

# Ensayo de inmunoprotección frente a la coccidiosis caprina producida por *Eimeria ninakohlyakimovae* mediante la utilización de ooquistes irradiados

Muñoz, M.C. (1); Molina, J.M. (1); Hermosilla, C. (2); Taubert, A. (2); Andrada, M. (3); Lara, P.C. (4), Bordón, E. (4), Pérez, D. (1); López, A.M. (1); Matos, L. (1); Guedes, A.C. (1); Falcón S. (1); Falcón, Y. (1); Martín, S. (1); Ruiz, A. (1\*)

(1) Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria, España

(2) Institute of Parasitology, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany

(3) Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria, España

(4) Departamento de Oncología Radioterápica, Hospital Universitario de Gran Canaria "Dr. Negrín", España

**RESUMEN:** La coccidiosis constituye una de las parasitosis más frecuentes y más ampliamente distribuidas en los sistemas de producción caprinos y su control se basa en el uso de prácticas de manejo en combinación con tratamientos anticoccidióticos o anticoccidiostáticos, siendo estos medicamentos, en su mayoría, los prescritos para otras especies hospedadoras (bovinos, ovinos, aves de corral o incluso conejos). Hasta el momento no se ha realizado ningún estudio para abordar el control inmunológico de las infecciones caprinas causadas por las distintas especies de *Eimeria*. En el presente estudio se llevó a cabo una prueba de inmunoprotección mediante el empleo de ooquistes de *Eimeria ninakohlyakimovae* irradiados (X-Rad, 20 kilorrad) en cabritos infectados experimentalmente con esta misma especie de *Eimeria*. Para ello, un total de 18 cabritos se dividieron en cuatro grupos: animales infectados a las 5 semanas de edad con ooquistes irradiados y re infectados 3 semanas más tarde (grupo 1), animales infectados a las 5 semanas de edad con ooquistes no irradiados y re infectados 3 semanas más tarde (grupo 2), animales primoinfectados a las 8 semanas de edad (control de la reinfección, grupo 3) y animales no infectados (grupo control, grupo 4). En todos los casos las inoculaciones se realizaron vía oral con  $2 \times 10^5$  ooquistes esporulados de *E. ninakohlyakimovae* (cepa GC), irradiados o no irradiados. Los cabritos sensibilizados con ooquistes irradiados (grupo 1) eliminaron por heces una cantidad de ooquistes significativamente menor (95,3%) y mostraron un menor grado de coccidiosis clínica que los cabritos infectados con los ooquistes no irradiados (grupo 2). Estos resultados demuestran, por primera vez, que la atenuación de los ooquistes de *Eimeria* mediante irradiación podría ser utilizada como estrategia inmunoprolifáctica de control frente a la coccidiosis en el ganado caprino.

**SUMMARY:** The control of goat coccidiosis, one of the most important parasitic diseases in goat production systems, traditionally relies on the use of management practices combined with anticoccidial treatments. As for anthelmintics, most of the drugs used to control goat coccidiosis are prescribed for other host species (bovines, sheep, poultry or even rabbits) and, additionally, no effort has been made to address the immunological control of caprine infections caused by *Eimeria sp.* so far. In the present study we conducted a preliminary vaccination trial applying attenuated oocysts in goat kids experimentally infected with *Eimeria ninakohlyakimovae*. For attenuation, sporulated oocysts of *E. ninakohlyakimovae* were subjected to irradiation (X-Rad, 20 kilorrad). A total of 18 goat kids were divided into the following four groups: animals infected with irradiated oocysts at week 5 of age and challenged 3 weeks later (group 1), animals infected with non-irradiated oocysts at week 5 of age and challenged 3 weeks later (group 2), animals primary-infected with non-irradiated oocysts at week 8 of age (control of challenge infection, group 3) and non-infected control animals (group 4). For oral infections,  $2 \times 10^5$  sporulated oocysts of *E. ninakohlyakimovae* (GC strain) were used per animal. Goat kids infected with irradiated oocysts (group 1) shed significantly less oocysts in the faeces (95.3%) and showed a lower degree of clinical coccidiosis than kids infected with non-irradiated oocysts (group 2). These results demonstrate for the first time that attenuation of *Eimeria* oocysts may be used as an immunoprophylactic strategy to control coccidiosis in goats.

## Correspondencia

Antonio Ruiz Reyes (Unidad de Parasitología). Tf.: 928 451113; Fax: 928 454341; Email: aruiz@dpat.ulpgc.es

## Introducción

La coccidiosis caprina, producida por las diferentes especies del género *Eimeria*, es una de las enfermedades parasitarias más frecuente y ampliamente extendida. Ha sido descrita en un gran número de regiones y países de Europa, África, Asia y América, constituyendo en todos los casos una importante limitación para la producción caprina (1, 7, 18, 25). Pero es sobre todo en las áreas rurales semiáridas que dependen económicamente de la producción caprina, como las Islas Canarias (España) u otras zonas de África u Oriente Medio con condiciones climáticas análogas, donde la coccidiosis caprina afecta con más severidad a la salud animal y a la rentabilidad de la industria caprina (25).

