

Aislamiento e infectividad en cabritos de una cepa de *Eimeria ninkohlyakimovae* aislada en Gran Canaria (España)

Matos, L. (1); Hermosilla, C. (2,3); Taubert, A. (2); Muñoz, M. C. (1); Molina, J. M. (1); Andrada, M. (4); Rodríguez, F. (4); Pérez, D. (1); López, A. (1); Guedes, A. (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) Department of Pathology and Infectious Diseases, Royal Veterinary College, London, UK

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

RESUMEN: La coccidiosis producida por el género *Eimeria* constituye una de las principales enfermedades parasitarias en los sistemas de explotación caprinos, con especial relevancia en cabritos con edades próximas al periodo de destete. Dada la importancia de la producción caprina en el Archipiélago Canario y en otras zonas áridas y semiáridas de diferentes localizaciones geográficas, la disponibilidad de una especie definida de *Eimeria* podría permitir la realización de estudios experimentales de investigación tanto básica como aplicada sobre coccidiosis en el ganado caprino. Por su patogenicidad, en el presente estudio se trató de aislar una cepa de *Eimeria ninkohlyakimovae* para, a continuación, valorar su infectividad en condiciones experimentales. El aislamiento se realizó a partir de muestras fecales de animales infectados de forma natural. A continuación se infectaron cabritos de 4 semanas de edad con 2×10^5 ooquistes esporulados y se monitorizó la infección en base a parámetros parasitológicos, patológicos y productivos. La cepa aislada, que se ha denominado cepa GC de *Eimeria ninkohlyakimovae*, presentó un periodo prepatente de entre 14-15 días y marcada patogenicidad. El cuadro clínico desarrollado se caracterizó por diarreas profusas, deshidratación y deterioro general del animal, y estuvo asociado con una fuerte enterocolitis eosinofílica y retraso del crecimiento. La disminución de la producción de ooquistes y la menor intensidad de los signos clínicos tras la reinfección indicarían, además, que se trata de una cepa capaz de desarrollar una respuesta inmune protectora. En su conjunto, los datos obtenidos en el presente estudio indicarían que la cepa GC de *Eimeria ninkohlyakimovae* podría utilizarse para evaluar los mecanismos de patogenicidad y la respuesta inmune en la coccidiosis caprina, como base para el diseño de estrategias de profilaxis y control de la enfermedad.

Palabras clave: *Eimeria ninkohlyakimovae*, Cepa GC (Gran Canaria)

ISOLATION AND INFECTIVITY IN GOAT KIDS OF AN *EIMERIA NINKOHLIYAKIMOVAE* STRAIN FROM GRAN CANARIA (SPAIN)

SUMMARY: Coccidiosis produced by *Eimeria* species constitutes one of the most important parasitic diseases for the caprine production systems, with special relevance in goat kids around weaning. Because of the importance of goat rearing in the Canary Islands and other arid and semi-arid zones of different geographical locations, the availability of a defined species of *Eimeria* could enable the possibility to develop experimental studies of basic and applied research on caprine coccidiosis. In the present study we intended to isolate a strain of *Eimeria ninkohlyakimovae* and to evaluate the infectivity in experimental conditions, as this *Eimeria* species is considered one of the most pathogenic for goats. The isolation was carried out using faecal samples from naturally infected animals. Afterwards, 4 week-old goat kids were infected with 2×10^5 sporulated oocysts and the infection was monitored based on parasitological, pathological and productive parameters. The strain which was isolated, named *E. ninkohlyakimovae* GC, had a prepatent period of 14-15 days and a noticeable pathogenicity. The clinical course was characterized by diarrhoea, dehydration and general impairment of the animals, and was associated to strong eosinophilic enterocolitis and delayed growth rates. Besides, the decrease of the OPG counts and the intensity of the clinical signs in challenged kids would indicate that the strain was able to induce a protective immune response in the host. Altogether, the data reported in the present study suggest that the strain *E. ninkohlyakimovae* GC could be used for the evaluation of the mechanisms of pathogenicity and the characterization of the host immune response in caprine coccidiosis, as prerequisites for the development of future strategies for prophylaxis and control of the disease.

Key words: *Eimeria ninkohlyakimovae*, GC Strain (Gran Canaria).

Correspondencia

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

Introducción

Las infecciones producidas por las diferentes especies del protozoo *Eimeria*, conocidas en medicina veterinaria como coccidiosis, constituyen unas de las parasitosis más frecuentes y más ampliamente distribuidas en los sistemas de producción caprinos (9). La parasitación por estos enteropatógenos, que independientemente de la forma de manejo puede afectar a casi un 100 % de los cabritos entre 4-10 semanas de edad, representa además uno de los principales motivos de pérdidas económicas para la producción caprina a nivel mundial (9). En un estudio epidemiológico realizado en Gran Canaria (España), donde la producción caprina constituye una de las principales fuentes económicas agropecuarias (7), se encontró que las especies más frecuentes en el ganado caprino eran *E. arloingi*, *E. ninakohlyakimovae*, *E. alijevi* y *E. caprina* (16), de las cuales *E. ninakohlyakimovae* se considera como la de mayor patogenicidad (9).

