

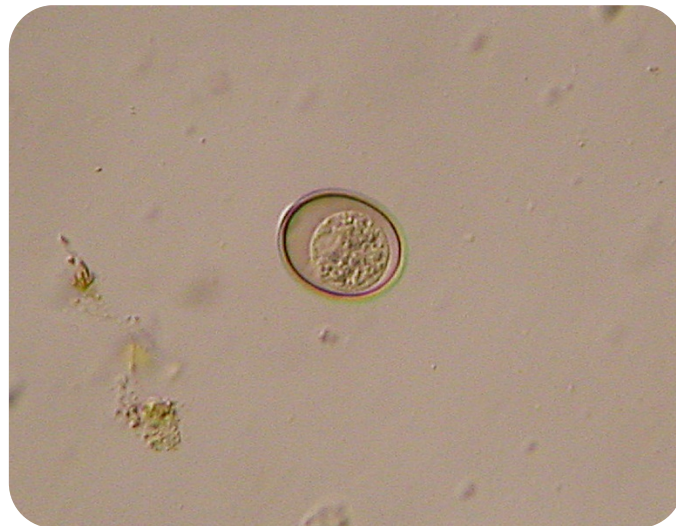
**TESIS DOCTORAL 2024**



**PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN EN BIOMEDICINA**  
**VALORACIÓN DE DISTINTOS MÉTODOS**  
**PARA UN CONTROL INTEGRADO DE LA COCCIDIOSIS CAPRINA**

---

ARÁNZAZU DEL CARMEN GUEDES SANTANA



Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

# ÍNDICE

<b>Agradecimientos.....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción y objetivos .....</b>	<b>3</b>
Introducción .....	3
Objetivos .....	4
<b>Revisión Bibliográfica.....</b>	<b>5</b>
Introducción.....	5
Etiología y clasificación .....	6
Epidemiología.....	10
Respuesta inmune.....	15
Patología .....	16
Patogenia .....	16
Clínica .....	17
Lesiones .....	18
Diagnóstico .....	19
Tratamiento .....	23
Control .....	27
<b>Presentación de artículos.....</b>	<b>31</b>
Primer artículo .....	31
Segundo artículo .....	39
Tercer artículo.....	51
<b>Conclusiones .....</b>	<b>62</b>
<b>Resumen - Summary.....</b>	<b>63</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>65</b>



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

Programa de Doctorado: **“INVESTIGACIÓN EN BIOMEDICINA”**

**Título de la Tesis**

**VALORACIÓN DE LOS DISTINTOS MÉTODOS PARA UN CONTROL  
INTEGRADO DE LA COCCIDIOSIS CAPRINA**

Tesis doctoral presentada por: **Dña. Aránzazu del Carmen Guedes Santana**

Dirigida por el **Dr. Antonio Ruiz Reyes** y el **Dr José Manuel Molina Caballero**

**La Doctoranda**

Aránzazu del Carmen Guedes Santana

**Los directores**

**José Manuel Molina Caballero**

**Antonio Ruiz Reyes**

Arucas, febrero 2024

**D. Antonio Ruiz Reyes**, Doctor en Veterinaria y Profesor Titular del Área de Parasitología y **D. José Manuel Molina** Caballero, Catedrático del Área de Parasitología, ambos pertenecientes al Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos (Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria),

**INFORMAN:**

Que la tesis doctoral que lleva por título **“Valoración de distintos métodos para un control integrado de la coccidiosis caprina”** ha sido realizada por la licenciada en Veterinaria **Dña. Aránzazu del Carmen Guedes Santana** en el Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la (Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria) bajo nuestra dirección y asesoramiento, y consideramos que cumple la normativa vigente para optar al Grado de Doctor en Veterinaria por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

En Arucas (Las Palmas) a 15 Febrero de 2024

**Fdo. José Manuel Molina Caballero**

**Fdo. Antonio Ruiz Reyes**



# **1. AGRADECIMIENTOS**



## 1. AGRADECIMIENTOS

La vida es un viaje lleno de momentos. Llegar hasta aquí ha sido un proceso de prueba constante desde el mismísimo principio de la vida. El camino nunca es recto. Siempre te encuentras baches pequeños, baches grandes y barrancos que pueden ser cruzados, o no. Muchas veces he tenido que dar rodeos porque no podía cruzar; ya sea por causas naturales o humanas. Cuando poco a poco vas haciendo camino puedes pensar que has perdido el tiempo, que otros van por delante de ti. Yo creo que lo más importante es no dejar de correr, si no puedes correr anda, si no puedes andar ve con muletas, y si por casualidad ni eso tienes, hay que avanzar, aunque sea con la mente, con los sueños. No te pares nunca porque la Tierra no va a dejar de rotar. No importa lo solo que estés.

Quiero dar primero gracias a Dios. Él me mandó a este mundo y me puso donde estoy, simplemente movió los hilos que creyó conveniente para guiarme en el camino. “Tú, principio eminentísimo, que eres llamado fuente de luz y sabiduría, difunde tu claridad sobre las dos tinieblas de mi mente con las cuales he nacido, removiendo ambas, las del pecado y la ignorancia.” Gracias por su bendición.

Doy gracias también a mi familia, a mi hija Victoria, que desde el principio y aunque fuera con corta edad demostró y demuestra una paciencia y comprensión infinita, sin trabas, sin peros. Simplemente entendía que era necesario. A mi marido Jeremías porque sin él no hubiera ni siquiera acabado la licenciatura. También entendió que era necesario, espero no defraudarlo.

Por supuesto no puedo dejar de dar las gracias a mis directores de tesis Antonio Ruiz y José Manuel Molina. Gracias sobre todo por tu paciencia, tu confianza en mí, por enseñarme a no parar y sobre todo por darme siempre otra oportunidad, aunque metiera la pata hasta el fondo tantas veces. Nunca voy a poder agradecer todo esto.

Doy Gracias a toda la unidad docente de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, a todos los que conforman el Departamento de Patología Animal y la Facultad de Veterinaria. Cada uno llegó a poner su granito de arena para llegar aquí, desde el personal de administración y servicios, laboratorio, profesorado y compañeros hasta llegar al decanato. Todos jugaron un papel en el proceso. Son tantos que no se si me olvido de alguno, si es así, que me lo haga saber; mi memoria ya no da para tanto.

No debo olvidar a tantas otras personas pertenecientes a instituciones externas, donde complementé mi formación. Todo el personal de los centros veterinarios donde hice prácticas: “Pardela” y “Albéitar”. El Hospital Dr. Negrín de Las Palmas de Gran Canaria, donde aprendí que, en lo que se refiere a oncología, contamos con grandes profesionales y que estamos en muy buenas manos. A la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, su Departamento de Parasitología y la Comunidad Autónoma de Aragón donde llevé a cabo estancias de investigación: gracias por organizar todo el proceso y gracias a todos los forestales que me acompañaron en el muestreo.

Por último, gracias a mis amigos que entendieron lo que hacía y porqué lo hacía y a los extraños y anónimos que consciente o inconscientemente me ayudaron de cualquier manera a avanzar. Gracias por estar ahí, por animarme, por desearme suerte, por respetar mi trabajo, por no juzgarme, por hacerme feliz, por levantar mi ánimo cuando lloré, por decirme “sigue adelante”, por decirme “tú puedes”, por poner una mano en mi hombro o cogerme la mano. De todo eso no me olvido.

A todos: GRACIAS

La realización de esta tesis ha sido financiada en base a los siguientes proyectos de investigación:

Ministerio de Educación y Ciencia, Innovación Tecnológica 2008-2010

PROYECTO: AGL2007-63415

RESPUESTA INMUNE Y MECANISMOS DE PATOGENICIDAD EN LA COCCIDIOSIS CAPRINA:  
IMPLICACIONES EN LA PROFILAXIS Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD

Gobierno de Canarias, ACIISI (Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información)

ENSAYOS DE VACUNACIÓN FRENTE A LA COCCIDIOSIS CAPRINA MEDIANTE EL EMPLEO DE OOQUISTES ATENUADOS POR IRRADIACIÓN

PROYECTO: ProID2017010039



## **2. INTRODUCCIÓN**





## 2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 2.2. INTRODUCCIÓN

*Eimeria* forma parte del phylum Apicomplexa, clase Sporozoea, subclase Coccidia, orden Eucoccidia, suborden Eimeriina y familia Eimeriidae. Con el nombre de *Eimeria* se denomina a un género de protozoos que afecta al sistema digestivo (intestino delgado y grueso) de diferentes especies animales. Es un parásito muy específico en cuanto a la especie hospedadora a la que afecta, incluso en especies muy próximas como ovinos y caprinos. En los caprinos se han descrito más de 15 diferentes de *Eimeria*, siendo las más patógenas *E. ninakholyakimovae*, *E. arloingi* e *E. christenseni*.

La coccidiosis caprina es una de las enfermedades parasitarias con una distribución geográfica más amplia a nivel mundial. Se puede encontrar en diversas partes del continente europeo, Asia, África y América, adaptándose perfectamente a multitud de climas. Esto es debido a la alta resistencia al medio ambiente que presentan los elementos de diseminación (ooquistes). A menudo, independientemente de la edad, todos los animales de una explotación pueden estar infectados, pero la enfermedad afecta sobre todo a cabritos desde las 2 semanas hasta los 4 meses de edad, aproximadamente. Uno de los periodos de mayor susceptibilidad es el destete, debido al estrés de la separación de las madres y el cambio de alimentación, pero también el traslado y las condiciones de hacinamiento pueden favorecer la coccidiosis clínica. En cambio, los adultos suelen actuar como portadores asintomáticos, no siendo posible detectar la presencia del parásito a menos que se realicen exámenes coprológicos rutinarios. Los animales jóvenes, debido a la gran cantidad de ooquistes que pueden llegar a liberar con las heces, son los que general mayor contaminación ambiental y, por tanto, son los que mantienen el ciclo activo del parásito. Por este motivo, pocas semanas de las parideras es frecuente encontrar cuadros de coccidiosis en animales jóvenes con síntomas que pueden ser muy graves, llegando incluso a causar la muerte.

El control de la carga parasitaria ambiental es un punto clave para el tratamiento de esta enfermedad. Limpiar completamente el medio de ooquistes, sobre todo en explotaciones de régimen extensivo, no es aplicable. Sería más factible en regímenes intensivos, pero habrían de seguirse unas medidas higiénicas rigurosas: retirada frecuente del estiércol, barrido y desinfección de zonas cementadas y utensilios, vigilar que no se contaminen la comida y el agua a los que los animales tienen acceso, etc. En general, las medidas de control ambiental habrían de ser especialmente exhaustivas en las instalaciones donde se alojan los cabritos, dada su mayor susceptibilidad a padecer coccidiosis clínica.

Realmente, no se puede llegar a desinfectar una explotación ganadera al 100%, por este motivo, aparte de las medidas higiénicas ambientales, para el control de la carga de ooquistes debemos tratar a los animales de manera profiláctica o metafiláctica mediante anticoccidiósicos. Hay en el mercado un gran número de compuestos para el tratamiento y prevención de la coccidiosis pero, en la Unión Europea, hasta el momento, no hay ninguno registrado para la especie caprina, por lo se utilizan de forma empírica en base a las recomendaciones para otras especies de rumiantes. Por tanto, conocer la eficacia de los anticoccidiósico en los caprinos, las dosis recomendadas y la frecuencia de tratamiento sería importante, no sólo para un uso racional del producto, sino también para evitar la aparición de resistencias.

Sin embargo, a pesar de que el empleo de anticoccidiósicos sigue siendo un pilar fundamental para el control de la coccidiosis, la limitación a nivel de la Unión Europea de su uso, los residuos que estos compuestos dejan en los productos animales (leche, carne), la demanda de los consumidores de alimentos orgánicos y la creciente aparición de fenómenos de resistencia anticoccidiósica, han motivado el desarrollo de estrategias alternativas de control, entre las cuales se encuentra la inmunoprofilaxis.

## 2.2. OBJETIVOS

- Evaluar los efectos de diferentes estrategias de tratamiento con el anticoccidiósico diclazuril (Vecoxan<sup>®</sup>, Janssen-Cilag) para prevenir la coccidiosis clínica en cabritos infectados de forma natural por *Eimeria* spp.
- Evaluar los efectos clínicos y parasitológicos de diferentes tratamientos metafilácticos con toltrazuril (Baycox<sup>®</sup>) en cabritos naturalmente infectados con *Eimeria* spp.
- Analizar, en ambos casos, mediante la comparativa de grupos, la dosis y momento en que habría de administrarse el producto, que resulten más eficaces según la fase de la enfermedad y las características del medio donde se encuentren los animales.
- Evaluar el grado de protección frente a la coccidiosis caprina tras la inmunización con ooquistes de *E. ninakohlyakimovae* atenuados por irradiación X y posterior infección homóloga con ooquistes no atenuados del parásito.



### **3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA: EIMERIOSIS CAPRINA

#### 3.1. INTRODUCCIÓN

Con el nombre de eimeriosis se conoce al conjunto de enfermedades producidas por especies del género *Eimeria* (subclase Coccidia), causantes de parasitosis fundamentalmente intestinales y altamente contagiosas (**Lefevre y Blancou, 2010**). Aunque en la subclase Coccidia, además del género *Eimeria*, se incluyen otros como *Isoospora*, *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Neospora*, *Hammondia*, *Besnoitia* y *Frenkelia*, las infecciones por *Eimeria* se conocen comúnmente como coccidiosis, y a esta nomenclatura nos referiremos a lo largo del manuscrito.

Los coccidios del género *Eimeria* son parásitos intracelulares de las células epiteliales del intestino delgado y grueso de los hospedadores, aunque no exclusivamente. Entre las localizaciones extra-intestinales más frecuentes se encuentran el hígado y el riñón aunque, en menor frecuencia, también se han observado en el bazo y en el pulmón (**Collins et al. 1988; Dai et al., 1991; Morgan et al., 2013**). Su acción patógena fundamental se debe a la destrucción celular que resulta de los ciclos de reproducción asexual y sexual de su ciclo endógeno (**Stockdale, 1980**).

La coccidiosis caprina es una enfermedad cosmopolita, pero con especial relevancia en zonas geográficas semiáridas que dependen económicamente de la producción caprina, como la cuenca mediterránea, el norte de África y determinadas regiones de Asia o América Latina, donde las infecciones por *Eimeria* pueden afectar a la salud animal y de ahí la rentabilidad de la producción caprina (**Cavalcante et al. 2012**).

Los animales adultos suelen hacerse resistentes después de sobrevivir al periodo crítico durante las primeras semanas de vida, transformándose entonces en reservorios y portadores inaparentes del parásito (**Dauguscheis y Najdrowski, 2005**). Por el contrario, los animales jóvenes son los más susceptibles de padecer la enfermedad, especialmente entre las 2 semanas y los 4 meses de vida (**Ruiz et al., 2006**). La tasa de mortalidad por esta enfermedad puede llegar al 50% de los jóvenes y aquellos que no mueren sufren un retraso en el crecimiento significativo, lo que resulta en pérdidas económicas importantes (**Jalila et al. 1998; Smith y Sherman, 2009**).

Los coccidios están presentes en todas las ganaderías de rumiantes, aunque esto no quiere decir que en todas ellas se desarrolle la enfermedad. No se conocen con exactitud los mecanismos que desarrollan una coccidiosis patente; lo que sí están claros son los factores de riesgo: destete, transporte, entrada en cebaderos, partos múltiples, madres mal alimentadas, ubres sucias, problemas de mastitis, etc., situaciones todas ellas típicas del sistema de crianza y engorde de rumiantes (**Sanz, 2000**).

En general, la coccidiosis en los rumiantes es el resultado de una compleja interacción entre huésped y parásito en la que intervienen, además, numerosos factores externos que pueden condicionar la severidad de la enfermedad, por lo que, a pesar de los avances logrados en los últimos años en el estudio de los ciclos de vida, la patogenia, la epidemiología y el control, la coccidiosis en los rumiantes presenta, aún en la actualidad, muchos aspectos sin aclarar. Además, muchos de los ciclos de vida de las

especies que se consideran de menor importancia aún no se han dilucidado y existe controversia sobre la patogenicidad de algunas de ellas. En este contexto, se ha observado que los brotes de coccidiosis se producen con una frecuencia cada vez mayor, lo que contrasta con la escasa disponibilidad comercial de medicamentos para su tratamiento y prevención; asimismo, son limitadas las investigaciones que se han llevado a cabo sobre los métodos inmunológicos de control (**Taylor y Catchpole, 1994**).

## 3.2. ETIOLOGÍA

### 3.2.1. Clasificación taxonómica y morfología

El género *Eimeria* forma parte del phylum Apicomplexa, clase Sporozoea, subclase Coccidia, orden Eucoccidia, suborden Eimeriina y familia Eimeriidae (**Soulsby, 1982; Levine, 1988; Urquhart et al., 1996**). Normalmente no producen infecciones mono-específicas, por lo que los signos clínicos observados son fruto de la acción combinada de varias especies, o incluso otros parásitos, en combinación con factores predisponentes de la enfermedad, por lo general factores debilitantes. Se han descrito, al menos, 18 especies diferentes de *Eimeria* que pueden infectar a caprinos en todo el mundo (**Soe y Pomroy, 1992; Smith y Sherman, 2009**), de las cuales 9 son las frecuentes e importantes a nivel mundial (Fig. 1). *Eimeria ninakohlyakimovae* (**Viera et al., 1997**), *Eimeria arloingi* (**Sayin et al., 1980**) y también *E. christenseni* (**Lima, 1981**) son consideradas las más patógenas (**Sayin et al., 1980; Levine, 1985; Aumont et al., 1984; Ruiz et al. 2006; Silva et al. 2014b**), debido a su capacidad de replicación masiva durante la primera merogonia en las células endoteliales hospedadoras y a la destrucción generalizada de la mucosa intestinal afectada (**Soe y Pomroy, 1992; Ruiz et al., 2006; Taylor et al., 2007**). Entre los criterios para diferenciar entre las distintas especies se incluyen la forma y tamaño de los ooquistes y de los esporozoítos, la presencia de cápsula micropilar / micropilo, la existencia de diversos residuos dentro de los ooquistes o de los esporocistos y el tiempo de esporulación (**Levine and Ivens, 1986; Alyousif et al., 1992 – en Ruiz et al., 2006**).

La pared del ooquiste tiene 2 capas y puede ser incolora, de color amarillo pálido, rosado o marrón oscuro, con una superficie lisa, picada o rugosa. En algunas especies de *Eimeria*, los ooquistes intracelulares están encerrados en una fina capa (velo) que puede perderse cuando los ooquistes se excretan en las heces (**Ball et al., 2014**).

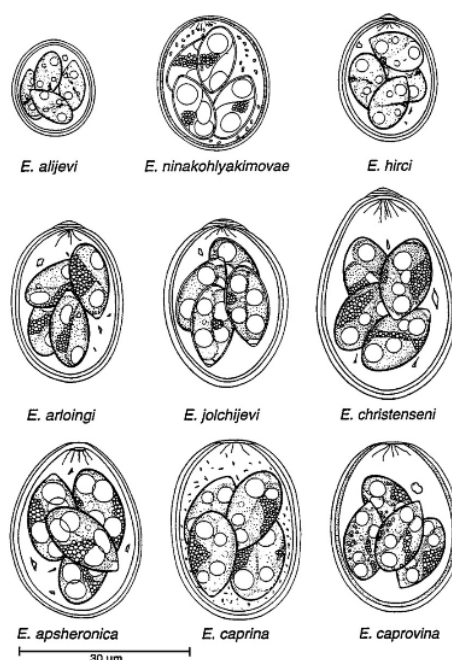
Los esporocistos pueden ser circulares, ovalados, piriformes o alargados y pueden contener una estructura similar a un tapón en un polo, el cuerpo de Stieda. En algunas especies de *Eimeria* también puede estar presente un cuerpo substiedal, debajo del cuerpo Stieda (**Hammond et al., 1970**). Una masa residual, el residuo de ooquistes, está presente en algunas especies de *Eimeria* y su presencia o ausencia en ooquistes esporulados puede tener valor taxonómico.

Los esporozoítos suelen tener forma de plátano y contienen un núcleo vesicular central, gránulos de almacenamiento y uno o más cuerpos refringentes de distintos tamaños; los cuerpos refringentes son de naturaleza proteica, en número de 1 a 4, y pueden ocupar dos tercios del esporozoíto (**Hammond et al., 1968; de Venevelles et al. 2006**).

Todos los parásitos Apicomplexa son protozoos intracelulares obligados y se definen por la presencia de un complejo apical que está presente, únicamente, en estadios infectantes tales como esporozoítos, taquizoítos, bradizoítos y merozoítos (**Jolley y Bardsley, 2006**).

### 3.2.2. Biología de los coccidios

El ciclo biológico endógeno de los coccidios del género *Eimeria* es continuo y más del 70% ocurre en el intestino delgado. Una vez ingeridos los ooquistes (día 1) se reproducen rápidamente en el yeyuno e íleon. A partir de los 10-12 días invaden y se desarrollan en el intestino grueso y, transcurridas aproximadamente dos semanas desde la infección, comienzan a liberar un gran número de ooquistes con las heces, los cuales, tras esporular en el medio y ser ingeridos por otros hospedadores, darían comienzo a un nuevo ciclo (**Marshall y Williams, 1985**).



**Fig. 1.** Características diferenciadoras de las principales especies de *Eimeria* que afectan a la cabra.

En rumiantes, como en otras especies hospedadoras, el desarrollo tiene lugar en dos etapas (**Sánchez et al., 2008**): fase endógena, en la que se alternan ciclos de reproducción asexual (esquizogonia o merogonia) y sexual (gametogonia), y fase exógena en medio, que consiste en un proceso de reproducción asexual mediante esporulación (esporogonia).

#### *Esporogonia*

El proceso de esporulación consiste en la segmentación del protoplasma en pequeños cuerpos infectantes llamados esporozoítos que se encuentran dentro de los esporocistos y éstos, a su vez, dentro del ooquiste. En el género *Eimeria*, en el ooquiste

esporulado se desarrollan cuatro esporocistos que contienen dos esporozoítos cada uno. Para que ocurra ese proceso son necesarias determinadas condiciones de humedad, temperatura y oxígeno en el ambiente. Dependiendo de la especie de *Eimeria*, el tiempo de esporulación puede extenderse entre las 48 y las 104 horas. La maduración de los ooquistes (esporulación) es un proceso aeróbico que ocurre en el medio ambiente. Depende de 3 factores, la presencia de aire, temperaturas entre 10-30 °C y humedad; la esporulación es óptima entre 22-29 °C. La meiosis ocurre poco después de la excreción de ooquistes no esporulados **(del Cacho et al., 2010)**.

Los ooquistes pueden sobrevivir durante meses o años, dependiendo de la especie de *Eimeria* y de las condiciones ambientales. La anoxia, la sequía y las temperaturas superiores a 40 °C son perjudiciales y los ooquistes no esporulados son más susceptibles a temperaturas extremas que los esporulados. Los ooquistes de coccidios de rumiantes pueden sobrevivir a temperaturas bajo cero y pasar el invierno en los pastos siendo, incluso, resistentes a los desinfectantes más utilizados **(Dauguschies et al., 2013)**.

### *Merogonia*

El ooquiste esporulado ingresa en el organismo hospedador cuando es ingerido junto con alimentos o agua de bebida y, a nivel de la luz del tracto digestivo, se produce el desenquistamiento. Una vez en el lumen, los esporozoítos penetran en las células epiteliales del intestino (enterocitos), gracias a un complejo sistema de microfibrillas que existen en su histoarquitectura, aunque en ocasiones pueden parasitar células endoteliales en primera instancia. Ya dentro de la célula hospedadora, se transforman en trofozoítos, más redondeados y ligeramente de mayor tamaño, los cuales se replican de forma asexual por un proceso conocido como endopoligenia, término que definieron por primera vez **(Piekarski et al., 1971)**, transformándose finalmente en esquizontes de primera generación.

Los esquizontes contienen una gran cantidad de merozoítos que son liberados a la luz intestinal tras la destrucción de la célula hospedadora, momento en el cual pueden empezar a observarse los primeros signos clínicos. Los merozoítos resultantes de la primera esquizogonia colonizan de nuevo la mucosa intestinal invadiendo otras poblaciones de células epiteliales. Estos merozoítos experimentarán de nuevo una fase asexual, en este caso por endodigenia, creciendo en número dentro de las células epiteliales hasta formar esquizontes de segunda generación (más pequeños y con menos merozoítos que los de primera generación). Los merozoítos resultantes salen a la luz intestinal tras la ruptura de las células epiteliales y colonizarán nuevas células epiteliales para iniciar la etapa sexual **(Drugueri, 2002)**. La merogonia puede repetirse en más de dos generaciones dependiendo de la especie de *Eimeria* **(Mehlhorn, 2004; Urquhart et al., 1996)**.

### *Gametogonia*

Los merozoítos de la “última” generación de esquizontes penetran en nuevas células transformándose en: a) macrogamontes (la mayor parte), que se dividen y forman un macrogameto cada uno, y b) microgamontes, que por división generan una gran cantidad de gametocitos biflagelados, los cuales salen de la célula para alcanzar aquellas que contienen macrogametos **(Sanchez et al., 2008)**. Los cigotos resultantes de la unión de los microgametos con los macrogametos mediante singamia sufren posteriormente una división meiótica tras la que se genera una nueva forma haploide, el esporogonio u

ooquiste no esporulado (Striepen et al., 2007). Los nuevos ooquistes serán liberados al medio con las heces de los animales, reiniciándose nuevamente el ciclo (Drugueri, 2002).



Fig. 2. Ciclo biológico general de *Eimeria* spp.

Los datos descritos anteriormente en relación a la biología de los coccidios son de carácter general, pues cada especie de *Eimeria* presenta particularidades muy concretas en su ciclo biológico. Como se apuntó anteriormente, la principal particularidad de *E. ninakohlyakimovae*, especie con la que se realizarán algunos de los experimentos del presente trabajo, es que la primera esquizogonia se desarrolla a nivel de las células endoteliales de los vasos linfáticos del intestino íleon distal, siendo, por tanto, las células endoteliales las células hospedadoras que los esporozoítos infectan en primera instancia (Cordero del Campillo y Rojo-Vázquez, 2000; Ruiz et al. 2010; Silva et al. 2015).

En el desarrollo endógeno de *E. ninakohlyakimovae* se producen dos generaciones de esquizontes; la primera generación da lugar a macrosquizontes de hasta 166  $\mu\text{m}$  x 124  $\mu\text{m}$  (Viera et al., 1997). Estos esquizontes se desarrollan a los 10-12 días post-infección y pueden contener más de 100.000 merozoítos de primera generación. Por el contrario, los esquizontes de segunda generación son más pequeños (tamaño medio de 17  $\mu\text{m}$  x 12  $\mu\text{m}$ ) y se desarrollan en torno al día 13 post-infección a nivel de las células epiteliales de las criptas del ciego y colon. En estas células se desarrollan también los gamontes y, entre los días 14-15 post-infección, suele comenzar la liberación de ooquistes al medio ambiente junto con las heces del hospedador (Viera et al., 1997).



### 3.3. EPIDEMIOLOGÍA

#### 3.3.1. Distribución y prevalencia

La coccidiosis producida por especies de *Eimeria* es una de las enfermedades entéricas más ubicuas y extendidas en los sistemas de producción caprina. Se ha descrito en un gran número de regiones y países de Europa, África, Asia y América (**Penzhorn et al, 1994; Balicka- Ramisz, 1999; Faizal y Rajapakse, 2001; Agyei et al., 2004; Diao et al; 2022; García-Álvarez et al., 2023**).

Así, en un estudio realizado en Brasil el 92,1% de los caprinos analizados resultaron ser positivos, identificándose un total de ocho especies, de las cuales *E. alijevi* (26,7%), *E. arloingi* (20,6%) y *E. hirci* (18%) fueron las más prevalentes, seguidas de *E. ninakohlyakimovae* (16,2%), *E. jolchijevi* (8,7%), *E. christenseni* (6%), *E. caprovina* (2,8%) y *E. caprina* (1%) (**Cavalcante et al., 2012**). También en el continente americano, pero en este caso en el suroeste de Montana (USA), se observaron ooquistes de *Eimeria* en el 97,2% del total de muestras de heces de caprinos Cashmere analizados. En este caso se identificaron nueve especies de *Eimeria*, de las cuales *E. arloingi*, *E. ninakohlyakimovae* y *E. alijevi* comprendían conjuntamente el 88,3% del total de ooquistes identificados. Estas tres especies de *Eimeria*, además de *E. hirci*, estuvieron presentes en todas las muestras examinadas (**Penzhorn et al, 1994**).

En el continente africano, en concreto en Tanzania, se observaron prevalencias igualmente muy elevadas (94,7%) en algunas granjas pero, en general, los porcentajes de infección fueron ligeramente inferiores a lo descrito en el continente americano, rondando el 80% (**Kusiluka et al., 1996**). En este estudio, las especies predominantes fueron *E. arloingi* (91,7%), *E. alijevi* (80,3%), *E. ninakohlyakimovae* (71,4%) y *E. christenseni* (45,2%), seguidas de *E. caprovina* (27,6%), *E. pallida* (8,8%), *E. jolchijevi* (6,9%) y *E. aspheronica* (5,2%). Una elevada prevalencia de coccidiosis (97,3%) se ha descrito también en la provincia de Shaanxi, el noroeste de China, en las razas Saanen y Guanzhong (**Zhao et al., 2012**). Los autores confirmaron de nuevo que las infecciones mixtas por varias especies de *Eimeria* son habituales; en este caso, las especies más frecuentes fueron seis (*E. jolchijevi*, *E. arloingi*, *E. alijevi*, *E. caprina*, *E. hirci*, y *E. christenseni*) con distintas prevalencias según la raza.

Por último, varios trabajos también han demostrado una elevada prevalencia de coccidiosis en diversos países o regiones de Europa. De este modo, en centroeuropa (Ucrania y Polonia) la prevalencia de la infección por coccidios en cabras se estimó en el 74%, siendo nueve las especies más prevalentes: *E. arloingi*, *E. christenseni*, *E. jolchijevi*, *E. ninakohlyakimovae*, *E. alijevi*, *E. caprina*, *E. caprovina*, *E. hirci*, y *E. aspheronica* (**Balicka-Ramisz et al., 2012**). Las mismas especies se encontraron parasitando a caprinos en el área de Alentejo (Portugal), siendo las especies más frecuentes *E. ninakohlyakimovae* (88%) y *E. arloingi* (85%), seguidas de *E. alijevi* (63%) y *E. caprovina* (63%). En este caso, se encontraron ooquistes de *Eimeria* en el 98,61% de las muestras fecales analizadas (**Silva et al., 2014**). Otros análisis coprológicos llevados a cabo en la Península ibérica demostraron una prevalencia del 100% en diferentes zonas geográficas de España, siendo moderado el grado de infección (**de la Fuente y Alunda, 1992**). Así mismo, en zonas semi-áridas de la isla de Gran Canaria (España) se encontraron ooquistes de *Eimeria* en el 96,1% de las muestras analizadas, identificándose un total de ocho especies, de las cuales *E.*

*ninakohlyakimovae* (30,0%), *E. arloingi* (28,6%) y *E. alijevi* (20,5%) fueron las más frecuentes, seguidas de *E. caprina* (9,1%), *E. christenseni* (4,5%), *E. jolchijevi* (3,4%), *E. caprovina* (3,2%) y *E. hirci* (0,7%) (Ruiz et al., 2006).