De entre las especies del género *Eimeria* que con más frecuencia afectan al ganado caprino, *E. ninakohlyakimovae* se considera como la de mayor patogenicidad (11). Independientemente de cual sea el sistema de producción, la mayoría de los animales se infectan durante los primeros meses de vida, pudiendo en algunas áreas verse afectados más del 96% de los cabritos en edades comprendidas entre las 4 y 10 semanas de vida, aunque el desarrollo clínico de la enfermedad está influenciado por diferentes factores, como los sistemas de producción intensivos, el estado inmune de los animales, la edad y las condiciones climáticas (25).

Un gran número de compuestos, combinados con medidas de manejo, han sido utilizados para el control y profilaxis de la coccidiosis tanto para corderos (8, 10, 14) como terneros (12, 21, 22) o aves de corral (9), pero el uso extensivo de drogas anticoccidíicas ha provocado la aparición de cepas resistentes de *Eimeria* (23). Este hecho ha llevado a la realización de ensayos de inmunización frente a la coccidiosis mediante el empleo de distintos tipos de vacunas. Diversos estudios se han llevado a cabo con distintas cepas de *Eimeria* en aves, utilizando tanto vacunas atenuadas

mediante pases en huevos embrionados (Livacox®), como cepas pre-coces (Paracox®) o cepas de baja patogenicidad seleccionadas de infecciones naturales (NobilisCox ATM1®). Otros estudios se han basado en el empleo de vacunas recombinantes (5, 20). Por otra parte, diversas investigaciones han demostrado que la irradiación gamma puede ser utilizada para atenuar varias especies de coccidios aviarios, como *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, o *E. maxima*, y prevenir la reproducción asexual del parásito y la formación de ooquistes (17). Hasta el momento no se ha realizado ningún estudio similar que aborde el control inmunológico de las infecciones caprinas causadas por *Eimeria spp.* En el presente trabajo se ha investigado el efecto inmunoprotector frente a la coccidiosis experimental en cabritos utilizando ooquistes irradiados de *Eimeria ninakohlyakimovae*.

## Material y métodos

### Parásitos y atenuación de los ooquistes

La cepa GC de *E. ninakohlyakimovae* utilizada en este estudio fue aislada por primera vez en el año 2006 en la isla de Gran Canaria a partir de heces de un grupo de cabras infectadas de forma natural y desde entonces se ha mantenido por pases sucesivos en cabritos (24). Para la producción de ooquistes, los cabritos fueron infectados vía oral a la edad de 4 semanas con  $2 \times 10^5$  ooquistes esporulados de *E. ninakohlyakimovae*. Los ooquistes excretados fueron aislados de las heces a partir de los 14 días p. i., según el método descrito por Hermosilla et al. (13), y se llevaron hasta la fase de esporulación tras incubación en solución de dicromato potásico al 2% p/v a temperatura ambiente durante al menos una semana. Los ooquistes esporulados fueron recogidos y almacenados a 4 °C hasta su utilización.

Para la atenuación, los ooquistes esporulados de *E. ninakohlyakimovae* fueron sometidos a una irradiación

total de 20 kilorads con una intensidad de 6 mV x-rays, a una velocidad de 50 cGy/min durante 15 minutos. La irradiación se realizó en frascos de cultivos de 25 cm<sup>2</sup> (Nunc) sobre un volumen total de solución de ooquistes de 20 ml utilizando como fuente de irradiación X el acelerador lineal Mevatron (Siemens, Germany).

### Animales y diseño experimental

Un total de 18 cabritos de raza Majorera fueron adquiridos en una granja local cuando tenían entre 1 y 5 días de vida; inmediatamente fueron tratados con Vecoxan® (Laboratorios Jansen) y Halocur® (Intervet) y se analizaron para descartar cualquier infección parasitaria. Una vez comprobado que estaban libres de parásitos fueron ubicados en jaulas metabólicas previamente esterilizadas, en las que se mantuvieron hasta el final de la experiencia. Durante todo el proceso los cabritos fueron alimentados con leche de sustitución Bacilactol® (Capisa) y pienso de arranque comercial (Capisa). También dispusieron de heno esterilizado y agua ad libitum.

Los animales se dividieron en los siguientes cuatro grupos experimentales:

- Grupo 1 (n=5): animales infectados a las 5 semanas de edad con ooquistes irradiados y reinfectados 3 semanas más tarde con ooquistes no irradiados.
- Grupo 2 (n=5): animales infectados a las 5 semanas de edad con ooquistes no irradiados y reinfectados 3 semanas más tarde con este mismo tipo de ooquistes.
- Grupo 3 (n=4): animales primoinfectados con ooquistes no irradiados a las 8 semanas de edad (control de reinfección).
- Grupo 4 (n=4): animales no infectados (grupo control).