Las parasitosis producidas por el género *Eimeria* son altamente específicas de cada hospedador y las reacciones inmunológicas que inducen en el animal se aceptan como especie-específicas (14). Por este motivo, es esencial que la investigación básica y aplicada en coccidiosis caprina esté desarrollada en una especie precisa de *Eimeria*. En efecto, durante su desarrollo endógeno, los coccidios están sujetos a un fuerte control inmunológico que culmina con una inmunidad protectora una vez finalizada la infección, pero esta inmunidad sólo está restringida a la misma especie que la generó. Por otro lado, el desarrollo de estrategias inmuno-profilácticas frente a la coccidiosis caprina requiere del conocimiento de la respuesta inmune de la cabra frente a las infecciones por las diferentes especies de *Eimeria* y la identificación de los mecanismos de patogenicidad implicados en la interacción parásito-hospedador.

A diferencia de lo que ocurre en otras especies de *Eimeria*, especialmente en las *Eimeria* spp. aviares (15, 22), sólo se ha realizado un escaso número de infecciones experimentales en caprino con este protozoo Apicomplexa, fundamentalmente orientadas al estudio de los aspectos parasitológicos y biopatológicos de la enfermedad. Especialmente relevantes han sido los trabajos realizados con *E. ninakohlyakimovae* en Brasil (21) y China (4). La elevada patogenicidad y la alta prevalencia en Canarias de esta especie de *Eimeria*, junto con las similitudes biológicas con respecto a *E. bovis* en cuanto desarrollo de macroesquizontes en células endoteliales de vasos linfáticos (10), hacen de *E. ninakohlyakimovae* una especie modelo idónea para el estudio de la respuesta inmune y los mecanismos de patogenicidad en la coccidiosis caprina.

El presente estudio tuvo como objetivo el aislamiento de una cepa de origen caprino de *E. ninakohlyakimovae* definida y la realización de infecciones experimentales para valorar su grado infectividad, patogenicidad y capacidad de desarrollar

una respuesta inmune en los hospedadores. La disponibilidad de una especie definida de *Eimeria* podría permitir la realización de estudios experimentales de investigación tanto básica como aplicada sobre coccidiosis en el ganado caprino, que a su vez podrían constituir la base de futuras estrategias de profilaxis y control de la enfermedad.

Material y métodos

1. Parásitos

Para la obtención de una cepa definida de *E. ninakohlyakimovae*, los ooquistes se obtuvieron inicialmente a partir de animales infectados de forma natural siguiendo un protocolo similar al descrito por Silva y Lima (19) con ligeras modificaciones. Una vez que se confirmó que las heces eran positivas para esta especie en más de un 90%, las muestras se mezclaron con una solución saturada de ClNa con densidad 1,19 g/l y se realizó una concentración por flotación durante 40 min. Los ooquistes recogidos se diluyeron en dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$) al 2% p/v, se dispensaron

Figura 1. Recuentos de ooquistes por gramo de heces (OPG) en animales primoinfectados a las 4 semanas de edad (S4PI) con *E. ninakohlyakimovae*, reinfectados tres semanas más tarde (S7RI) y en los correspondientes controles de reinfección (S7PI). Los datos se expresan como valores transformados del log (OPG + 1) y se representan las medias \pm SEM.

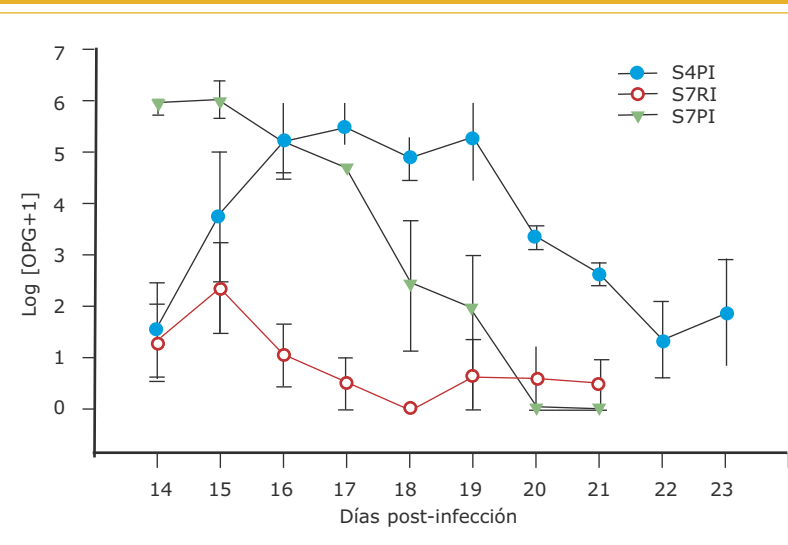
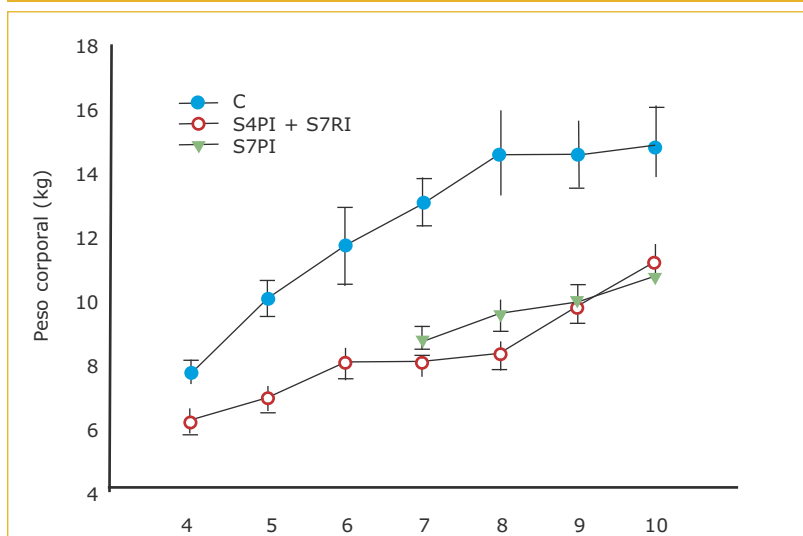