La variación en la prevalencia y distribución de las especies de *Eimeria* puede atribuirse a factores relacionados con diferencias en el manejo y las condiciones higiénicas, la temperatura, la agroecología, el clima, las condiciones climáticas, el estado inmunológico del huésped, el tamaño de la muestra, la raza, el sexo, el período de muestreo o la susceptibilidad de la raza coccidios (Khodakaram-Tafti y Hashemnia 2017; Harper y Penzhorn 1999; Balicka-Ramisz 1999; Ruiz et al. 2006; Hashemnia et al. 2011; Zvinorova et al. 2016; Faber et al. 2002; Ruiz et al. 2013b).

### 3.3.2. Factor edad

En las primeras semanas, los anticuerpos frente a *Eimeria* en rumiantes pueden transferirse por el calostro, lo que podría constituir un mecanismo de inmunidad pasiva frente a la coccidiosis. Este hecho fue publicado por Gregory et al. (1989) y Fiege et al. (1992), quienes, tras administrar calostro con un alto contenido en IgG a corderos infectados por *E. crandallis*, observaron un mayor título de anticuerpos en los animales alimentados con calostro que en aquellos que no lo recibieron. Posteriormente, Faber et al. (2002), tras una infección experimental con *E. bovis* en terneros, no lograron demostrar inmunoprotección mediante la administración de anticuerpos del calostro materno. Aunque no hay datos de transmisión de inmunidad pasiva en caprinos frente a coccidiosis, sí es cierto que los animales recién nacidos que reciben una ingesta insuficiente de calostro o experimentan períodos de estrés pueden comenzar a mostrar signos clínicos de la enfermedad a partir de una edad más temprana. En general, la franja de edad en la que los cabritos son más susceptibles frente a las infecciones por *Eimeria* se extiende entre las 3 semanas y 6 meses, siendo entre estas edades cuando los animales se ven más severamente afectados, tanto a nivel clínico como productivo (Sayin et al., 1980; Foreyt et al., 1986; Yvoré et al., 1985). Los cabritos se infectan al ingerir ooquistes con el alimento, agua o, incluso, de los pezones de la madre cuando la infección se produce a edades muy tempranas. La gravedad de la enfermedad dependerá del número de ooquistes ingeridos, del ritmo de infección y del estado general del animal. Una gran ingestión de ooquistes puede causar la muerte, pero si la dosis infectante es baja y el estado de los cabritos es bueno, la enfermedad se manifestará de manera subclínica y las infecciones reiteradas desarrollarán un proceso de inmunoprotección natural (Argüello y Cordero del Campillo, 1999).

En general, en las infecciones por *Eimeria* spp. existe un alto grado de resistencia homóloga como respuesta a una exposición previa (Chapman, 1974; Yvoré et al, 1985; Gregory y Catchpole, 1989). Por este motivo, a medida que avanza la edad de los caprinos se va estableciendo una respuesta inmune efectiva y los animales se terminan comportando como portadores asintomáticos, a lo que contribuyen las constantes reinfecciones. No obstante, se ha podido constatar un ligero aumento de la liberación de ooquistes en animales de más de 4 años de edad (Kanyari, 1988), que podría estar relacionado con una reducción de la eficacia de los mecanismos inmunológicos. Por otro lado, aunque los animales adultos son, posiblemente, la fuente original de ooquistes, no suelen ser los responsables de los altos niveles de contaminación encontrados en el

medio. La fuente principal de contagio son, en la mayoría de los casos, los animales jóvenes que, a raíz de una infección inicial, pueden eliminar millones de ooquistes en su propio entorno. De esta forma, los animales nacidos más tarde que se introduzcan en el mismo entorno se verían inmediatamente expuestos a una carga de ooquistes muy elevada, sobre todo en condiciones de hacinamiento y falta de higiene. Por otro lado, el estrés, un suministro de leche pobre, un destete brusco, el clima frío y el transporte, son factores que pueden reducir la resistencia adquirida y exacerbar el cuadro patológico de la infección por coccidios (**Ruiz et al., 2012**).

La influencia de la edad en la coccidiosis caprina se ha constatado en diversas localizaciones geográficas a nivel mundial, como Brasil (**Cavalcante et al., 2012**), Tanzania (**Kimbata et al., 2009**) o Europa Central (**Balicka-Ramisz et al., 2012**). También en España (**de la Fuente et al., 1992; Ruiz et al., 2006**), tanto la prevalencia como el grado de infección fueron mayores en los animales jóvenes que en los adultos. Incluso, se han encontrado diferencias relacionadas con la edad de los animales en relación con la frecuencia de presentación de las distintas especies de *Eimeria*. A modo de ejemplo, en el estudio realizado en Brasil por **Calvacante et al. (2012)**, la especie *E. ninakohlyakimovae* fue la de mayor prevalencia en los animales jóvenes (97%), mientras que *E. alijevi* (77%) fue la más frecuentemente encontrada en las cabras adultas.

Según un estudio para evaluar la inmunocompetencia de cabritos frente a la coccidiosis se infectaron animales de 3, 4 y 5 semanas de edad con ooquistes esporulados de *E. ninakohlyakimovae* y se los sometió a una exposición homóloga 3 semanas después. La inmunidad protectora se evaluó mediante parámetros clínicos, hematológicos, parasitológicos, inmunológicos y patológicos. En conjunto, los resultados demuestran que los cabritos son capaces de desarrollar infecciones patentes y respuestas inmunoprotectoras frente al parásito, ya que todos los grupos de edad: (1) liberaron significativamente menos ooquistes después de la reinfección, lo que se asoció a signos clínicos más leves; (2) mostró una respuesta inmune local, con un aumento significativo de numerosas poblaciones celulares; y (3) tenían niveles elevados de IgG e IgM, y principalmente de IgA local. Sin embargo, un análisis detallado de los datos mostró algunas diferencias entre los tres grupos de edad, relacionadas tanto con el resultado de la infección por *Eimeria* como con la respuesta inmune resultante, a partir de las cuales se infiere que los cabritos más jóvenes no son completamente inmunocompetentes. Este hallazgo puede ser de interés para el diseño de enfoques inmunoprofilácticos y/o tratamientos profilácticos/metafilácticos frente a la coccidiosis caprina (**Matos L. et al., 2018**).

### **3.3.3. Factores climáticos**

La elevada prevalencia y amplia distribución geográfica de la eimeriosis se debe, en parte, a la gran resistencia en el medio de los ooquistes. En condiciones ambientales óptimas de humedad, temperatura (24-31 °C) y suministro de oxígeno adecuado, la esporulación de los ooquistes en la mayoría de las especies de *Eimeria* se produce en aproximadamente 2-5 días (**Levine, 1985**). Generalmente, los ooquistes mueren a temperaturas superiores a 40 °C y por debajo de -30 °C, pero entre estos extremos los ooquistes esporulados y no esporulados pueden permanecer viables durante más de un año (**Foreyt, 1986**), siendo los esporulados más susceptibles a los cambios climáticos

extremos (**Horton-Smith, 1954**). En general, pueden soportar la congelación de -5 °C a -8 °C durante varios meses y se ha demostrado que en los pastos son capaces de soportar el invierno en países de clima frío como Noruega, permaneciendo infectantes para los animales durante la próxima temporada de pastoreo (**Helle, 1970**). Los inviernos fríos favorecen la supervivencia de los ooquistes en hibernación en cantidades suficientes para que la enfermedad vuelva a ser un problema en primavera, especialmente cuando, al nacer, los animales jóvenes se encuentran en pastos permanentes cerca de los edificios de la granja. En tales circunstancias, las inclemencias del tiempo pueden causar estrés, bajar la inmunidad y, de esta forma, contribuir al desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, los climas suaves y húmedos favorecen la esporulación, y la acumulación rápida de gran número de ooquistes infectantes. Esto hace que los animales nacidos en otoño puedan estar sujetos a ambientes muy contaminados (**Soulsby, 1987; Taylor et al., 2015**).

En zonas semiáridas se han descrito recuentos de ooquistes significativamente más altos en las hembras en producción lechera durante la temporada de calor, correlacionándose positivamente dichos recuentos con la temperatura (**Vihan et al., 1988**). Esta correlación se ha observado, incluso, en áreas subhúmedas (**Balicka-Ramisz, 1999; Harper y Penzhorn, 1999**) y podría explicarse por la influencia de la temperatura en el inicio de la esporulación y en las tasas de esporulación de los ooquistes de *Eimeria* (**Graat et al., 1994**).

#### **3.3.4. Condiciones de manejo**

La evaluación de la influencia de las condiciones de manejo sobre la prevalencia de las infecciones de *Eimeria* ha demostrado que, en las grandes explotaciones, que no necesariamente corresponden a las granjas con sistemas intensivos, pero que sí cumplen con las medidas de higiene más estrictamente y, además, emplean sistemas de desparasitación rutinarios, los recuentos de ooquistes son menores (**Ruiz et al., 2006**). Otros aspectos, como el estado de nutrición, también han de tenerse en cuenta, pues se sabe que influyen decisivamente en el grado de competencia inmunológica del animal (**Knox y del Acero, 1996**), así como situaciones que generen estrés en los animales. En este sentido, se ha observado que la producción de ooquistes de *Eimeria* en cabritos es especialmente elevada en los períodos de destete (otoño y primavera, fundamentalmente) (**Ruiz et al., 2006**).

En la naturaleza, o bajo sistemas extensivos más naturales, los animales susceptibles son expuestos a un bajo número de ooquistes y terminan por adquirir una inmunidad protectora. Bajo modernos sistemas de producción, sin embargo, los animales jóvenes nacen en un ambiente potencialmente muy contaminado por lo que, tradicionalmente, la cría intensiva se considera un sistema de alto riesgo, especialmente cuando la población de animales jóvenes es alta. En general, los tres principales factores de manejo que se asocian con altos niveles de infección y riesgo serio de coccidiosis en rumiantes son: 1) falta de higiene en las explotaciones, 2) hacinamiento de los animales y 3) empleo de corrales para albergar a diferentes grupos de edad (**Argüello y Cordero del Campillo, 1999; Taylor et al., 2015**).

Posiblemente, la higiene de la explotación es uno de los factores clave de la coccidiosis y otras parasitosis de transmisión orofecal. Así, se ha comprobado que la proporción de infecciones graves entre rumiantes adultos criados en ambientes rurales

con condiciones higiénicas deficientes era significativamente mayor en comparación con establos en los que se seguían correctas prácticas de higiene (**Woji et al., 1994**). Únicamente con el barrido de los corrales, se ha comprobado que puede reducirse de forma considerable la contaminación ambiental y, como consecuencia, los recuentos de ooquistes en heces de los animales que se ubican en zonas limpias. De forma complementaria, el empleo de desinfectantes en la limpieza de suelos pavimentados y utensilios también se ha observado que reduce de forma significativa el grado de contaminación ambiental. Como desinfectantes de explotaciones ganaderas se han empleado tradicionalmente el hipoclorito sódico, el cresol, el fenol o el formaldehído (**Arguello y Cordero del Campillo, 1999**). Más recientemente se han empleado otros desinfectantes comerciales a base de peróxido de hidrógeno en combinación con ácido peracético (Ox-Virin) o nitrato de plata (Ox-Agua); ambos demostraron un efecto perjudicial sobre la viabilidad e infectividad de los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* en ratones (**Quilez et al., 2005**). Frente a ooquistes de *Eimeria tenella* también se ha evaluado *in vitro* la acción de diferentes principios químicos desinfectantes, obteniéndose los mejores resultados con las combinaciones siguientes: formol + dodecilbenceno sulfonato de sodio; hipoclorito de sodio al 2%; ortodichlorobenceno + Xileno (**Guimarães et al., 2007**). Igualmente, se ha observado que el ácido acético, el cresol, el xileno y el benceno son buenos candidatos como antisépticos por su capacidad para inhibir la esporulación de los ooquistes de *E. tenella* (**You, 2014**). Por otro lado, las pruebas realizadas con Neopredisan en dos laboratorios independientes demostraron que una solución al 4% del producto era capaz de inhibir la esporulación en más de un 95% tras 120 min de incubación (**Dauguschies et al., 2002**). Finalmente, en un estudio realizado por **Samaha et al. (2013)** se comprobó que los desinfectantes más eficaces frente a los ooquistes de *E. tenella* eran el hidróxido de amonio al 5-10% y fenol al 10%, mientras que otros como el Eco. Bio® y el Virox® (Biocidas Biodegradables), fueron menos efectivos. Además, la incorporación de materia orgánica en forma de heces de pollo (10%) redujo la eficacia de estos dos últimos productos hasta en un 52,9% y 47%, respectivamente, mientras que el hidróxido de amonio y fenol no se vieron afectados.

Por último, dentro del manejo, otro factor importante a tener en cuenta es la realización de tratamientos profilácticos o metafilácticos, pues se ha observado que en los rebaños medicados, la proporción de animales infectados y la tasa de excreción de ooquistes media es menor que en los no medicados (**Gregory et al., 1983; Catchpole et al., 1986**). Además, desde el punto de vista productivo, se ha demostrado que la administración a corderos de coccidiostáticos como el diclazuril de forma profiláctica incrementa la ganancia de peso (**Alzieu et al., 1999**). De hecho, el beneficio terapéutico del diclazuril parece mayor cuando se administra temprano en la infección, antes de que ocurra el daño intestinal (**Taylor et al., 2003**). En contraposición a lo anterior, **Berriatua et al. (1993)** no observaron diferencias entre corderos alimentados con piensos medicados y no medicados, sugiriendo que la infección por coccidios puede ser controlada en rebaños no medicados sin el uso de coccidiostáticos. Una explicación posible sería que, durante las primeras 2 ó 3 semanas de vida (antes del destete), los corderos no ingerían suficiente pienso de arranque medicado como para evitar la infección y el desarrollo del parásito. Alternativamente, la inmunidad pasiva podría haber reducido la producción de ooquistes de forma natural, tanto en rebaños medicados como no medicados (**Berriatua et al., 1993**).

### 3.4. RESPUESTA INMUNE

La exposición previa a *Eimeria* spp. en cabras puede conducir a una inmunidad protectora frente a infecciones posteriores (**Dai et al., 2006; Ruiz et al., 2013a**). En condiciones de campo, la exposición natural al parásito asegura un contacto continuo que permite el desarrollo de inmunidad, lo que explicaría por qué las cabras adultas tienen OPG significativamente menores que los cabritos (**de la Fuente y Alunda 1992, Ruiz et al., 2006, Balicka-Ramisz et al., 2012**). En relación con esto, las infecciones primarias con la cepa GC de *Eimeria ninakohlyakimovae* condujeron a una reducción significativa de los recuentos de OPG en cabritos infectados y reinfectados en comparación con los controles de infección, así como a una mejora de la enfermedad clínica. Sin embargo, la inmunoprotección inducida fue solo parcial, ya que algunos signos clínicos, aunque más leves, aún aparecían después de las reinfecciones (**Dai et al., 2006; Ruiz et al., 2013a**). Sin embargo, si la dosis infectante es muy alta (alrededor de  $10^6$  ooquistes), la inmunidad puede romperse y producirse la muerte del animal, circunstancia que puede ocurrir en ambientes altamente contaminados (**Ruiz et al., 2006, Ruiz et al., 2013b**).

Algunas especies de *Eimeria* como *E. arloingi*, *E. ninakohlyakimovae* y *E. christenseni* parasitan en primera instancia las células endoteliales de los vasos linfáticos del intestino (**Ruiz et al., 2010, Silva et al., 2015**), por lo que es posible que se desarrollen respuestas inmunes protectoras durante el periodo prepatente, tal y como se ha demostrado en cabritos infectados experimentalmente con *E. ninakohlyakimovae* (**Matos et al. 2017a**). Los autores señalan que la protección es, probablemente, el resultado de un marco complejo de mecanismos moleculares, células efectoras y citocinas que involucran respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas.

Se han encontrado varias células inmunocompetentes dentro de la mucosa de cabritos infectados experimentalmente con *E. ninakohlyakimovae*, incluidas células polimorfonucleares (PMN), mastocitos, eosinófilos, leucocitos globulares y linfocitos (**Ruiz et al., 2013b, Ruiz et al., 2014, Matos et al., 2017a, Matos et al., 2018**). De acuerdo con el aumento del recuento medio de linfocitos en la mucosa intestinal, los cabritos infectados con *E. ninakohlyakimovae* tuvieron un mayor número de células TCD4+ y TCD8+, y una mayor expresión genética relativa de IL-2, IL-4, IL-10 e INF $\gamma$ , lo que sugiere que podrían generarse respuestas Th1 y Th2 frente a este parásito (**Matos et al., 2017a**). Además, en relación con la implicación de la respuesta inmune innata en la coccidiosis caprina, los niveles circulatorios de la mayoría de los marcadores inflamatorios sistémicos, las citocinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6), AGP ( $\alpha$ 1-glucoproteína ácida) y ADA (adenosina desaminasa) se han visto significativamente aumentados en cabritos infectados con ooquistes esporulados de tres especies de *Eimeria*: *E. caprina* (57%), *E. ninakohlyakimovae* (28%) y *E. arloingi* (15%) (**Tadayon et al. 2016**). Las reacciones innatas tempranas de los monocitos frente a *E. ninakohlyakimovae* también inducen redes extracelulares de monocitos dependiente de la NADPH oxidasa y, además, regulan positivamente la transcripción genética de moléculas inmunorreguladoras críticas, incluyendo IL-12 y TNF- $\gamma$ , además de IL-6 y CCL2 (**Pérez et al., 2016**).

Las reacciones inmunes humorales también se desencadenan en respuesta a infecciones por *Eimeria* en cabras. Así pues, los análisis detallados de las subpoblaciones de células T de cabritos infectados con *E. ninakohlyakimovae* mostraron que las células T

CD45+ aumentaron en el íleon de los animales infectados, y se registraron correlaciones negativas con el número de esquizontes inmaduros tanto en el íleon como en el colon, lo que podría estar relacionado con el leve aumento de IgA específica en las muestras de mucus **(Matos et al., 2017a)**. En concordancia, el análisis de los niveles de IgA en muestras de mucosa intestinal de animales infectados por *E. ninakohlyakimovae* reveló niveles significativamente aumentados de esta inmunoglobulina tanto en cabritos re infectados como en primo infectados en comparación con los controles no infectados **(Matos et al., 2017b)**. Los autores también demostraron que los niveles de IgG e IgM en muestras de suero aumentaron significativamente en los animales infectados, y una amplia gama de péptidos de antígeno somático fue reconocida por IgG específica mediante inmunotransferencia **(Matos et al., 2017b)**. Sin embargo, no se encontraron correlaciones entre los niveles de inmunoglobulinas y los recuentos de OPG después de la reinfección, lo que coincide con los datos controvertidos sobre si las respuestas humorales específicas frente a las especies de *Eimeria* de rumiantes pueden conferir inmunoprotección o no.

### 3.5. PATOLOGÍA

#### 3.5.1. Patogenia

El efecto patológico fundamental ejercido por la parasitación por las diferentes especies de *Eimeria* se debe a la destrucción de las células epiteliales (en ocasiones endoteliales) en distintas partes del intestino, lo cual depende del número de ooquistes ingeridos, del potencial de reproducción de las especies implicadas, del efecto de superpoblación (*Crowding factor*) y de la localización exacta de los parásitos **(Argüello y Cordero del Campillo, 1999)**.

El enorme número de merozoítos de primera generación resultantes de la primera esquizogonia provoca una destrucción exponencial del epitelio durante la segunda esquizogonia y, finalmente, durante la fase de reproducción sexual o gametogonia **(Dauguschies y Najdrowski, 2005)**. En general, la gravedad de la coccidiosis está determinada por la capacidad de proliferación de la especie patógena de *Eimeria*, que se define como el número de merogonias y el número de merozoítos producidos por cada merogonia, y está estrechamente relacionada con el número de células destruidas por cada ooquiste esporulado ingerido. Por tanto, la dosis primoinfectante (número de ooquistes viables ingeridos) y la magnitud de la reinfección pueden influir en el desarrollo y curso de la enfermedad **(Ruiz et al. 2013b)**.

La patología que se asocia a las especies que desarrollan macroesquizontes de primera generación en células endoteliales linfáticas de la lámina propia en el intestino delgado, como *E. ninakohlyakimovae*, *E. arloingi* e *E. christensenii* **(Matos et al., 2017)**, suele ser más severa, pudiendo originar signos clínicos graves e incluso la muerte antes de observar ooquistes en heces **(Ruiz et al., 2013b)**.

Además del efecto patógeno de los parásitos, debido a la destrucción de las células epiteliales del intestino, la infección por coccidios interactúa fuertemente con el aparato digestivo y su microflora **(Gouet et al., 1984; Chartier y Paraud, 2012)**. El cambio de la microflora digestiva se manifiesta especialmente en el porcentaje de bacterias Gram

negativas, que se eleva desde el 16 hasta el 76%, es, un agravante o incluso el factor determinante de la diarrea **(Mohammed et al., 2000; Chartier y Paraud, 2012)**.

Como consecuencia de la pérdida de agua derivada de la diarrea y la mala absorción, los animales suelen sufrir un proceso de deshidratación, especialmente si el efecto perjudicial de la infección es de larga duración como ocurre con especies como *E. ninakohlyakimovae* **(Dai et al., 2006)**.

Por otro lado, probablemente debido a que el daño de la mucosa en el íleon impide la reabsorción de bilis en el intestino delgado, los ácidos biliares en suero están disminuidos. El aumento de la bilirrubina sérica y disminución de la actividad de las enzimas del hígado son más complejas de explicar, pero podría reflejar la anorexia y la alteración transitoria del metabolismo del hígado observada en animales infectados por *Eimeria* spp. **(Holst y Svensson, 1994; Dauschies y Najdrowski, 2005)**. La anorexia asociada a la deshidratación puede derivar en un estado de postración y muerte si no se instaura un tratamiento urgente con fluidoterapia.

El efecto patógeno de los coccidios podría agravarse por el poli-parasitismo si se ven afectadas diferentes partes del tracto digestivo. Las diferentes especies de *Eimeria* **(Craig, 1986)**, los nematodos gastrointestinales **(Taylor, 2009)**, o incluso otros agentes patógenos, como los virus o bacterias podrían contribuir a este fenómeno **(Wright y Coop, 2007; Chartier y Paraud, 2012)**.

### 3.5.2. Clínica

Hay una correlación directa entre la cantidad de ooquistes ingeridos y la aparición de los signos clínicos **(Fayer, 1989; Gregory et al., 1989; Chartier y Paraud, 2012)**. Por ejemplo, se ha demostrado que una dosis oral diaria de 500.000 ooquistes de una mezcla de diferentes especies de *Eimeria* en cabras durante 5 días provoca graves trastornos clínicos que conducen a la muerte de los animales infectados, mientras que tal desenlace puede evitarse si la dosis infectante se reduce dos veces **(Yvoré et al., 1980; Chartier y Paraud, 2012)**. Se sabe poco sobre la patogenicidad de *Eimeria* dependiente de la cepa en todos los huéspedes, incluidas las cabras. Incluso una dosis alta ( $10^6$  ooquistes esporulados) de *E. ninakohlyakimovae* indujo sólo una coccidiosis leve y ninguna muerte **(Dai et al., 2006)**. Por el contrario, en infecciones experimentales con la cepa GC de *E. ninakohlyakimovae* utilizando una dosis infectante 5 veces menor, los animales desarrollaron una enfermedad clínica tan grave que fue necesario un tratamiento de emergencia inmediato para evitar la muerte **(Matos et al., 2017)**.

En determinadas condiciones, la coccidiosis puede asociarse a muerte súbita con ausencia de signos clínicos, especialmente en animales jóvenes, lo que se ha relacionado con el daño en la mucosa intestinal producido por algunas especies de *Eimeria* durante el periodo prepatente debido a la primera esquizogonia **(Ruiz et al. 2013b; Matos et al., 2017)**.

Las primeras manifestaciones aparecen al cabo de aproximadamente dos semanas de una infección intensa. Los síntomas incluyen debilidad, dolor abdominal, pérdida de apetito y diarrea con heces amarillo-verdosas y olor acre. En las coccidiosis agudas (disentería roja) la diarrea es sanguinolenta, con abundante mucus e incluso con coágulos de sangre. Son también bastante frecuentes el tenesmo y la anemia, y todos estos signos



suelen estar acompañados de pérdida de peso que, en ocasiones, puede llevar a una emaciación. En especies como *E. christensenii*, la infección suele derivar en la eliminación de heces líquidas, sin mucus ni sangre, y los signos clínicos pueden persistir durante varios días (**Argüello y Cordero del Campillo, 1999**).

A pesar de la gravedad de los signos clínicos, las alteraciones hematológicas no son tan llamativas como se esperaría en infecciones experimentales con *E. ninakohlyakimovae* (**Dai et al. 2006; Ruiz et al. 2013a; Hashemnia et al., 2014**). Tal y como se ha descrito en infecciones con esta especie de *Eimeria*, la diarrea se ha asociado con una reducción en la actividad de la fosfatasa alcalina y un aumento del hematocrito y de los niveles de hemoglobina (**Dai et al., 2006**). Por el contrario, estos mismos autores no encontraron diferencias en los niveles séricos de aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, proteínas totales, albúmina, globulina, Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>). Sin embargo, en infecciones experimentales con *E. arloingi*, la diarrea también se asoció con una reducción en la actividad de ALP, mientras que en esta ocasión se demostró una disminución de los niveles de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> (**Hashemnia et al., 2014**).

Por último, se han observado mayores concentraciones de proteínas de fase aguda antes de la aparición de los signos clínicos de coccidiosis, por lo que este tipo de proteínas podría utilizarse como un marcador no específico de la enfermedad, así como para monitorizar la respuesta al tratamiento en las infecciones por *Eimeria* spp. En general, la determinación de los niveles de proteínas de fase aguda, junto con los signos clínicos y los recuentos fecales de ooquistes (OPG), se han considerado útiles para proporcionar información acerca de las etapas de la coccidiosis clínica y subclínica (**Hashemnia, 2011**).

La reducción del peso corporal y el retraso del desarrollo físico de los animales infectados son características comunes en la coccidiosis (**Fox, 1985; Alyousif et al., 1992; Dauschies et al., 2007**), y son de gran importancia económica para los ganaderos de todo el mundo. En la coccidiosis caprina, esta consecuencia clínica puede afectar de forma determinante las producciones, en particular en zonas áridas o semiáridas, donde las cabras son la única fuente de leche y carne disponible. Se estima que, incluso la coccidiosis subclínica, puede alterar los índices de conversión por lo que, debido a la frecuencia de este tipo de coccidiosis, las pérdidas económicas podrían ser superiores a las causadas por la coccidiosis clínica (**Fox, 1985; Dauschies y Najdrowsky, 2005**). La pérdida de peso en los animales puede ser considerable, incluso después del tratamiento, necesitándose entre 6-13 semanas para que el consumo de agua y alimento de los animales infectados vuelva a los niveles de preinfección (**Argüello y Cordero del Campillo, 1999**). Si los animales no mueren en un plazo de 7 a 10 días, se recuperan lentamente, pero el retraso en el crecimiento puede prolongarse durante tiempo (**Matos et al., 2017**).

### 3.5.3. Lesiones

Los caprinos afectados por coccidiosis muestran diversos grados de inflamación proliferativa en el intestino, incluso cuando los parásitos ya han completado su ciclo endógeno (**Dai, et al., 2006**). En infecciones graves puede haber enteritis catarral generalizada, hasta difterioide y necrotizante, tanto en el intestino delgado como en el grueso. Las lesiones más importantes se presentan en el intestino grueso, en donde en la mayoría de las criptas pueden estar destruidas. El ciego y el colon contienen material hemorrágico semifluido o, incluso, sangre con coágulos fibrinosos. La pared intestinal

aparece engrosada, congestionada y edematosa, con petequias o hemorragias difusas y exceso de mucus. La mucosa está necrosada y se desprende, apareciendo zonas desnudas. A menudo se observan capas pseudomembranosas marrón amarillentas y nódulos puntiformes de parásitos de color blanco o gris **(Argüello y Cordero del Campillo, 1999; Chartier y Paraud, 2012)**.

La histología muestra hiperplasia moderada del epitelio intestinal e hipertrofia de los ganglios linfáticos mesentéricos y placas de Peyer. Además, se observa una enteritis eosinofílica clara y una infiltración difusa de mastocitos, linfocitos y PMN. También es frecuente encontrar en la mucosa intestinal diferentes estados o etapas parasitarias de *Eimeria* en los animales infectados (ooquistes inmaduros y maduros, gamontes y merontes) **(Ruiz et al., 2013a)**.

Aparte de su ciclo entérico endógeno convencional, algunas especies de *Eimeria*, como *E. ninakohlyakimovae*, se ha demostrado que pueden colonizar otro tipo de epitelio, en concreto, el epitelio de los conductos biliares, produciendo lo que se denomina "coccidiosis hepática" **(Dai et al., 1991; Mahmoud et al., 1994; Schafer et al., 1995)**. A pesar de que se han encontrado estadios endógenos en hígados y vesículas biliares de cabras infectadas natural y experimentalmente con *E. ninakholyakimovae*, no se pudieron demostrar cambios en los niveles de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT), dos enzimas que reflejan daño hepático **(Dai et al. 2006)**.

### **3.6. DIAGNÓSTICO**

En el diagnóstico de la coccidiosis en rumiantes resulta de gran utilidad realizar una correcta anamnesis y un examen minucioso de los signos clínicos. Sin embargo, un diagnóstico asertivo sólo se consigue mediante análisis coprológicos que demuestren la presencia de ooquistes en heces **(Daugshies y Najdrowski, 2005; Silva et al., 2013)**. De forma complementaria al análisis coprológico, el examen *post mortem* mediante raspados e improntas de la mucosa intestinal para observar las distintas fases del ciclo del parásito también se considera de utilidad. Por el contrario, la demostración de anticuerpos (fluorescencia, técnicas de precipitación, ELISA) no es muy útil, debido a que los niveles detectables de anticuerpos aparecen como mínimo a los 7 días post infección y, además, muchos animales son portadores de anticuerpos pero no muestran signos de enfermedad **(Hidalgo Argüello y Cordero del Campillo, 1999)**.

#### **3.6.1. Diagnóstico clínico y epidemiológico**

Se sospecha de coccidiosis cuando se encuentran problemas digestivos, con o sin diarrea hemorrágica, en animales jóvenes criados en malas condiciones de higiene o en sistemas intensivos. Por otro lado, una mortalidad súbita hacia el destete también podría hacer sospechar de una coccidiosis sobreaguda. La disminución del crecimiento y el empeoramiento de los índices de conversión, incluso sin la presencia de signos gastroentéricos aparentes, también pueden ser indicativos de la presencia de coccidiosis en la explotación **(Sanz, 2000)**.