La dosis infectante tanto en las primoinfecciones como en las reinfecciones fue de  $2 \times 10^5$  ooquistes esporulados de *E. ninakohlyakimovae* (cepa GC), irradiados o no irradiados. Todas las

infecciones se realizaron por vía oral mediante sonda gastroruminal. El peso de los animales se controló semanalmente, y con la misma periodicidad se tomaron muestras de sangre por punción yugular para los análisis biopatológicos. Para el estudio parasitológico se tomaron muestras fecales directamente del recto a partir del día 14 post-infección, y el sacrificio de los animales se realizó a los 21 días post-infección (semana 11 de vida). Durante todo el estudio se examinó la evolución clínica de los animales. La intensidad de los signos clínicos se estableció teniendo en cuenta la consistencia de las heces y las características de la diarrea, desde heces normales a fluidas, diarrea acuosa o sanguinolenta.

#### **Análisis parasitológico y biopatológico**

La carga de ooquistes en heces (OPG: ooquistes por gramo de heces) fue determinada utilizando la técnica de MacMaster modificada (2). Para la determinación del recuento total de leucocitos y concentración de hemoglobina, las muestras se recogieron en tubos VetCollect® de IDEXX e inmediatamente fueron procesadas utilizando el analizador hematológico LaserCyte (IDEXX). El hematocrito se determinó mediante centrifugación utilizando tubos capilares estándares y centrífuga de microhematocrito. El recuento diferencial de leucocitos se realizó sobre frotis de sangre teñidos con la tinción panóptica (Diff-Quick) contando un total de 200 leucocitos por frotis.

Para el análisis estadístico, los recuentos fecales de ooquistes se transformaron en Log (OPG + 1) para obtener distribuciones normales según el test de Normalidad de Kolmogorov-Smirnov. La normalización de los datos no fue necesaria para analizar la evolución del peso corporal ni para los parámetros hematológicos. La evolución del peso corporal se expresó como tasa de crecimiento ( $\ln$  peso 1 -  $\ln$  peso 2/ $t \cdot 100$ ), donde “t”

es el tiempo (en días) entre los puntos de muestreo 1 y 2. Las comparaciones se realizaron mediante análisis factorial de la varianza ANOVA y el test de Comparación Múltiple de Turkey, más la prueba “t” de Student. Todos los análisis se realizaron mediante el programa informático SigmaStat 2.03, considerándose significativas las diferencias entre las distintas comparaciones para valores  $P < 0,05$ .

## **Resultados**

### **Clínicos**

Durante la primoinfección, los cabritos infectados con ooquistes irradiados mostraron signos clínicos moderados, mientras que los infectados con ooquistes no atenuados desarrollaron unos signos clínicos mucho más severos, aunque con importantes diferencias individuales (Tabla 1A). Después de la reinfección, tanto los animales infectados con ooquistes irradiados como con ooquistes no irradiados presentaron signos clínicos leves, mientras que el grupo control de reinfección mostró signos clínicos de moderados a severos. Dentro de este grupo, un animal murió en el curso de

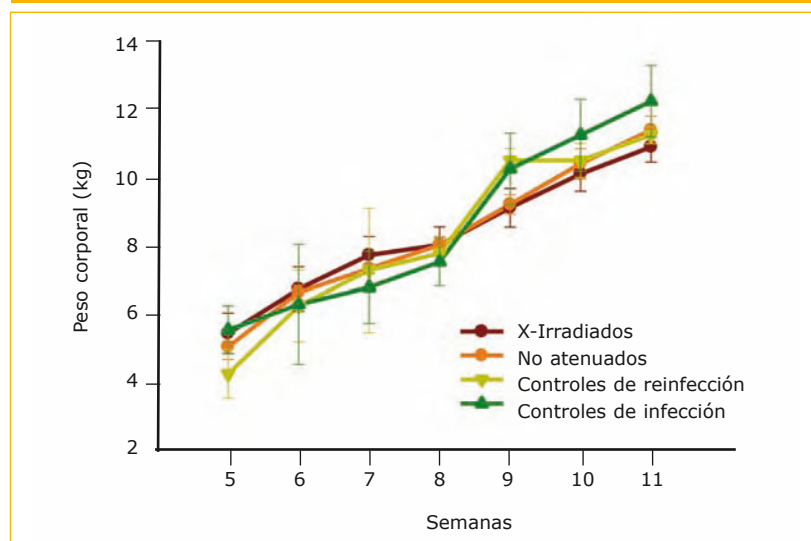
la infección (Tabla 1B). A pesar de los signos clínicos observados, sólo se detectó un ligero incremento en el peso corporal de los controles no infectados cuando se comparó con los animales primo- y reinfectados (Fig. 1).