Figura 2. Evolución del peso corporal en animales primoinfectados a las 4 semanas de edad (S4PI) con *E. ninakohlyakimovae* y reinfectados tres semanas más tarde (S7RI), en animales infectados a las siete semanas (S7PI, controles de reinfección) y en los correspondientes animales controles no infectados. Se representan las medias \pm SEM.



en una placa de Petri formando una capa fina y se mantuvieron a temperatura ambiente (25 °C) durante una semana hasta la esporulación. A partir de los cultivos se purificaron aproximadamente 2×10^4 ooquistes esporulados de *E. ninakohlyakimovae* con una micropipeta utilizando un microscopio invertido de micromanipulación (Olympus IMT-2). Los ooquistes aislados de esta forma se inocularon vía oral a cabritos de 4 semanas de edad, siendo necesarios tres pases consecutivos para la obtención de una cepa 100% pura.

Para la obtención de los ooquistes necesarios para las infecciones experimentales se inocularon cabritos de 4 semanas de edad vía oral con 2×10^5 ooquistes esporulados de *E. ninakohlyakimovae*. Los ooquistes excretados por los animales donantes se aislaron a partir de las heces comenzando a las dos semanas postinfección de acuerdo con el método descrito por Jackson (8). Brevemente, el material fecal se disgregó en agua y se filtró por mallas de diámetro decreciente para eliminar residuos, y la solución resultante se mezcló al 50% con una solución concentrada de azúcar con 1,5 g/l de densidad. La

mezcla resultante se hizo flotar en recipientes rectangulares de aproximadamente 2 litros sobre los que se colocaron cristales de 25 x 25 cm. Los ooquistes adheridos a los cristales se recogieron cada dos horas, se diluyeron en agua destilada y se concentraron. La esporulación se llevó a cabo en matraces mediante incubaciones en una solución al 2% p/v de dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$) a temperatura ambiente. Los ooquistes esporulados se mantuvieron a 4 °C en botellas de cultivo de fondo plano hasta realizar las infecciones por no más de 6 meses.

2. Animales

Se utilizaron cabritos de 1-4 días de edad de la raza Majorera, que se compraron a ganaderos locales y se trataron con Vecoxan® (Labs. Esteve) y Halocur® (Intervet) para minimizar el riesgo de infección con coccidios. Cuando se consideraron libres de coccidios se ubicaron en jaulas de hierro galvanizado esterilizadas por calor en condiciones que previniesen las infecciones por parásitos. Los cabritos se alimentaron con lactoreemplazante (Bacilactol, Capisa) y

concentrados comerciales (Capisa). Recibieron agua y heno *ad libitum*. En la obtención de la cepa de *E. ninakohlyakimovae* se empleó un total de 8 cabritos y 9 animales adicionales se destinaron a la evaluación de las infecciones experimentales.

3. Diseño experimental

Para el desarrollo del experimento los cabritos se distribuyeron en 3 grupos, que se mantuvieron convenientemente separados entre sí evitando las infecciones con coccidios. En dos ensayos diferentes se evaluó la inmunoprotección conferida por primoinfecciones (Grupo S4PI) y posterior reinfección con ooquistes de *E. ninakohlyakimovae* (Grupo S7RI). El nivel de inmunoprotección se evaluó en base a parámetros productivos (peso corporal), clínicos (presencia de signos de eimeriosis, p.e. diarrea, variación de los patrones hemáticos), parasitológicos (recuentos de ooquistes en heces) e histopatológicos (lesiones macro y microscópicas en nódulos linfáticos mesentéricos e intestino). Las primoinfecciones se realizaron en animales de 4 semanas de edad mediante inoculaciones vía oral con una dosis de 2×10^5 ooquistes por animal (S4PI) y las reinfecciones tres semanas después con la misma dosis infectante (S7RI). Como control de reinfección se utilizaron cabritos primoinfectados en la semana 7 de vida (S7PI) y como control de infección (Grupo C) animales no infectados.

