVAC obtiveram uma melhor classificação. Estes dados poderão indicar que os bandos VAC não absorveram tão bem os pigmentos, podendo explicar-se pela interferência da vacina na absorção do intestino. No entanto, sublinha-se que foi observada uma amostra de apenas 100 animais de cada bando (Calik *et al.*, 2019; Luquetti *et al.*, 2016).

3.6 Análise dos dados produtivos

Na tabela 5, encontram-se descritas as médias dos quadrados mínimos dos parâmetros de rendimento, para quantificar as diferenças desses parâmetros em função da medida de controlo.

Tabela 5 - Médias dos Quadrados mínimos \pm erro padrão dos parâmetros de rendimento segundo a medida de controlo (PMT: peso médio total, MT: mortalidade, IC: índice de conversão, IEP: índice de eficiência produtiva).

Medida de controlo	PMT	MT	IC	IEP
NVAC	1,630 \pm 0,04	1,4 \pm 0,02	1,621 \pm 0,02	318 \pm 9,4
VAC	1,669 \pm 0,06	1,6 \pm 0,12	1,583 \pm 0,03	350 \pm 13,0

Relativamente aos dados de rendimento, o PMT foi superior em bandos VAC (1,669 kg) que em NVAC (1,630 kg), embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa ($P=0,5616$). Estes resultados são consistentes com os dados de Williams (1994) e Williams & Gobbi (2002). Outros estudos mostraram o contrário (Williams *et al.*, 1999). O IC foi melhor em VAC (1,583) que em NVAC (1,621), sem significado estatístico ($P=0,1921$) o que está de acordo com os resultados de estudos de Williams & Gobbi (2002), Williams (1994) e Lee e col. (2011). No entanto, outros estudos obtiveram resultados diferentes em que o IC em bandos VAC foi pior que em NVAC (Williams *et al.*, 1999; Parent *et al.*, 2018; Gautier *et al.*, 2020). A MT foi superior em VAC (1,6%) que em NVAC (1,4%) não sendo esta diferença estatisticamente significativa ($P=0,377$) e estando de acordo com o estudo de Calik e col. (2019). Estes valores diferem dos apresentados por Williams (1994), Williams e col. (1999), Williams & Gobbi (2002) e Lee e col. (2011) em que a MT foi mais alta em NVAC. O IEP, foi superior em VAC, com significado estatístico de $P<0,05$, sendo que nenhum estudo foi encontrado com este dado.

Este estudo permitiu a ligação da produção primária à universidade, fomentando o interesse de novas investigações académicas nesta área. Até à data, não é do conhecimento dos autores a existência de estudos similares em Portugal, podendo contribuir para o desenvolvimento do conhecimento científico nesta área, que fundamente a tomada de decisões por parte de produtores e autoridades sanitárias. Importa ainda referir que, durante a realização do presente estudo, foi efetuada a recolha de segmentos do intestino para posterior avaliação histopatológica. No entanto, devido à circunstância da pandemia COVID19, as amostras não foram processadas a tempo da sua inclusão na presente dissertação. Dessa forma, para estudos futuros, seria interessante incluir a avaliação histopatológica. Seria igualmente importante garantir que o alimento tivesse a mesma origem em todas as explorações, bem como relacionar o peso dos segmentos intestinais com carga parasitária e comparar com pesagem de segmentos intestinais sem carga parasitária.

4. Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo indicaram que, nos bandos em estudo, a quantidade da carga parasitária influenciou negativamente os pesos médios das aves devido aos danos provocados no epitélio intestinal. Ainda assim, os bandos VAC mostraram uma recuperação notória aos 35 dias de idade. Do ponto de vista zootécnico, neste estudo, os resultados sugeriram que é vantajoso vacinar os animais em detrimento da utilização dos coccidiostáticos, indicando que a vacinação permitirá alcançar

melhores *performances*. Os bandos VAC apresentaram um índice de conversão menor que os NVAC, sendo que para obter o mesmo peso dos NVAC o consumo de ração foi menor.