### **Parasitológicos**

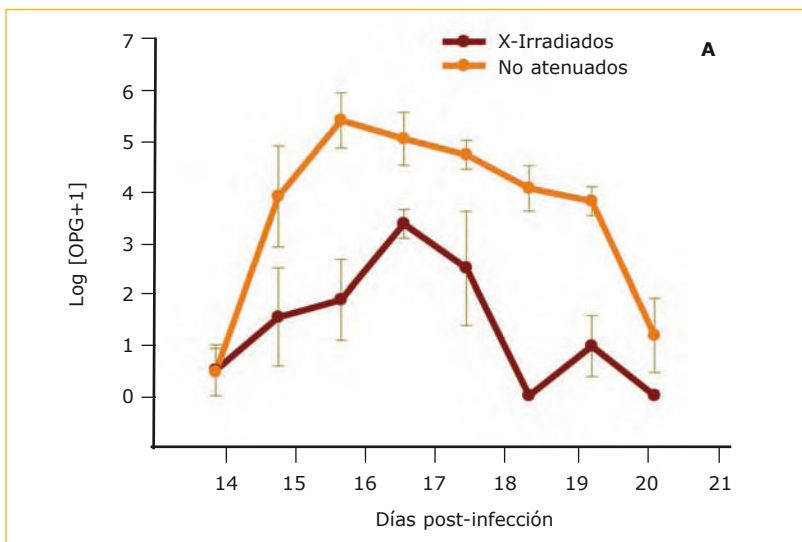
Durante la infección primaria, los cabritos infectados con ooquistes irradiados eliminaron una cantidad de ooquistes significativamente menor que aquéllos infectados con ooquistes no irradiados (Fig. 2A). La mayor eliminación de ooquistes se pudo observar a los 16 dpi en el grupo de animales infectado con ooquistes no atenuados, permaneciendo los valores elevados hasta los 20 dpi. En los cabritos infectados con ooquistes irradiados el pico máximo se observó a los 17 dpi, descendiendo a valores mínimos a los 19 dpi. Los recuentos fecales de ooquistes fueron negativos en los animales del grupo control no infectado.

Durante la reinfección, los valores de OPG fueron significativamente menores en los cabritos infectados, tanto con ooquistes irradiados como con ooquistes no irradiados, cuando se comparó con los animales del grupo

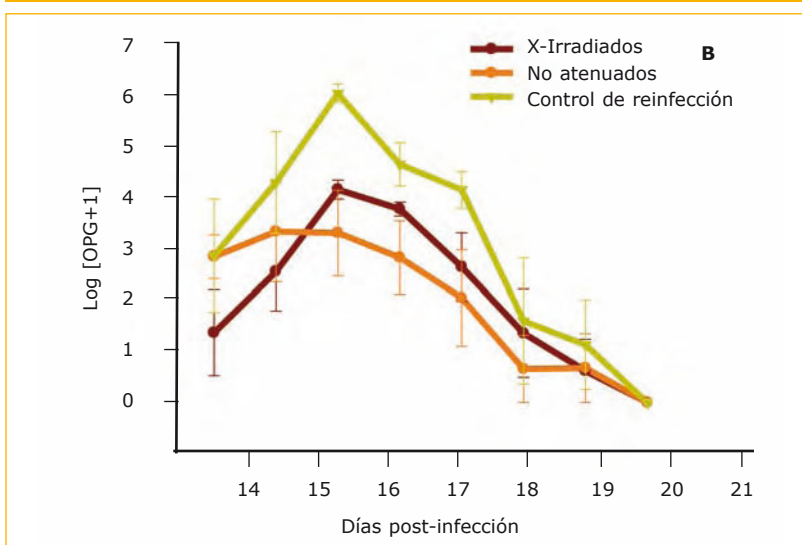
**Figura 1.** Evolución del peso corporal en animales no inmunizados y no infectados (G4, controles de infección), no inmunizados e infectados (G3, control de reinfección), inmunizados con ooquistes irradiados de *Eimeria ninakohlyakimovae* y reinfectados (G1, X-irradiados) e inmunizados con ooquistes no atenuados (G2 - no atenuados) y reinfectados. Se representan las medias  $\pm$  SEM.



**Figura 2.** Recuentos de ooquistes por gramo de heces (OPG) durante la fase de primoinfección (A) y reinfección (B) en cabritos no inmunizados e infectados (G3, control de reinfección), inmunizados con ooquistes irradiados de *Eimeria ninakohl-yakimovae* y reinfectedos (G1, X-irradiados) e inmunizados con ooquistes no atenuados (G2, no atenuados) y reinfectedos. Los datos se expresan como valores transformados del log (OPG + 1) y se representan las medias  $\pm$  SEM.



**Figura 2b.**



control de reinfección (Fig. 2B). Las diferencias fueron particularmente importantes en los días 16 y 17 post-infección. En todos los grupos los recuentos fecales de ooquistes comenzaron a descender a partir de los 16 dpi y fueron negativos a los 21 dpi.

En general, los cabritos infectados con ooquistes irradiados eliminaron por heces 95,3% menos ooquistes que los infectados con ooquistes no atenuados

durante la infección primaria. Durante la reinfección se produjo una reducción del total de ooquistes eliminado del 87,7% y del 60,5% en los animales sensibilizados con ooquistes irradiados y no atenuados, respectivamente.