### 3.6.2. Diagnóstico anatomopatológico

Una correcta necropsia y posterior análisis histológico debe permitir detectar lesiones típicas de la enfermedad, así como evidenciar las diferentes formas parasitarias del ciclo de *Eimeria* (Gregory y Catchpole, 1990).

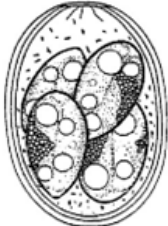

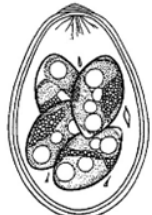




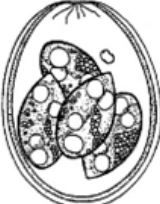
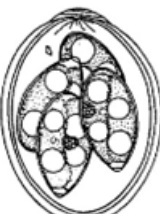
ESPECIE DE <i>EIMERIA</i>	Descripción	Tamaño (μm)	Esporulación (días)	Ooquiste
<i>E. caprina</i>	Elipsoidal, de color marrón oscuro a amarillo parduzco, con micropilo	27-40 x 19-26	2-3	
<i>E. ninakohlyakimovae</i>	Elipsoidal, de pared delgada, incolora, micropilo ausente	17-25 x 13-20	1-3	
<i>E. christenseni</i>	Ovoide, pared delgada, incoloro a amarillo pálido con micropilo y cápsula micropilar	27- 44 x 17-31	6	
<i>E. hirci</i>	Oval, redondeado, de color amarillo claro, con micropilo y cápsula micropilar	21-23 x 16- 19	2-3	

Tabla 1A. Diagnóstico diferencial entre las especies de *Eimeria* más frecuentes en caprinos.

### 3.6.3. Diagnóstico laboratorial

En los análisis coprológicos se deben de incluir técnicas de concentración por flotación, por ejemplo con CINA. Sin embargo, generalmente se prefiere un método cuantitativo para estimar el grado de infección de los animales y establecer una administración más racional de anticoccidiales, tanto con fines terapéuticos como profilácticos (Chartier y Paraud 2012; Ruiz et al., 2012; Iqbal et al., 2013). Para realizar

una cuantificación de los ooquistes liberados, suele emplearse la técnica modificada de McMaster (**Thienpont et al., 1979; Bangoura y Dauschies, 2007**), aunque recientemente se ha demostrado la utilidad de nuevas técnicas como el FLOTAC<sup>®</sup> o el Mini-FLOTAC<sup>®</sup> (**O’Grady y Slocombe, 1980**). Con diferentes modificaciones, la técnica de McMaster se ha empleado en muchos estudios epidemiológicos que involucran rebaños de cabras de diversas áreas geográficas (**Faizal y Rajapakse 2001; Ruiz et al., 2006; Kheirandish et al., 2014**). Los resultados suelen expresarse como ooquistes por gramo de heces (OPG) y, cuando la carga parasitaria es muy alta, en ocasiones es necesario realizar diluciones fecales 1:10, 1:100, etc. para facilitar el recuento (**Ruiz et al., 2012**).

ESPECIE DE <i>EIMERIA</i>	Descripción	Tamaño (µm)	Esporulación (días)	Ooquiste
<i>E. alijevi</i>	Ovoide o elipsoidal, con micropilo poco visible, incoloro o amarillo pálido	16 – 20 x 13 -19	-	
<i>E. arloingi</i>	Elipsoidal, de pared gruesa con micropilo y cápsula micropilar	21-23 x 16- 19	4	
<i>E. aspheronica</i>	Ovoides, de color verdoso a amarillo-marrón, con micropilo	24-37 x 18-23	-	
<i>E. caprovina</i>	Elipsoidal a subesférico, incoloro, con micropilo	30 x 24	2-3	
<i>E. jolchievi</i>	Elipsoidal u ovalado, de color amarillo pálido con micropilo y cápsula micropilar	31 – 3 x 22 - 23	-	

**Tabla 1B.** Diagnóstico diferencial entre las especies de Eimeria más frecuentes en caprinos.

Como único método, la coprología tiene algunas limitaciones ya que, en casos agudos, pueden aparecer los primeros síntomas de enfermedad sin que se encuentren ooquistes en heces (**Wright y Coop, 2007**). Por otro lado, hay que subrayar que, especialmente en rumiantes, pueden encontrarse animales con recuentos superiores al millón de ooquistes por gramo de heces sin manifestaciones clínicas. Al contrario, animales enfermos o moribundos pueden tener bajos recuentos de ooquistes. Por último, ha de tenerse en cuenta que la producción de ooquistes puede ser transitoria y que no todas las especies son patógenas.

La capacidad para muestrear los casos sospechosos de coccidiosis depende, en gran medida, de la edad y tamaño de los animales del lote donde se sospecha de infecciones por *Eimeria* spp. El muestreo es bastante sencillo, pero la obtención de la materia fecal suficiente de cabritos, especialmente los de menos 4 semanas de edad, puede ser problemática. Por lo general, se recomienda muestrear un número de animales dentro de un rebaño o manada para obtener una idea de los niveles de infección, más que realizar un muestreo del conjunto de la población.

Categoría	Características de las heces
1	Normales, formadas
2	Consistencia ligeramente disminuida
3	Consistencia bastante disminuida; zona perianal y patas traseras manchadas
4	Diarrea líquida explosiva
5	Diarrea acuosa sanguinolenta, a veces con trazas de mucosa

**Tabla 2.** Caracterización de la diarrea en cabritos infectados por *Eimeria* spp.

El estudio cuantitativo es de gran importancia como método de estimación de la carga parasitaria, pero también resulta interesante identificar las especies que se encuentran parasitando al ganado, ya que no todas ellas son patógenas. En este sentido, la determinación de los porcentajes correspondientes a las especies que son las más patógenas para cada hospedador es una información crucial, ya que algunas especies menos patógenas pueden ser excretadas en cantidades relativamente grandes sin causar ningún efecto clínico evidente (**Chartier et al., 1994**). Una correcta identificación de las diferentes especies de *Eimeria* debe de realizarse sobre la base de los criterios morfológicos de los ooquistes, normalmente, después de que esporulen, para lo cual la materia fecal se incuba a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) durante 2-7 días, preferentemente, en una dilución de dicromato potásico al 2%. Los criterios a seguir

para la especiación incluyen el tamaño, la forma y la presencia de elementos característicos como la cápsula micropilar, el micropilo, el color de la pared, el aspecto de los residuos de pared de ooquistes, etc. (Levine, 1985; Eckert, 1995), tal y como se comentó en el apartado de morfología (Tablas 1A, 1B).

De forma complementaria a los recuentos de ooquistes fecales también resulta de interés el análisis y caracterización de la diarrea, así como la asociación entre ambos parámetros. En algunos trabajos experimentales realizados en cabritos se ha clasificado la diarrea asociada a coccidiosis en cinco categorías (Ruiz et al., 2013a) (Tabla 2).

#### 3.6.4. Métodos moleculares (PCR)

En la última década se han realizado ensayos moleculares mediante PCR cuantitativa específica para distintas especies del género *Eimeria* (Raj et al., 2013). Esta metodología se ha empleado de forma experimental para el diagnóstico simultáneo de *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. necatrix*, especies que infectan a aves de corral (You, 2014). También fue posible extraer y amplificar el ADN de las siete especies de *Eimeria* a partir de muestras de heces de campo mediante un sistema PCR multiplex. En ambos casos, el método resultó práctico y preciso, por lo que podría utilizarse en la vigilancia y la realización de estudios epidemiológicos en coccidiosis producidas por *Eimeria* (Carvalho, 2011). Utilizando este método, también ha sido posible identificar tres especies de *Eimeria* de codornices (Gerhold et al., 2011), e incluso secuenciar y analizar la relación filogenética existente entre diferentes especies de coccidios en bovinos: *E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis* y *E. zuernii* (Kawahara et al., 2010). Más recientemente, se ha podido realizar una caracterización molecular, en base a diferentes marcadores, de las especies caprinas *E. christenseni* y *E. arloingi* encontradas en la provincia de Shaanxi (China).

Una de las principales ventajas del diagnóstico molecular e identificación de especies de *Eimeria* es la posibilidad de analizar grandes cantidades de muestras, ya que las heces (o el ADN purificado) pueden congelarse. Esto resulta en una herramienta de diagnóstico valiosa tanto para estudios de campo como para trabajos experimentales (Velkers et al., 2010). Además, la técnica de PCR a tiempo real permite, no sólo la identificación de especies de *Eimeria* sino también su cuantificación, con lo que la técnica puede tener un significado tanto cualitativo como cuantitativo (Morgan et al., 2009). Por último, otro de los potenciales de los ensayos basados en PCR para la identificación y detección de *Eimeria* incluye la posibilidad de identificar especies menores presentes en infecciones mixtas (Molloy et al., 1998).

### 3.7. TRATAMIENTO

La existencia de lotes de cría de animales de edades similares en una granja limita la acumulación y difusión de ooquistes y, sobre todo, permite focalizar el tratamiento para los grupos de edad susceptibles durante los periodos de peligro. Los tratamientos suelen realizarse en animales entre las 2-3 semanas y los 4-5 meses de vida y, normalmente, se

han de tratar todos los animales del grupo, incluso aquellos que no muestran síntomas, pues quizás sean éstos los más propensos a ser infectados.

Para el tratamiento específico de la coccidiosis se pueden emplear diversos compuestos farmacológicos. Algunos de estos fármacos actúan frente a las etapas finales del desarrollo y otros durante todo el desarrollo parasitario, por lo que su uso puede ser meramente terapéutico, profiláctico o metafiláctico; en este último caso el anticoccidiósico se aplica una vez que el animal está infectado pero no presenta signos clínicos **(Daugschies y Najdrowski, 2005)**.

Cuando se emplean fármacos que actúan exclusivamente frente a las etapas sexuales del parásito (los gamontes), la terapia tiene sólo un valor limitado, pues la mayor parte del ciclo ya se ha completado y, por tanto, se han producido la mayoría de los daños en el intestino **(Bohrmann, 1991; Mundt et al., 2003; Taylor et al., 2003)**. Preferiblemente, los medicamentos han de tener la capacidad para interrumpir la reproducción del parásito en una etapa temprana, es decir, la merogonia, a fin de evitar la multiplicación y posterior alteración de la mucosa **(Daugschies y Najdrowski, 2005)**. En cualquiera de los casos, aunque la terapia anticoccidiósica no sea plenamente curativa, siempre será recomendable para reducir el número de ooquistes liberado con las heces y, en consecuencia, la carga parasitaria en el medio **(Fox, 1985)**.

El tratamiento específico debe apoyarse en medidas sintomáticas, aplicando remedios para detener las hemorragias intestinales, astringentes para reducir la inflamación intestinal, soluciones electrolíticas, glucosa y alimentación seca para reducir la deshidratación, etc. **(Burger, 1983)**. Además, los antibióticos son recomendables si se sospecha de infecciones bacterianas secundarias **(Conlogue et al., 1984; Gräfner et al., 1985b; Mundt et al., 2005)**.

A continuación se relacionan los principales anticoccidiósicos empleados en rumiantes. Ninguno de ellos está registrado en la Unión Europea para caprinos, por lo que suelen utilizarse las dosis recomendadas en ovinos o, en ocasiones, concentraciones dobles o triples, ya que se ha demostrado que los caprinos tienen un metabolismo mayor que los ovinos y, por tanto, la biodisponibilidad de los fármacos podría ser menor **(Dilek et al., 2015)**.

### **3.7.1. Diclazuril**

Es un derivado de la triazinona que parece tener un efecto directo sobre varias etapas del ciclo de vida del parásito, en particular, sobre los merontes de primera generación, pero también sobre los de segunda generación y las etapas sexuales. Se ha demostrado que afecta la síntesis de la pared del parásito, lo que resulta en la formación de una pared de ooquiste incompleta y anormalmente engrosada y necrosis del cigoto tanto en *E. brunetti* como en *E. maxima* **(Verheyen et al., 1988)**. Además, se ha demostrado que el diclazuril causa alteración del potencial transmembrana de las mitocondrias e induce cambios ultraestructurales en los merozoítos **(Zhou et al., 2010)**.

Sus efectos son mayores cuando se administra en la fase temprana de la infección, antes de que se produzcan los daños en el intestino **(Taylor et al., 2003)**. La administración metafiláctica en terneros se ha demostrado que reduce la contaminación del medio y previene los efectos negativos de la coccidiosis en su crecimiento

(**Dauguschies et al., 2007**). De igual forma, se ha observado que los corderos tratados con diclazuril presentan menos lesiones intestinales, liberan menos ooquistes y muestran unas tasas de crecimiento mayores (**Alzieu et al., 1999; Platzer et al., 2005**). También se ha demostrado la eficacia del diclazuril en cabritos, como se indicará más adelante en el primer artículo presentado en la presente tesis doctoral (**Ruiz et al., 2012**).

### 3.7.2. Toltrazuril

El toltrazuril es una triazina de prolongada, por lo que se requiere realizar sólo un tratamiento de los animales. Es activo frente a esquizontes y gamontes y su administración puede ser oral o parenteral, considerándose un fármaco altamente eficaz y seguro en el tratamiento metafiláctico y terapéutico de coccidiosis en rumiantes (**Epe et al., 2005; Veronesi et al., 2011, 2013**). Actúa sobre etapas intracelulares del ciclo vital (**Haberkorn y Stoltefuss 1987**), afectando especialmente a las mitocondrias y al retículo endoplasmático (**Mehlhorn et al., 1984**). Este anticoccidiósico, administrado a corderos dentro el primer mes de vida, elimina de forma persistente las especies más altamente patógenas de *Eimeria* (*E. ahsata*, *E. ovinoidalis* y *E. crandallis*), prolongándose su efecto durante los dos meses siguientes al tratamiento (**Diaferia et al., 2013**). En este último estudio, los autores incluyeron también un grupo de animales tratado con diclazuril, pero los resultados siempre fueron mejores tras el tratamiento con toltrazuril, en términos de: a) porcentaje de animales positivos; b) recuentos fecales de ooquistes; c) frecuencia y gravedad de los trastornos entéricos; d) reducción de las especies de coccidios más patógenas. En los caprinos se ha demostrado igualmente el efecto del toltrazuril en las infecciones por coccidios (**McKenna, 1988; Chartier et al., 1992; Šlosárková et al., 1998; Balicka-Ramis, 1999; Iqbal et al., 2013a, b; Nunes et al., 2015; Awasthi et al., 2022**). Muy recientemente, se ha probado la eficacia del fármaco a distintas dosis y en diferentes tiempos, tal y como se recogerá en el tercer artículo presentado en esta tesis (**Guedes et al., 2024**).

### 3.7.3. Ponazuril

Ponazuril, un nuevo fármaco antiprotozoario de la clase de las triazinas, ha demostrado una aplicación prometedora en las infecciones por apicomplejos en aves. Sin embargo, su efecto y su mecanismo de acción no están claros. La eficacia frente a *E. tenella* se estudió inicialmente administrando diferentes dosis de ponazuril en el agua de bebida. Una dosis de ponazuril de 20 mg/L alivió eficazmente las lesiones cecales y disminuyó el número de merozoítos. Las micrografías electrónicas de transmisión (TEM) mostraron que los merozoítos adquirían forma irregular y se presentaron algunas protuberancias aparentes de la membrana externa, especialmente los merozoítos de segunda generación. Además, se observaron anomalías en el desarrollo en los macrogametocitos (**YanYang et al., 2023**).

### 3.7.4. Sulfonamidas

Las sulfonamidas, unos de los primeros anticoccidiósicos que se emplearon, son activas frente a la primera y segunda etapa de merontes, siendo coccidiostáticos a dosis bajas y coccidiósicos a dosis más altas (**Gräfner et al., 1985a; Mundt et al., 2005**). Se han utilizado en el tratamiento de la coccidiosis en el ganado vacuno y ovejas durante mucho



tiempo, pero ya no están autorizados para este fin en muchos países. Este tipo de fármacos también actúa frente a ciertas bacterias, por lo que su administración puede ayudar a suprimir las infecciones secundarias en brotes de coccidiosis (**Burger, 1983**). Algunos ejemplos de sulfonamidas empleadas como anticoccidióticos son las sulfaquinoxalina y la sulfametazina (**Argüello y Cordero del Campillo, 1999**).

### 3.7.5. Monensina

Pertenece al grupo de los antibióticos ionóforos y se ha empleado como un aditivo coccidiostático en piensos de pollo. Los ionóforos actúan sobre las formas libres intestinales de los coccidios (esporozoítos, merozoítos y gametocitos). También se ha documentado la actividad anticoccidiótica de la monensina en rumiantes cuando se aplica durante períodos prolongados de tiempo (**Parker et al., 1986**).

La monensina a 20 mg por tonelada de alimento controla la eliminación de ooquistes y aumenta la conversión alimenticia en las cabras, por lo que podría considerarse una buena opción para la prevención de la coccidiosis en caprinos; sin embargo, los niveles altos de monensina hacen que el alimento sea desagradable y tóxico (**Constable et al. 2012**).

### 3.7.6. Decoquinato

Las quinolonas se descubrieron por primera vez en 1962 y desde entonces han sufrido numerosas modificaciones en su núcleo para mejorar el espectro y la farmacocinética (**Galarini et al., 2009**). Se ha demostrado que el decoquinato administrado en forma de sal mineral es capaz de reducir la eliminación de ooquistes (**Andrade Jr. et al., 2012**), siendo eficaz en el tratamiento de la coccidiosis en corderos cuando se administra con el alimento durante al menos 28 días (**Taylor, et al., 2011**). Así mismo, su eficiencia también se ha probado en caprinos tras la administración en pienso a razón de (0,5 mg/kg durante al menos 28 días (**Keeton y Navarre 2018**).

### 3.7.7. Amprolio

Puede ser un tratamiento eficaz frente a las especies patógenas de *Eimeria* en cabritos, aunque para ello se deben utilizar dosis elevadas (**Young et al., 2011**). Su empleo no está permitido en muchos países, pero se sigue empleando en otros como Francia y EE.UU. El compuesto tiene baja toxicidad y ha de ser aplicado vía oral a través del agua potable durante cuatro a cinco días consecutivos. Su actividad fundamental es frente a los merontes (**Daugshies y Najdrowski, 2005**).

### 3.7.8. Lasalocid, salinomicina

Por último, el uso de estos fármacos que actúan en las primeras fases del ciclo biológico del parásito, también ha sido muy extendido pero, a diferencia del amprolio, a altas dosis sí pueden ser tóxicos (**Smith y Sherman, 2009**).

También están disponibles en el mercado productos combinados, que consisten en un compuesto sintético y un ionóforo (por ejemplo, nicarbazina/narasina - Maxiban®, Elanco) o 2 compuestos sintéticos (clopidol/benzocuoato de metilo - Lerbek®, Impextraco NV). Los medicamentos arsénicos como la roxarsona, que tiene cierta eficacia anticoccidial, el ácido arsanílico, la carbarsona y sus combinaciones, se han bdescatalogado en muchos países desde 2015, basándose en informes científicos que indicaban que el arsénico orgánico podría transformarse en arsénico inorgánico, que es altamente tóxico **(Nachman et al., 2013, Yang et al., 2016)**. Por último, la asociación de toltrazuril + fenbendazol, asociada a otras medidas, se ha probado como herramienta importante y adecuada para el control y tratamiento de *Eimeria* spp. en ganado joven **(Beltrán et al., 2024)**.

### 3.8. PROFILAXIS Y CONTROL

#### 3.8.1. Medidas higiénicas y de manejo

Los ooquistes de coccidios son resistentes al medio ambiente y pueden sobrevivir durante meses en condiciones adversas. También son resistentes a la mayoría de los desinfectantes disponibles cuando se usan en las concentraciones recomendadas **(Daugschies et al., 2013)**. Aun así, la cama y el suelo pueden desinfectarse con productos como hipoclorito sódico, cresol o fenol y, o bien mediante fumigaciones con formaldehído. Algunos químicos pueden ser efectivos, pero están en concentraciones que también son dañinas para los humanos y el ganado, por lo que no suelen utilizarse. De entre ellos, el compuesto organosulfurado conocido como metam sódico se ha empleado durante años, aplicado en fumigación, para prevenir la esporulación de ooquistes de *Eimeria* en camas de aves **(Fetterer et al., 2010)**. La desecación y el vapor (> 70 °C) constituyen otras alternativas para reducir la contaminación ambiental por ooquistes **(Parker y Jones, 1990; Fayer y Reid, 1982)**.

En la prevención y control de las coccidiosis es fundamental que se adopten también adecuadas medidas higiénicas. Por ejemplo, los comederos y bebederos han de estar lejos del suelo para evitar la contaminación fecal y la caída de los alimentos. Las explotaciones deben mantenerse secas y limpias y, en las zonas de pastoreo, se debe impedir que los animales jóvenes beban en charcas, pozos o zanjas de agua contaminadas. En general, una buena higiene es una valiosa ayuda para reducir la presión de infección **(Hiepe et al., 1978; Joachim, 2002)**.

En la práctica es imposible evitar la presencia de *Eimeria*, pero sí cabe reducirla a límites tolerables. Conviene evitar el hacinamiento de animales, alternar los alojamientos y pasar los cabritos lo más pronto posible a pastos que no estén contaminados por aprovechamiento anterior con animales adultos. La separación de adultos portadores y jóvenes es, igualmente, recomendable **(Daugschies y Najdrowski, 2005)**. Las cabras adultas, aunque no presenten ningún síntoma clínico, pueden diseminar ooquistes durante periodos muy prolongados y servir de fuente última de infección para los cabritos. Por este motivo, en rebaños problemáticos puede ser necesario aislar a los cabritos de sus madres en el momento del nacimiento y alimentarlos artificialmente hasta el destete.

En condiciones más favorables puede ser suficiente con proporcionar un lugar limpio y desinfectado y lavar cuidadosamente las ubres de la madre antes de que los cabritos mamen (**Smith y Sherman, 1994**).

### **3.7.2. Profilaxis terapéutica**

La profilaxis de la coccidiosis con coccidiostáticos en el agua potable o en los alimentos se emplea comúnmente para controlar la enfermedad, particularmente en sistemas intensivos de producción caprina (**Khodakaram-Tafti y Hashemnia 2017**).

La mayoría de los fármacos descritos anteriormente, aparte de su acción terapéutica, tienen la posibilidad de ser utilizados como preventivos, bien como profilácticos o como metafilácticos.

La quimioprofilaxis es útil, pero no debe olvidarse que los anticoccidiósicos, si bien previenen la enfermedad, también impiden el desarrollo de la inmunidad, de modo que, si se suprimen bruscamente, pueden aparecer brotes graves de coccidiosis. La vigilancia de las características de las heces, incluida la investigación cuantitativa de ooquistes, al menos en las épocas de riesgo, en las explotaciones intensivas, puede permitir establecer a tiempo la metafilaxia. La clave radica en permitir infecciones subclínicas, que inmunizan a los animales e impiden el acúmulo de elevadas cantidades de ooquistes que puedan dar lugar a brotes clínicos (**Argüello y Cordero del Campillo, 1999**). En general, se debe garantizar una exposición a la infección primaria suficiente para desencadenar inmunidad adquirida y, en consecuencia, en tratamientos metafilácticos con diclazuril se ha sugerido que: (1) el momento de la primera dosis se establezca en 4 semanas de vida, una vez que los cabritos ya han tenido contacto con especies de *Eimeria* y, por lo tanto, han tenido la oportunidad de desarrollar reacciones inmunes; (2) por la misma razón, los tratamientos con un intervalo de 3 semanas (en lugar de 2) serían una mejor opción en caso de que sea necesaria una dosis adicional para controlar la coccidiosis caprina en rebaños con alto índice de coccidiosis clínica (**Ruiz et al., 2012**).

En épocas de riesgo sería conveniente la administración preventiva de un anticoccidiósico durante 15-30 días con el alimento, o bien realizar de uno a tres tratamientos puntuales, según el fármaco. Los individuos enfermos deben alojarse en pequeños lotes, con cama seca y abundante, limpieza y desinfección escrupulosa para impedir la difusión de los ooquistes, y alimentación sustanciosa con aportación de minerales, vitaminas y terapia de rehidratación (**Argüello y Cordero del Campillo, 1999**).

Ha de tenerse presente que el tratamiento preventivo en animales lactantes es difícil debido a que pueden no ingerir o beber lo suficiente como para obtener niveles adecuados de coccidiostático. Además, otro aspecto a tener en cuenta es la posible aparición de resistencias a los anticoccidiósicos cuando se emplean de forma continua e indiscriminada (**Stephan et al., 1997**).

### **3.8.3. Medidas alternativas de control**

El uso continuo de coccidiostáticos reduce el número de ooquistes eliminados en las heces con el tiempo, pero también puede conducir al desarrollo de fenómenos de

resistencia, por lo que es necesario un seguimiento regular de los animales tratados. Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado en aves de corral, existiendo una gran variedad de estudios que analizan y evalúan el incremento de resistencias a los productos anticoccidióticos comúnmente utilizados frente a la coccidiosis aviar (**McDougald 1981; Stephan et al. 1997**). Por el contrario, no hay datos disponibles en la literatura sobre la resistencia a los anticoccidióticos en caprinos, pero según los resultados publicados en ovejas, no se descarta que éste deba ser un tema por investigar en detalle en el futuro (**Gjerde et al., 2010; Odden et al. 2018**).

Debido a la creciente aparición de resistencia anticoccidiótica, pero también a otros factores como la limitación del uso de coccidiostáticos en la Unión Europea, los tiempos de supresión en carne y leche, y la demanda de productos orgánicos libres de residuos por parte de los consumidores, en la última década se ha estimulado la búsqueda de nuevas alternativas de control y terapia frente a la coccidiosis.

Una de estas alternativas es el empleo de plantas medicinales. Se han realizado varios estudios para evaluar el efecto de diferentes extractos de plantas frente a la coccidiosis caprina. A modo de ejemplo, la exposición de los frutos de *Melia azedarach* reduce la producción de ooquistes de *Eimeria* en cabras Tswana (**Madibela y Kelemogile 2008**), y las plantas *Aloe ferox* y *Leonotis leonurus* fueron, incluso, eficaces frente a infecciones mixtas con helmintos y coccidios (**Maphosa y Masika 2012**). Así mismo, se ha observado que la harina de hojas de *Sericea lespedeza* usada como suplemento alimenticio resulta eficaz en la prevención de la coccidiosis en corderos (**Burke et al., 2013**). De manera similar, se ha encontrado signos clínicos más bajos en cabras alimentadas con *Sericea lespedeza* (*Lespedeza cuneata*) granulada seca en comparación con el grupo control, además de una disminución en los recuentos de OPG (**Kommuru et al., 2014**).

En sistemas de producción caprina con limitaciones nutricionales de forrajes y otros recursos alimenticios, se sugiere como alternativa la suplementación con forrajes de leguminosas durante periodos de sequía severa, o fuentes de energía como melazas, granos de cereales y subproductos, además de minerales y vitamina A (**Kawas et al., 2010**). Otra estrategia de control relacionada con la nutrición en la producción animal sostenible ha sido el uso de probióticos. Así, al investigar los efectos del kéfir sobre la excreción de ooquistes de coccidios y el rendimiento de los cabritos lecheros después del destete, se registró un número reducido de muestras positivas y recuentos de OPG más bajos, pero la frecuencia de la diarrea, el nivel de excreción más alta de ooquistes y el rendimiento de los cabritos no se afectaron (**Das et al., 2012**).

Otra alternativa de control muy extendida en la coccidiosis aviar es la inmunoprofilaxis. En este sentido, existe una gran variedad de vacunas comercializadas en aves, que incluyen vacunas vivas (**McDonald y Shirley, 2009**), vacunas vivas atenuadas, como Paracox® y Livacox® (**Jeffers, 1975; Shirley y Millard, 1986; Bedrnik, 1989**), o aquellas que están basadas en el uso de cepas menos virulentas del parásito, como NobilisCox ATM®. Aunque aún sin comercializar, otras vacunas han utilizado ADN recombinante de especies de *Eimeria* aviares como método de protección (**Ding et al., 2005; Ma et al., 2011; Zhao et al., 2021**). También se ha observado que la inmunización oral, en perlas de gel y spray, con dosis bajas de ooquistes del género *Eimeria* se ha

comprobado que aumenta la resistencia a la infección por coccidios de pollos criados en suelo, los cuales no mostraron una reducción de la ganancia de peso ni de la conversión del alimento, dos indicadores de la presencia de coccidiosis en aves (**Jenkins et al., 2013**). Mucho menor es el número de estudios sobre inmunoprofilaxis en la coccidiosis de rumiantes. En ellos, cabría mencionar el ensayo realizado por **Ruiz et al. (2014)** en caprinos, cuyo objetivo fue comprobar si animales inoculados oralmente con ooquistes esporulados de *Eimeria ninakholyakimovae* atenuados mediante irradiación X adquirirían inmunidad frente a una reinfección. Este trabajo constituye el tercer artículo de la presente tesis doctoral y los resultados se presentarán en detalle en secciones posteriores.



## **4. PRESENTACIÓN DE ARTÍCULOS**



**Estrategias de control mediante el uso de diclazuril (Vecoxán®)  
frente a la coccidiosis en cabritos**

**Parasitology Research (2012) 110: 2131-2136**

\*RESUMEN\*

La coccidiosis es probablemente la principal enfermedad parasitaria que afecta a los cabritos durante el periodo de destete, dejando importantes pérdidas económicas en la producción caprina. Se atribuye a las infecciones producidas por las diferentes especies del género *Eimeria*. Afecta principalmente a cabritos comprendidos entre las 2 semanas y 4 meses de edad, y se manifiesta en el animal con graves cuadros diarreicos, en ocasiones hemorrágicos, frecuentemente acompañados de mucus e, incluso, de restos de la mucosa intestinal. Otros signos que acompañan la parasitación por *Eimeria* spp. incluyen debilidad, anorexia, pérdida de peso y retraso en el crecimiento de los animales infectados.

Para el tratamiento y control de la coccidiosis se utilizan comúnmente agentes químicos conocidos como anticoccidiósicos o coccidiostáticos. Existe un número relativamente elevado de este tipo de fármacos, todos con una elevada eficacia pero, hasta el momento, ninguno de ellos está registrado para su uso en ganado caprino. Por otro lado, al tratarse de parásitos de transmisión orofecal, el tratamiento con agentes químicos se recomienda combinarlo con prácticas de manejo que limiten el contacto entre el parásito y el hospedador, en particular extremando las medidas higiénico-sanitarias.

En el presente estudio se ha evaluado la eficacia del diclazuril (Vecoxan®, Janssen-Cilag) en la prevención, tratamiento y control de cabritos afectados por diferentes especies de *Eimeria* spp. presentes de manera natural en una granja de producción caprina. Se incluyeron un total de 101 cabritos de aproximadamente 2-4 semanas de edad pertenecientes a la raza Majorera, de aptitud lechera. Al tratarse de un estudio de campo controlado con grupos paralelos de animales, los cabritos objeto de estudio se aislaron de su madre inmediatamente después del nacimiento, siendo alimentados con leche artificial (Bacilactol®, CAPISA) durante todo el experimento y, a partir de los 15 días del nacimiento, se empezó a suministrar agua, heno y pienso de arranque (CAPISA) a libre disposición.