Desde el día 13 postinfección (tanto en primoinfecciones como en reinfecciones) se tomaron muestras de heces directamente del recto durante 8 días consecutivos para la realización de los análisis coprológicos. El análisis coprológico también se realizó en el Grupo C para constatar la ausencia de infección en los animales control. Semanalmente se recogieron muestras de sangre mediante punción yugular para el análisis hematológico y se determinó la evolución del peso corporal.

Adicionalmente, se tomaron muestras de sangre entre los días 16-17 post-infección, coincidiendo con el pico esperado de producción de ooquistes y, por tanto, con el momento de mayor gravedad dentro de la patencia.

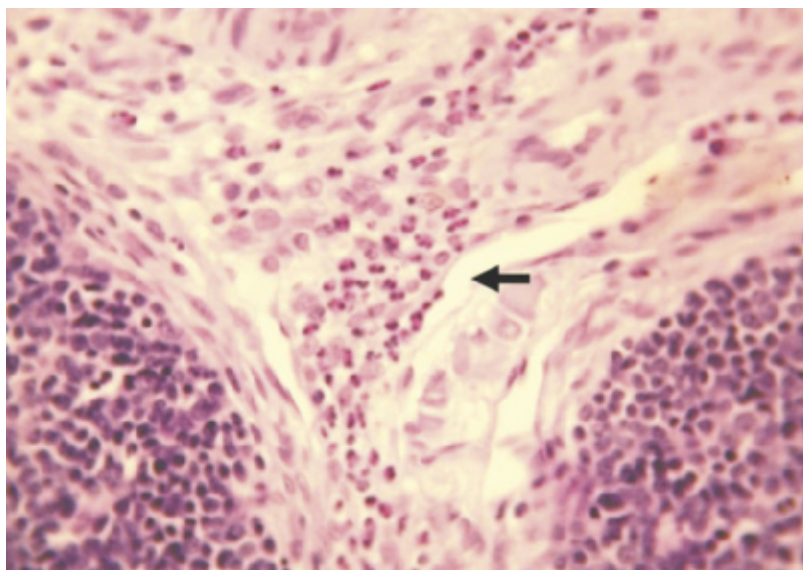
Finalmente, todos los animales se sacrificaron en la semana 10 de vida para el análisis anatomopatológico. En la necropsia se tomaron muestras de ganglios linfáticos mesentéricos y mucosa intestinal, principalmente íleon y colon.

4. Análisis coprológico, biopatológico e histopatológico

La presencia y la determinación del número de ooquistes por gramo de heces (OPG) en los animales de todos los grupos primo- o reinfectados se determinó a partir de muestras tomadas directamente del recto mediante la técnica de McMaster modificada y el método de concentración por flotación con CINa (13). Para la normalización de los resultados los recuentos fecales se transformaron en el Log (OPG+1).

Mediante el empleo del analizador hematológico LaserCyte (Idexx), se obtuvo el recuento de leucocitos totales y la concentración de hemoglobina. El valor hematocrito se determinó mediante centrifugación con tubos capilares estándar en centrífuga de microhematocrito. El recuento diferencial de leucocitos fue realizado manualmente, para ello se contaron 200 leucocitos en extensiones de sangre teñidas con la tinción panóptica (Diff-Quick).

Tras el sacrificio se practicó la necropsia a todos los animales y en ella se anotaron todas las lesiones macroscópicas. Se tomaron muestras de tejido (mucosa intestinal –incluyendo placas de Peyer– y nódulos linfáticos) que se fijaron en formol tamponado al 10%; posteriormente se incluyeron en bloques de parafina, se cortaron secciones de 4-5 micras y, finalmente, se tiñeron mediante hematoxilina y eosina (H&E). En el



▲ Figura 3. Microfotografía tomada a 20 x 5 aumentos en la submucosa del íleon distal en las proximidades de una Placa de Peyer en un corte teñido con H/E. Nótese el gran infiltrado inflamatorio con predominio de eosinófilos (ver flecha).

análisis microscópico se consideraron aspectos anatomopatológicos tales como la presencia de infiltrado leucocitario (fundamentalmente, eosinófilos y linfocitos), hiperplasia e hipertrofia de la mucosa intestinal, engrosamiento y fusión de las vellosidades intestinales, edema y congestión, o la existencia de los diferentes estados evolutivos del parásito.