**Biopatológicos**

Los análisis hematológicos no mostraron importantes cambios en la serie

roja (Tabla 2), sólo una ligera disminución en los valores de hematocrito y hemoglobina en los grupos 1 (infectados con ooquistes irradiados) y 2 (infectados con ooquistes no irradiados) durante la primoinfección, pudiéndose comprobar que durante la reinfección estos valores tendieron a la normalización en ambos grupos. En el grupo 3 (grupo control de reinfección) se observó un incremento en los valores de hematocrito y hemoglobina a partir de los 8 dpi, con valores máximos a los 16 dpi, coincidiendo con la fase clínica de la enfermedad.

En la serie blanca, las principales diferencias se observaron en los recuentos de neutrófilos en los grupos 1 y 2 durante la primoinfección. Durante esta fase, los neutrófilos de los cabritos del grupo 1 apenas sufrieron modificaciones y durante la reinfección los valores se incrementaron ligeramente, mientras que en el grupo 2 los neutrófilos tendieron a disminuir a partir de la primera semana post-infección y durante la reinfección los valores permanecieron sin cambios considerables. Los neutrófilos periféricos también tendieron a disminuir en las semanas subsiguientes a la infección en los animales del grupo 3.

La concentración de proteínas plasmáticas permaneció sin modificaciones considerables durante la experiencia. En general los cambios hematológicos fueron ligeros o moderados, motivo por el cual las diferencias entre semanas y grupos no llegaron a ser significativas.

**Discusión**

En este estudio se pone en evidencia que la inmunización con ooquistes irradiados de *E. ninakohl-yakimovae* podría ser una alternativa para el control de la coccidiosis caprina. El protocolo de inmunización seguido evitó que los animales sensibilizados con ooquistes irradiados padecieran coccidiosis clínica severa durante la primoinfección, al tiempo que desarrolló una respuesta inmune protectora que,



en términos globales, redujo la producción de ooquistes en un 90%. Hasta el momento no hay datos bibliográficos disponibles sobre ensayos de inmunoprotección frente a la eimeriosis en rumiantes utilizando ooquistes irradiados, pero el grado de protección alcanzado en el presente estudio es equiparable al descrito en ensayos similares realizado con pollos frente a *Eimeria tenella* (15) o *Eimeria maxima* (16), en este último caso utilizando irradiación gamma. Los resultados son incluso comparables con el nivel de inmunoprotección inducido por vacunas recombinantes recientemente ensayadas en pollos frente a la coccidiosis por *Eimeria tenella* (19) u otras especie de *Eimeria* (6) y próximos a los obtenidos en experiencias realizadas con vacunas comerciales como Paracox® (3). En algunos ensayos de inmunización de pollos con ooquistes atenuados por irradiación se observaron importantes diferencias en base a las características del inóculo (grado de atenuación de los ooquistes y dosis infectantes) (15), por lo que no se descarta que los beneficios inmunoprotectores obtenidos en este estudio puedan ser implementados modificando la estrategia de inmunización. Este tipo de actuación sería necesaria para que el proceso de inmunización derive en una mejora de los diferentes parámetros productivos.

Los beneficios clínicos y parasitológicos de la inmunoprotección sí fueron más contundentes. Los cabritos sensibilizados con ooquistes irradiados no sólo presentaron menores manifestaciones clínicas y menores recuentos de ooquistes durante la fase de primoinfección, en relación con los infectados con ooquistes no atenuados, sino que, además, el inóculo utilizado fue suficiente como para desarrollar una respuesta inmunoprotectora adquirida y reducir la severidad de los signos clínicos y la eliminación de ooquistes durante la reinfección, en porcentajes incluso superiores a los conseguidos durante la infección con ooquistes no irradiados (87,7% vs 60,5%). En concordancia con lo encontrado en el pre-






**Tabla 1.** Intensidad y características de la diarrea durante la primo-infección (A) y reinfección (B) en cabritos infectados con *Eimeria ninakohlyakimovae*.

(A) PRIMO-INFECCIÓN									
		Días post-infección							
		14	15	16	17	18	19	20	21
G1- irradiados									
	C1								
	C2								
	C3								
	C21								
	C22								
G2 - no atenuados									
	C4								
	C5								
	C7								
	C23								
	C24								
G3, G4 - controles									
	C8								
	C9								
	C25								
	C26								
	C31								
	C32								
	C33								
	C34								

(B) REINFECCIÓN									
		Días post-reinfección							
		14	15	16	17	18	19	20	21
G1 - irradiados									
	C1								♠
	C2								♠
	C3								♠
	C21								♠
	C22								♠
G2 - no atenuados									
	C4								♠
	C5								♠
	C7								♠
	C23								♠
	C24								♠
G3 - controles RI									
	C8								♠
	C9								♠
	C25								♠
	C26			♠					
G4 - controles									
	C31								♠
	C32								♠
	C33								♠
	C34								♠