Los animales del estudio se distribuyeron en cinco grupos, formado por 19-23 cabritos cada uno de ellos, que se alojaron en corrales separados sobre suelos de slat. La composición y los tratamientos realizados en cada grupo experimental se detallan a continuación:

- *Grupo 1* (n=23): animales tratados con 1 mg de diclazuril (Vecoxan®, Janssen-Cilag) / Kg de peso corporal v.o. una vez al comienzo del experimento (día 0).
- *Grupo 2* (n=23): animales tratados con 2 mg de diclazuril (Vecoxan®, Janssen-Cilag.) / Kg de peso corporal v.o. una vez al comienzo del experimento (día 0).
- *Grupo 3* (n=19): cabritos tratados dos veces con 1 mg / Kg de peso corporal v.o. del medicamento los días 0 y 14.

- *Grupo 4* (n=20): cabritos tratados dos veces con 2 mg / Kg de peso corporal v.o. del medicamento los días 0 y 14.
- *Grupo 5* (n=22): animales sin tratar o grupo CONTROL.

La toma de muestras de heces se realizó individualmente a partir del recto en los días -2, 0, 14, 28 y 42 del experimento. Concluido el muestreo, el conjunto de las muestras fecales se trasladaron inmediatamente al Laboratorio de Parasitología (ULPGC) y se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento. En los mismos días en los que se tomaron muestras de heces se estimó el peso corporal y se realizó la inspección clínica individual de todos los animales.

A nivel de laboratorio se determinaron los recuentos de ooquistes por gramo de heces (OPG) por la técnica de McMaster modificada. Además, con el fin de identificar las especies de *Eimeria* responsables de la coccidiosis clínica en cabritos observada en este estudio, y para evaluar su dinámica después del tratamiento con diclazuril, se realizó una identificación de los ooquistes en las muestras tomadas en todos los intervalos de tiempo. Se identificaron un total de nueve especies de *Eimeria* distintas en cada uno de los cinco grupos, de las cuales *E. arloingi*, *E. ninakohlyakimovae* y *E. christensenii* fueron las especies más frecuentes.

El análisis de los recuentos de ooquistes y de los signos clínicos demuestra que la administración de diclazuril en cabritos reduce los recuentos fecales de ooquistes (OPG) y el riesgo de coccidiosis clínica en el período de destete. El calendario del primer tratamiento deberá ajustarse mejor a las 4 semanas de vida, una vez los cabritos ya han tenido contacto con diferentes especies de *Eimeria* y, por lo tanto, hayan tenido la oportunidad de desarrollar reacciones inmunológicas; (2) por la misma razón, los tratamientos con un intervalo de 3 semanas (en lugar de 2) sería una mejor opción cuando sea necesaria la administración de una dosis adicional para controlar la coccidiosis de caprina en rebaños con problemas de coccidiosis clínica graves.

De los datos presentados en este estudio puede concluirse que el tratamiento con diclazuril es altamente eficaz frente la coccidiosis en cabritos. Sin embargo, la estrategia de control óptima debe adaptarse a las condiciones de manejo y a la presencia de coccidiosis clínica o subclínica en el rebaño. En las explotaciones con un historial de graves problemas de eimeriosis caprina clínica, un doble tratamiento con dosis doble del anticoccidiósico diclazuril (2 mg/Kpv), sería la mejor estrategia de control en términos de reducción de la excreción de ooquistes, mejora de las tasas de crecimiento y disminución de la severidad de los signos clínicos. Por el contrario, la administración de una dosis única de 1 mg/kpv podría ser una alternativa profiláctica/metafiláctica adecuada para los rebaños con condiciones de manejo óptimas que contribuyan a prevenir la aparición de brotes clínicos de coccidiosis en cabritos.



# Control strategies using diclazuril against coccidiosis in goat kids

Antonio Ruiz · Aránzazu C. Guedes · María C. Muñoz · José M. Molina · Carlos Hermosilla · Sergio Martín · Yeray I. Hernández · Álvaro Hernández · Davinia Pérez · Lorena Matos · Adassa M. López · Anja Taubert

Received: 5 August 2011 / Accepted: 24 November 2011 / Published online: 23 December 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** Coccidiosis is probably the main parasitic disease affecting goat kids around the weaning period, leading to high economic losses in goat production due to deaths and delayed growth rates of infected animals. A total of 101 kids of 2–4 weeks of age, naturally infected with *Eimeria* spp., were divided into five groups and studies were conducted to analyse the effects of metaphylactic administration of diclazuril (Vecoxan®) on parasitological and productive parameters. Two different doses of diclazuril (1 and 2 mg/kg BW, p.o.) were given either at 3 weeks (single treatment) or at 3 and 5 weeks of life (double treatment). The faecal oocyst shedding and the body weights of the animals were monitored at 2-weeks intervals for 6 consecutive weeks. Treatments of goat kids with diclazuril were effective against the three most predominant *Eimeria* species recorded in this study (*E. arloingi*, *E. ninakohlyakimovae* and *E. christenseni*) and also against other minor species found in faecal examinations, including *E. alijeivi*, *E. caprina*, *E. jolchijevi*, *E. caprovina*, *E. hirci* and *E. aspheronica*). In consequence, OPG values lower than  $1 \times 10^3$  were detected in 90 to 100% of the animals up to 15–20 days post-treatment depending on the treatment regimen. Even a single dose of 1 mg/kg BW p.o. resulted in an increase of growth rates in

treated animals and therefore should be considered as a control strategy in farms precluding coccidian infections, whilst double and multiple dose treatments could be the recommendation for environments heavily contaminated with *Eimeria* oocysts. In relation to the OPG reduction and increased growth rates, the severity of the clinical signs (i.e., diarrhoea) was ameliorated in treated animals during the course of infection compared to that of non-treated or control kids. The precise timing of treatment appears crucial in order to prevent severe clinical coccidiosis and thereby enabling the adequate development of protective immune response against *Eimeria* challenge infections.

## Introduction

Coccidiosis caused by the apicomplexan protozoa *Eimeria* is a common intestinal parasitosis of goats (Koudela and Bokova 1998; Balicka-Ramisz 1999; Faizal and Rajapakse 2001; Ruiz et al. 2006). It has been described to predominantly affect young animals of 2–4 weeks of age mainly leading to non-haemorrhagic diarrhoea, occasionally characterized by excreted mucus and changes of colour from yellowish brown to dark brown, accompanied by weight loss, dehydration and growth delay (Koudela and Bokova 1998). Similar features have been reported for both *Eimeria*-infected calves (Niilo 1969; Svensson et al. 1994; von Samson-Himmelstjerna et al. 2006) and sheep (Gregory and Catchpole 1987, 1990). So far, a total of 16 *Eimeria* species have been described worldwide in goats (Soe and Pomroy 1992; Smith and Sherman 1994), amongst which *E. ninakohlyakimovae* is considered as the most pathogenic one (Levine 1985).

The metaphylaxis and control of ruminant coccidiosis should cause significant improvements on weight gains

A. Ruiz (✉) · A. C. Guedes · M. C. Muñoz · J. M. Molina · S. Martín · Y. I. Hernández · Á. Hernández · D. Pérez · L. Matos · A. M. López  
Parasitology Unit, Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35413 Arucas, Las Palmas, Spain  
e-mail: aruiz@dpat.ulpgc.es

C. Hermosilla · A. Taubert  
Institute of Parasitology, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany

and production, thus resulting in economic benefits for the producer (Forey 1990). Some compounds have been used for this purpose in the last few decades for both lambs (Foreyt et al. 1979; Horton and Stockdale 1981; Gjerde and Helle 1991) and calves (McMeniman and Elliott 1995; Hasbullah et al. 1996; Mundt et al. 2005), but were rarely used in goat coccidiosis. Diclazuril (Vecoxan<sup>®</sup>, Janssen-Cilag), a triazinone derivate, is an anticoccidial drug used for oral administration in sheep lambs. Its benefits as metaphylactic medication have been demonstrated in several studies, describing that the reduction of oocyst shedding and the amelioration of the lesions in intestinal epithelium seem to correlate with an increase of the average growth rates of affected animals (Alzieu et al. 1999; Taylor et al. 2003; Platzer et al. 2005). The application of this anticoccidial compound in cattle likewise results in significant reduction of oocyst excretion and prevents negative effects on growth performance of calves (Dauguschies et al. 2007). Diclazuril has also been registered as an effective anticoccidial feed additive for broilers (Maes et al. 1991; El-Banna et al. 2005) and appears to be effective against coccidiosis in species apart from ruminants or poultry, such as dogs and cats (Lloyd and Smith 2001) and rabbits (Vanparijs et al. 1989).

So far, no data are available in literature on the pharmacokinetics, efficacy and persistence of the drug in goats, neither in experimental nor under field conditions. This basic pharmacological information is of high importance and a prerequisite for the development of efficient control programs for goat coccidiosis in arid and semi-arid zones, where this ruminant species represents one of the most important economical resources for farmers (Abo-Shehadeh and Abo-Farieha 2003). Furthermore, the prescription of inappropriate (suboptimal) doses may promote the development of drug resistance, which has already been reported for diclazuril in avian fowl coccidiosis (Peek and Landman 2005). In consequence, there is an urgent need for monitored field studies to evaluate the effects of anticoccidials in goats. Therefore, in the present study we wanted to evaluate the effects of different administration procedures using the anticoccidial drug diclazuril (Vecoxan<sup>®</sup>, Janssen-Cilag) to prevent clinical goat coccidiosis in the critical weaning period. For this purpose, both parasitological (faecal oocyst counts and identification of *Eimeria* species) and productive (growth rate) parameters were evaluated throughout a 42-day post-treatment (dpt) period.

## Material and methods

A total of 101 goat kids of about 3 weeks age (18–22 days old) belonging to the Majoreta milk aptitude breed were included in this study. The trial was a reference-controlled field study with parallel groups and was carried out in a

semi-intensive goat farm in the Gran Canaria Island (Spain) with a history of moderate to severe clinical coccidiosis occurring in the weaning period. The goat kids were isolated from their mother immediately after birth and fed with special artificial milk (Bacilactol<sup>®</sup>, CAPISA) for lactating goat kids. Five groups of approximately 20 animals per group were allocated in separated pens in a different area of the farm, where they received milk exchanger from an automated feeding system and supplementation with starting concentrate for weaning kids (CAPISA). Groups 1 ( $n=23$ ) and 2 ( $n=23$ ) received 1 and 2 mg diclazuril (Vecoxan<sup>®</sup>, Janssen-Cilag.) /kg bodyweight (BW) p.o. once at the beginning of the experiment (day 0), respectively; groups 3 ( $n=19$ ) and 4 ( $n=20$ ) were treated twice with 1 and 2 mg/kg BW p.o. of the drug (days 0 and 14), respectively; and group 5 ( $n=22$ ) remained untreated.

Individual faecal samples were taken from the rectum on days -2, 0, 14, 28 and 42. Additionally, in order to check the efficacy of diclazuril against different *Eimeria* species, daily samples were taken from six kids randomly chosen from all treated groups 2 weeks after the last treatment for a period of 14 consecutive days. All samples were immediately subjected to the laboratory of the Department of Animal Pathology (University of Las Palmas de Gran Canaria, Spain) and maintained at 4°C until further processed. Counts of oocysts per gram of faeces (OPG) were determined by the modified McMaster technique (Thienpont et al. 1979). In case of very high oocyst counts, dilutions of the faecal suspension by 10 or 100 times were performed to enable proper counting. After the oocyst counting, the remaining faecal material was pooled according to each group category (groups 1–5) and incubated in Petri culture dishes (Nunc) to allow oocyst sporulation and further identification of the *Eimeria* species. Faecal oocyst cultures were performed in 2% potassium dichromate at room temperature (20–25°C) for at least 1 week according to Hermosilla et al. (2002). Sporulated oocysts were then concentrated by flotation in saturated sodium chloride solution and identified at 400× magnification applying a calibrated eyepiece according to keys reported by other investigators (Levine and Ivens 1986; Alyousif et al. 1992; Soe and Pomroy 1992).

The goat kids were weighed on days 0, 14, 28 and 42 of the experiment and were examined for the presence of clinical signs of coccidiosis (diarrhoea) or other typical diseases affecting animals within this age range. The animals were considered to present diarrhoea when faeces of lower consistency than normal were observed down legs, including explosive, fluid and watery diarrhoea.

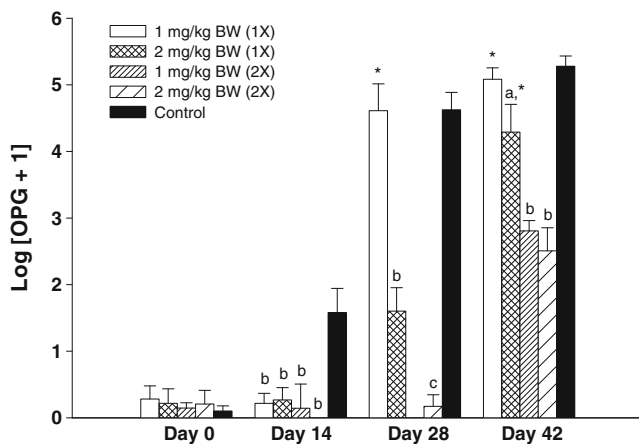
Faecal oocyst counts were logarithmically transformed and added by 1 ( $\log [OPG+1]$ ) to obtain normal distributions (Kolmogorov–Smirnov's normality test). For the estimation of bodyweight improvements, the data were expressed as growth rate ( $\ln \text{weight } 2 - \ln \text{weight } 1 / t \times 100$ ), with  $t$

representing the number of days between the sampling time points 1 and 2. One factorial analysis of variance, Tukey's multiple comparison test, Student's *t*-test and non-parametric Chi-square test were used to analyse the data (SigmaStat 2.03).

## Results and discussion

The results of this study demonstrate that the administration of diclazuril in goat kids reduces the OPG counts and the risk of clinical coccidiosis around the weaning period and, additionally, results in improved growth rates. This study also addressed the design of metaphylactic treatments with the goal to minimize clinical signs and production losses at the weaning time, which is the most critical period for clinical caprine coccidiosis due to *Eimeria* spp.

Overall, OPG values had considerable individual variation within groups. Individual maximum excretion was recorded at day 42 of the experiment for control group 5 ( $5.4 \times 10^6$  OPG), group 2 ( $1.7 \times 10^6$  OPG), group 3 ( $4.7 \times 10^5$ ) and for group 4 ( $1.4 \times 10^4$  OPG), whilst pick value for individual oocyst counts was observed at day 28 in group 1 ( $3.4 \times 10^6$  OPG). Oocyst faecal counts were significantly ( $P < 0.01$ ) reduced in single treated (1 mg diclazuril/kg BW p.o.) animals up to day 14 dpt and increased thereafter to OPG values recorded for untreated controls at the next sampling time points (days 28 and 42) (Fig. 1). The administration of a second treatment with diclazuril (1 mg/kg BW p.o.) had a cumulative effect and a prolonged OPG decrease up to 28 dpt. From this sampling point onwards, the



**Fig. 1** OPG (oocysts per gram of faeces) counts in goat kids naturally infected with *Eimeria* spp. and treated with diclazuril (Vecoxan®). Different doses (1 and 2 mg/kg BW, p.o.) were applied either at 3 weeks (day 0 of the experiments) or at 3 and 5 weeks of age (days 0 and 14 of the experiments). The OPG counts are depicted as the logarithm of the OPG plus one ( $\log [OPG + 1]$ ) and represent the mean  $\pm$  SEM in all the experimental groups. a:  $P < 0.05$  treated vs. controls; b:  $P < 0.01$  treated vs. controls; c:  $P < 0.001$  treated vs. controls; \* $P < 0.01$  between different treated groups

shedding of oocysts increased to moderate levels, which were, however, still significantly lower than those recorded in untreated control animals ( $P < 0.01$ ). In general, these results are in agreement with those previously reported in sheep lambs receiving single or double treatments with the same dosage (Alzieu et al. 1999), representing the recommended dose in this small ruminant host species. The same dosage administered to *E. bovis*- and *E. zuernii*-infected calves also reduced faecal counts up to 2 weeks post-treatment (Dauguschies et al. 2007), which indicates a comparable diclazuril metabolism in these three ruminants, in contrast to that reported for other antiparasitic drugs (Jabbar et al. 2006; Molina et al. 2008).

Treatments with double dose of diclazuril (2 mg/kg BW) appeared slightly more effective than the administration of 1 mg/kg BW, p.o. Firstly, animals treated with a double dose of diclazuril excreted significantly less oocysts at 28 and 42 of the experiment compared to kids treated with 1 mg/kg BW p.o. and to the untreated control (significance ranging from  $P < 0.05$  to  $P < 0.01$ ) (Fig. 1). Secondly, more than 50% of the goat kids daily monitored for the presence of oocysts in faeces after treatment with 1 mg/kg BW p.o. first released oocysts at 15 dpi and 100% did at 19 dpt, while in animals treated with the double dose, these reactions were delayed for one day. Thirdly, most of the treated goat kids suffering from severe coccidiosis during the experiments belonged to group 1 (treatment with 1 mg/kg BW, p.o.). Finally, goat kids that received a double dose of diclazuril had slightly higher growth rates than those receiving 1 mg/kg BW p.o., although differences were not statistically significant (Table 1). In accordance with these results, the benefits of the low dosage in metaphylactic treatments against coccidiosis have also been demonstrated in terms of increased growth performance in *Eimeria*-infected lambs and calves (Alzieu et al. 1999; Dauguschies et al. 2007).

Considering the overall results, a single oral dose of diclazuril of 1 mg/kg BW p.o. might be considered sufficient to overcome the critical period of weaning, during which lambs, calves and goat kids are highly sensitive to coccidian infections. However, Alzieu et al. (1999) suggested that a second treatment with diclazuril may be of advantage for lambs overexposed to high environmental contamination with oocysts. Accordingly, the average daily weight gain was significantly greater in the groups of lambs treated twice with diclazuril (Alzieu et al. 1999). In our current therapy study, the medication of the goat kids at two consecutive time points (days 0 and 14 of the experiment) with either 1 or 2 mg diclazuril/kg BW p.o. resulted in reduced oocyst shedding up to week 8 of age (days 42 of the experiment) ( $P < 0.01$ ) (Fig. 1), when most of the kids were already coming to the end of the weaning period. General clinical signs of coccidiosis occurred more often in animals medicated only once compared to double treated goat kids

**Table 1** Growth rates ( $\ln \text{weight } 2 - \ln \text{weight } 1 / t \times 100$ ) in goat kids naturally infected with *Eimeria* spp. and treated with different doses of diclazuril (Vecoxan®) and treatment regimens

	1 mg/ml BW (1×)	2 mg/ml BW (1×)	1 mg/ml BW (2×)	2 mg/ml BW (2×)	Untreated
0–14 days	3.393±0.207 <sup>c</sup>	2.632±0.242 <sup>b</sup>	2.563±0.353 <sup>b</sup>	2.493±0.318 <sup>b</sup>	1.348±0.186
14–28 days	0.481±0.153 <sup>b,*</sup>	2.005±0.263 <sup>a</sup>	2.272±0.413 <sup>b</sup>	2.16±1.115	1.384±0.202
28–42 days	1.089±0.111 <sup>b</sup>	1.232±0.299 <sup>a</sup>	0.741±0.196 <sup>a</sup>	1.037±0.323 <sup>a</sup>	0.151±0.294
0–42 days	1.654±0.09 <sup>b</sup>	1.709±0.0785 <sup>b</sup>	1.858±0.179 <sup>b</sup>	1.897±0.273 <sup>b</sup>	0.961±0.140

The growth rates amongst different sampling times (0–14, 14–28 and 28–42 days) and global growth (0–42) are depicted. Data represent the mean ± SEM in all experimental groups

<sup>a</sup>  $P < 0.05$  treated vs. controls

<sup>b</sup>  $P < 0.01$  treated vs. controls

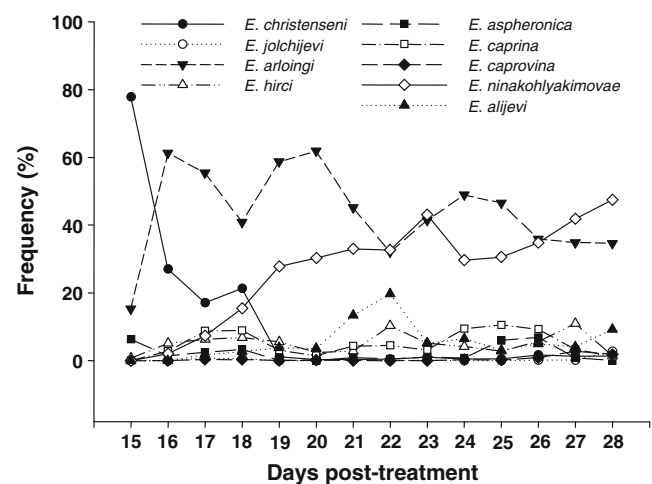
<sup>c</sup>  $P < 0.001$  treated vs. controls

\* $P < 0.01$  between different treated groups

(17.4 % vs. 2.1%, respectively). Furthermore, severe coccidiosis was detected in 4.3% and 0.7% of the kids receiving one or two anticoccidial treatments, respectively. In addition, although no significant differences were observed, the growth rates in groups treated twice (groups 3 and 4) were higher than in the corresponding groups which received a single treatment (Table 1). It remains to be elucidated, whether the time points for consecutive treatments have to be optimized. In general, the timing of treatment seems to be crucial for both preventing clinical disease and simultaneously allowing for the adequate development of a protective cellular immune response (Taylor et al. 2010). Accordingly, as reported by the same authors with respect to bovine coccidiosis, a too effective anticoccidial treatment resulting in the removal of all intestinal *Eimeria* stages and thereby preventing oocyst shedding in the faeces, risks the failure to develop protective immunity and, in consequence, recurrence of clinical disease when calves are confronted with heavily contaminated environments. It is known that the degree of immunity depends on the quantity of oocysts picked up during the primary infection (Conlogue et al. 1984); thus, a primary infection exposure sufficient to trigger acquired immunity has to be ensured. In this respect, the results of the present study would suggest that: (1) the timing of the first treatment should better be set at 4 weeks of life, once goat kids have already had contact with *Eimeria* species and thereby have the chance to develop immune reactions; (2) for the same reason, treatments at an interval of 3 weeks (instead of 2) would be a better option in case an additional dose is necessary to control goat coccidiosis in a particular herd.

In order to identify the *Eimeria* species responsible for the clinical caprine coccidiosis described in this study and to evaluate their dynamics after treatment with diclazuril, specification of *Eimeria* oocysts was performed at all sampling time points. Overall, a total of nine different *Eimeria* species was identified in each of the five groups throughout the

experiment. *E. arloingi*, *E. ninakohlyakimovae* and *E. christensenii* were the most predominant species. Other minor species were *E. alijevi*, *E. caprina*, *E. jolchijevi*, *E. caprovina*, *E. hirci* and *E. aspheronica*. These results are in agreement with those reported in an epidemiological survey on goat coccidiosis recently performed in Gran Canaria (Ruiz et al. 2006); exclusively *E. aspheronica* was identified as a novel species in this area. Although there were some variations in the frequency of the *Eimeria* species at the four sampling time points (days 0, 14, 28 and 42 of the experiment), the results showed no differences between experimental groups, indicating that diclazuril did not significantly affect the mean frequency of different *Eimeria* species after reinfection (Fig. 2). However, the kinetics of the three most prevalent *Eimeria* species differed after treatment: *E. christensenii* was the predominant species from the first to third days of oocyst shedding after treatment (Fig. 2). This evidence, together with the high prevalence of this particular



**Fig. 2** Frequency (%) of *Eimeria* species in goat kids naturally infected with *Eimeria* spp. after treatment with diclazuril (Vecoxan®). The data represent the mean ± SEM of 24 animals belonging to groups 1, 2, 3 and 4 of the experiment

*Eimeria* species in untreated control animals (group 5) at the first sampling time points (days 0 and 14 of the experiments) might suggest this species, recently described as a pathogenic one in goats (Young et al. 2011), to be involved in the etiology of early coccidiosis in goat kids. The frequencies of the two other most prevalent species (*E. arloingi* and *E. ninakohlyakimovae*) increased thereafter but remained longer in time in contrast to *E. christensenii*, which might indicate a correlation with the farm history of sustained clinical coccidiosis observed in the farm in goat kids during the weaning period. The particularities of the life cycle, the virulence and the innate/acquired cellular immune response developed by the host against the different parasitic stages of each *Eimeria* species could explain those differences as reported for bovine coccidiosis (Hermosilla et al. 2002; Dausgschies and Najdrowski 2005; Taubert et al. 2009; Sühwold et al. 2010).

In summary, the data presented here indicate that treatment with diclazuril is highly effective against coccidiosis in goat kids. The optimal control strategy should be adapted to the management conditions and the status of clinical or subclinical coccidiosis of the respective herd. In farms with a history of serious problems of clinical caprine eimeriosis, a double dose treatment with the anticoccidial drug diclazuril in addition to the administration of a second treatment would be the best control strategy in terms of the reduction of the oocyst shedding, the growth performance, the food conversion and the amelioration of clinical signs, whilst the administration of a single dose of 1 mg/kg BW p.o. could be a suitable alternative for herds with good management conditions preventing severe clinical coccidiosis in goat kids. Further studies, including combined immunological approaches, should be performed in terms of timing of treatments in order to exclude that anticoccidial treatment interferes with the development of a natural protective immunity against the different *Eimeria* species, which in the end is needed for optimal goat production.

**Acknowledgements** This study has been supported by Steve Laboratories and funding derived from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICIN) and the ACIISI (Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información). We also thank the goat farmers and Mr. Andrés Guedes González for his veterinary assistance during this reference field study. All experiments included in the present study comply with the current laws of the Spanish government.

## References

- Abo-Shehada MN, Abo-Farieha HA (2003) Prevalence of *Eimeria* species among goats in northern Jordan. *Small Rumin Res* 49:109–113
- Alyousif MS, Kasim AA, Al-Shawa YR (1992) Coccidia of the domestic goat (*Capra hircus*) in Saudi Arabia. *Int J Parasitol* 22:807–811
- Alzieu JP, Mage C, Maes L, Muelenaere C (1999) Economic benefits of prophylaxis with diclazuril against subclinical coccidiosis in lambs reared indoors. *Vet Rec* 144:442–444
- Balicka-Ramis A (1999) Studies on coccidiosis in goats in Poland. *Vet Parasitol* 81:347–349
- Conlogue G, Foreyt WJ, Wescott RB (1984) Bovine coccidiosis: protective effects of low-level infection and coccidiostat treatments in calves. *Am J Vet Res* 45:863–866
- Dausgschies A, Najdrowski M (2005) Eimeriosis in cattle: current understanding. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52:417–427
- Dausgschies A, Agneessens J, Goossens L, Mengel H, Veys P (2007) The effect of a metaphylactic treatment with diclazuril (Vecoxan®) on the oocyst excretion and growth performance of calves exposed to a natural *Eimeria* infection. *Vet Parasitol* 149:199–206
- El-Banna HA, El-Bahy MM, El-Zorba HY, El-Hady M (2005) Anticoccidial efficacy of drinking water soluble diclazuril on experimental and field coccidiosis in broiler chickens. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 52:287–291
- Faizal AC, Rajapakse RP (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
- Foreyt WJ (1990) Coccidiosis and cryptosporidiosis in sheep and goats. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 6:655–669
- 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
- Gjerde B, Helle O (1991) Chemoprophylaxis of coccidiosis in lambs with a single oral dose of toltrazuril. *Vet Parasitol* 38:97–107
- Gregory MW, Catchpole J (1987) Ovine coccidiosis: pathology of *Eimeria ovinoidalis* infection. *Int J Parasitol* 17:1099–10111
- Gregory MW, Catchpole J (1990) Ovine coccidiosis: the pathology of *Eimeria crandallis* infection. *Int J Parasitol* 20:849–860
- Hasbullah IH, 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* 58:169–170
- 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
- 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
- Jabbar A, Iqbal Z, Kerboeuf D, Muhammad G, Khan MN, Afaq M (2006) Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life Sci* 79:2413–2431
- Koudela B, Bokova A (1998) Coccidiosis in goats in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 76:261–267
- Levine ND (1985) *Veterinary protozoology*. Iowa State University Press, Ames, IA
- Levine ND, Ivens V (1986) *The Coccidian Parasites (Protozoa, Apicomplexa) of Artiodactyla*. University of Illinois Press, Urbana, pp 120–141
- Lloyd S, Smith J (2001) Activity of toltrazuril and diclazuril against *Isospora* species in kittens and puppies. *Vet Rec* 148:509–511
- Maes L, Vanparijs O, Marsboom R (1991) Effect of diclazuril (Clina-cox) on the development of protective immunity against *Eimeria tenella*: laboratory trial in broiler chickens. *Poult Sci* 70:504–508
- McMeniman NP, Elliott R (1995) Control of coccidia in young calves using lasalocid. *Aust Vet J* 72:7–9
- Molina JM, Ruiz A, Hernández B, González JF, Martín S, Hernández YI (2008) Effect of Eprinomectin “pour-on” on *Haemonchus*

- contortus* egg shedding in experimentally infected goats. Aust Vet J 86:444–445
- Mundt HC, Bangoura B, Mengel H, Keidel J, Dausgies 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–S142
- Niilo L (1969) Experimental infection of newborn calves with coccidia and reinfection after weaning. Can J Comp Med 33:287–291
- 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
- Platzer B, Prosl H, Cieslicki M, Joachim A (2005) Epidemiology of *Eimeria* infections in an Austrian milking sheep flock and control with diclazuril. Vet Parasitol 129:1–9
- 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
- Smith MC, Sherman DM (1994) Goat medicine. Lea and Febiger, Philadelphia, PA
- Soe AK, Pomroy WE (1992) New species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the domesticated goat *Capra hircus* in New Zealand. Syst Parasitol 23:195–202
- Sühwold A, Hermosilla C, Seeger T, Zahner H, Taubert A (2010) T cell reactions of *Eimeria bovis* primary and challenge-infected calves. Parasitol Res 106:595–605
- Svensson C, Uggla A, Pehrson B (1994) *Eimeria alabamensis* infection as a cause of diarrhoea in calves at pasture. Vet Parasitol 53:33–43
- Taubert A, Behrendt JH, Sühwold A, Zahner H, Hermosilla C (2009) Monocyte- and macrophage-mediated immune reactions against *Eimeria bovis*. Vet Parasitol 164:141–153
- Taylor MA, Catchpole J, Marshall J, Marshall RN, Hoeben D (2003) Histopathological observations on the activity of diclazuril (Vecoxan) against the endogenous stages of *Eimeria crandallii* in sheep. Vet Parasitol 116:305–314
- Taylor MA, Andrews AH, Alzieu JP, Holzhauer M, Kaske M, Willemsen M (2010) Role of immunity in the management and control of bovine coccidiosis. Vet Rec 166:831–832
- Thienpont D, Rochette F, Van Parijs OFJ (1979) Diagnosing helminthiasis by coprological examination. Janssen Research Foundation, Beerse, p 187
- Vanparijs O, Hermans L, van der Flaes L, Marsboom R (1989) Efficacy of diclazuril in the prevention and cure of intestinal and hepatic coccidiosis in rabbits. Vet Parasitol 32:109–117
- von Samson-Himmelstjerna G, Epe C, Wirtherle N, von der Heyden V, Welz C, Radeloff I, Beening J, Carr D, Hellmann K, Schnieder T, Krieger K (2006) Clinical and epidemiological characteristics of *Eimeria* infections in first-year grazing cattle. Vet Parasitol 136:215–221
- Young G, Alley ML, Foster DM, Smith GW (2011) Efficacy of amprolium for the treatment of pathogenic *Eimeria* species in Boer goat kids. Vet Parasitol 178:346–349

**Protección frente a la coccidiosis clínica en cabritos mediante la inmunización con ooquistes atenuados de *Eimeria ninakohlyakimovae***

**Veterinary Parasitology 199 (2014) 8-17**

\*RESUMEN\*

La coccidiosis caprina, que afecta principalmente a cabritos jóvenes alrededor del período de destete, es a nivel mundial la enfermedad más importante en la industria caprina. Conlleva importantes pérdidas económicas para los ganaderos que ven sus rebaños diezmados por las muertes que produce esta enfermedad en cabritos a las pocas semanas de edad, aparte de la necesidad de reposición de los animales del rebaño que tiene que ser suplida mediante una nueva inversión.