Resultados

1. Características de la cepa GC de *E. ninakohlyakimovae*

Los ooquistes de *E. ninakohlyakimovae* presentaron un tamaño medio de 22,7 x 16,2 μm con valores que oscilaron entre 16,5 - 28,2 μm (diámetro longitudinal) y 12,0 - 20,8 μm (diámetro transversal). Su morfología fue de redondeada a ligeramente ovoide, el micropilo era poco manifiesto y la cápsula micropilar estuvo ausente. El tiempo de esporulación medio a temperatura ambiente (22 - 25 $^{\circ}\text{C}$) osciló entre 72 - 96 h. Los esporoquistes presentaron una morfología elongada, con un tamaño medio aproximado de 11,9 x 6,1 μm y estaban provistos de cuerpo de Stieda. Se observó cuerpo residual del esporoquiste y gránulos polares. El interior del

ooquiste presentaba una coloración rosa-anaranjada brillante y con frecuencia se encontraron granulaciones dispersas entre los esporocistos.

2. Análisis coprológicos

El periodo prepatente tanto en animales primo- como reinfectados osciló entre 14-15 días, siendo mayor la proporción de cabritos que comenzaron a liberar ooquistes en heces a los 15 días post-infección. No se observaron diferencias significativas entre el comienzo de la liberación de ooquistes entre animales primo- y reinfectados ni entre los primoinfectados a edades distintas (S4PI vs S7PI).

El recuento de ooquistes en las heces en los animales primoinfectados a las 4 semanas de edad se incrementó a partir de los 14 días post-infección llegando a valores máximos entre el día 17 y 18 post-infección. A partir de este momento los valores de OPG disminuyeron gradualmente hasta alcanzar valores próximos a cero. En los animales primoinfectados a las 4 semanas y reinfectados a las 7 semanas de edad (S7RI) el recuento de ooquistes en heces fue significativamente menor durante toda la experiencia con respecto al control de reinfeción

(S7PI), observándose el pico máximo de OPG el día 15 post-infección. En los animales primoinfectados a las 7 semanas de edad el recuento de ooquistes se incrementó bruscamente desde el día 14 post-infección, alcanzando valores máximos al día siguiente (día 15 p.i.) y disminuyendo progresivamente hasta el final del muestreo. No se observó presencia de ooquistes en heces en ninguna de las muestras analizadas pertenecientes a los animales controles (Grupo C).

3. Estudio clínico y productivo

Los animales primoinfectados a las 4 semanas de edad (S4PI) y reinfectados a las 7 semanas (S7RI), así como los primoinfectados a las 7 semanas (S7PI) presentaron un patrón de crecimiento significativamente menor que en los animales controles (C), con pesos máximos aproximados de 14 y 10 kg de peso vivo, respectivamente (Fig. 2).

Con grado variable de intensidad, todos los animales primoinfectados a las 4 semanas de vida presentaron signos clínicos compatibles con coccidiosis, incluyendo diarrea de consistencia variable (en ocasiones totalmente líquida y con tinte sanguinolento), deshidratación, deterioro del aspecto general del animal, anorexia y, ocasionalmente, postración. Puntualmente, los animales tuvieron que ser rehidratados vía oral y subcutánea con suero salino. Los signos clínicos comenzaron aproximadamente a los 13-14 días post-infección y se extendieron durante unos 4-6 días. Cuando este mismo lote de animales se reinfectó (Grupo S7RI), la clínica presentada fue mucho menos evidente, a veces imperceptible. Por otro lado, al comparar los animales primoinfectados a las 4 semanas (S4PI) con los primoinfectados a las 7 semanas (S7PI, control de reinfección), se observó que los infectados a mayor edad mostraron un cuadro clínico ligeramente menos severo.

4. Análisis biopatológico y anatómico

Los niveles de proteínas totales en suero disminuyeron de forma moderada en los animales primoinfectados (S4PI, S7PI), especialmente a partir de los días 16-17 post-infección (Tabla 1). La serie roja no experimentó grandes cambios, aunque se observó que en los animales de los grupos S4PI y S7RI, el valor hematocrito permaneció siempre más bajo que en los animales del grupo S7PI. Sobre los 14-16 días p.i. (S4PI y S7PI), el valor hematocrito aumentó ligeramente coincidiendo con el periodo de patencia en los animales primoinfectados (Tabla 1). Los cambios en la serie blanca se concretaron en una ligera desviación a la izquierda, más manifiesta en el grupo S4PI a los 16 días p.i., y en una moderada eosinofilia en las últimas semanas post-infección en el grupo S7PI (Tabla 1).

En la necropsia, el intestino de los animales inoculados no mostó cambios

Tabla 1. Resultados biopatológicos. Parámetros hematológicos en animales primoinfectados a las 4 semanas de edad (S4PI) con *E. ninakohlyakimovae* y reinfectados tres semanas más tarde (S7RI) y en animales infectados a las siete semanas (S7PI, controles de reinfección). Se representan los valores medios de proteínas totales (PT), hematocrito (HTO), hemoglobina (HGB), recuento total de leucocitos (WBC), neutrófilos (NEU), neutrófilos en banda (BAN), linfocitos (LYM), monocitos (MONO) y eosinófilos (EOS).