Importa ainda questionar quão compensador será economicamente a vacinação *versus* a administração de coccidiostáticos. Cálculos preliminares sugerem que, apesar da vacina ser mais dispendiosa e considerando os custos atuais de ambas as medidas de controlo estudadas, a vacinação poderá ser economicamente vantajosa em relação aos coccidiostáticos.

Deve ainda ser referido que, para melhorar a eficácia de qualquer medida de controlo, e apesar de neste estudo a qualidade da cama não ter influenciado nenhum parâmetro, os produtores devem ser incentivados a praticar boas práticas de manejo e biossegurança.

Face aos resultados obtidos e à escassez de estudos semelhantes, seria importante realizar estudos adicionais.

Referências

ABDISA, T.; HASEN, R.; TAGESU, T. *et al.* Coccidiosis and its Prevention, Control. **Journal of Veterinary and Animal Research**, v.2, n.1, p.101, 2019.

ADHIKARI, P.; KIESS, A.; ADHIKARI, R. *et al.* An approach to alternative strategies to control avian coccidiosis and necrotic enteritis. **Journal of Applied Poultry Research**, v.2, n.2, p.515-534, 2020. doi: 10.1016/j.japr.2019.11.005.

BARBOUR, E.; AYYASH, D.; IYER, *et al.* A Review of Approaches Targeting the Replacement of Coccidiostat Application in Poultry Production. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.17, n.4, p.405-418, 2015. doi: 10.1590/1516-635x1704405-418.

BLAKE, D.; PASTOR-FERNÁNDEZ, I.; NOLAN, M. *et al.* Recombinant anticoccidial vaccines - a cup half full? **Infection, Genetics and Evolution**, v.55, p.358-365, 2017. doi: 10.1016/j.meegid.2017.10.009.

BUTTERWORTH, A.; ARNOULD, C.; VAN NIEKERK, T. G. C. M. *et al.* Welfare quality®, assessment protocol for poultry (broilers, laying hens). **The Welfare Quality® Consortium**, Lelystad, Netherlands, 2009.

CALIK, A.; OMARA, I.; WHITE, M. *et al.* Effects of Dietary Direct Fed Microbial Supplementation on Performance, Intestinal Morphology and Immune Response of Broiler Chickens Challenged With Coccidiosis. **Frontiers in Veterinary Science**, v.6, p.463, 2019. doi: 10.3389/fvets.2019.00463.

CHAPMAN, H. Milestones in avian coccidiosis research: A review. **Poultry Science**, v.93, n.3, p.501-511, 2014. doi: 10.3382/ps.2013-03634.

DE GUSSEM, M. Coccidiosis in poultry: Review on diagnosis, control, prevention and interaction with overall gut health. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON POULTRY NUTRITION, 16, 2007, Strasbourg. **Proceedings of the 16th European Symposium on Poultry Nutrition**. Strasbourg, 2007, p.253-261.

GALHA, V.; BONDAN, E.F.; LALLO, M.A. Relação entre imunossupressão e coccidiose clínica em frangos de corte criados comercialmente. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v.26, n.4, p.432-7, 2008.

GAUTIER, A.; LATORRE, J.; MATSLER, P. *et al.* Longitudinal Characterization of Coccidiosis Control Methods on Live Performance and Nutrient Utilization in Broilers. **Frontiers in Veterinary Science**, v.6, p.468, 2020. doi: 10.3389/fvets.2019.00468.

GHAREKHANI, J.; SADEGHI-DEHKORDI, Z.; BAHRAMI, M. Prevalence of Coccidiosis in Broiler Chicken Farms in Western Iran. **Journal of Veterinary Medicine**, p.1-4, 2014. doi: 10.1155/2014/980604.