El control de la coccidiosis caprina se ha basado tradicionalmente en una combinación de medidas higiénicas y de manejo tradicionales junto con la prevención terapéutica. Esto último está cada vez más obstaculizado por la creciente aparición de resistencias frente a los fármacos anticoccidióticos, por lo que sería importante el desarrollo de vacunas frente a las infecciones por este grupo de protozoos.

En el presente estudio se realizó un ensayo de inmunización con ooquistes atenuados de *Eimeria ninakohlyakimovae*. Los ooquistes se atenuaron mediante irradiación X, para lo cual se expusieron en un acelerador lineal Mevatron® (Siemens) asignado en el Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín (Las Palmas, España), a una irradiación total de 20 kilo Rads durante 15 min aplicando una intensidad de rayos X de 6 mV y una velocidad de 50 cGy/min. El diseño experimental incluyó un total de 18 cabritos divididos en los siguientes grupos:

- (i) animales inmunizados con ooquistes atenuados de *E. ninakohlyakimovae* a las 5 semanas de edad e infectados 3 semanas después con ooquistes homólogos no atenuados (grupo 1)
- (ii) animales infectados con ooquistes de *E. ninakohlyakimovae* no atenuados a las 5 semanas de edad y re infectados 3 semanas después con ooquistes homólogos no atenuados (grupo 2)
- (iii) Animales primo-infectados con ooquistes de *E. ninakohlyakimovae* no tratados a las 8 semanas de edad (control de reinfección, grupo 3);
- (iv) animales control no infectados (grupo 4).

Los cabritos inmunizados con ooquistes vivos atenuados de *E. ninakohlyakimovae* (grupo 1) excretaron significativamente menos ooquistes en las heces (reducción del 95,3%) que los cabritos infectados con ooquistes no atenuados (grupo 2). Además, durante la fase de inmunización con ooquistes atenuados la sintomatología fue más leve en comparación con cabritos primo-infectados con ooquistes no tratados a las 5 semanas (grupo 2). De igual forma, los signos clínicos de coccidiosis después del desafío fueron comparables con los observados en el grupo primo-infectado y re infectado con ooquistes no atenuados. Es importante destacar que los animales vacunados aún seguían eliminando cantidades bajas de ooquistes, lo que garantizaría la contaminación ambiental y consiguientes infecciones de refuerzo para mantener la inmunidad en curso.

En conclusión, el presente estudio demuestra por primera vez que la inmunización con ooquistes atenuados de *E. ninakohlyakimovae* administrado por vía oral prácticamente no mostró efecto patógeno pero sí suficiente inmunogenicidad en términos de inmunoprotección.





## Immunization with *Eimeria ninakohlyakimovae*-live attenuated oocysts protect goat kids from clinical coccidiosis



Antonio Ruiz<sup>a,\*</sup>, María Carmen Muñoz<sup>a</sup>, José Manuel Molina<sup>a</sup>, Carlos Hermosilla<sup>b</sup>, Marisa Andrada<sup>c</sup>, Pedro Lara<sup>d</sup>, Elisa Bordón<sup>d</sup>, Davinia Pérez<sup>a</sup>, Adassa María López<sup>a</sup>, Lorena Matos<sup>a</sup>, Aránzazu Carmen Guedes<sup>a</sup>, Soraya Falcón<sup>a</sup>, Yaiza Falcón<sup>a</sup>, Sergio Martín<sup>a</sup>, Anja Taubert<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Parasitology Unit, Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, Spain

<sup>b</sup> Institute of Parasitology, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany

<sup>c</sup> Department of Anatomy and Compared Anatomy Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, Spain

<sup>d</sup> Department of Radiotherapeutical Oncology, University Hospital of Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 May 2013

Received in revised form

27 September 2013

Accepted 29 September 2013

#### Keywords:

*Eimeria ninakohlyakimovae*

X-irradiation

Immunoprotection

Goats

Vaccine

### ABSTRACT

Caprine coccidiosis, affecting mainly young goat kids around the weaning period, is worldwide the most important disease in the goat industry. Control of caprine coccidiosis is increasingly hampered by resistances developed against coccidiostatic drugs leading to an enhanced need for anticoccidial vaccines. In the current study we conducted an oral immunization trial with live attenuated sporulated *Eimeria ninakohlyakimovae* oocysts. Sporulated *E. ninakohlyakimovae* oocysts were attenuated by X-irradiation technique. The experimental design included a total of 18 goat kids divided into the following groups: (i) animals immunized with attenuated *E. ninakohlyakimovae* oocysts at 5 weeks of age and challenged 3 weeks later with non-irradiated homologous oocysts (group 1); (ii) animals infected with non-attenuated *E. ninakohlyakimovae* oocysts at 5 weeks of age and challenged 3 weeks later with non-attenuated homologous oocysts (group 2); (iii) animals primary-infected with untreated *E. ninakohlyakimovae* oocysts at 8 weeks of age (control of the challenge infection, group 3); (iv) non-infected control animals (group 4). Goat kids immunized with live attenuated *E. ninakohlyakimovae* oocysts (group 1) excreted significantly less oocysts in the faeces (95.3% reduction) than kids infected with non-attenuated ones (group 2). Furthermore, immunization with live but attenuated oocysts resulted in ameliorated clinical coccidiosis compared to goat kids infected with untreated oocysts (group 2) and resulted in equally reduced signs of coccidiosis after challenge infection compared to acquired immunity driven by non-attenuated oocysts. Overall, the present study demonstrates for the first time that live attenuated *E. ninakohlyakimovae* oocysts orally administered showed almost no pathogenicity but enough immunogenicity in terms of immunoprotection. Importantly, vaccinated animals still shed low amounts of oocysts, guaranteeing environmental contamination and consecutive booster infections to sustain ongoing immunity.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author at: Parasitology Unit, Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35413 Arucas, Las Palmas, Spain. Tel.: +34 928451113; fax: +34 928 454341.

E-mail address: [aruiz@dpat.ulpgc.es](mailto:aruiz@dpat.ulpgc.es) (A. Ruiz).

## 1. Introduction

*Eimeria* spp. typically infect cells of the intestine of a large number of hosts and are responsible for clinical coccidiosis. Currently, coccidiosis is considered as a major health problem for goat industry in different countries of Europe, Africa, Asia and Latin America (Koudela and Boková, 1998; Balicka-Ramisz, 1999; Faizal and Rajapakse, 2001; Ruiz et al., 2006; Cavalcante et al., 2012; Ruiz et al., 2013). Particularly in rural semi-arid geographic areas depending economically on goat rearing, such as the Mediterranean basin, North Africa, Asia or Latin America exhibiting analogous climate conditions, caprine coccidiosis severely affects animal health and profitability of the goat industry (Harper and Penzhorn, 1999; Ruiz et al., 2006; Cavalcante et al., 2012). During the last two decades there was a remarkable growth of caprine industry worldwide and up to date more than 920 million of animal heads are reared for meat and milk production worldwide (FAOSTAT, 2010). It is evident that caprine industry is not only playing a great role for the nutritional security of small farmers in many poor countries but also providing working opportunities to a sizeable population of the world.

In general, semi-intensive and intensive systems of goat rearing provide excellent environmental conditions for the accumulation and transmission of *Eimeria* oocysts. In the absence of effective control measures clinical coccidiosis is the inevitable outcome resulting in extensive morbidity and mortality particularly in young goat kids around the weaning period (Ruiz et al., 2006). Control of caprine coccidiosis is currently based on management practices combined with the use of metaphylactic chemotherapy with specific anticoccidial drugs. A vast number of different anticoccidial compounds have been used in the control of coccidiosis in sheep (Foreyt et al., 1979; Horton and Stockdale, 1981; Gjerde and Helle, 1991), in cattle (McMeniman and Elliott, 1995; Hasbullah et al., 1996; Mundt et al., 2005), in chickens (Gerhold et al., 2011) and in goats (Ruiz et al., 2012), but extensive use of drugs has caused the emergence of new drug-resistant *Eimeria* spp. strains worldwide (Peek and Landman, 2005). Moreover, no new drugs against *Eimeria* have been introduced into the market for many years and international legislation increasingly favours the abolition of the use of coccidiostatic drugs of livestock to be destined for human nutrition.

*Eimeria* spp. infections in ruminants (Catchpole et al., 1993a,b; Taubert et al., 2008; Sühwold et al., 2010) as well as in other host species (e.g. chickens and rodents) (Shirley and Millard, 1986; Jenkins et al., 1991; McDonald and Shirley, 2009; Shi et al., 2000) generally induce strong species-specific protective immune responses which prevent clinical disease derived from homologous challenge infections. Studies conducted in cattle *Eimeria* infections indicate that mainly T-cell responses are involved (Hermosilla et al., 1999; Taubert et al., 2008; Sühwold et al., 2010). T-cell reactions negatively correlate with excretion of oocysts of *E. bovis* (Taubert et al., 2008) and are therefore considered to be more effective for the development of protective immunity than the humoral-mediated immune responses (Faber et al., 2002). The evaluation of the cellular immune response in the ruminant system has

demonstrated the expansion of both CD4<sup>+</sup>- and CD8<sup>+</sup>-T cell subsets during primary *Eimeria* infection (Hermosilla et al., 1999; Sühwold et al., 2010). Furthermore, recent data showed enhanced antigen-specific IFN- $\gamma$  production in *Eimeria* infections in calves suggesting Th1-dominated immune responses in the pre-patency (Taubert et al., 2008).

Therefore, strong species-specific protective immunity within the genus *Eimeria* has generated an expanding portfolio of vaccines against coccidiosis, which are almost exclusively based on live vaccines, and are now commercially available exclusively for the poultry industry (McDonald and Shirley, 2009). Protective immunity in chickens can be induced by live virulent strain based vaccines (Coccivac<sup>®</sup>, Immunocox<sup>®</sup>) which incorporate a variable number of wild type strains (Lee, 1987) and is used by broiler-breeders (Tewari and Maharana, 2011). Furthermore, live attenuated strain based vaccines being attenuated by repeated selection for early maturation (precociousness) or by serial passage through embryonated eggs (Long, 1972; Jeffers, 1975) are used in avian coccidiosis. Paracox<sup>®</sup> (precocious strains; Shirley and Millard, 1986) and Livacox<sup>®</sup> (precocious: TA strains; Bedrnik, 1989) are two examples of such attenuated live vaccines and their performance was comparable to anticoccidial drug treatments (Williams et al., 1999). Also live, less virulent strain based vaccines isolated from the field, such as NobilisCoxATM<sup>®</sup> can effectively be used in chicken coccidiosis. Other vaccination approaches in chicken coccidiosis have included recombinant based vaccines (Ding et al., 2005; Ma et al., 2011), but are not commercially available until now. Biological effects of gamma-irradiation on laboratory and field isolates of diverse avian *Eimeria* spp. (Bajwa and Gill, 1977; Gilbert et al., 1998), e.g. *E. tenella*, *E. acervulina* and *E. maxima*, have also shown the potential to attenuate parasites by reducing the asexual reproduction and, in consequence, the total oocyst shedding (Jenkins et al., 1997).

In principle, as demonstrated for avian coccidiosis, vaccination with attenuated caprine *Eimeria* oocysts on a mass scale should also be feasible within goat industry. On this account, the aim of the present work was to achieve immunological protection by using attenuated *E. ninakohlyakimovae* X-irradiated oocysts. Our study demonstrates for the first time the efficacy of live attenuated *E. ninakohlyakimovae* oocysts administered orally to goat kids to induce immunity against homologous infections, which may be considered as a promising safe prophylactic strategy against goat coccidiosis.

## 2. Material and methods

### 2.1. Parasite maintenance

The *E. ninakohlyakimovae* strain GC used in the current study was initially isolated in 2006 from the field of naturally infected goats in the Gran Canaria Island (Spain) and maintained by passages in goat kids for oocysts production (Ruiz et al., 2013). For oocyst mass production, goat kids were orally infected at the age of 4 weeks with  $2 \times 10^5$  sporulated *E. ninakohlyakimovae* oocysts. Oocysts were isolated and purified from faeces beginning 14 days p.i.

according to the method proposed by Jackson (1964) and then concentrated. Sporulation of oocysts was achieved in a week by leaving this suspension at room temperature (25 °C) and stirring the oocyst suspension daily to infuse oxygen into the suspension. Finally, sporulated oocysts were stored in a 2% potassium dichromate solution at 4 °C until further use. Only oocysts being less than six-month old were used in the experiments.

## 2.2. Attenuation of *Eimeria ninakohlyakimovae* oocysts

For parasite attenuation, approximately  $2 \times 10^6$  sporulated oocysts of *E. ninakohlyakimovae* were washed three times (400 × g, 10 min) with sterile distilled H<sub>2</sub>O in order to remove the 2% potassium dichromate, re-suspended in 20 ml sterile distilled H<sub>2</sub>O and transferred into a 25 cm<sup>2</sup> tissue plastic culture flask (Nunc). This oocyst suspension was exposed to a lineal accelerator Mevatron® (Siemens) allocated at the University Hospital of Gran Canaria Dr Negrín (Las Palmas, Spain), with a total irradiation of 20 kilo Rads during 15 min applying an intensity of 6 mV X-rays and a speed of 50 cGy/min.

## 2.3. Goat kids

A total of 18 goat kids of the Majorera breed was purchased from a local farmer at the age of 1–5 days and maintained under parasite-free conditions in autoclaved stainless steel cages in a restricted stable (Faculty of Veterinary Medicine, University of Las Palmas de Gran Canaria, Spain). In order to minimize the contact of goat kids with coccidian parasites, animals were treated with Vecoxan® (Janssen-Cilag) and Halocur® (Intervet) just at their arrival to the Faculty of Veterinary Medicine. Following this procedure we aimed to prevent *E. ninakohlyakimovae* development in case goat kids could have ingested some oocysts during the first days of life. As the prepatent period of *E. ninakohlyakimovae* is about 14 days, demonstration of the absence of coccidian infections was performed using conventional parasitological methods two weeks after the arrival of the animals and repeated just before the experimental infections were carried out. The same was done to avoid cross reactions to *Cryptosporidium*. Goat kids were fed with the milk substitute Bacilactol® (Capisa) and commercial concentrate pellets for weaning goat kids (Starting Concentrate, Capisa). Water and sterilized hay were always given ad libitum. All animal procedures were conducted in strict accordance with national animal ethics and by institutional review board-approved protocols.

## 2.4. Experimental design

For experimental purposes goat kids were randomly divided into the following four groups: group 1 ( $n=5$ ; X-Rad Immunized): animals orally immunized with attenuated sporulated *E. ninakohlyakimovae* oocysts at day 1 of the experiment and challenged at day 21 with non-attenuated homologous oocysts; group 2 ( $n=5$ ; Challenge Infected): animals orally immunized with non-attenuated sporulated *E. ninakohlyakimovae* oocysts at day 1 and challenged at day 21 with non-attenuated

homologous oocysts; group 3 ( $n=4$ ; Challenge Control): animals primary-infected with non-attenuated sporulated *E. ninakohlyakimovae* oocysts at day 21; group 4 ( $n=4$ ; Uninfected Control): non-infected animals. Day 1 of the experiment corresponds to 5<sup>th</sup> week of age in all groups.

All infections were performed orally via gastro-ruminal tube using an infectious dose of  $2 \times 10^5$  sporulated attenuated or non-attenuated oocysts of the *E. ninakohlyakimovae* CG strain. Levels of immunoprotection were evaluated by productive (body weight), clinical (presence of clinical signs and variation in blood parameters) and parasitic (oocyst counts in faeces) parameters. To achieve this assessment, goat kids were weekly weighted, bled from the jugular vein and further examined for the presence of clinical signs of coccidiosis (diarrhoea) or for any other typical disease affecting goat kids within this range of age. Individual faecal samples were daily taken from the rectum starting at 14 days post infection (p.i.) and ending at 21 days p.i. both in primary and challenge infections. All samples were immediately submitted to the laboratory of the Department of Animal Pathology (University of Las Palmas de Gran Canaria, Spain) and maintained at 4 °C until further processed.

Goat kids were euthanized on day 42 and then subjected to a complete necropsy. Samples from different areas of the gastrointestinal tract and regional lymph nodes, in addition to specimens from the rest of the organs, were taken for histopathological analysis.

## 2.5. Clinical, parasitological and haematological determinations

The faecal consistency was judged immediately after individual collection according to faecal score (FS) keys described in Table 1: (0) clean normal; (1) dried soiling normal; (2) wet soiling diarrhoea; (3) diarrhoea down legs; (4) explosive diarrhoea. Signs of diarrhoea were judged as evident when FS was >0, when faeces of lower consistency were observed around the perianal region (dry-1 or wet-2) or down legs, including explosive, fluid and watery diarrhoea. Additionally, all faecal samples were evaluated for oocysts excretion by modified McMaster counting (Thienpont et al., 1979) and expressed as oocysts per gram of faeces (OPG). In cases of very high OPG values dilutions of the faecal suspension by 10 or 100 times were performed to enable accurate counting of oocysts in McMaster chambers according to Bangoura and Daugschies (2007).

For haematological assessments, samples were collected in VetCollect® tubes (IDEXX) and immediately processed by using the haematology analyzer LaserCyte® (IDEXX). Packed cell volumes (PCV) were determined by centrifugation in a standard capillary microhaematocrit centrifuge and blood smears were stained with Panoptic staining (Diff-Quick) to perform differential leucocyte counting.

## 2.6. Histopathological analysis

Tissue specimens were collected and fixed in 4% formaldehyde (Merck) in phosphate-buffered saline (PBS) for 24 h, dehydrated and embedded in paraffin according

**Table 1**  
Faecal scores in primary- and challenge-infected goat kids with *Eimeria ninakohlyakimovae*.

		PRIMARY INFECTION							
		Days of the experiment							
		14	15	16	17	18	19	20	21
G1 / X-Rad Immunized									
	K1								
	K2								
	K3								
	K21								
	K22								
G2 / Challenge Infected									
	K4								
	K5								
	K7								
	K23								
	K24								
G3,4 / Uninfected Control									
	K8								
	K9								
	K25								
	K26								
	K31								
	K32								
	K33								
	K34								

		CHALLENGE INFECTION							
		Days of the experiment							
		35	36	37	38	39	40	41	42
G1 / X-Rad Immunized									
	K1								↓
	K2								↓
	K3								↓
	K21								↓
	K22								↓
G2 / Challenge Infected									
	K4								↓
	K5								↓
	K7								↓
	K23								↓
	K24								↓
G3 / Challenge Control									
	K8								↓
	K9								↓
	K25								↓
	K26								↓
G4 / Uninfected Control									
	K31								↓
	K32								↓
	K33								↓
	K34								↓

Individual faecal scores of goat kids (K) primary infected at day 1 of the experiment either with  $2 \times 10^5$  attenuated sporulated oocysts of *E. ninakohlyakimovae* (G1: X-Rad Immunized) or non-attenuated oocysts (G2: Challenge Infected). On day 21 all these animals were challenged with the same dose of non-attenuated oocysts. Four animals primary infected at day 21 of the experiment were used as Challenge Control (G2) and four non-infected kids served as controls of infection (G4: Uninfected Control). The arrow (↓) point to either the day of sacrifice or the death of the animals. The clinical evaluation of the diarrhoea was determined using the following score:

- 0 Clean normal
- 1 Dried soiling normal
- 2 Wet soiling diarrhoea
- 3 Diarrhoea down legs
- 4 Fluid, watery or bloody diarrhoea

to standard procedures. Cross sections of 4  $\mu\text{m}$  were stained with haematoxylin–eosin (H&E, Merck) and examined by light microscopy (Leitz Laborlux X Wild GMBH microscope). Quantification of leucocyte populations (lymphocytes, macrophages, eosinophils and neutrophils) in tissue sections was performed on the ileum and colon samples of uninfected (controls – group 4) and primary- or challenged infected *E. ninakohlyakimovae* goat kids (groups 1, 2 and 3). Cells were counted using a 10 $\times$  eyepiece containing a calibrated graticule and 40 $\times$  objective lens viewing an area of 0.05265 mm<sup>2</sup>. The counts were randomly taken on 20 graticule fields within the mucosal surface. The counts were expressed as number of cells per mm<sup>2</sup> of mucosa (Amarante et al., 2005).

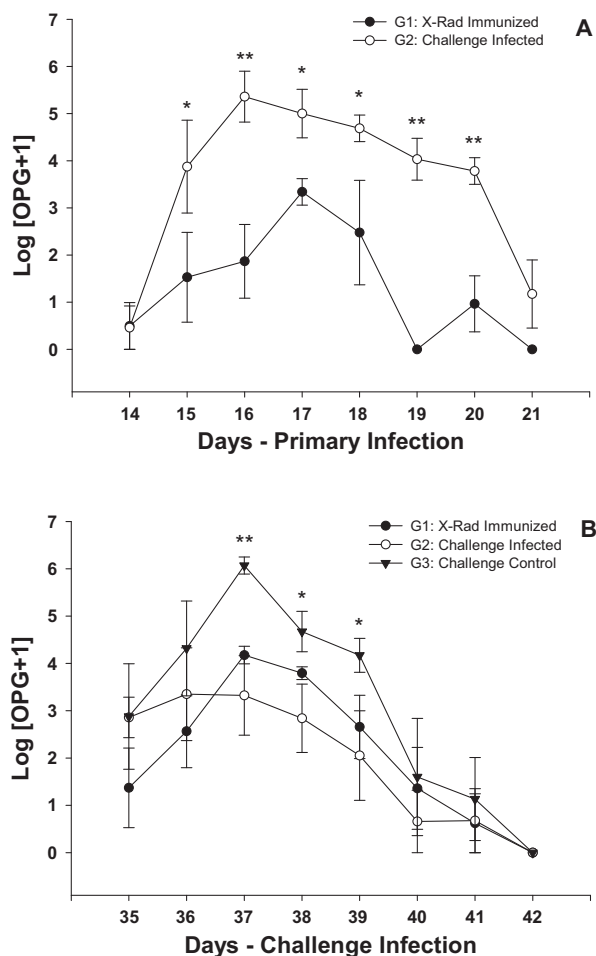
### 2.7. Statistical analyses

Faecal OPG were logarithmically transformed and added by 1[log(OPG + 1)] in order to obtain normal distributions according to the Kolmogorov–Smirnov's normality test. For the estimation of body weight improvements, the data were expressed as growth rate ( $\ln \text{weight } 2 - \ln \text{weight } 1 / t \times 100$ , with  $t$  representing the number of days between the sampling time points 1 and 2). By using the statistical software SigmaStat 2.03, one factorial analysis of variance, Tukey's multiple comparison test and Student's  $t$ -test were performed to analyze the data: OPG counts, growth rates, haematological parameters and leucocyte cell counts. Differences were regarded as significant at a level of  $P < 0.05$ .

### 3. Results

Goat kids orally immunized with attenuated *E. ninakohlyakimovae* oocysts (group 1) showed mild signs of coccidiosis when compared to those primary infected with the same dose of non-attenuated *E. ninakohlyakimovae* oocysts (group 2). In the latter case, primary infections resulted in severe clinical coccidiosis showing marked individual differences in the intensity of clinical signs (Table 1A). After the challenge, goat kids immunized with either attenuated or non-attenuated oocysts showed ameliorated course of infection, whilst the challenge control group (group 3) suffered from moderate to severe clinical signs of coccidiosis (Table 1B). Within this group, one primary infected goat kid succumbed to infection due to a severe *E. ninakohlyakimovae* induced haemorrhagic typhlocolitis. In general, the signs of coccidiosis were accompanied by diarrhoea, dehydration, anorexia and recumbency only in more severely affected goat kids.

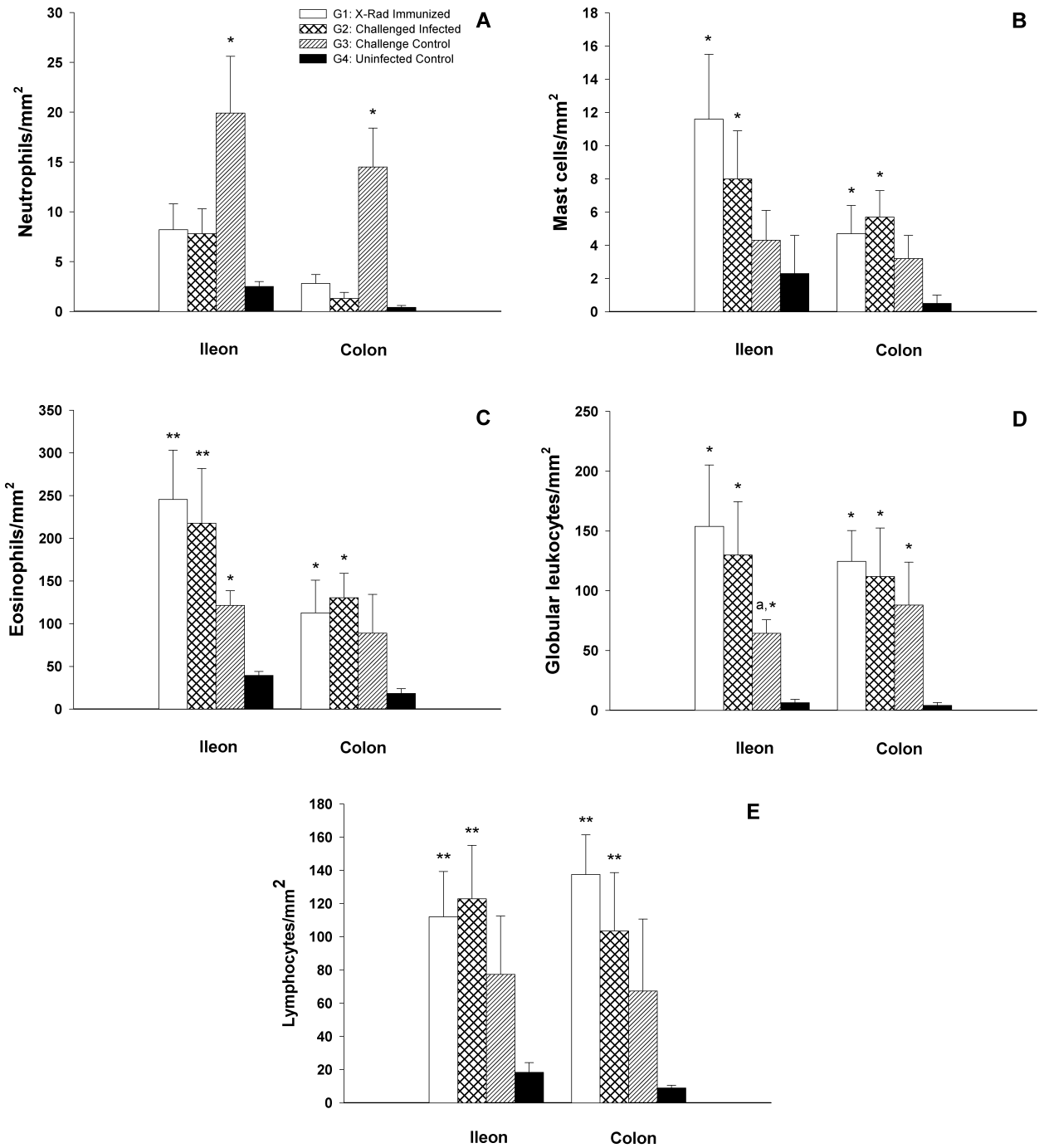
The clinical course of immunization and infections was mirrored by the oocyst output. The application of live attenuated oocysts for immunization purposes (group 1) resulted in significantly reduced shedding of oocysts when compared to oocyst output induced by primary infection brought about by non-attenuated oocysts (group 2; Fig. 1A), indicating that the attenuation of the oocysts by irradiation was performed successfully. In uninfected control animals (group 4) no oocyst shedding was observed. Furthermore, goat kids immunized either with attenuated or non-attenuated oocysts resulted in comparable levels



**Fig. 1.** Counts of oocysts per gram faeces (OPG) during immunization (A) and challenge infection (B) in non-immunized and immunized goat kids. Groups: G1 = group immunized with irradiated oocysts of *Eimeria ninakohlyakimovae* and challenged (X-Rad Immunized); G2 = group primary and challenge infected with non-attenuated oocysts (Challenge Infected); G3 = control of the challenge infection (Challenge Control). The data are expressed as logarithmically transformed values (OPG + 1) and are presented here as mean values  $\pm$  SEM. (\*)  $P < 0.05$  and (\*\*)  $P < 0.01$  represent significant differences between groups.

of protection against challenge infection since OPG values were significantly ( $P < 0.05$ ) reduced in both groups after *E. ninakohlyakimovae* challenge infection when compared to the challenge infection control group 3 (Fig. 1B). Referring to mean values of the total oocyst output, oral immunization of goat kids with attenuated oocysts of *E. ninakohlyakimovae* resulted in a 95.3% reduction of oocyst shedding ( $P < 0.01$ ). Additionally, during the course of the challenge infection there was also a significant reduction of the oocyst shedding in animals immunized either with attenuated oocysts (87.7%) or non-attenuated oocysts (60.5%) when compared to challenge control group 3 ( $P < 0.01$ ). However, neither the immunization with attenuated or non-attenuated oocysts significantly influenced the body weights of the goat kids (data not shown).