	PT	HTO	HGB	WBC	NEU	BAN	LYM	MONO	EOS
Grupo S4PI (animales primoinfectados a las 4 semanas)									
0 dpi	4,8	26	8,4	11753	6178	0	5363	102	110
7 dpi	5,0	24	7,2	8540	4691	0	3561	223	65
14 dpi	4,7	25	7,8	8535	3692	0	4772	0	71
16 dpi	4,6	28	8,2	11953	4417	617	6666	253	0
21 dpi	4,6	25	7,2	13873	7754	0	6046	0	73
Grupo S7RI (animales reinfectados a las 7 semanas)									
7 dpri	4,7	24	7,4	10488	5436	76	4458	93	424
14 dpri	4,9	27	8,3	10180	3783	0	6069	0	327
17 dpri	4,9	27	8,2	9125	4079	0	4856	25	165
21 dpri	4,9	27	8,7	9478	3875	0	5296	93	212
Grupo S7PI (animales primoinfectados a las 7 semanas, control de reinfección)									
0 dpi	5,2	30	8,6	12797	7228	0	5345	38	186
7 dpi	5,0	31	9,7	11097	6033	30	4312	135	587
14 dpi	4,8	38	10,5	10703	4674	22	5477	121	408
17 dpi	4,5	35	10,1	12490	5502	39	6141	109	699
21 dpi	4,9	32	10,2	12767	6355	0	5804	90	518

relevantes. Histológicamente, se observó una moderada hiperplasia del epitelio intestinal, ligera reacción de los nódulos linfáticos y placas de Peyer, enteritis eosinofílica (Fig. 3) e infiltración difusa de mastocitos, linfocitos y PMN. Las formas parasitarias sólo se encontraron de forma puntual y consistieron con formas sexuales de *Eimeria*, fundamentalmente ooquistes. Los animales control no mostraron cambios morfológicos destacables.

Discusión

En base a los resultados obtenidos durante el diseño experimental, se puede concluir que la cepa de *E. ninakohlyakimovae* aislada en Gran Canarias (cepa GC), cuyas características morfológicas y biológicas coinciden con lo descrito para esta especie de *Eimeria* en diferentes referencias bibliográficas (1, 10), es capaz de desarrollar coccidiosis patentes en los cabritos lactantes tras infecciones experimentales realizadas a las 4 semanas de vida, al tiempo que desarrollar una respuesta inmune protectora tras reinfecciones a las 3 semanas.

La patogenicidad de *E. ninakohlyakimovae* se puso de manifiesto por la intensidad de los signos clínicos, especialmente severos en los animales primoinfectados a las 4 semanas. El cuadro clínico fue similar al descrito en trabajos previos, tanto en infecciones naturales de campo (9) como en infecciones experimentales realizadas con diferentes dosis infectantes (4), donde incluso la mitad de la dosis empleada en el presente estudio (1×10^5 ooquistes) fue capaz de desarrollar una clínica severa en animales infectados a las tres semanas de edad. En este último trabajo, dosis infectantes mayores de 1×10^6 ooquistes se relacionaron con una mayor severidad de los signos clínicos; sin embargo, no se señaló la muerte de ningún animal a lo largo del estudio. Esta circunstancia contrastaría con la evolución del cuadro clínico en algunos de los animales primoinfectados observada en este trabajo, cuyo pronóstico

fue evaluado con tal gravedad que se optó por el tratamiento de urgencia con fluidoterapia y administración de vitaminas. Tales observaciones podrían indicar que la patogenicidad de la cepa GC de *E. ninakohlyakimovae* sería mayor que la de la cepa china utilizada por Dai *et al.* (4) en sus experimentos. Diferencias entre cepas con respecto a virulencia también se han descrito para diversas especies de *Eimeria* aviares (11, 12).

La primera aparición de los signos clínicos ocurrió entorno al comienzo del periodo de prepatencia y fue especialmente manifiesta entre los días 16-18 post-infección en los animales primoinfectados, coincidiendo con la evolución de la producción de ooquistes, posiblemente como consecuencia de la rotura masiva de células epiteliales a nivel de colon y ciego (21). La patencia fue relativamente corta cuando se comparó con lo descrito en infecciones experimentales de similares características (4), donde los signos clínicos en los diferentes grupos experimentales se observaron como mínimo durante diez días. En el presente estudio, prácticamente todos los animales volvieron a presentar heces de consistencia normal, apetito y actividad entre los días 5-8 post-infección. Coincidiendo con estas observaciones, las alteraciones anatomopatológicas que se observaron en el momento del sacrificio (realizado en el periodo post-patente—entre 21 y 23 días post-infección—) no fueron especialmente relevantes. No obstante, se observaron lesiones inflamatorias de relativa gravedad, con un componente eosinofílico importante, moderada hiperplasia de las células epiteliales e hiperplasia reactiva de los nódulos linfáticos mesentéricos locales, de forma similar a lo descrito en trabajos previos (4).