GIBBONS, L.; JACOBS, D.; FOX, M. *et al.* McMaster Egg Counting technique. **The Royal Veterinary College**. Disponível em: <https://www.https://www.rvc.ac.uk/Review/Parasitology/EggCount/Principle.htm>. Acedido em 15/04/2020. GIORGI,

J; BOWMAN, D; LYNN, R. **Georgis' Parasitology For Veterinarians**. 10.ed. Philadelphia: Saunders, 2014.

GILES, T.; VAN LIMBERGEN, T.; SAKKAS, P. *et al.* Diagnosis of sub-clinical coccidiosis in fast growing broiler chickens by MicroRNA profiling. **Genomics**, v.112, n.5, p.3218-3225, 2020. doi: 10.1016/j.ygeno.2020.03.010.

GYÖRKE, A.; POP, L.; COZMA, V. Prevalence and distribution of Eimeria species in broiler chicken farms of different capacities. **Parasite**, v.20, p.50, 2013. doi: 10.1051/parasite/2013052.

Instituto Nacional de Estatística, INE. Consumo humano de carne per capita (kg/ hab.) Disponível em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000211&contexto=bd&selTab=tab2&xlang=PT. Acedido em 19/05/2020.

JACOBS, D; FOX, M; GIBBONS, L. *et al.* **Principles of Veterinary Parasitology**. 1.ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2016, p.240.

JENKINS, M.; PARKER, C.; RITTER, D. Eimeria Oocyst Concentrations and Species Composition in Litter from Commercial Broiler Farms During Anticoccidial Drug or Live Eimeria Oocyst Vaccine Control Programs. **Avian Diseases**, v.61, n.2, p.214-220, 2017. doi: 10.1637/11578-010317-Reg.1.

HIPRA, EVANT suspensão e solvente para spray oral para galinhas. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/evant>. Acedido em 21/06/2020.

LEE, J.; ECKERT, N.; AMEISS, K. *et al.* The effect of dietary protein level on performance characteristics of coccidiosis vaccinated and nonvaccinated broilers following mixed-species Eimeria challenge. **Poultry Science**, v.90, n.9, p.1916-1925, 2011. doi: 10.3382/ps.2011-01362.

LOURENZONI, G. **Poultry Diseases Influenced By Gastrointestinal Health**. 1.ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2010. p.62-64.

LUQUETTI, B.; ALARCON, M.; LUNEDO, R. *et al.* Effects of glutamine on performance and intestinal mucosa morphometry of broiler chickens vaccinated against coccidiosis. **Scientia Agricola**, v.73, n.4, p.322-327, 2016. doi: 10.1590/0103-9016-2015-0114.

PARENT, E.; FERNANDEZ, D.; BOULIANNE, M. The use of a live non-attenuated coccidiosis vaccine modifies Eimeria spp. excretion in commercial antibiotic-free broiler chicken flocks compared to conventional shuttle anticoccidial programs. **Poultry Science**, v.97, n.8, p.2740-2744, 2018. doi: 10.3382/ps/pey140.

PEEK, H.; LANDMAN, W. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. **Veterinary Quarterly**, v.31, n.3, p.143-161, 2011. doi: 10.1080/01652176.2011.605247.

RASHID, M.; AKBAR, H.; BAKHSH, A. *et al.* Assessing the prevalence and economic significance of coccidiosis individually and in combination with concurrent infections in Pakistani commercial poultry farms. **Poultry Science**, v.98, n.3, p.1167-1175, 2019. doi: 10.3382/ps/pey522.

RITZI, M.; ABDELRAHMAN, W.; VAN-HEERDEN, K. *et al.* Combination of probiotics and coccidiosis vaccine enhances protection against an Eimeria challenge. **Veterinary Research**, v.47, n.1, p.111, 2016. doi: 10.1186/s13567-016-0397-y.

SAS Institute Inc., (2019). Copyright© 2019 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

SOUTTER, F.; WERLING, D.; TOMLEY, F. *et al.* Poultry Coccidiosis: Design and Interpretation of Vaccine Studies. **Frontiers in Veterinary Science**, v.7, p.101, 2020. doi: 10.3389/fvets.2020.00101.