Se detallan los datos individuales de cabritos (C) primo-infectados en el día 0 con  $2 \times 10^5$  ooquistes esporulados atenuados mediante irradiación-X (G1 - irradiados) y con ooquistes no atenuados (G2 - no atenuados). Se utilizaron cinco animales como controles de infección (G4 - controles). En la reinfección, estos mismos grupos de animales se inocularon con  $2 \times 10^5$  ooquistes esporulados no atenuados. La flecha (♠) señala el día de la muerte o sacrificio y la correspondiente necropsia de los animales. La evaluación de la diarrea se determinó utilizando el siguiente criterio:

-  Heces normales, sin manchas
-  Manchas diarreicas secas
-  Manchas diarreicas húmedas
-  Diarrea en extremidades
-  Diarrea fluida, acuosa o sanguinolenta

sente estudio, el nivel de inmunoprotección alcanzado en pollos inmunizados con ooquistes irradiados también se correlacionó con una mejora de la clínica y una disminución de los recuentos de ooquistes (3). En algunos estudios sí se logró asociar la inmunoprotección con un beneficio en los parámetros productivos (3, 15, 16).

Los cambios hematológicos resultaron en general ligeros en todos los animales infectados independientemente de si fueron inmunizados o no, por lo que no fue posible establecer una correlación entre el grado de inmunoprotección y la normalización de los parámetros hematológicos. En este sentido, los valores de hematocrito

**Tabla 2.** Parámetros hematológicos durante la primo-infección y reinfección en cabritos infectados con *Eimeria ninakohlyakimovae*.

		HTO	HB	WBC	BAN	NEU	LIN	EOS	MONO	PT
		%	g/dl	cel/ $\mu$ l	cel/ $\mu$ l	cel/ $\mu$ l	cel/ $\mu$ l	cel/ $\mu$ l	cel/ $\mu$ l	g/dl
<b>Primo infección</b>										
G1	0 dpi	27	9,0	12234	103	4857	6124	332	819	5,3
	8 dpi	25	8,0	9730	65	4198	5232	32	203	5,0
	16 dpi	24	7,9	9358	15	4666	3916	83	679	5,9
G2	0 dpi	26	8,5	16708	140	8187	7526	316	538	5,2
	8 dpi	28	8,8	10572	151	3359	6018	208	836	5,2
	16 dpi	25	8,2	7488	136	3153	4157	55	259	5,4
G4	0 dpi	20	7,4	17540	0	6927	10438	55	121	5,9
	8 dpi	26	7,5	19520	0	9091	9107	304	1018	6,4
	16 dpi	25	8,6	18765	177	10867	7158	89	474	6,35
<b>Reinfección</b>										
G1	0 dpri	24	8,0	9138	27	4131	4353	250	375	5,7
	8 dpri	28	9,3	11660	661	6105	4467	207	750	5,7
	16 dpri	26	8,9	7008	59	3299	3517	43	87	5,5
	23 dpri	28	9,1	16182	258	9074	5864	186	760	5,7
G2	0 dpri	25	8,3	9916	112	4143	5336	88	238	5,4
	8 dpri	29	9,6	11396	201	5155	5523	314	255	5,4
	16 dpri	29	9,5	10656	139	4008	3420	360	442	5,5
	23 dpri	29	9,7	11832	44	5220	5364	72	1084	5,4
G3	0 dpi	23	8,0	14095	346	9049	3555	260	787	5,4
	8 dpi	29	9,5	10640	0	5164	5399	890	72	5,5
	16 dpi	35	11,0	11680	114	5862	4855	29	718	5,3
	23 dpi	27	8,6	10265	0	3690	5125	110	1275	5,6
G4	0 dpi	36	10,9	14513	0	5410	8853	113	136	5,2
	8 dpi	32	9,6	13013	0	4492	8257	263	0	5,2
	16 dpi	31	9,7	13680	0	3726	9686	131	136	5
	23 dpi	32	9,7	12940	0	2847	9780	312	0	5,2

Se detallan las medias de los animales infectados con ooquistes esporulados atenuados mediante irradiación-X (G1 - irradiados) y con ooquistes no atenuados (G2 - no atenuados). Se utilizaron tres animales como controles de infección (G3 - controles). En la reinfección, estos mismos grupos de animales se inocularon con  $2 \times 10^5$  ooquistes esporulados no atenuados.

y hemoglobina sólo mostraron una ligera disminución en los grupos G1 (infectados con ooquistes irradiados) y G2 (infectados con ooquistes no atenuados) durante la primoinfección, pudiéndose deber, como indican Bangoura y Dauschies (2) a ligeras pérdidas de sangre vía intestinal que se producen como consecuencia de la infección aguda. Igualmente, según describen estos mismos autores, en el grupo G3 (grupo control de reinfección) observamos un incremento en los valores de hematocrito y hemoglobina a partir de los 8 dpi, alcanzado valores máximos a los 16 dpi, coincidiendo con la fase clínica de la enfermedad, pudiéndose deber esta

hemoconcentración a la pérdida de fluidos a través del intestino. En la serie blanca, durante la primoinfección, los neutrófilos disminuyeron de forma considerable en los grupos 2 y 3, posiblemente debido al paso de los neutrófilos desde la sangre hasta la mucosa intestinal, hacia donde se movilizan en respuesta a diversos factores quimiotácticos producidos por los tejidos inflamados (4); por el contrario, durante la fase de primoinfección del grupo G1 (cabritos inmunizados con ooquistes irradiados) los neutrófilos apenas sufrieron modificaciones, posiblemente por el escaso daño que el parásito produjo en estos animales.