Macroscopic examination of any of the infected goat groups (groups 1, 2 and 3) at necropsy showed no



**Fig. 2.** Differential leucocyte counts, expressed as number of cells per mm<sup>2</sup>, in the mucosa of the ileum and colon of goat kids primary infected and challenged with *E. ninakohlyakimovae*. Groups: G1 = group immunized with irradiated oocysts and challenged (X-Rad Immunized); G2 = group primary and challenge infected with non-attenuated oocysts (Challenge Infected); G3 = control of the challenge infection (Challenge Control); G4 = Uninfected Control. (\*):  $P < 0.05$  between infected animals and uninfected controls; (\*\*):  $P < 0.01$  between infected animals and uninfected controls; (a):  $P < 0.05$  between primary infected and challenged groups.

relevant alterations. The intestinal epithelium of goat kids from these three groups displayed a moderate hyperplasia and hypertrophy of the mesenteric lymph nodes and Peyer’s patches (PP) was also observed. Colon sections of the goat kid from challenge control group 3 which

died during the patent period (day 16 p.i.; day 36 of the experiment) presented a high number of microgamonts, macrogamonts and oocysts of *E. ninakohlyakimovae*, whilst in animals necropsied at the end of the experiment (day 42) sexual stages of the parasites were barely observed.

Macroscopic and microscopic examination of uninfected control group 4 did not reveal any alteration. Both the ileum and colon mucosa of infected goat kids were significantly infiltrated by different inflammatory cells, including PMN, mast cells, eosinophils, globular leukocytes and lymphocytes in relation to tissue samples from uninfected control animals (Fig. 2). Neutrophils were significantly increased ( $P < 0.05$ ) only in challenge controls (group 3), while mast cells, eosinophils, globular leukocytes and lymphocytes were predominantly increased in challenged animals (from  $P < 0.05$  to  $P < 0.01$ ), with differences between primary (G3) and challenged groups (G1, G2) being significant for globular leucocyte counts ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2D). No significant differences were observed between counts from goat kids immunized with attenuated oocysts and those of animals challenged with non-attenuated oocysts of *E. ninakohlyakimovae*.

Alongside, haematological analyses revealed no significant changes in the red blood fraction (Table 2). Worth noting is that in group 3 (controls for challenge infection) there was an increase of PCV- and haemoglobin values from day 8 p.i. onwards reaching maximum levels at 16 days p.i., which coincided with the onset of the clinical phase of *E. ninakohlyakimovae* coccidiosis. Concerning the white blood fraction analyses, moderate non-significant changes in leucocyte subpopulations were observed for neutrophils in the different groups, particularly during the course of the primary infections. Whilst neutrophils of goat kids immunized with attenuated oocysts (group 1) remained almost unchanged during the primary infection, those of groups primary infected with non-attenuated oocysts (groups 2 and 3) were slightly but not significantly decreased. Also the plasma protein concentrations were not significantly altered during the observation period and this held true for all experimental groups (Table 2).

#### 4. Discussion

In general, coccidiosis of goat kids is accepted as an important disease severely affecting the profitability of caprine industry. The aim of this work was to establish a vaccination scheme for the control of one of the most pathogenic *Eimeria* species in goats, *E. ninakohlyakimovae*, which hampers total abrogation of the disease but supports both protection from clinical disease and shedding of low amounts of oocysts sufficient for booster purposes. In fact, both requirements were fulfilled in the current work.

Various studies based on gamma-irradiated oocysts of avian *Eimeria* species (Bajwa and Gill, 1977; Gilbert et al., 1998; Jenkins et al., 1997) have shown the potential to induce protective immune protection against chicken coccidiosis. The current study evaluated the efficacy of X-irradiated *E. ninakohlyakimovae* oocysts administered orally to goat kids to induce immune protection against homologous challenge infections. The data provide first evidence that this vaccination approach is effective and leads to significantly reduced oocyst shedding and amelioration of clinical signs in challenge infected animals. These results are in accordance to data obtained from comparable vaccination protocols concerning *E. tenella* (Jenkins et al., 1991) and *E. maxima* (Jenkins et al., 1997) in chicken.

Furthermore, the level of immunoprotection achieved by the current approach is comparable to that induced by recombinant vaccines for *Eimeria* spp. in fowls (Li et al., 2012; Ding et al., 2012) or by commercially available vaccines, e.g. Paracox® (Crouch et al., 2003). Jenkins et al. (1991) have shown that the level of immunoprotection depends on the inoculum size and the grade of attenuation. Consequently, even higher grades of protection may be achieved in the current system by modifying these parameters. Taking into account that the mass production of viable oocysts is a limiting factor for the generation of a future vaccine, the optimization towards a rather smaller inoculum size would be of advantage for commercialization purposes.

Nonetheless the clinical and parasitological benefits of the current vaccination approach were clearly demonstrated in this study, as animals showed almost no clinical signs of coccidiosis and a moderate oocyst excretion after immunization but were additionally protected from homologous challenge infection. Thus, in immunized goat kids a highly significant reduction of oocyst shedding was observed after challenge infection. It has to be stressed that immunization with  $2 \times 10^5$  irradiated oocysts led even to a higher protection grade than native primary infection as measured by oocyst shedding (87.8% vs. 60.5% reduction) emphasizing the efficacy of the current vaccination protocol. In accordance to our findings, the level of immunoprotection achieved by irradiated oocysts in chicken coccidiosis was strongly correlated to a significant reduction of oocysts excretion as well as to diminished clinical signs (Crouch et al., 2003). In some vaccination studies immunoprotection was additionally correlated to improved productive parameters such as increased growth performance (Jenkins et al., 1991, 1997; Crouch et al., 2003). However, no significant improvement of weight gains was detected in immunized goat kids in this study.

In general, haematological changes were minimal in all experimentally infected animals independently of their vaccination and infection status and, consequently, no significant correlation between levels of immune protection and alterations of blood parameters were observed. Referring to animals primary and challenge infected with non-attenuated oocysts this is in accordance to preliminary results in *E. ninakohlyakimovae* infections in goat kids (Ruiz et al., 2013).

So far, the current results do not clarify the type of the host immune response induced by attenuated *E. ninakohlyakimovae* oocysts. However, histopathological examinations revealed that, whether the intrinsic molecular mechanisms triggering the cellular immune response is or not the same in goat kids immunized with attenuated oocysts and those challenged with non-attenuated oocysts, the local immune response in terms of inflammatory cell counts are rather similar. Most probable a proportion of attenuated oocysts achieved excystation within the small intestine allowing the release of infective sporozoites which may have triggered cellular immune responses as has been described for other (non-attenuated) eimerian sporozoites (Zhu et al., 2012). Obviously some of the attenuated parasites successfully accomplished the complete endogenous life cycle, as low amounts of fully

**Table 2**  
Haematological parameters in *Eimeria ninakohlyakimovae* primary- and challenge-infected goat kids.

	Days	PCV (%)	HGB (g/dl)	WBC (cel/ $\mu$ l)	BAN (cel/ $\mu$ l)	NEU (cel/ $\mu$ l)	LYM (cel/ $\mu$ l)	EOS (cel/ $\mu$ l)	MONO (cel/ $\mu$ l)	TP (g/dl)
<i>Primary infection</i>										
G1	1	27	9.0	12,234	103	4857	6124	332	819	5.3
	9	25	8.0	9730	65	4198	5232	32	203	5.0
	16	24	7.9	9358	15	4666	3916	83	679	5.9
G2	1	26	8.5	16,708	140	8187	7526	316	538	5.2
	9	28	8.8	10,572	151	3359	6018	208	836	5.2
	16	25	8.2	7488	136	3153	4157	55	259	5.4
G4	1	20	7.4	17,540	0	6927	10438	55	121	5.9
	9	26	7.5	19,520	0	9091	9107	304	1018	6.4
	16	25	8.6	18,765	177	10,867	7158	89	474	6.35
<i>Challenge infection</i>										
G1	21	24	8.0	9138	27	4131	4353	250	375	5.7
	30	28	9.3	11,660	661	6105	4467	207	750	5.7
	37	26	8.9	7008	59	3299	3517	43	87	5.5
	42	28	9.1	16,182	258	9074	5864	186	760	5.7
G2	21	25	8.3	9916	112	4143	5336	88	238	5.4
	30	29	9.6	11,396	201	5155	5523	314	255	5.4
	37	29	9.5	10,656	139	4008	3420	360	442	5.5
	42	29	9.7	11,832	44	5220	5364	72	1084	5.4
G3	21	23	8.0	14,095	346	9049	3555	260	787	5.4
	30	29	9.5	10,640	0	5164	5399	890	72	5.5
	37	35	11.0	11,680	114	5862	4855	29	718	5.3
	42	27	8.6	10,265	0	3690	5125	110	1275	5.6
G4	21	36	10.9	14,513	0	5410	8853	113	136	5.2
	30	32	9.6	13,013	0	4492	8257	263	0	5.2
	37	31	9.7	13,680	0	3726	9686	131	136	5
	42	32	9.7	12,940	0	2847	9780	312	0	5.2

Goat kids (K) were primary infected at day 1 of the experiment of life either with  $2 \times 10^5$  X-irradiated sporulated oocysts of *E. ninakohlyakimovae* (G1) or non-attenuated oocysts (G2). On day 21 all these animals were challenged with the same dose of non-attenuated oocysts. Four animals primary infected at day 21 were used as challenge controls (G3) and four uninfected kids served as controls of infection (G4). PCV: packed cell volume; HGB: hemoglobin; WBC: while blood cells; BAN: band neutrophils; NEU: neutrophils; LYM: lymphocytes; EOS: eosinophils; MONO: monocytes; TP: total proteins. The results are expressed as the mean of different sampling days.

developed oocysts were excreted. Similar irradiation protocols for avian *Eimeria* spp. showed that exposure of 10, 15, 20 and 30 kRad did not alter oocysts excystation and release of motile sporozoites (Jenkins et al., 1991).

The advantage of this vaccination approach is that all naturally occurring stages potentially bearing overlapping and different stage-specific antigens were developed, and, consequently, a complex, specific and broad immune response must have been generated. Referring to clearly reduced amounts of shed oocysts, most probably most of the parasites failed to fully develop and the endogenous life cycle may have been interrupted at different stages, nevertheless presenting specific antigens on infected host cells, as previously demonstrated for *E. bovis*-infected (Badawy et al., 2010). In this context, Jenkins et al. (1995) have shown that irradiation of 15 or 25 kRad did not substantially alter the immunogenicity of avian oocyst proteins. Besides, the generation of diminished numbers of meront and gamonts (in comparison to challenge infection controls), i.e. of stages generally being accepted as the pathogenic ones (Dauguschies and Najdrowsky, 2005), resulted in minor damage as reflected by almost absent signs of caprine coccidiosis. Nevertheless, apart from meronts and gamonts, early (e.g. sporozoites) stages of *E. ninakohlyakimovae* could have triggered protective cellular immune reactions as it

has already been proposed for other eimerian infections (Zhu et al., 2012). In accordance, protective immunity was also induced in chickens immunized with irradiated *E. tenella* oocysts independently of meront I formation (Jenkins et al., 1991).

The present study provides first evidence for the usefulness of live attenuated *E. ninakohlyakimovae* oocysts as a promising vaccination tool for the control of caprine coccidiosis. Given that particularly organic farming industry – demanding for no or low chemotherapeutic treatments – is globally expanding, the current vaccination approach may be of high value for cost effective goat rearing in semi-intensive and intensive systems. Caprine coccidiosis is well known to predominantly affect pre- and post-weaned goat kids due to enhanced stress (Ruiz et al., 2006). Infections frequently occur during the first days after birth and can rapidly lead to oocyst shedding depending on the average duration of the prepatency of *Eimeria* species involved. Therefore, in environments contaminated with *Eimeria* oocysts, the risk to develop caprine coccidiosis exists throughout the whole goat kid rearing period, so a suitable vaccine against the most pathogenic *Eimeria* species would be of tremendous value. However, it has to be kept in mind that the current protocol includes merely one pathogenic caprine *Eimeria* species. As it is generally accepted that immunity against *Eimeria* is species-specific



and cross-immunity rarely occurs (Prowse, 1991), future experiments have to be expanded to other pathogenic *Eimeria* spp. in the goat. Furthermore, detailed analyses of the cell types triggering caprine protective immune responses and of the molecular mechanisms involved in these responses are needed in order to optimize immunization protocols.

## Acknowledgements

This work has financially been supported by funds derived from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICIN) and the ACIISI (Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información). All animal experiments included in the current study comply with the present laws of the Spanish government.

## References

- Amarante, A.F., Bricarello, P.A., Huntley, J.F., Mazzolin, L.P., Gomes, J.C., 2005. Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. *Vet. Parasitol.* 128, 99–107.
- Badawy, A.I., Lutz, K., Taubert, A., Zahner, H., Hermosilla, C., 2010. *Eimeria bovis* meront I-carrying host cells express parasite-specific antigens on their surface membrane. *Vet. Res. Commun.* 34, 103–118.
- Balicka-Ramis, A., 1999. Studies on coccidiosis in goats in Poland. *Vet. Parasitol.* 81, 347–349.
- Bajwa, R.S., Gill, B.S., 1977. Effect of irradiation (gamma rays) on the biology of *Eimeria tenella* oocysts. *Ann. Rech. Vet.* 8, 181–186.
- Bangoura, B., Dausgchies, 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.
- Bedrník, P., 1989. The role of different *Eimeria* species in a prospective coccidiosis vaccine. In: Yvone, P. (Ed.), *Coccidian and Intestinal Coccidiomorphs*. INRA, France: Tours, pp. 667–678.
- Catchpole, J., Norton, C.C., Gregory, M.W., 1993a. Immunisation of lambs against coccidiosis. *Vet. Rec.* 132, 56–59.
- Catchpole, J., Taylor, M.A., Green, J., 1993b. Immunological approaches to the control of ovine coccidiosis. In: *Abstr. Vth International Coccidiosis Conference*, Guelph, Ontario, Canada, June 21–25th 1993, p. 141.
- Cavalcante, A.C., Teixeira, M., Monteiro, J.P., Lopes, C.W., 2012. *Eimeria* species in dairy goats in Brazil. *Vet. Parasitol.* 183, 356–358.
- Crouch, C.F., Andrews, S.J., Ward, R.G., Francis, M.J., 2003. Protective efficacy of a live attenuated anti-coccidial vaccine administered to 1-day-old chickens. *Avian Pathol.* 32, 297–304.
- Dausgchies, A., Najdrowsky, M., 2005. Eimeriosis in cattle: current understanding. *J. Vet. Med. B* 52, 417–427.
- Ding, X., Lillehoj, H.S., Dalloul, R.A., Min, W., Sato, T., Yasuda, A., Lillehoj, E.P., 2005. In ovo vaccination with the *Eimeria tenella* EtMIC2 gene induces protective immunity against coccidiosis. *Vaccine* 23, 3733–3740.
- 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.
- Faizal, A.C.M., Rajapakse, R.P.V.J., 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.
- Faber, J.E., Kollmann, D., Heise, A., Bauer, C., Failing, K., Bürger, H.J., Zahner, H., 2002. *Eimeria* infections in cows in the periparturient phase and their calves: oocyst excretion and levels of specific serum and colostrum antibodies. *Vet. Parasitol.* 104, 1–17.
- FAOSTAT, 2010. *Food and Agricultural Commodities Production: Goat Production*. Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- Foreyt, W.J., Gates, N.L., Wescott, R.B., 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.
- Gilbert, J.M., Fuller, A.L., Scott, T.C., McDougald, L.R., 1998. Biological effects of gamma-irradiation on laboratory and field isolates of *Eimeria tenella* (Protozoa: Coccidia). *Parasitol. Res.* 84, 437–441.
- Gjerde, B., Helle, O., 1991. Chemoprophylaxis of coccidiosis in lambs with a single oral dose of toltrazuril. *Vet. Parasitol.* 38, 97–107.
- Gerhold, R.W., Fuller, A.L., Lollis, L., Parr, C., McDougald, L.R., 2011. The efficacy of anticoccidial products against *Eimeria* spp. in northern bobwhites. *Avian Dis.* 55, 59–64.
- Harper, C.K., Penzhorn, B.L., 1999. Occurrence and diversity of coccidia in indigenous, Saanen and crossbred goats in South Africa. *Vet. Parasitol.* 82, 1–9.
- 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, 169–170.
- Hermosilla, C., Bürger, H.J., Zahner, H., 1999. T cell responses in calves to a primary *Eimeria bovis* infection: phenotypical and functional changes. *Vet. Parasitol.* 84, 49–64.
- Horton, G.M., Stockdale, P.H., 1981. Lasalocid and monensin in finishing diets for early weaned lambs with naturally occurring coccidiosis. *Am. J. Vet. Res.* 42, 433–436.
- Jackson, A.R., 1964. The isolation of viable coccidial sporozoites. *Parasitology* 54, 87–93.
- Jeffers, T.K., 1975. Attenuation of *Eimeria tenella* through selection for precociousness. *J. Parasitol.* 61, 1083–1090.
- Jenkins, M.C., Augustine, P.C., Danforth, H.D., Barta, J.R., 1991. X-irradiation of *Eimeria tenella* oocysts provides direct evidence that sporozoite invasion and early schizont development induce a protective immune response(s). *Infect. Immunol.* 59, 4042–4048.
- Jenkins, M.C., Chute, M.B., Danforth, H.D., 1997. Protection against coccidiosis in outbred chickens elicited by gamma-irradiated *Eimeria maxima*. *Avian Dis.* 41, 702–708.
- Jenkins, M.C., Chute, M.B., Danforth, H.D., Lillehoj, H.S., 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.
- Koudela, B., Boková, A., 1998. Coccidiosis in goats in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 76, 261–267.
- Lee, E.-H., 1987. Vaccination against coccidiosis in commercial roaster chickens. *Can. Vet. J.* 28, 434–436.
- 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.
- Long, P.L., 1972. *Eimeria tenella*: reproduction, pathogenicity and immunogenicity of a strain maintained in chick embryos by serial passage. *J. Comp. Pathol.* 82, 429–437.
- 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.
- McDonald, V., Shirley, M.W., 2009. Past and future: vaccination against *Eimeria*. *Parasitology* 136, 1477–1489.
- McMeniman, N.P., Elliott, R., 1995. Control of coccidia in young calves using lasalocid. *Aust. Vet. J.* 72, 7–9.
- Mundt, H.C., Bangoura, B., Mengel, H., Keidel, J., Dausgchies, 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), 134–142.
- Peek, H.W., Landman, W.J., 2005. Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2001. *Avian Pathol.* 32, 391–401.
- Prowse, S.J., 1991. Cell-mediated immunity to *Eimeria* in the fowl: the absence of cross-species protection is not due to the lack of cross-reactive T cells. *Int. J. Parasitol.* 21, 133–135.
- Ruiz, A., Matos, L., Muñoz, M.C., Hermosilla, C., Molina, J.M., Andrada, M., Rodríguez, F., Pérez, D., López, A., Guedes, A., Taubert, A., 2013. Isolation of an *Eimeria ninakohlyakimovae* field strain (Canary Islands) and analysis of its infection characteristics in goat kids. *Res. Vet. Sci.* 94, 277–284.
- 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. Infect. Dis. Vet. Public Health* 53, 399–402.
- Ruiz, A., Guedes, A.C., Muñoz, M.C., Molina, J.M., Hermosilla, C., Martín, S., Hernández, Y.I., Hernández, A., Pérez, D., Matos, L., López, A.M., Taubert, A., 2012. Control strategies using diclazuril against coccidiosis in goat kids. *Parasitol. Res.* 110, 2131–2136.
- Shi, M.Q., Huther, S., Burkhardt, E., Zahner, H., 2000. Immunity in rats against *Eimeria separata*: oocyst excretion, effects on endogenous stages and local tissue response after primary and challenge infections. *Parasitol. Res.* 86, 891–898.

- Shirley, M.W., Millard, B.J., 1986. Studies on the immunogenicity of seven attenuated lines of *Eimeria* given as a mixture to chickens. *Avian Pathol.* 15, 629–638.
- Sühwold, A., Hermosilla, C., Seeger, T., Zahner, H., Taubert, A., 2010. T cell reactions of *Eimeria bovis* primary and challenge-infected calves. *Parasitol. Res.* 106, 595–605.
- Taubert, A., Hermosilla, C., Sühwold, A., Zahner, H., 2008. Antigen-induced cytokine production in lymphocytes of *Eimeria bovis* primary and challenge infected calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 126, 309–320.
- Tewari, A.K., Maharana, B.R., 2011. Control of poultry coccidiosis: changing trends. *J. Parasit. Dis.* 35, 10–17.
- Thienpont, D., Rochette, F., Van Parijs, O.F.J., 1979. Diagnosing Helminthiasis by Coprological Examination. Janssen Research Foundation, Beerse, p. 187.
- Williams, R.B., Carlyle, W.W., Bond, D.R., Brown, I.A., 1999. The efficacy and economic benefits of Paracox, a live attenuated anticoccidial vaccine, in commercial trials with standard broiler chickens in the United Kingdom. *Int. J. Parasitol.* 29, 341–355.
- Zhu, H., Yan, R., Wang, S., Song, X., Xu, L., Li, X., 2012. Identification and molecular characterization of a novel antigen of *Eimeria acervulina*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 186, 21–28.

## ARTÍCULO Nº3

### Estrategias metafilácticas mediante el uso de Toltrazuril (Baycox®) frente a la coccidiosis en cabritos

**Veterinary Parasitology (2024) 19 327: 110-133**

\*RESUMEN\*

La coccidiosis caprina compromete el bienestar animal, reduce la productividad y puede provocar mortalidad y retrasos en las tasas de crecimiento de los cabritos alrededor del período de destete.

Tradicionalmente, la producción caprina ha sido un importante recurso económico en las Islas Canarias, probablemente por la capacidad de adaptación de esta especie animal a las diversas condiciones climáticas, a veces extremas, del archipiélago; una aptitud que, junto con la conversión de recursos alimenticios limitados en carne, leche o cuero, ha hecho de la cabra uno de los rumiantes más rentables y eficientes. Para optimizar y rentabilizar la producción caprina es requisito indispensable mejorar el estado sanitario de los animales, lo cual incluye necesariamente un conocimiento lo más exhaustivo posible de la situación epidemiológica de las parasitosis y el establecimiento de medidas terapéuticas y de control eficaces.

Este estudio de campo se realizó para evaluar la eficacia de tratamientos metafilácticos con dos dosis de toltrazuril (Baycox®, 20 o 40 mg/kg de peso corporal p.o.), en diferentes momentos (2 o 7 semanas de edad), en 97 cabritos (Raza Majorera con aptitud lechera) infectados de forma natural con *Eimeria* spp. Se determinaron los ooquistes por gramo de heces (OPG), la consistencia fecal y el peso corporal el día 0 y a intervalos semanales en los animales tratados (grupos 1 a 4) y en el control no tratado (grupo 5). También se realizó la identificación morfométrica de especies de *Eimeria*.

Los cabritos tratados a las 2 semanas de edad mantuvieron valores de OPG cercanos a cero durante las 5 semanas posteriores al tratamiento y, en general, tuvieron OPG más bajos que el grupo de control no tratado. No se observaron diferencias significativas entre ambas dosis de toltrazuril en animales tratados a las 2 semanas.

Por el contrario, en cabritos de 7 semanas, la dosis de 40 mg/kg de toltrazuril redujo los niveles de ooquistes durante más tiempo y en mayor medida que la dosis de 20 mg/kg. Independientemente del tratamiento y la dosis, el toltrazuril retrasó la aparición de especies patógenas de *Eimeria*: *E. ninakohlyakimovae* y *E. arloingi*.

En general, la especie caprina *E. christensenii* (patogenicidad moderada) fue la predominante durante todo el estudio, incluidos los animales no tratados, lo que probablemente fue la razón por la cual apenas se observaron signos clínicos de coccidiosis.

El efecto positivo del toltrazuril sobre el peso corporal observado en algunos grupos tratados fue difícil de correlacionar con el momento del tratamiento y las dosis. En base en estos resultados, se concluye que los tratamientos metafilácticos con 20 mg/kg de peso corporal de toltrazuril a las 2 semanas de edad son suficientes para controlar los síntomas clínicos de coccidiosis en cabritos; mientras que si se administra

más tarde, a las 7 semanas de edad, coincidiendo así con el pico de excreción de ooquistes frecuentemente observado en cabritos en condiciones de campo, podría ser aconsejable una dosis doble para prevenir la coccidiosis clínica.



## Metaphylactic strategies using toltrazuril against coccidiosis in goat kids

Aránzazu C. Guedes<sup>a</sup>, Magnolia Conde-Felipe<sup>a,\*</sup>, Emilio Barba<sup>a</sup>, José Manuel Molina<sup>a</sup>,  
María del Carmen Muñoz<sup>a</sup>, Otilia Ferrer<sup>a</sup>, Sergio Martín<sup>a</sup>, Carlos Herмосilla<sup>b</sup>, Anja Taubert<sup>b</sup>,  
Antonio Ruiz<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Parasitology Unit, Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, Spain

<sup>b</sup> Institute of Parasitology, Justus Liebig University Giessen, Biomedical Research Center Seltersberg (BFS), Giessen, Germany

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Eimeria* infections  
Control  
Triazines  
Majorera goat

### ABSTRACT

Goat coccidiosis compromises animal welfare, reduces productivity and may cause mortality and delayed growth rates in goat kids around the weaning period worldwide. This field study was conducted to evaluate the efficacy of metaphylactic treatments with two doses of toltrazuril (20 or 40 mg/kg body weight – BW, p. o.), at different timing, in kids naturally infected with *Eimeria* spp. A total of 97 healthy goat kids (Majorera milk aptitude breed) were divided into five groups, depending on the age of treatment (2 or 7 weeks). One group remained untreated as a negative control until the end of the study. Faecal oocyst shedding, faecal consistency, and body weight of the animals were monitored at day 0 and at weekly intervals. Counts of oocysts per gram of faeces (OPG) were determined by a modified McMaster technique. Morphometric identification of *Eimeria* species was carried out on individual faecal samples from each experimental group after oocyst sporulation. Goat kids treated at two weeks of age maintained OPG values close to zero during the 5 weeks post-treatment and, overall, had lower faecal oocyst counts than untreated control animals. No significant differences were observed between the two doses of toltrazuril used in two-week-old treated animals. By contrast, when treatment was carried out at seven weeks of age, the dose of 40 mg/kg BW of toltrazuril reduced oocyst levels for longer and to a greater extent than the 20 mg/kg dose. Irrespectively of the treatment and dose, toltrazuril delayed the appearance of pathogenic *Eimeria* species, i. e. *Eimeria ninakohlyakimovae* and *Eimeria arloingi*. As a whole, *Eimeria christenseni*, with a rather moderate pathogenicity, was highly predominant throughout the study period, including the untreated control group, which was probably the reason why clinical signs of coccidiosis were barely observed throughout the experiment. Under these circumstances, the positive effect of toltrazuril on body weight condition observed in some treated groups was difficult to correlate to the timing and doses. Metaphylactic treatments with 20 mg/kg BW toltrazuril given at two weeks of age are sufficient to control oocyst excretion in goat kids; whereas if administered later in 7-week-old animals, thereby coinciding with the frequently observed peak of oocyst elimination in goat kids under field conditions, a higher dose might be advisable to prevent environmental contamination with infectious oocysts.

### 1. Introduction

The genus *Eimeria*, a host-specific obligate intestinal apicomplexan protozoan, is responsible for coccidiosis in many vertebrate hosts worldwide (Chapman et al., 2013). Coccidiosis in sheep and goat compromises animal welfare, reduces productivity and may cause mortality, especially in young animals during their first weeks of life (Foreyt, 1990; Chartier and Paraud, 2012). In goat kids, the intensity of *Eimeria* oocyst excretion usually reaches peak values around the weaning period, i. e.

between 6–10 weeks of age (Ruiz et al., 2006; Chartier and Paraud, 2012). The main clinical sign of eimeriosis in goat kids is non-haemorrhagic diarrhoea, characterized by watery faeces with clumps of mucus and colour changes from brown to yellow (Koudela and Boková, 1998). Therefore, these animals show dehydration, reduced feed intake, weight loss, a decreased appetite and even death in cases of severe infections (Yvoré et al., 1980; Bidorff et al., 1986). In addition, subclinical coccidiosis can cause impairment of growth and poor weight gain from gut damage, which also leads to significant economic losses

\* Correspondence to: Parasitology Unit, Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Las Palmas de Gran Canaria, Arucas, 35413 Las Palmas, Spain.

E-mail address: [magnolia.conde@ulpgc.es](mailto:magnolia.conde@ulpgc.es) (M. Conde-Felipe).

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2024.110133>

Received 21 November 2023; Received in revised form 16 January 2024; Accepted 16 January 2024

Available online 19 January 2024

0304-4017/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

(Foreyt, 1990; Ruiz et al., 2006; Silva et al., 2017).

Several monoxenous *Eimeria* species have been described in sheep and goat worldwide. Of the at least 13 *Eimeria* species described in goats, the most prevalent species are *E. ninakohlyakimovae*, *E. arloingi* and *E. alijevi* (Lima, 1980; Yvoré et al., 1981; Vercruyssen, 1982; Faizal and Rajapakse, 2001; Ruiz et al., 2006), amongst which *E. ninakohlyakimovae* and *E. arloingi* are the most pathogenic ones (Levine, 1985; Yvoré et al., 1985; Koudela and Boková, 1998; Silva et al., 2017). In the field, infections with multiple *Eimeria* species are common in goats (Ruiz et al., 2006). Pathogenic effects of infections with different *Eimeria* species might be aggravated due to extended damage of the intestines since different species reside in different intestinal sections. In addition, longer-lasting clinical effects might be observed due to different reproductive patterns and prepatent and patent periods of different *Eimeria* species (Craig, 1986).

The control of eimeriosis in ruminants aims to reduce mortality and morbidity, as well as to ensure animal weight gains, thus resulting in economic benefits for farmers (Foreyt, 1990). Triazine derivatives such as diclazuril and toltrazuril have a significant efficacy against *Eimeria* species since these compounds can early reduce oocyst excretion. Accordingly, several studies have confirmed the efficacy of diclazuril and toltrazuril on sheep coccidiosis (Gjerde and Helle, 1986, 1991; Taylor and Kenny, 1988; Stafford et al., 1994; Alzieu et al., 1999; Platzer et al., 2005; Dittmar et al., 2009; Le Sueur et al., 2009; Mundt et al., 2009; Taylor et al., 2011; Diaferia et al., 2013; Saratsis et al., 2013; Scala et al., 2014; Pérez-Fonseca et al., 2016; de Souza Rodrigues et al., 2016, 2017). By contrast, these compounds have been much less investigated in caprine coccidiosis (McKenna, 1988; Chartier et al., 1992; Šlosárková et al., 1998; Balicka-Ramisz, 1999; Ruiz et al., 2012; Iqbal et al., 2013a, b; Nunes et al., 2015; Awasthi et al., 2022).