SWAYNE, D; BOULIANNE, M; LOGUE, C. *et al.* **Diseases of poultry**. 14.ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2020. p.1193-1212.

TAYLOR, M; COOP, R; WALL, R. **Veterinary Parasitology**. 4.ed. John Wiley & Sons, 2015.

TEWARI, A.; MAHARANA, B. Control of poultry coccidiosis: changing trends. **Journal of Parasitic Diseases**, v.35, n.1, p.10-17, 2011. doi: 10.1007/s12639-011-0034-7.

VILLALON, J. **Gallina Castellana Negra: Coccidiosis en pollos, Tri-tro**. Última atualização: 2020. Disponível em: <http://www.tri-tro.com/enfermedades-parasitarias-en-gallinas/coccidiosis-en-pollos/>. Acedido em 19/05/2020.

WILLIAMS, R.; CARLYLE, W.; BOND, D. *et al.* The efficacy and economic benefits of Paracox®, alive attenuated anticoccidial vaccine, in commercial trials with standard broiler chickens in the United Kingdom. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.2, p.341-355, 1999. doi: 10.1016/s0020-7519(98)00212-4.

WILLIAMS, R. Safety of the attenuated anticoccidial vaccine 'Paracox' in broiler chickens isolated from extraneous coccidial infection. **Veterinary Research Communications**, v.18, n.3, p.189-198, 1994. doi: 10.1007/BF01839268.

WILLIAMS, R.; GOBBI, L. Comparison of an attenuated anticoccidial vaccine and an anticoccidial drug programme in commercial broiler chickens in Italy. **Avian Pathology**, v.31, n.3, p.253-265, 2002. doi: 10.1080/03079450220136567a.

WONDIMU, A.; MESFIN, E.; BAYU, Y. Prevalence of Poultry Coccidiosis and Associated Risk Factors in Intensive Farming System of Gondar Town, Ethiopia. **Veterinary Medicine International**. n.9, p.1-6, 2019. doi: 10.1155/2019/5748690.

Anexo 1 – Espécies de *Eimeria*

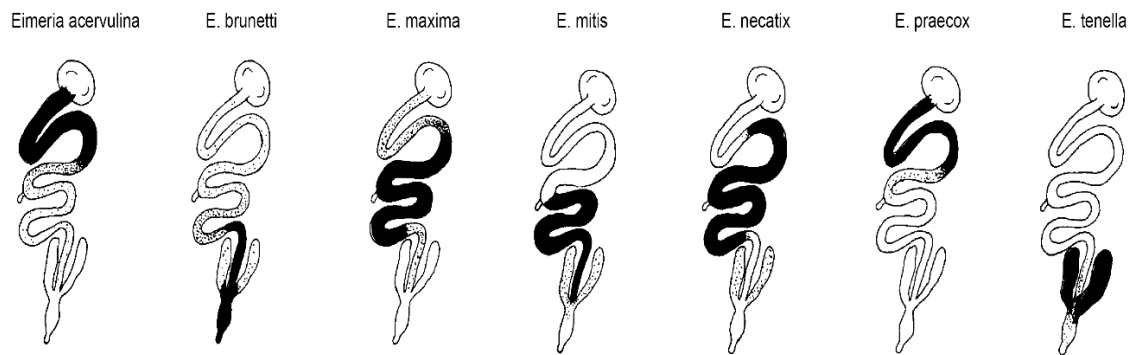


Figura 2 – Espécies de *Eimeria* e respetivas localizações (Adaptado de Swayne, 2020).