En base a los resultados obtenidos

en el presente estudio no es posible establecer con certeza los mecanismos inmunológicos responsables de la inmunoprotección inducida frente a *E. ninakohlyakimovae* mediante la inmunización con ooquistes irradiados. La hipótesis más probable sería que los ooquistes atenuados siguieran manteniendo la facultad de exquistarse *in vivo* y que los esporozoítos resultantes invadieran las células endoteliales sin desarrollar, debido a su atenuación, ni igual número de esquizontes maduros, ni esquizontes del mismo tamaño que en el caso de infecciones con ooquistes no atenuados, pero que sí fueran capaces de estimular una respuesta inmune protectora. Esta posibilidad explicaría la menor intensidad de los signos clínicos observada en el grupo de animales inmunizado con ooquistes irradiados y el elevado grado de protección conseguido. La hipótesis de que durante la primera merogonia pueden ya desencadenarse los mecanismos para el desarrollo de una respuesta inmune adquirida concordaría con observaciones realizadas por nuestro grupo (datos no publicados) según las cuales el número de esquizontes inmaduros encontrado en el periodo prepatente (7 dpi, merogonia I) es significativamente menor en animales reinfectados que en primoinfectados. Este planteamiento está en consonancia con datos publicados por Jenkins et al. (15), según los cuales la inmunización de pollos con ooquistes irradiados de *E. tenella* desarrolla una protección que no requiere del desarrollo de una primera generación de esquizontes durante la infección primaria.

En principio no sería descartable que debido a la irradiación los ooquistes no hubieran tenido la aptitud de exquistarse y que el menor número de ooquistes que sí lograron hacerlo pudiera haber sido suficiente para desarrollar una respuesta inmune protectora en ausencia de signos clínicos severos. Sin embargo, esta posibilidad contrasta con la apariencia microscópica normal que presentaban la totalidad de los ooquistes que se sometieron a

irradiación. Además, el diseño del protocolo de atenuación se realizó de tal forma que todos los ooquistes recibieran igual dosis de irradiación. Para este fin los ooquistes se dispusieron en la botella de cultivo de manera que formaran una fina película en el fondo, que fue donde se concentró el haz de rayos X. Esta posibilidad también se ha descartado en trabajos similares al realizado en el presente estudio (15), en los que demostró que la exquistación de ooquistes expuestos a 10, 15, 20 y 30 kilorads de irradiación-X no determinó diferencias en la liberación de esporozoítos móviles. Este mismo grupo de investigación también demostró que la exposición a 15 o 25 kilorads de irradiación-gamma tiene un mínimo efecto sobre los antígenos estructurales de los ooquistes irradiados (17).

El presente trabajo constituye la primera evidencia de inmunoprotección realizada en rumiantes frente a la coccidiosis producida por *Eimeria spp.* utilizando ooquistes irradiados. El grado de inmunoprotección conseguido en términos de reducción de los recuentos fecales de ooquistes y la menor severidad del cuadro clínico abren la posibilidad de la utilización de este tipo de inmunizaciones en el control de la coccidiosis caprina y en rumiantes en general. No obstante, como requisito previo, serían necesarios estudios adicionales que clarificaran los mecanismos intrínsecos subyacentes al proceso de inmunoprotección así como el ensayo de nuevos protocolos que aumentarían la rentabilidad de la inmunización en términos productivos.

### Agradecimientos

El presente trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de España (MEC, proyecto nº AGL2007-63415) y los Fondos FEDER, así como por la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACII-SI) (Ref. SolSubC200801000244).