Toltrazuril is an anticoccidial drug widely used in chicken, turkeys, piglets, calves and lambs (EMA/CVMP/278616/2005; Karembe et al., 2021). This compound acts against asexual and sexual intracellular stages of *Eimeria* life cycle in poultry (i. e. schizogony and gamogony) (Haberkorn, 1987; Harder and Haberkorn, 1989), especially affecting parasite mitochondria, the endoplasmic reticulum and hampering nuclear division not only in schizonts (meronts) but also microgamonts (Mehlhorn et al., 1984; Mehlhorn, 2008). Previous studies in goats have shown the clinical efficacy of ponazuril, a metabolite of toltrazuril, in decreasing faecal *Eimeria* oocyst counts (Gibbons et al., 2016) and on how this compound is absorbed after a single oral dose application (Love et al., 2015). In addition, a higher dose rate of toltrazuril should be administered in goats compared to the dose rate for sheep or cattle (15–20 mg / kg BW) (Gjerde and Helle, 1986; Chartier et al., 1992; Epe et al., 2005). The persistent efficacy of toltrazuril is generally long but variable according to target species and literature (i. e. > 80%, 9 days post-treatment (p. t.) in piglets, 3–4 weeks p. t. in calves or more than 9 weeks p. t. in lambs (Mundt et al., 2007; Diaferia et al., 2013; Zapa et al., 2022). Basic pharmacological information is essential to establish the dose rate and then determine the efficacy of different control programs for goat coccidiosis in arid and semi-arid zones, where this ruminant species represents one of the most important economic resources for farmers (Abo-Shehadeh and Abo-Farieha, 2003; Ruiz et al., 2006). Therefore, the aim of this study was to evaluate the clinical and parasitological outcomes of different metaphylactic treatments with toltrazuril in goat kids naturally infected with *Eimeria* spp.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study farm

This study was carried out in a semi-extensive goat farm with common clinical manifestations of moderate to severe naturally acquired coccidiosis occurring during and after the weaning period. This farm is located in San Bartolomé de Tirajana (27°47'29.4"N 15°31'15.0"W) in the south of Gran Canaria Island (Spain). In this arid region, the

temperature ranges between 15 °C in winter and 28 °C in summer with an average of 21 °C, and the monthly rainfall ranges from zero in summer to 60 mm in winter (<https://www.climatestotravel.com/climate/canary-islands/gran-canaria>; accessed Dec 5, 2023). These climatic conditions have contributed to the development of goat industry in this area. In fact, this region holds 57% of the goat population of Gran Canaria. Animals are either kept in medium-sized farms (around 300 animals) or large farms (≥ 1000 animals). The farm chosen as study site housed approximately 5000 goats (Majorera breed with milk aptitude) during the trial. This farm has three breeding seasons, late winter to early spring (February to March), early summer (June) or autumn (October–November).

### 2.2. Animals

This trial was performed with a total of 97 healthy Majorera goat kids ( $n = 97$ ) either in their second or seventh week of age at the beginning of the study, and all naturally exposed to *Eimeria* spp.-oocysts within farm premises. All animals were born on the study farm itself and belonged to the same farrowing period (early spring). They were separated from their mother immediately after birth and, after 2–3 days of colostrum administration, and fed with special artificial milk (Bacilactol®, CAPISA, Canary Islands, Spain) for lactating goat kids from an automated feeding system. Water, hay, and supplementation with starter concentrate for weaning kids (CAPISA) were available during the whole experimental setting. No animal had received any medication before the study. Efficacy of metaphylactic treatments with two doses of toltrazuril (Baycox® 50 mg/ml suspension, Bayer Animal Health GmbH, Germany) were assessed in these goat kids, as described below.

### 2.3. Study design

Goat kids were randomly assigned (by birth weight) to five groups and correspondingly identified by an ear tag attached to a chain around their necks. To not alter the management conditions on the farm, the animals included in the experiment shared the same facilities as the kids born in the same kidding period (approximately, 300 goat kids in total). All five experimental groups were run in parallel. At two weeks of age, groups 1 ( $n = 21$ ) and 2 ( $n = 21$ ) received 20 mg or 40 mg toltrazuril (Baycox®)/kg body weight (BW) p. o. once, respectively. At seven weeks of age, group 3 ( $n = 23$ ) and 4 ( $n = 22$ ) were treated once with 20 mg or 40 mg/kg BW p. o. of this drug, respectively. Finally, group 5 ( $n = 10$ ) remained untreated as a negative control until twelve weeks of age. For the presentation of the results and the discussion the experimental groups may be referred to as: group 1 (G1): "low dose early treatment"; group 2 (G2): "high dose early treatment"; group 3 (G3): "low dose late treatment"; group 4 (G4): "high dose late treatment"; and group 5 (G5): "control".

Counts of oocysts per gram of faeces (OPG), BW, faecal consistency and soiling of the anal region were monitored just before treatment and at weekly intervals for 11 (groups 1–2 and 5) and 6 (groups 3 and 4) weeks post-treatment, respectively. Individual faecal samples were taken manually, carrying gloves, from the rectum.

All animal procedures were conducted in strict accordance with national ethics, the current European Animal Welfare Legislation (ART13TFEU) and by institutional review board-approved protocols (project OEBA-ULPGC 16/2018 authorized on 30/11/2018, administrative decision 902/2018, Department of Agriculture and Livestock, Government of the Canary Islands).

### 2.4. Parasitological analysis

Oocysts per gram of faeces (OPG) were determined by a modified McMaster technique (Thienpont et al., 1979). The lower detection limit was 50 OPG. In the case of very high oocyst counts, dilutions of the faecal suspension by 10 or 100 times were performed to enable proper

counting.

Morphological identification of *Eimeria* species was carried out over 20 oocysts per animal and the relative proportion of all the species found for each experimental group was determined. For sporulation, faecal material was individually incubated in a 2% potassium dichromate solution at room temperature (RT) for at least one week under constant oxygenation (Hermosilla et al., 2002). Sporulated oocysts were then concentrated by flotation in saturated sodium chloride solution and identified at 400 × magnification applying a calibrated eyepiece according to keys previously reported (Levine and Ivens, 1986; Alyousif et al., 1992; Soe and Pomroy, 1992).

### 2.5. Clinical and productive determinations

The faecal consistency was scored on a scale from one to five (1, normal consistency; 2, soft unformed; 3, semiliquid; 4, watery diarrhoea; 5, diarrhoea with blood and/or intestinal mucosal tissue). A score ≥ 3 was considered as diarrhoea. Soiling of the anal region was recorded as no soiling (score = 1), dry soiling (score = 2) and humid soiling (score = 3). Other clinical features, such as respiratory signs or the presence of contagious ecthyma, as well as the BW were also recorded at weekly intervals.

### 2.6. Statistical analysis

Data were analysed descriptively and statistically. For the analysis, faecal oocyst counts, expressed as OPG, were logarithmically transformed, and added by 1 ( $\log [OPG+1]$ ) to obtain normal distributions (Kolmogorov–Smirnov’s normality test). The relative reduction of oocyst excretion was calculated based on the formula  $C - T/C \times 100$ , with  $C$  representing the mean OPG values of the untreated control group (group 5) and  $T$  representing the mean OPG values of the treated groups (groups 1–4) (Saratsis et al., 2013). An estimate of the overall treatment efficacy for each group was calculated on the basis of the area under the curve (AUC). The estimation of the BW gains over time was expressed as growth rate  $(\ln \text{weight } 2 - \ln \text{weight } 1)/t \times 100$ , with  $t$  representing the number of days between the sampling time points 1 and 2.

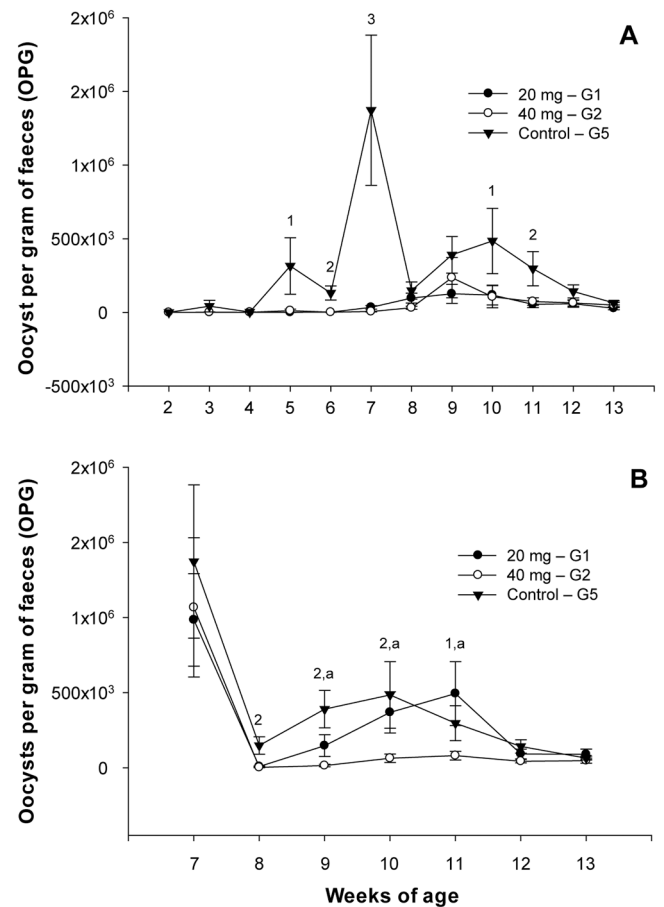
The average of faecal consistency score, body weight and  $\log (OPG+1)$  were calculated and then compared among the different groups by one-way ANOVA with pairwise post-hoc comparisons by the Tukey test, while differences between *Eimeria* species in each group were analyzed by non-parametric Chi-square test. Finally, the Pearson correlation test was used for the analysis of the association between parasitological and productive parameters (BW) at all sampling times (weeks 1–8). Analyses were carried out by the statistical software SigmaPlot 14.5 (Systat Software Inc., Germany) and the differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Faecal oocyst excretion

The differences in OPG (oocysts per gram of faeces) over time in the five experimental groups are shown in Fig. 1. In the non-treated goat kids (control group), *Eimeria* oocysts were first detected at two weeks of age, with peak values at week 7 ( $1.37 \times 10^6$  OPG). From this week onwards, OPG counts progressively dropped until the end of the trial (week 13 of age), with around 60 thousand OPG counts being recorded.

OPG values of the untreated control group (group 5) were significantly higher at weeks 5, 6, 7, 10 and 11 of the experiment ( $P < 0.05 - P < 0.001$ ) (Fig. 1A) when compared to those of goat kids treated with 20 mg/kg toltrazuril at two week of age (group 1). Early treatment with a higher dose of toltrazuril also reduced OPG counts in relation to control group 5, with significant differences being recorded at weeks 5, 6, 7, 8 and 10 ( $P < 0.05 - P < 0.001$ ) and almost statistical differences in week 11 of the experiment ( $P = 0.065$ ) (Fig. 1A). OPG values



**Fig. 1.** *Eimeria* oocyst counts per gram of faeces in goat kids naturally infected with *Eimeria* spp. and treated with toltrazuril. Two doses (20 and 40 mg/kg BW, p. o.) were applied either at two week of age (groups G1-G2; early treatment) (A) or at seven weeks of age (groups G3-G4; late treatment) (B). Untreated control; non-treated animals (group 5). The data are expressed as means ± SEM. (1, 2, 3)  $P < 0.05 - P < 0.01 - P < 0.001$ , G1-G4 vs G5; (a)  $P < 0.05$ , G3 vs G4.

throughout the observation period did not differ statistically between the low and high dose groups treated at two weeks of age.

The treatment of 7-week-old goat kids with both doses of toltrazuril significantly reduced faecal oocyst counts one week after treatment when compared to untreated control group 5 ( $P < 0.01$ ) (Fig. 1B). In the following sampling times, the 40 mg/kg dose (group 4) maintained OPG values significantly reduced in week 9 and 10 ( $P < 0.01$ ), while no differences were observed with respect to control group 5 in the remaining weeks of the experiment. By contrast, goat kids treated with 20 mg/kg toltrazuril at 7 weeks of age registered OPG counts similar to non-treated controls in weeks 9, 10, 11, 12 and 13 of the experiment. In addition, when comparing the two treatment doses, faecal oocyst counts were found to be significantly lower in goat kids receiving 40 mg/kg (group 4) from weeks 9 to 11 ( $P < 0.05$ ).

Overall, OPG values showed high individual variations within groups. Individual maximum oocyst excretion was recorded in control group 5 at week seven of the experiment ( $8.6 \times 10^6$  OPG) coinciding with mean peak values found in this group. In groups 1 and 2, the individual maximum excretion was recorded in week 5 after treatment (week 7 of life) ( $1.2 \times 10^6$  OPG and  $2.12 \times 10^6$  OPG, respectively), also when mean OPG values were higher in these two experimental groups (Fig. 1A). A similar result was detected in groups 3 and 4, where the individual maximum excretion was recorded at mean peak OPG values (Fig. 1B), four weeks after treatment (week 11 of life) ( $4.1 \times 10^6$  OPG and  $4.1 \times 10^5$  OPG, respectively). On the days of maximum OPGs, the

animals in group 4 had the lowest values.

### 3.2. Treatment efficacy

The mean oocyst reduction over time in two-week-old (groups 1–2) and in 7-week-old goat kids (groups 3–4) is shown in Table 1. In groups 1 and 2, the mean oocyst reduction was higher than 90% from week 1 to week 5 after treatment (seven weeks of age), thereafter dropping to values ranging from 81.7% to 23.2%. No differences were observed between the efficacy values of the two toltrazuril doses used, except at week 5 post-treatment (p. t.), when the group receiving 40 mg/kg (group 2) had a significantly higher oocyst reduction than group 1 ( $P < 0.05$ ). The administration of 40 mg/kg of toltrazuril in 7-week-old goat kids resulted in oocyst reduction  $> 85\%$  one and two weeks after treatment. This difference to the control group gradually became smaller towards the end of the observation period (6 weeks after treatment). In the group with the low dose at 7 weeks of age, an oocyst reduction  $> 60\%$  was only seen in the first week after treatment, whereas the effect in the following weeks was low or absent (Table 1). On this occasion, only at week 2 post-treatment goat kids treated with 40 mg/kg BW (group 4) had a significantly higher oocyst reduction than animals treated with single dose (group 3) ( $P < 0.01$ ).

When treatment efficacy was estimated on the basis of area under the curve (AUC) (Table 1) in early treatment, an oocyst reduction of 74% and 49% were recorded in groups 1 and 2, respectively, without significant differences. By contrast, late treatment resulted in 24% and 65% oocyst reductions when using 20 mg/kg and 40 mg/kg, respectively, and the differences between groups were significant ( $P < 0.05$ ). This estimation could constitute an approximation to understand the average oocyst contamination of the environment, which has unquestionable epidemiological implications (Ruiz et al., 2014; Joachim et al., 2018).

### 3.3. Body weight (BW) and growth rates

Goat kids treated with 20 mg/kg BW p. o. of toltrazuril at two-weeks of age (group 1) showed increased BW from week 4 p. t. until the end of the study when compared to non-treated animals (group 5), with significant differences being recorded at weeks 5, 6, 7 and 8 p. t. ( $P < 0.05 - P < 0.01$ ) (Table 2). By contrast, treatment with 40 mg/kg of toltrazuril showed higher body weight than controls only from week 7 p. t. onwards, and significant differences could not be demonstrated. Moreover, significant differences were found between group 1 and 2 at weeks 5, 6, 7 and 8 p. t. ( $P < 0.05 - P < 0.01$ ).

Seven-week-old goat kids treated with toltrazuril at 20 mg/kg BW resulted in increased body weight from week 2 p. t. until the end of the experiment ( $P < 0.05$  in weeks 2 and 3 p. t.) in comparison to control group. On the other hand, treatment with 40 mg/kg (group 4), only revealed in increased BW in week 2 (eight weeks of age) and 4 p. t. (ten weeks of age), without significant differences.

Accordingly, the overall growth rate at the end of the study was significantly higher in goat kids treated with 20 mg/kg BW at two (group 1) ( $P < 0.05$ ) or seven weeks of age (group 3) ( $P < 0.001$ ),

whereas no differences between groups treated with the higher dose and non-treated animals could be demonstrated (Fig. 2A, B).

### 3.4. Faecal score and soiling

A similar faecal consistency pattern was observed over time in untreated (control group 5) and toltrazuril treated goat kids at two (groups 1–2) or seven weeks of age (groups 3–4) (date not shown). Goat kids treated at week 2 of age (groups 1–2) and control (group 5) had an overall faecal score between one and two, indicating normal to soft unformed faecal consistency, in 95% of the samples analysed from week one to week twelve after treatment. Only one animal had diarrhoea with blood and/or fragments of intestinal mucosa (faecal score = 5) (group 1, two weeks p. t.). Goat kids treated at 7 weeks of age showed a global faecal score of 1–2 in 91% (group 3) and 85% (group 4) of the faecal samples analysed, slightly lower than in the corresponding untreated animals (100%). Semiliquid faeces (faecal score = 3) and watery diarrhoea (faecal score = 4) were observed in 8% and 15% of the samples analysed in group 3 and 4, respectively. Statistical analysis revealed no significant differences between groups in the average faecal score.

Soiling of the anal region was recorded in treated and non-treated kids from the beginning until the end of the experiment (data not shown). From week one to week six after treatment, a mean soiling score of  $\leq 2$ , indicating no soiling (score = 1) or dry soiling (score = 2), was observed in both non-treated and treated goat kids at two weeks of age, while no soiling was detected afterwards. Groups 1, 2 and 5 showed dry soiling in 23.7%, 27.3% and 28.6% of the samples analysed, respectively. On the other hand, most of the kids treated with toltrazuril at 7 weeks of age and the corresponding untreated control group showed no soiling over time. In this case, groups 3, 4 and 5 had dry soiling in 15.7%, 13.5% and 8.7% of the samples analysed, respectively. Overall, no significant differences were recorded between groups at any time of treatment.

No animals died during this study and no adverse effects were reported from treatment with the two different doses of toltrazuril employed (i. e. 20 mg/kg BW and 40 mg/kg BW).

### 3.5. Eimeria species

A total of 10 *Eimeria* species were identified in all groups, at least once, from the beginning to the end of the trial. Overall, the predominant species of coccidia were *Eimeria christensenii* (67.3%), *E. arloingi* (21.9%) and *E. ninakholyakimovae* (5.6%). Minor species included *E. jolchijevi*, *E. hirci*, *E. aspheronica*, *E. caprina*, *E. caprovina*, *E. parva* and *E. pallida*, with specific frequency of 0.3–11.4% on different time points of sampling. All these minor *Eimeria* species were named as “other species” and had a global frequency of 5.2% in the experiment (Table 3).

In groups 1 and 2, frequencies of the different *Eimeria* species significantly varied with time ( $P < 0.05 - P < 0.001$ ) (Table 3). In both groups, the frequency of *E. christensenii* was high until week 4 p. t. ( $> 80\%$ ) and decreased thereafter to mean values of about 50%. By contrast, the percentage of this *Eimeria* species in the corresponding

**Table 1**

*Eimeria* oocyst reduction (%) and Area Under the Curve (AUC)\* (%) in goat kids naturally infected with *Eimeria* spp. and treated with two different doses (20 and 40 mg/kg B. W.) of toltrazuril at two- or seven weeks of age (W)\* \*.

	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12	W13	AUC
20 mg / 2 weeks	99.9	90.9	99.9	98.9	97.5	34.7	67.7	75.8	81.7	59.1	56.7	74.4
40 mg / 2 weeks	96.7	91.7	96.6	99.4	99.6 <sup>a</sup>	78.8	39.7	78.2	75.4	55.2	23.2	49.2
20 mg / 7 weeks						62.4	23.9	-66.4	35.2	-37.7	94.7	24.5
40 mg / 7 weeks						96.2	86.9 <sup>b</sup>	72.8	69.5	25.9	98.3	65.0

(\*) Area Under the Curve (AUC) for the 4 treated groups.

(\*\*) Group 1 (20 mg / 2 weeks): Two-week of age, treated with 20 mg/kg B.W. (early treatment – low dose); Group 2 (40 mg / 2 weeks): Two-week of age, treated with 40 mg/kg B.W. (early treatment – high dose); Group 3 (20 mg / 7 weeks): Seven-weeks of age, treated with 20 mg/kg B.W. (late treatment – low dose); Group 4 (40 mg / 7 weeks): Seven-weeks of age, treated with 40 mg/kg B.W. (late treatment – high dose); (a)  $P < 0.05$  Group 1 vs Group 2; (b)  $P < 0.01$  Group 3 vs Group 4.

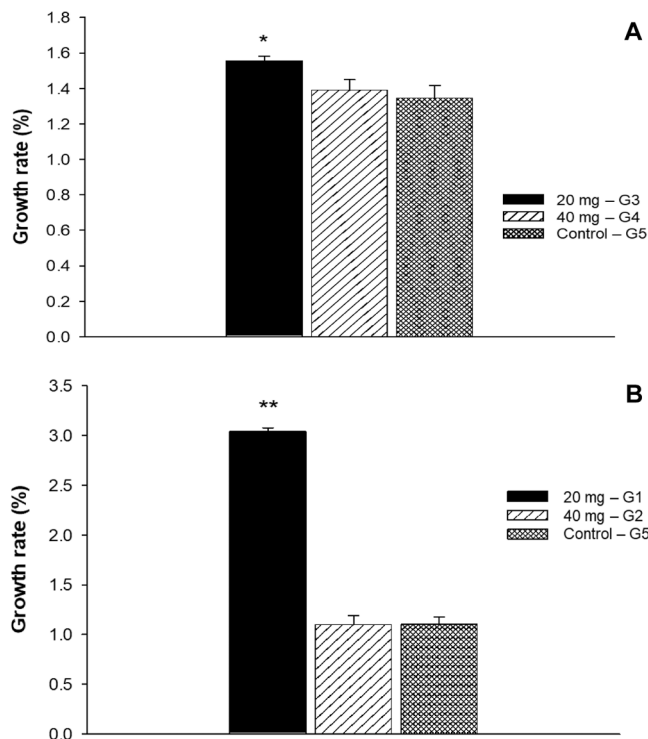


**Table 2**

Body weight in goat kids naturally infected with *Eimeria* spp. and treated with two different doses (20 and 40 mg/kg B.W.) of toltrazuril at two- or seven weeks of age (W), and non-treated control animals\*.

	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12	W13
<b>Two-weeks</b>												
20 mg / 2 weeks	3.9 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.7 ± 0.2	5.6 ± 0.2	6.3 ± 0.2	7.1 ± 0.2 <sup>1</sup> <sub>a</sub>	8.1 ± 0.2 <sup>1</sup> <sub>a</sub>	9.3 ± 0.3 <sup>1</sup> <sub>a</sub>	10.6 ± 0.3 <sup>1</sup> <sub>a</sub>	10.9 ± 0.4	12.1 ± 0.3	12.7 ± 0.4
40 mg / 2 weeks	4.1 ± 0.1	4.3 ± 0.2	4.8 ± 0.1	5.4 ± 0.2	5.9 ± 0.2	6.4 ± 0.2	7.1 ± 0.2	8.3 ± 0.3	9.7 ± 0.3	10.1 ± 0.5	11.0 ± 0.4	11.9 ± 0.5
Control	3.9 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.9 ± 0.1	5.3 ± 0.2	5.9 ± 0.2	6.5 ± 0.2	7.2 ± 0.3	7.8 ± 0.3	8.8 ± 0.4	10.1 ± 0.4	10.8 ± 0.7	11.4 ± 0.6
<b>Seven-weeks</b>												
20 mg / 7 weeks						7.1 ± 0.3	7.8 ± 0.4	8.7 ± 0.4 <sup>2</sup>	10.3 ± 0.4 <sup>2</sup>	11.0 ± 0.5	11.7 ± 0.4	11.9 ± 0.5
40 mg / 7 weeks						6.9 ± 0.2	7.4 ± 0.3	8.5 ± 0.3	9.1 ± 0.4	10.7 ± 0.4	10.5 ± 0.4	11.1 ± 0.6
Control						6.5 ± 0.2	7.2 ± 0.3	7.8 ± 0.3	8.8 ± 0.4	10.1 ± 0.4	10.8 ± 0.7	11.4 ± 0.6

(\*) The data are expressed as means (Kg) ± SEM. Group 1 (20 mg / 2 weeks): Two-week of age, treated with 20 mg/kg B.W. (early treatment – low dose); Group 2 (40 mg / 2 weeks): Two-week of age, treated with 40 mg/kg B.W. (early treatment – high dose); Group 3 (20 mg / 7 weeks): Seven-weeks of age, treated with 20 mg/kg B.W. (late treatment – low dose); Group 4 (40 mg / 7 weeks): Seven-weeks of age, treated with 40 mg/kg B.W. (late treatment – high dose); Group 5: Non-treated control animals. (1)  $P < 0.05 - P < 0.01$  Group 1 vs Group 5 (non-treated animals); (2)  $P < 0.05$  Group 3 vs Group 5; (a)  $P < 0.05 - P < 0.01$  Group 1 vs Group 2.



**Fig. 2.** Growth rates (In weight 2 – In weight 1) / t × 100 in goat kids naturally infected with *Eimeria* spp. and treated with two different doses (20 and 40 mg/kg BW, p. o.) of toltrazuril at two weeks of age (groups G1-G2; early treatment) (A) or at seven weeks of age (groups 3–4; late treatment) (B). Global growth rates are represented: days 0 to 84 post-treatment (groups 1 and 2), and days 0–42 post-treatment (groups G3 and G4). Untreated control; non-treated animals (group 5). (\*)  $P < 0.05$ ; (\*\*)  $P < 0.001$ .

untreated control group was more stable during the whole sampling period and had mean values of about 70%. Conversely, frequencies of *E. arloingi* in treated animals were lower than 15% during the first 4 weeks p. t. and then progressively increased, with global mean values of approximately 35%. Compared to treated groups, control animals had relatively high percentages of *E. arloingi* the first two weeks p. t. and lower rates afterwards, around an overall mean value of 15%. Finally, the global frequency of *E. ninakohlyakimovae* was approximately the same in both treated and controls animals, although the untreated

control group had higher rates at the beginning of the experiment (Table 3).

Goat kids treated at 7 weeks of age, either with 20 or 40 mg/kg BW of toltrazuril showed approximately the same percentage of *E. christenseni* as control animals, with overall rates of around 80% (Table 3). Global rates did not differ between control and treated groups concerning *E. arloingi* (about 10%). However, in contrast to controls, the frequency of this *Eimeria* species in treated animals was close to zero during the first 3 weeks p. t., showing an increase thereafter. A similar pattern was recorded for *E. ninakohlyakimovae*, but in this case the overall proportion of this *Eimeria* species was around 5% (Table 3). Based on these results, significant differences between the frequencies of the *Eimeria* species monitored during the second phase of the study were also found ( $P < 0.05 - P < 0.001$ ).

### 3.6. Correlation analysis

The analysis of correlation among clinical parameters revealed a strong positive correlation ( $P < 0.001$ ) between faecal score and soiling, while no correlation was observed with other clinical features such as the presence of respiratory signs or contagious ecthyma. On the other hand, both faecal score and soiling were negatively correlated with the BW of the animals ( $P < 0.001$  and  $P < 0.05$ , respectively).

Concerning parasitological parameters, no significant correlations were found between OPG counts and both clinical and productive data. In contrast, Log transformed OPG values were negatively correlated with faecal score ( $P < 0.001$ ), soiling ( $P < 0.05$ ) and the BW of goat kids ( $P < 0.001$ ).

## 4. Discussion

Anticoccidial compounds aimed to control caprine coccidiosis, a costly and neglected parasitic disease of goat industry, when compared to chicken coccidiosis. Caprine coccidiosis is caused by protozoan parasites of the genus *Eimeria* and controlled by the usage of either ionophores or synthetic compounds such as toltrazuril and diclazuril (Noack et al., 2019). The timing of appropriate anticoccidial treatment depends mainly on the farm history, farm management/hygiene and on the rearing system. Importantly, treatment should be done during the prepatent period to ensure that goat kids will not suffer clinical coccidiosis but should have certain contact to different stages of the parasite in order to generate protective immunity to homologous *Eimeria* re-infections (Matos et al., 2017, 2018).

Based on the prepatent periods of pathogenic *Eimeria* species in

Table 3

Percentage of the *Eimeria* species found in faeces in goat kids (two- or seven-weeks of age) naturally infected with *Eimeria* spp. and treated with toltrazuril (20 or 40 mg/kg B.W., and non-treated control group\*.