Anexo 2 – Esquema vacinal dos bandos

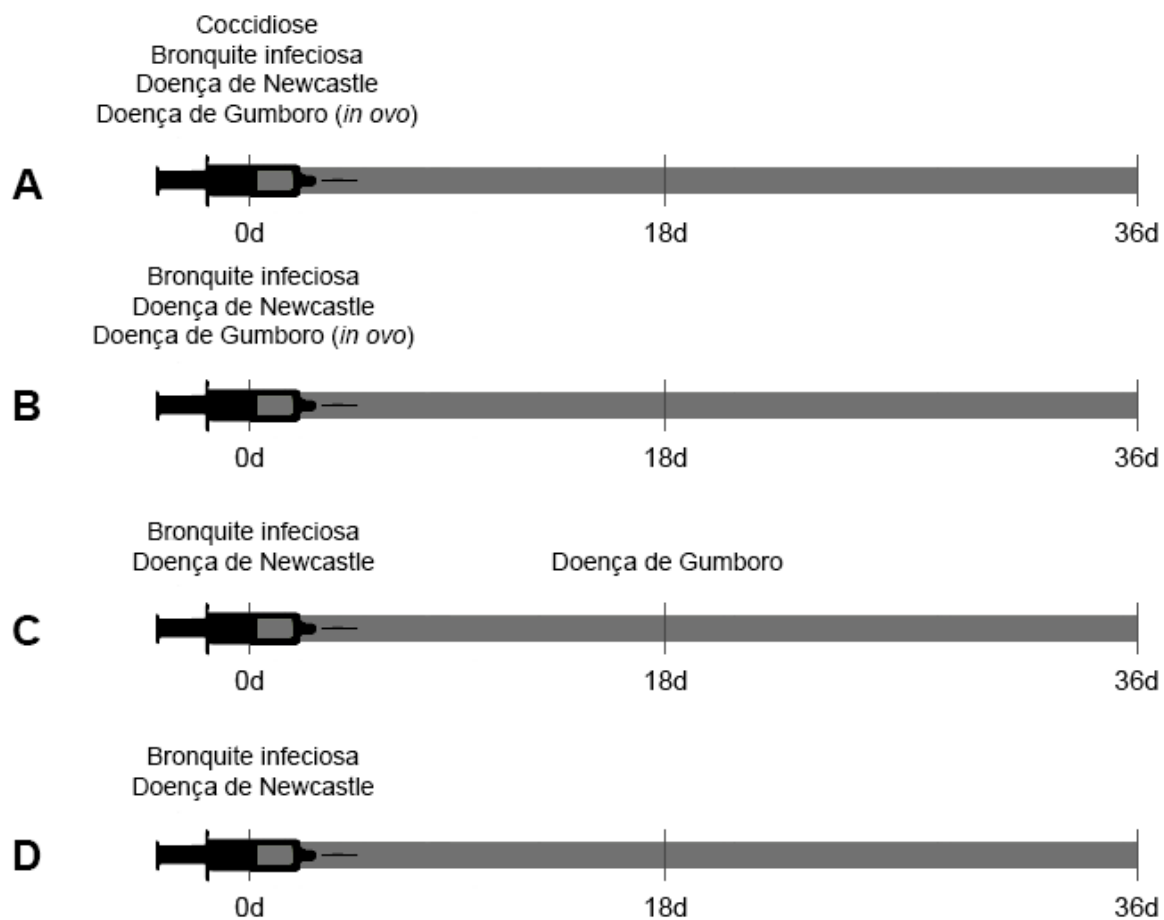


Figura 3 - Esquema vacinal dos bandos.

(B: bando; VAC: Vacinado; NVAC: não vacinado)

Esquema A: B1VAC, B3VAC, B5VAC e B8VAC.

Esquema B: B1NVAC, B2NVAC, B3NVAC, B5NVAC, B8NVAC e B9NVAC.

Esquema C: B4NVAC e B6NVAC.

Esquema D: B7NVAC.

Anexo 3 – Escalas de classificação das camas

Limpeza da plumagem (Butterworth *et al.*, 2009)

Ao realizar as pesagens dos animais nas 10 faixas do pavilhão, observar a limpeza/sujidade da plumagem, classificando com *score* de zero (limpo) a três (muito sujo).