A pesar de la gravedad del cuadro clínico, los cambios hematológicos no fueron tan manifiestos como se esperaba en un principio, ni siquiera en los días 16-17 días post-infección, donde la intensidad de los signos clínicos

fue más acusada. Tales cambios, que podrían haber estado enmascarados por la deshidratación y/o la fluidoterapia, tampoco fueron especialmente llamativos en infecciones experimentales previas con *E. ninakohlyakimovae* en caprinos (4) o en corderos infectados con *E. ovinoidalis* y *E. faurei* (3, 18). En todos estos trabajos los niveles de proteínas totales en suero no variaron significativamente, posiblemente porque el descenso de los niveles de albúmina sérica estuvo compensado por el incremento de los niveles de globulinas plasmáticas (3). El descenso de los niveles de albúmina descrito por Chapman (3) a partir del día 15 p.i., vendría a corresponderse con la moderada disminución de las proteínas totales observada en el presente estudio, cuyo descenso empezó a ser manifiesto a partir de esa misma fecha, aproximadamente. El incremento del valor hematocrito observado en los animales primoinfectados coincide con lo descrito en trabajos previos (3, 4, 18), que explicaron esta situación por una disminución del volumen total de sangre circulante resultado de la diarrea y las hemorragias intestinales ocasionadas por el parásito.

La disminución de la ganancia de peso corporal ocasionada por la coccidiosis en rumiantes ha sido ampliamente documentada (1, 5). Se asume que las coccidiosis subclínicas pueden incluso aumentar los índices de conversión y, por su frecuencia, ocasionar pérdidas económicas que podrían exceder a las originadas por la coccidiosis clínica (6). El retraso del crecimiento en los animales infectados con *E. ninakohlyakimovae* respecto a los animales control observada en el presente estudio corrobora la importancia de la coccidiosis en los sistemas de producción caprina. Cabría esperar no obstante una afectación de los parámetros productivos mucho más manifiesta en condiciones de campo, especialmente en explotaciones con deficiencias higiénico sanitarias y de manejo, donde lo habitual no es una infección puntual

sino repetidas infecciones, a veces con dosis infectantes extraordinariamente altas (hasta de más de 1×10^6 ooquistes/día). Coincidiendo con esta posibilidad, cabritos infectados de forma experimental con dosis diarias de ooquistes de *E. ninakohlyakimovae* presentaron periodos de diarrea y de patencia en general mucho más prolongados (4).

La reducción significativa de los recuentos de OPG en los cabritos reinfectedos (S7RI) con respecto a los controles de reinfección (S7PI), junto con la menor gravedad del cuadro clínico en el grupo reinfectedo, es indicativa de que la cepa GC de *E. ninakohlyakimovae* es capaz de generar en el hospedador una respuesta inmune protectora, un fenómeno habitual entre los coccidios del género *Eimeria*, tal y como se ha descrito para diversas especies de rumiantes (20), aviares (15) y de roedores (17). Sin embargo, el grado de protección no es siempre lo suficientemente efectivo como para prevenir la aparición de signos clínicos tras las reinfecciones, especialmente cuando se utilizan dosis elevadas. De acuerdo con esto, Dai *et al.* (4) consiguieron proteger sólo parcialmente a cabritos primoinfectados con 1×10^5 ooquistes y reinfectedos con 1×10^6 ooquistes a los 32 días.

La respuesta inmune frente a *E. ninakohlyakimovae*, cuyo componente local se relacionó en el presente estudio con un fuerte infiltrado eosinofílico en la mucosa intestinal, es probablemente el resultado de un cúmulo de factores dependientes del parásito (dosis primoinfectante y de reinfección, virulencia de la cepa, etc.) y del hospedador (estado general de los animales, raza, edad, etc.). En lo referente a este último factor, la edad, el análisis comparativo del grupo primoinfectado a las 4 semanas (Grupo S4PI) y el primoinfectado a las 7 semanas de vida (S7PI) demostró que, aunque el periodo de prepatencia fue aproximadamente el mismo (14-15 días), la máxima producción de ooquistes se produjo antes

en los animales infectados a mayor edad y, por el contrario, el periodo total de liberación de ooquistes se redujo considerablemente. Este último dato podría estar relacionado con la menor intensidad del cuadro clínico encontrada en los cabritos primoinfectados a las 7 semanas. Aunque éste y otros aspectos inmunológicos sobre la coccidiosis caprina habrían de ser investigados en profundidad en posteriores estudios, en su conjunto, las anteriores evidencias indicarían que animales de mayor edad serían más receptivos a la infección por *E. ninakohlyakimovae*, pero al mismo tiempo más inmunocompetentes a la hora de controlar el curso de la enfermedad.