### Bibliografía

- 1.- Balicka-Ramisz A (1999) Studies on coccidiosis in goats in Poland. *Vet Parasitol* 81:347-349.
- 2.- Bangoura B, Dauschies A (2007) Parasitological and clinical parameters of experimental *Eimeria zuernii* infection in calves and influence on weight gain and haemogram. *Parasitol Res* 100:1331-1340.
- 3.- Crouch CF, Andrews SJ, Ward RG, Francis MJ (2003) Protective efficacy of a live attenuated anti-coccidial vaccine administered to 1-day-old chickens. *Avian Pathol* 32:297-304.
- 4.- Chtanova T, Shaeffer M, Han S, van Dooren GG, Nollmann M, Herzmark P, Chan SW, Satija J, Camfield D, Aaron H, Striepen B, Robey EA (2008) Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection. *Immunity* 29:467-496.
- 5.- Ding X, Lillehoj HS, Dalloul RA, Min W, Sato T, Yasuda A, Lillehoj EP (2005) In ovo vaccination with the *Eimeria tenella* EtMIC2 gene induces protective immunity against coccidiosis. *Vaccine* 23:3733-3740.
- 6.- Ding J, Qian W, Liu Q, Liu Q (2012) Multi-epitope recombinant vaccine induces immunoprotection against mixed infection of *Eimeria spp.* *Parasitol Res* 110:2297-2306.
- 7.- Faizal ACM, Rajapakse RPVJ (2001) Prevalence of coccidia and gastrointestinal nematode infections in cross bred goats in the dry areas of Sri Lanka. *Small Rumin Res* 40:233-238.
- 8.- Foreyt WJ, Gates NL, Wescott RB (1979) Effects of lasalocid and monensin against experimentally induced coccidiosis in confinement-reared lambs from weaning to market weight. *Am J Vet Res* 40:97-100.
- 9.- Gerhold RW, Fuller AL, Lollis L, Parr C, McDougald LR (2011) The efficacy of anticoccidial products against *Eimeria spp.* in northern bobwhites. *Avian Dis* 55:59-64.
- 10.-Gjerde B, Helle O (1991) Chemoprophylaxis of coccidiosis in lambs with a single oral dose of toltrazuril. *Vet Parasitol* 38:97-107.
- 11.-Harper CK, Penzhorn BL (1999) Occurrence and diversity of coccidia in indigenous, Saanen and crossbred goats in South Africa. *Vet Parasitol* 82:1-9.
- 12.-Hasbullah, Itahana H, Uchida T, Inamoto T, Nakai Y, Ogimoto K (1996) Medication of feedlot calves infected with *Eimeria spp.* by a combination of sulfamonomethoxine and ormetoprim. *J Vet Med Sci* 58:169-70.
- 13.-Hermosilla C, Barbisch B, Heise A, Kowalik S, Zahner H (2002) Development of *Eimeria bovis* in vitro: suitability of several bovine, human and porcine endothelial cell lines, bovine fetal gastrointestinal, Madin-Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey kidney (VERO) cells. *Parasitol Res* 88:301-307.
- 14.-Horton GM, Stockdale PH (1981) Lasalocid and monensin in finishing diets for early weaned lambs with naturally occurring coccidiosis. *Am J Vet Res* 42:433-436.
- 15.-Jenkins MC, Augustine PC, Danforth HD, Barta JR (1991) X-irradiation of *Eimeria tenella* oocysts provides direct evidence that sporozoite invasion and early schizont development induce a protective immune response(s). *Infect Immun* 59: 4042-4048.
- 16.-Jenkins MC, Chute MB, Danforth HD (1997) Protection against coccidiosis in outbred chickens elicited by gamma-irradiated *Eimeria maxima*. *Avian Dis* 41:702-708.
- 17.-Jenkins MC, Chute MB, Danforth HD, Lillehoj HS (1995) Gamma-irradiated and nonirradiated *Eimeria tenella* sporozoites exhibit differential uracil

- uptake and expression of a 7- to 10-kDa metabolic antigen. *Exp Parasitol* 80:645-653.
- 18.-Koudela B, Boková A (1998) Coccidiosis in goats in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 76:261-267.
- 19.-Li J, Zheng J, Gong P, Zhang X (2012) Efficacy of *Eimeria tenella* rhomboid-like protein as a subunit vaccine in protective immunity against homologous challenge. *Parasitol Res* 110:1139-1145.
- 20.-Ma D, Ma C, Pan L, Li G, Yang J, Hong J, Cai H, Ren X (2011) Vaccination of chickens with DNA vaccine encoding *Eimeria acervulina* 3-1E and chicken IL-15 offers protection against homologous challenge. *Exp Parasitol* 127:208-214.
- 21.-McMeniman NP, Elliott R (1995) Control of coccidia in young calves using lasalocid. *Aust Vet J* 72:7-9.
- 22.-Mundt HC, Bangoura B, Mengel H, Keidel J, Dausgschies A (2005) Control of clinical coccidiosis of calves due to *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* with toltrazuril under field conditions. *Parasitol Res* 97 Suppl 1:S134-42.
- 23.-Peek HW, Landman WJ (2005) Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2001. *Avian Pathol* 32:391-401
- 24.-Ruiz A, Behrendt JH, Zahner H, Hermosilla C, Pérez D, Matos L, Muñoz MC, Molina JM, Taubert A (2010) Development of *Eimeria ninakohlyakimovae* in vitro in primary and permanent cell lines. *Vet Parasitol* 173:2-10.
- 25.-Ruiz A, González JF, Rodríguez E, Martín S, Hernández YI, Almeida R, Molina JM, (2006) Influence of climatic and management factors on *Eimeria* infections in goats from semi-arid zones. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53:399-402.