- 0- Plumagem branca, sem detritos
- 1- Plumagem branca mas com alguns detritos
- 2- Plumagem bege, com detritos
- 3- Plumagem castanha, com detritos

Qualidade da cama (Butterworth *et al.*, 2009)

Ao realizar as recolhas das fezes de modo perpendicular no pavilhão (10x), observar a qualidade da cama e registar, classificando com *score* de zero (cama seca) a quatro (muito húmida).

- 0- Cama completamente seca e fofa/ fácil de remexer com os pés
- 1- Cama seca mas não fácil de remexer com os pés
- 2- Pegadas ficam marcadas/ cama fixa-se levemente às solas (cai)
- 3- Pegadas ficam marcadas/ cama fixa-se às solas
- 4- Pegadas ficam marcadas/ cama fixa-se fortemente às solas (não cai)

Focos de água na cama (Butterworth *et al.*, 2009)

Observar as camas ao longo do pavilhão e classificar com *score* de zero (muito húmida) a 100 (seca).

- 0- Cama húmida parede a parede
- 20- Faixa junto à união de linhas de bebedouro
- 40- Foco junto ao início/fim da linha de bebedouro
- 50- Faixa junto às portas, cantos e janelas
- 60- Faixa junto à parede
- 70- Faixa nos pontos de água >30 cm
- 80- Faixa nos pontos de água <30 cm
- 90- *Donuts* nos pontos de água
- 100- Cama sem focos de humidade

Anexo 4 – Método de McMaster

Método de McMaster (Gibbons *et al.*, 2015)

- 1- Misturar e homogeneizar bem a amostra de fezes;
- 2- Pesar seis gramas de fezes (ausência de cama) num copo de urina;
- 3- Adicionar ao copo 70 mL de água destilada;
- 4- Dissolver bem;
- 5- Passar a solução numa peneira fina para outro copo. Lavar o restante do copo inicial com 14 mL de água destilada;
- 6- Agitar;
- 7- Com uma pipeta de Pasteur, transferir a solução (do meio do copo) para um eppendorf (1,5 mL);
- 8- Centrifugar a 1500 rpm durante 15 minutos;
- 9- Remover o sobrenadante;
- 10- Encher novamente o *eppendorf* (até 1,5 mL) com a solução de flutuação (solução saturada de Cloreto de Sódio);
- 11- Agitar bem de modo a que o sedimento desapareça;
- 12- Com uma pipeta, transferir a solução para uma câmara de McMaster;
- 13- Esperar cinco minutos;
- 14- Observar ao microscópio (ampliação 100x) e contar os oocistos;
- 15- Calcular o valor OOPG [n° de oocistos numa câmara x 100];
- 16- Registrar os resultados obtidos numa tabela;
- 17- Repetir para todas as amostras.

Anexo 5 – Tabelas de análise estatística

Tabela 6 - Médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão dos pesos segundo a medida de controlo.

Medida de controlo	P7	P14	P21	P28	P35
NVAC	179,3 \pm 8,1	431,7 \pm 21,8	824,98 \pm 9,7	1350,6 \pm 12,3	1848,7 \pm 19,6
VAC	176,7 \pm 14,0	477,03 \pm 37,8	865,16 \pm 12,7	1288,2 \pm 16,8	2006,6 \pm 16,9

Tabela 7 - Médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão dos Oocistos segundo a medida de controlo.

Medida de controlo	O7	O14	O21	O28	O35
NVAC	50,00 \pm 55,66	1548,75 \pm 503,8 4	37264 \pm 5306,06	3558,2 \pm 4325,0 6	17375 \pm 8304,48
VAC	876,37 \pm 90,90	7020 \pm 822,77	27000 \pm 8664,82	56945 \pm 5802,67	2648.15 \pm 7147,36

Tabela 8 - Médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão das carcaças segundo a medida de controlo.

Medida de Controlo	C1	C2	C3	C4
NVAC	3 \pm 1,05	15 \pm 3,15	54 \pm 3,76	28 \pm 3,38
VAC	8 \pm 1,26	28 \pm 3,78	47 \pm 4,51	18 \pm 4,05