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. Alyousif, M. S.; Kasim, A. A.; Al-Shawa; Y. R. (1992) Coccidia of the domestic goat (*Capra hircus*) in Saudi Arabia. *Int J Parasitol* 22, 807-811.
2. Alzieu, J. P.; Mage, C.; Maes, L.; Mûelenaere, C. (1999) Economic benefits of prophylaxis with diclazuril against subclinical coccidiosis in lambs reared indoors. *Vet Rec* 144:442-444.
3. Chapman, H. D. (1974) The effects of natural and artificially acquired infections of coccidia in lambs. *Res Vet Sci* 16:1-6.
4. Dai, Y. B.; Liu, X. Y.; Liu, M.; Tao, J. P. (2006) Pathogenic effects of the coccidium *Eimeria ninakohlyakimovae* in goats. *Vet Res Commun* 30:149-60.
5. Dauschies, A.; Agneessens, J.; Goossens, L.; Mengel, H.; Veys, P. (2007) The effect of a metaphylac-

tic treatment with diclazuril (Vecoxan) on the oocyst excretion and growth performance of calves exposed to a natural *Eimeria* infection. *Vet Parasitol* 149:199-206.

6. Fox, J. E. (1985) Coccidiosis in cattle. *Mod Vet Pract* 66: 113-116.
7. Fresno, M. R.; Gómez, J.; Molina, A.; Darmanin, N.; Capote, J. F.; Delgado, J. V. (1994) Preliminary study of milk production in Majorera goat breed. *Arch Zootecnia* 43:181-186.
8. Jackson, A. R. (1964) The isolation of viable coccidial sporozoites. *Parasitology* 54:87-93.
9. Koudela, B.; Boková, A. (1998) Coccidiosis in goats in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 76: 261-267.
10. Levine, N. D.; Ivens, V. (1986) The coccidian parasites (Protozoa, Apicomplexa) of Artiodactyla. Urbana: University of Illinois Press, pp. 120-141.
11. Li, G. Q.; Kanu, S.; Xiang, F. Y.; Xiao, S. M.; Zhang, L.; Chen, H. W.; Ye, H. J. (2004) Isolation and selection of ionophore-tolerant *Eimeria* precocious lines: *E. tenella*, *E. maxima* and *E. acervulina*. *Vet Parasitol* 119:261-276.
12. Loo, S. S.; Blake, D. P.; Mohd-Adnan, A.; Mohamed, R.; Wan, K. L. (2010) *Eimeria tenella* glucose-6-phosphate isomerase: molecular characterization and assessment as a target for anti-coccidial control. *Parasitology* 137:1169-1177.
13. Manual de Técnicas de Parasitología Veterinaria (MAFF) (1989) Ministerio Británico de Agricultura, Pesca y Alimentación, Londres.
14. Rose, M. E. (1987) Immunity to *Eimeria* infections. *Vet Immunol Immunopathol* 17: 333-343.
15. Rothwell, L.; Young, J.R.; Zoorob, R.; Whittaker, C. A.; Hesketh, P.; Archer, A.; Smith, A. L.; Kaiser, P. (2004) Cloning and characterization of chicken IL-10 and its role in the immune response to *Eimeria maxima*. *Journal of Immunology* 173: 2675-2682.
16. Ruiz, A.; González, J. F.; Rodríguez, E.; Martín, S.; Hernández,

- Y. I.; Almeida, R.; Molina, J. M. (2006) Influence of climatic and management factors on *Eimeria* infections in goats from semi-arid zones. *J Vet Med B* 53: 399-402.
17. Shi, M.; Huther, S.; Burkhardt, E.; Zahner, H. (2001) Lymphocyte subpopulations in the caecum mucosa of rats after infections with *Eimeria separata*: early responses in naive and immune animals to primary and challenge infections. *Int J Parasitol* 31:49-55.
18. Shumard, R. F. (1957) Studies on ovine coccidiosis. I. Some physiological changes taking place in experimental infections with *Eimeria ninae-kohl-yakimovi* (Yakimov and Rastegaeva, 1930) and *Eimeria faurei* (Moussu and Marotel, 1901). *J Parasitol* 43: 548-554
19. Silva, A.C.; Lima, J. D. (2000) Endogenous development of *Eimeria minasensis* in experimentally infected goats.. *J Parasitol* 86: 428-431.
20. Taubert, A; Hermosilla, C.; Sühwold, A.; Zhaner, A. (2008) Antigen-induced cytokine production in lymphocytes of *Eimeria bovis* primary and challenge infected calves *Vet Immunol Immunopathol* 126 (2008) 309-320.
21. Vieira, L. S.; Lima, J. D.; Rosa, J. S. (1997) Development of *Eimeria ninakohlyakimovae* Yakimoff & Rastegaieff, 1930 emend. Levine, 1961 in experimentally infected goats (*Capra hircus*). *J Parasitol* 83:1015-1018.
22. Yun, C. H.; Lillehoj, H. S.; Lillehoj, E. P. (2000) Intestinal immune responses to coccidiosis. *Develop Comp Immunol* 24:303-324.