	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12	W13
<b>20 mg / 2 weeks</b>												
<i>E. christenseni</i>	99	100	100	83	94	25	46	45	48	55	52	61
<i>E. arloingi</i>	0	0	0	6	5	67	36	36	41	21	28	31
<i>E. ninakohlyakimovae</i>	0	0	0	0	1	4	6	7	8	11	5	4
Other spp.	1	0	0	11	0	4	12	11	3	13	15	4
	(0.03 ± 0.03)	(0.04 ± 0.02)	(0.13 ± 0.05)	(0.36 ± 0.2)	(14.2 ± 6.8)	(33.8 ± 11.7)	(96.7 ± 33.8)	(126.0 ± 64.6)	(117.6 ± 67.3)	(54.2 ± 22.2)	(58.1 ± 23.9)	(27.7 ± 10.0)
<b>40 mg / 2 weeks</b>												
<i>E. christenseni</i>	98	92	100	83	90	86	48	18	50	42	57	32
<i>E. arloingi</i>	4	4	0	15	8	11	41	69	26	43	33	49
<i>E. ninakohlyakimovae</i>	0	0	0	3	0	1	7	10	12	8	5	11
Other spp.	2	4	0	0	2	2	4	3	12	7	4	7
	(0.05 ± 0.08)	(1.37 ± 1.14)	(0.12 ± 0.04)	(10.8 ± 11.0)	(0.72 ± 0.35)	(5.6 ± 2.9)	(31.4 ± 10.8)	(235.3 ± 136.3)	(105.7 ± 75.3)	(73.0 ± 25.8)	(63.6 ± 21.0)	(49.1 ± 16.7)
<b>20 mg / 7 weeks</b>												
<i>E. christenseni</i>							70	100	98	95	69	67
<i>E. arloingi</i>							16	0	1	4	20	19
<i>E. ninakohlyakimovae</i>							10	0	0	0	4	6
Other spp.							4	0	0	1	6	7
							(7.8 ± 3.5)	(146.8 ± 72.5)	(369.0 ± 137.6)	(493.7 ± 212.9)	(92.0 ± 32.6)	(89.6 ± 34.9)
<b>20 mg / 7 weeks</b>												
<i>E. christenseni</i>							69	100	100	93	88	75
<i>E. arloingi</i>							15	0	0	0	9	18
<i>E. ninakohlyakimovae</i>							6	0	0	0	1	3
Other spp.							10	0	0	7	1	5
							(2.4 ± 2.2)	(14.7 ± 8.3)	(63.5 ± 28.3)	(80.8 ± 290.0)	(43.3 ± 10.8)	(47.4 ± 17.0)
<b>Control</b>												
<i>E. christenseni</i>	98	97	45	64	72	73	70	89	80	80	86	73
<i>E. arloingi</i>	1	3	48	16	25	16	16	8	10	8	7	18
<i>E. ninakohlyakimovae</i>	0	0	2	14	3	7	9	2	6	2	5	6
Other spp.	1	0	5	5	1	4	5	1	4	9	2	3
	(1.43 ± 0.95)	(41.9 ± 39.7)	(1.5 ± 1.2)	(314.6 ± 192.1)	(131.0 ± 47.7)	(1373.3 ± 509.9)	(148.0 ± 58.1)	(390.2 ± 124.4)	(484.9 ± 222.2)	(296.76 ± 116.1)	(142.0 ± 44.8)	(64.05 ± 13.4)

(\* ) Other spp. included: *E. jolchijevi*, *E. hirci*, *E. aspheronica*, *E. caprina*, *E. caprovina*, *E. parva* and *E. pallida*. W: weeks of age. Group 1 (20 mg / 2 weeks): Two-week of age, treated with 20 mg/kg B.W. (early treatment – low dose); Group 2 (40 mg / 2 weeks): Two-week of age, treated with 40 mg/kg B.W. (early treatment – high dose); Group 3 (20 mg / 7 weeks): Seven-weeks of age, treated with 20 mg/kg B.W. (late treatment – low dose); Group 4 (20 mg / 2 weeks): Seven-weeks of age, treated with 40 mg/kg B.W. (late treatment – high dose); Group 5 (control): Non-treated control animals. Mean OPG values ± SEM (x 103) are indicated in parentheses.

sheep (Taylor et al., 1995), most of the studies evaluating the efficacy of toltrazuril against coccidiosis in lambs have been launched as metaphylactic treatment from 10–20 days of life onwards, and usually after turnout (Gjerde and Helle, 1986, 1991; Taylor and Kenny, 1988; Stafford et al., 1994; Platzer et al., 2005; Dittmar et al., 2009; Le Sueur et al., 2009; Mundt et al., 2009; Diaferia et al., 2013; Saratsis et al., 2013; Scala et al., 2014; Pérez-Fonseca et al., 2016; de Souza Rodrigues et al., 2016, 2017). The studies using toltrazuril in goats as metaphylactic treatment against coccidiosis are more limited (Chartier et al., 1992; Šlosárková et al., 1998; Balicka-Ramisz, 1999; Iqbal et al., 2013a, 2013b; Nunes et al., 2015) and, in some cases, the suggested timing of treatment is beyond the critical period for clinically manifest coccidiosis or even not available. In the present study, two different time points were evaluated to investigate the efficacy of toltrazuril in goat rearing systems. Based on our observations of ongoing research (data not shown) indicating that faecal oocyst counts higher than  $1 \times 10^5$  OPG can be already found in one-month goat kids, a first batch of animals were treated at 15 days of life (prompt treatment) as described for lambs by Le Sueur et al. (2009). The second timing for treatment was established at seven weeks of age, approximately two weeks before the onset of weaning, which is considered the most critical period for coccidiosis outbreaks, and when non-immune goat kids are more susceptible to *Eimeria* infections (Ruiz et al., 2006; Chartier and Paraud, 2012; Matos et al., 2018). The results of the present study confirm the efficacy of toltrazuril in goat kids against caprine coccidiosis given at two time points. Treatment at 2 weeks of life maintained faecal oocyst excretion at zero for five consecutive weeks and only started to increase from week 8 of life. By

this anticoccidial treatment, the animals did not experience the peak of oocyst elimination that occurred at week 7 of life in the untreated control animals and, accordingly, the intestinal damage caused by the release of the oocysts would have diminished. Interestingly, subsequent levels of infection in treated goat kids were mild compared to controls, indicating that previous contact with the parasite may have allowed the development of a protective immune response as reported for other ruminant species (Matos et al., 2018). This is important to emphasize because inappropriate timing of treatment (i. e. before animals have had enough contact to the parasite) may result in severe clinical coccidiosis in goat kids, coinciding with the stressful weaning period. In the farm where the experiment was done, weaning usually takes place from two months of life onwards and, apart from the change of feeding, generally involves the allocation of the animals into different pens, all this causing stress and, probably, weakening of the immune system. Accordingly, untreated control animals had another peak of oocyst excretion at week 9–11 of life. This second peak was considerably lower than the previous one, recorded at week 7 of life, indicating that some immunity against *Eimeria* infections had been mounted. Long-lasting effect of toltrazuril (10–11 weeks) has been previously observed in goat kids treated with toltrazuril at different ages (2, 3, 4 and 5 weeks of age) (Nunes et al., 2015) and other host species (Karembe et al., 2021). However, in contrast to our results, OPG counts close to zero were only observed one week after treatment in this study (Nunes et al., 2015). Additionally, here we further probed the efficacy of toltrazuril in goat kids given at week 7 of life in order to prevent weaning-associated coccidiosis, although with differences according to the dose employed as it will be

discussed below. The efficacy was lower than at 2-week treatment both in terms of percentage of OPG reduction and persistence of the effect, but comparable with previous data on the use of toltrazuril in older goat kids: 1–3 months old (Iqbal et al., 2013a), 3–6 months old (Awasthi et al., 2022), 4–6 months old (Chartier et al., 1992).

Although, there are limited published pharmacokinetic data evaluating toltrazuril in small ruminants (Stock et al., 2018), a previous study has shown that toltrazuril sulfone is absorbed equally well following a single oral dose in weaning goats as it has been described in cattle (Love et al., 2015). In fact, in pregnant and non-pregnant goats, toltrazuril is well absorbed after a single oral dose (Elazab et al., 2021), similarly to what occurs in pregnant and non-pregnant ewes (Al-Qadri et al., 2020). The pharmacokinetic of antiparasitic drugs, in this case a synthetic anticoccidial compound, it is essential not only to ensure the expected effect but also to avoid the appearance of resistances associated to underdosing (Escudero et al., 1999). Consistently, this factor in regular coccidiosis control was referred as a plausible cause of the first report of *Eimeria* spp. resistance development against toltrazuril reported in sheep herds of Norway (Odden et al., 2017, 2018). To address the underdose issue, two different doses (i. e. 20 or 40 mg/kg BW, p. o.) were assessed in the present study at both treatment times based on a previous study showing that a higher dose rate of toltrazuril should be administered compared to the dose rate for sheep or cattle (Chartier et al., 1992). As pointed out above, the efficacy of both doses was approximately the same when treatment was performed at 2 weeks of age. By contrast, in therapeutic treatment at week 7 of life important differences were identified on the effectiveness of the two doses. The higher dose was much more effective than the commonly 20 mg/kg BW used for lambs and maintained close to zero the levels of OPG during the first 4 weeks post-treatment. This is in agreement to previous data reported by Chartier et al. (1992), who described an oocyst reduction during 1 week after treatment with 20 mg/kg BW in 4–6 months old goat kids, while the reduction was extended to 3 weeks when using a higher dose. A similar finding was also reported for the other triazine diclazuril (Ruiz et al., 2012), although in this study the differences between the two doses were not so significant. The relatively poor effect of treatment with 20 mg/kg BW in older goat kids found here differs from other studies using the same dose in goat kids of approximately the same age (Iqbal et al., 2013a) or even in older animals (Chartier et al., 1992; Awasthi et al., 2022). Based on the current study, we cannot determine the reason for those differences, except that the pharmacokinetic of the drug might differ depending on the goat breed employed. Although the same hypothesis may be applied to age-dependent effects of toltrazuril observed here, further investigations must be addressed in this direction to prove the inter-assay repeatability of the results.

In this study, moderate significant differences in BW gain were found between untreated goat kids and those metaphylactically treated with toltrazuril. When overall growth rates were evaluated, animals treated either at 2 weeks or 7 weeks after birth with 20 mg/kg BW of toltrazuril were those which had higher growth rates compared to control group. This is in agreement to previous studies showing the efficacy of toltrazuril (20 mg/kg) in body weight gains 1- or 4- weeks after treatment (Iqbal et al., 2013a, b). No benefit on growth performance was found in kids treated with 40 mg/kg BW of toltrazuril as shown before by Chartier et al. (1992). In addition, toltrazuril given at 20 mg/kg BW had better effects on improving BW in 7-week-old treated animals, which is inconsistent to the higher treatment efficacy, in terms of OPG reduction, recorded in goat kids treated at the younger age. In addition to considering that increasing the dose rate may not be only beneficial, the low rate of clinical signs found here during most of the experiment, particularly in control animals, may be the explanation for the lack of correlation between OPG reduction and BW performance when evaluating the dose-dependent effects of toltrazuril. In fact, the percentage of animals with diarrhea and soiling was rather low. As for soiling, the percentage of animals showing this clinical sign was higher in the early phase of the experiment and no differences were found between treated

and untreated animals despite differences on OPG counts, so other factors (e.g., feeding disorders or other gastrointestinal infections) could be involved in early gastrointestinal disturbances. In agreement, several studies have hypothesized that the improvement of BW under moderate levels of *Eimeria* infection might have been inconsistent (Yvoré et al., 1985; Chartier et al., 1992). On another hand, variable effect on growth performance have been also shown in lambs according to time of treatment; for instance, a single dose of toltrazuril (20 mg/ kg BW) increased weight gains in lambs after weaning (Saratsis et al., 2013), while no effect was found when treatment was given at 10–14 days (Le Sueur et al., 2009), 11 days, 18 days (Saratsis et al., 2013) or even 25 days of age (de Souza Rodrigues et al., 2017). As previously suggested (Iqbal et al., 2013a, b) older kids may have a better ability to improve weight gains upon treatment with toltrazuril due to the development of a higher protective immunity against *Eimeria* infections (Chartier and Paraud, 2012).

In the present study, to identify the presence of pathogenic *Eimeria* species which may be responsible for clinical coccidiosis, and to evaluate the kinetics of these species after treatment with toltrazuril, *Eimeria* oocysts identification was performed at all sampling time points. Throughout this trial, a total of 10 *Eimeria* species were identified at least once, in each of the five experimental groups. *Eimeria christenseni* and *E. arloingi* were the most frequent species. The strongly pathogenic *E. ninakohlyakimovae* was found in moderate frequency, but still high compared to the remaining species found in the study and named as “other species”. These results are in agreement with those reported in previous studies on goat coccidiosis performed in Gran Canaria (Ruiz et al., 2006, 2012), with slight variation in species repertoire when compared to other publications worldwide (Chartier et al., 1992; Balicka-Ramisz, 1999; Young et al., 2011; Chartier and Paraud, 2012; Iqbal et al., 2013b; Gibbons et al., 2016; Keeton and Navarre, 2018).

The kinetics of the three most prevalent *Eimeria* species differed after differed after both early and late treatment. *Eimeria arloingi* and *E. ninakohlyakimovae* had a significantly lower frequency than untreated animals for up to 4 weeks post-treatment. Slight differences were observed depending to the dose of toltrazuril employed, with animals treated with 40 mg/kg dose of toltrazuril at two weeks of age being those which showed a greater delay in the appearance of pathogenic species (around five weeks post-treatment). In contrast, untreated control animals already had moderate frequencies for *E. arloingi* and *E. ninakohlyakimovae* already at week 3 to 5, which could lead to earlier onset of clinical signs of coccidiosis due to the pathogenicity of these *Eimeria* species in goats (Yvoré et al., 1985; Koudela and Boková, 1998).

*Eimeria christenseni* was the predominant *Eimeria* species in untreated animals throughout the experiment, and only slightly decreased when the frequency of *E. arloingi* and *E. ninakohlyakimovae* increased. In general, the predominance of *E. christenseni*, considered as a species moderate pathogenicity (Taylor and Catchpole, 1994), would explain why clinical signs of coccidiosis were not evident in any of the experimental groups. Conversely, the frequency of *E. christenseni* was particularly high in treated groups during the first weeks after treatment, in agreement to previous studies in goat kids (with no age reference) treated with toltrazuril (20 mg/kg BW) (Balicka-Ramisz, 1999). In this trial, the decrease in the frequency of *E. arloingi*, particularly, and of *E. ninakohlyakimovae* one week after treatment was more evident than that found for *E. christenseni* (Balicka-Ramisz, 1999). As for *E. ninakohlyakimovae*, the frequency in oocyst reduction was dose dependent in goat kids of 4–6 months old, being maintained for 7 days (20 mg/kg BW) and between 14 and 21 days (40 mg/kg BW) after treatment when compared with the control (Chartier et al., 1992). No difference was observed between 20 mg/kg BW and 40 mg/kg BW in our study, probably because this trial was conducted with younger goat kids. Overall, data on speciation hint that toltrazuril is more effective against pathogenic species, as suggested elsewhere (Torres et al., 2021), although single-species investigations should be undertaken to ultimately determine this hypothesis.

Based on the results presented here it can be concluded that toltrazuril is highly effective in reducing faecal OPG counts, in particular for pathogenic *Eimeria* species, with the treatment efficacy being more evident in goat kids treated at earlier timing. Although timely treatment could indeed be considered a key factor, a higher dose of toltrazuril (40 mg/kg) seems to be more effective in terms of OPG reductions in animals treated at older ages; however, the corresponding association to growth performance was not clear, probably because clinical signs of coccidiosis were only occasionally recorded during the whole investigation period. This study provides further input for a more rational use of anticoccidials in goats, in this case toltrazuril, which has not yet been registered for use in this host species.

### CRedit authorship contribution statement

**Guedes Aránzazu C.:** Investigation, Formal analysis, Writing - Original Draft. **Conde-Felipe Magnolia:** Investigation, Writing - Original Draft, Visualization. **Barba Emilio:** Investigation, Formal analysis. **Molina José Manuel:** Investigation, Methodology, Writing - Review & Editing. **Muñoz María del Carmen:** Investigation. **Ferrer Otilia:** Investigation. **Martín Sergio:** Investigation, Resources. **Hermosilla Carlos:** Writing - Review & Editing. **Taubert Anja:** Writing - Review & Editing. **Ruiz Antonio:** Methodology, Formal analysis, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Acknowledgments

This work was supported by the Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Ciencias de la Información (ProID2017010039). We sincerely thank the participating farmer to give us the permission to conduct the experiment and to the staff for helping in the management of the animals during treatment and sampling.

### References

- Abo-Shehadeh, M.N., Abo-Farhah, H.A., 2003. Prevalence of *Eimeria* species among goats in northern Jordan. *Small Rumin. Res.* 49, 109–113.
- Al-Qadri, R.F., Abu-Basha, E.A., Ababneh, M.M., Bani Ismail, Z., Idkaidek, N.M., 2020. Pharmacokinetics of toltrazuril and its metabolites in pregnant and nonpregnant ewes and determination of their concentrations in milk, allantoic fluid, and newborn plasma. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 43, 339–346. <https://doi.org/10.1111/jvp.12845>.
- 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. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(92\)90131-4](https://doi.org/10.1016/0020-7519(92)90131-4).
- Alzieu, J.P., Mage, C., Maes, L., De Mûelenaere, C., 1999. Economic benefits of prophylaxis with diclazuril against subclinical coccidiosis in lambs reared indoors. *Vet. Rec.* 144, 442–444. <https://doi.org/10.1136/vr.144.16.442>.
- Awasthi, S., Bagherwal, R.K., Mehta, H.K., Jayraw, A.K., Singh, R., 2022. Comparative efficacy of amprolium, toltrazuril and neem leaf powder against caprine coccidiosis. *Indian J. Vet. Sci. Biotechnol.* 18, 110–112.
- Balicka-Ramisz, A., 1999. Studies on coccidiosis in goats in Poland. *Vet. Parasitol.* 81, 347–349. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(98\)00258-1](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(98)00258-1).
- Bidorff, C., Yvore, P., Esnault, A., Picorit, R., 1986. Coccidiosis and gastro-intestinal transit in kids [*Eimeria* spp.]. *Recl. Med. Veterinaire Fr.*
- Chapman, H.D., Barta, J.R., Blake, D., Gruber, A., Jenkins, M., Smith, N.C., Suo, X., Tomley, F.M., 2013. A selective review of advances in coccidiosis research. *Adv. Parasitol.* 83, 93–171. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407705-8.00002-1>.
- Chartier, C., Paraud, C., 2012. Coccidiosis due to *Eimeria* in sheep and goats, a review. *Small Rumin. Res.* 103, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.10.022>.
- Chartier, C., Pellet, M.P., Pors, I., 1992. Effects of toltrazuril on oocyst discharge and growth in kids with naturally-acquired coccidial infections. *Small Rumin. Res.* 8, 171–177. [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(92\)90019-Z](https://doi.org/10.1016/0921-4488(92)90019-Z).
- Craig, T.M., 1986. Epidemiology and control of coccidia in goats. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2, 389–395. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)31250-0](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)31250-0).
- Diaferia, M., Veronesi, F., Morganti, G., Nisoli, L., Fioretti, D.P., 2013. Efficacy of toltrazuril 5% suspension (Baycox®, Bayer) and diclazuril (Vecoxan®, Janssen-

- Cilag) in the control of *Eimeria* spp. in lambs. *Parasitol. Res.* 112, 163–168. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3440-1>.
- Dittmar, K., Mundt, H.-C., Grzonka, E., Dausgschies, A., Bangoura, B., 2009. Multicentric study on the efficacy of toltrazuril as metaphylactic treatment against naturally acquired coccidiosis in housed lambs. *Dtsch. Tierärztl. Woche* 116, 355–362.
- Elazab, S.T., Elshater, N.S., Elweza, A.E., 2021. Pharmacokinetics of toltrazuril and its metabolites toltrazuril sulphoxide and toltrazuril sulphone in pregnant and non-pregnant goats. *Acta Vet. Brno* 90, 383–390.
- EMEA/CVMP/278616/ 2005. Toltrazuril (Extension to cattle and extrapolation to all mammalian food-producing species and poultry) (Summary Report), 2005. Committee for Medicinal Products for Veterinary use, Veterinary Medicines and Inspections, European Medicines Agency.
- Epe, C., Von Samson-Himmelstjerna, G., Wirtherle, N., Von Der Heyden, V., Welz, C., Beening, J., Radeloff, I., Hellmann, K., Schnieder, T., Krieger, K., 2005. Efficacy of toltrazuril as a metaphylactic and therapeutic treatment of coccidiosis in first-year grazing calves. *Parasitol. Res.* 97, S127–S133. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1456-x>.
- Escudero, E., Carceles, C.M., Diaz, M.S., Sutra, J.F., Galtier, P., Alvinerie, M., 1999. Pharmacokinetics of moxidectin and doramectin in goats. *Res. Vet. Sci.* 67, 177–181. <https://doi.org/10.1053/rvsc.1998.0304>.
- Faizal, A.C.M., Rajapakse, R.P.V.J., 2001. Prevalence of coccidia and gastrointestinal nematode infections in cross bred goats in the dry areas of Sri Lanka. *Small Rumin. Res. J. Int. Goat Assoc.* 40, 233–238. [https://doi.org/10.1016/s0921-4488\(01\)00179-1](https://doi.org/10.1016/s0921-4488(01)00179-1).
- Foreyt, W.J., 1990. Coccidiosis and cryptosporidiosis in sheep and goats. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 6, 655–670. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30838-0](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30838-0).
- Gibbons, P., Love, D., Craig, T., Budke, C., 2016. Efficacy of treatment of elevated coccidial oocyst counts in goats using amprolium versus ponazuril. *Vet. Parasitol.* 218, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.020>.
- Gjerde, B., Helle, O., 1986. Efficacy of toltrazuril in the prevention of coccidiosis in naturally infected lambs on pasture. *Acta Vet. Scand.* 27, 124–137. <https://doi.org/10.1186/BF03548565>.
- Gjerde, B., Helle, O., 1991. Chemoprophylaxis of coccidiosis in lambs with a single oral dose of toltrazuril. *Vet. Parasitol.* 38, 97–107. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(91\)90120-k](https://doi.org/10.1016/0304-4017(91)90120-k).
- Haberkorn, A., 1987. Studies on the activity spectrum of toltrazuril, a new anticoccidial agent. *Vet. Med. Rev.* 1, 22–32.
- Harder, A., Haberkorn, A., 1989. Possible mode of action of toltrazuril: studies on two *Eimeria* species and mammalian and *Ascaris suum* enzymes. *Parasitol. Res.* 76, 8–12. <https://doi.org/10.1007/BF00931064>.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00436-001-0531-1>.
- Iqbal, A., Tariq, K.A., Wazir, V.S., Singh, R., 2013a. Antiparasitic efficacy of *Artemisia absinthium*, toltrazuril and amprolium against intestinal coccidiosis in goats. *J. Parasit. Dis. Organ Indian Soc. Parasitol.* 37, 88–93. <https://doi.org/10.1007/s12639-012-0137-9>.
- Iqbal, A., Wazir, V.S., Singh, R., 2013b. Comparative studies on the efficacy of toltrazuril and amprolium in the treatment of caprine coccidiosis. *Intas Polivet* 14, 102–104.
- Joachim, A., Altreuther, G., Bangoura, B., Charles, S., Dausgschies, A., Hinney, B., Lindsay, D.S., Mundt, H.C., Ocak, M., Sotiraki, S., 2018. W A A V P guideline for evaluating the efficacy of anticoccidials in mammals (pigs, dogs, cattle, sheep). *Vet. Parasitol.* 253, 102–119. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.029>.
- Karembe, H., Sperling, D., Varinot, N., Magnier, R., Peyrou, M., Guerra, N., Smola, J., Vasek, J., Hinney, B., Joachim, A., 2021. Absorption and distribution of toltrazuril and toltrazuril sulfone in plasma, intestinal tissues and content of piglets after oral or intramuscular administration. *Molecules* 26, 5633. <https://doi.org/10.3390/molecules26185633>.
- Keeton, S.T.N., Navarre, C.B., 2018. Coccidiosis in large and small ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 34, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.10.009>.
- Koudela, B., Boková, A., 1998. Coccidiosis in goats in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 76, 261–267. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(97\)00147-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(97)00147-7).
- Le Sueur, C., Mage, C., Mundt, H.-C., 2009. Efficacy of toltrazuril (Baycox 5% suspension) in natural infections with pathogenic *Eimeria* spp. in housed lambs. *Parasitol. Res.* 104, 1157–1162. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1305-9>.
- Levine, N.D., 1985. *Veterinary protozoology*. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Levine, N.D., Ivens, V., 1986. The coccidian parasites (Protozoa, Apicomplexa) of Artiodactyla. University of Illinois, Urbana.
- Lima, J.D., 1980. Prevalence of coccidia in domestic goats from Illinois, Indiana, Missouri and Wisconsin. *Int. Goat Sheep Res* 1, 234–241.
- Love, D., Gibbons, P., Fajt, V., Jones, M., 2015. Pharmacokinetics of single-dose oral ponazuril in weanling goats. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 39, 305–308. <https://doi.org/10.1111/jvp.12273>.
- Matos, L., Muñoz, M.C., Molina, J.M., Rodríguez, F., Pérez, D., López, A.M., Ferrer, O., Hermosilla, C., Taubert, A., Ruiz, A., 2017. Protective immune responses during prepatency in goat kids experimentally infected with *Eimeria ninakohlyakimovae*. *Vet. Parasitol.* 242, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.016>.
- Matos, L., Muñoz, M.C., Molina, J.M., Rodríguez, F., Pérez, D., López, A.M., Hermosilla, C., Taubert, A., Ruiz, A., 2018. Age-related immune response to experimental infection with *Eimeria ninakohlyakimovae* in goat kids. *Res. Vet. Sci.* 118, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.02.004>.

- McKenna, P.B., 1988. The efficacy of toltrazuril against naturally-acquired coccidial infections in goats. *Vet. Med. Rev.* 59, 157–161.
- Mehlhorn, H., 2008. DNA-synthesis-affecting drugs V: interference with dihydroorotatedehydrogenase. In: *Encyclopedia of Parasitology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 389–392.
- Mehlhorn, H., Ortmann-Falkenstein, G., Haberkorn, A., 1984. The effects of sym. Triazinones on developmental stages of *Eimeria tenella*, *E. maxima* and *E. acervulina*: a light and electron microscopical study. *Z. Parasitenkd.* 70, 173–182.
- Mundt, H.-C., Mundt-Wüstenberg, S., Dausgchies, A., Joachim, A., 2007. Efficacy of various anticoccidials against experimental porcine neonatal isosporosis. *Parasitol. Res.* 100, 401–411. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0314-9>.
- Mundt, H.-C., Dittmar, K., Dausgchies, A., Grzonka, E., Bangoura, B., 2009. Study of the comparative efficacy of toltrazuril and diclazuril against ovine coccidiosis in housed lambs. *Parasitol. Res.* 105, 141–150. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1505-y>.
- Noack, S., Chapman, H.D., Selzer, P.M., 2019. Anticoccidial drugs of the livestock industry. *Parasitol. Res.* 118, 2009–2026. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06343-5>.
- Nunes, D.M., Cruz, J.F., Teixeira Neto, M.R., 2015. Uso preventivo do toltrazuril para controle da coccidiose em cabritos de corte criados em região semiárida. *Rev. Bras. Saúde E Produção Anim.* 16, 179–189.
- Odden, A., Enemark, H.L., Robertson, L.J., Ruiz, A., Hektoen, L., Stuen, S., 2017. Treatment against coccidiosis in Norwegian lambs and potential risk factors for development of anticoccidial resistance—a questionnaire-based study. *Parasitol. Res.* 116, 1237–1245. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5400-7>.
- Odden, A., Denwood, M.J., Stuen, S., Robertson, L.J., Ruiz, A., Hammes, I.S., Hektoen, L., Enemark, H.L., 2018. Field evaluation of anticoccidial efficacy: A novel approach demonstrates reduced efficacy of toltrazuril against ovine *Eimeria* spp. in Norway. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 8, 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.ijpdr.2018.05.002>.
- Pérez-Fonseca, A., Alcalá-Canto, Y., Salem, A.Z.M., Alberti-Navarro, A.B., 2016. Anticoccidial efficacy of naringenin and a grapefruit peel extract in growing lambs naturally-infected with *Eimeria* spp. *Vet. Parasitol.* 232, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.11.009>.
- Platzer, B., Prosl, H., Cieslicki, M., Joachim, A., 2005. Epidemiology of *Eimeria* infections in an Austrian milking sheep flock and control with diclazuril. *Vet. Parasitol.* 129, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.031>.
- 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. Ser. B* 53, 399–402. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2006.00985.x>.
- Ruiz, A., Guedes, A.C., Muñoz, M.C., Molina, J.M., Hermosilla, C., Martín, S., Hernández, Y.I., Hernández, A., Pérez, D., Matos, L., López, A.M., Taubert, A., 2012. Control strategies using diclazuril against coccidiosis in goat kids. *Parasitol. Res.* 110, 2131–2136. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2746-0>.
- Ruiz, A., Muñoz, M.C., Molina, J.M., Hermosilla, C., Andrada, M., Lara, P., Bordón, E., Pérez, D., López, A.M., Matos, L., Guedes, A.C., Falcón, S., Falcón, Y., Martín, S., Taubert, A., 2014. Immunization with *Eimeria ninakohlyakimovae* live attenuated oocysts protect goat kids from clinical coccidiosis. *Vet. Parasitol.* 199, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.09.032>.
- Saratsis, A., Karagiannis, I., Brozos, C., Kiossis, E., Tzanidakis, N., Joachim, A., Sotiraki, S., 2013. Lamb eimeriosis: applied treatment protocols in dairy sheep production systems. *Vet. Parasitol.* 196, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.020>.
- Scala, A., Varcasia, A., Dore, F., Solinas, C., Mula, P., Carta, A., Mura, M.C., Pipia, A.P., Sanna, G., 2014. Evaluation of efficacy of toltrazuril and diclazuril in the control of subclinical eimeriosis in weaned lambs. *Small Rumin. Res.* 120, 242–246. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.05.015>.
- Silva, L.M.R., Chávez-Maya, F., Macdonald, S., Pegg, E., Blake, D.P., Taubert, A., Hermosilla, C., 2017. A newly described strain of *Eimeria arloingi* (strain A) belongs to the phylogenetic group of ruminant-infecting pathogenic species, which replicate in host endothelial cells in vivo. *Vet. Parasitol.* 248, 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.10.014>.
- Šlosárková, S., Chroust, K., Skrivaneck, M., 1998. Effects of toltrazuril and monensin in kids naturally infected with coccidiosis. *Vet. Med. -UZPI* 43.
- Soe, A.K., Pomroy, W.E., 1992. New species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the domesticated goat *Capra hircus* in New Zealand. *Syst. Parasitol.* 23, 195–202.
- de Souza Rodrigues, F., Tavares, L.E.R., Paiva, F., 2016. Efficacy of treatments with toltrazuril 7.5% and lasalocid sodium in sheep naturally infected with *Eimeria* spp. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 25, 293–298.
- de Souza Rodrigues, F., Cezar, A.S., De Menezes, F.R., Sangioni, L.A., Vogel, F.S.F., De Avila Botton, S., 2017. Efficacy and economic analysis of two treatment regimens using toltrazuril in lambs naturally infected with *Eimeria* spp. on pasture. *Parasitol. Res.* 116, 2911–2919. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5597-5>.
- Stafford, K.J., West, D.M., Vermunt, J.J., Pomroy, W., Adlington, B.A., Calder, S.M., 1994. The effect of repeated doses of toltrazuril on coccidial oocyst output and weight gain in suckling lambs. *N. Z. Vet. J.* 42, 117–119.
- Stock, M.L., Elazab, S.T., Hsu, W.H., 2018. Review of triazine antiprotozoal drugs used in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 41, 184–194. <https://doi.org/10.1111/jvp.12450>.
- Taylor, M., Catchpole, J., Marshall, R., Norton, C., Green, J., 1995. *Eimeria* species of sheep. In: Eckert, J., Braun, R., Shirley, M.W., Coudert, P. (Eds.), *Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research*. European Commission, Luxembourg, pp. 25–39.
- Taylor, M.A., Catchpole, J., 1994. Review article: coccidiosis of domestic ruminants. *Appl. Parasitol.* 35, 73–86.
- Taylor, M.A., Marshall, R.N., Marshall, J.A., Catchpole, J., Bartram, D., 2011. Dose-response effects of diclazuril against pathogenic species of ovine coccidia and the development of protective immunity. *Vet. Parasitol.* 178, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.024>.
- Taylor, S.M., Kenny, J., 1988. Coccidiocidal efficacy of a single treatment of toltrazuril in naturally infected lambs. *Vet. Rec.* 123, 573. <https://doi.org/10.1136/vr.123.22.573>.
- Thienpont, D., Rochette, F., Vanparijs, O.F.J., 1979. Diagnosing helminthiasis by coprological examination. *Diagn. Helminthiasis Coprological Exam.*
- Torres, A., Capote, J., Fresno, M., Eguiza, A., Barba, E., Molina, J.M., Ruiz, A., 2021. Impact of different feeding systems on cost-effectiveness and *Eimeria* spp. infections in Canarian goat kids. *Small Rumin. Res.* 204, 106518. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106518>.
- Vercruysee, J., 1982. The coccidia of sheep and goats in Senegal. *Vet. Parasitol.* 10, 297–306. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(82\)90080-2](https://doi.org/10.1016/0304-4017(82)90080-2).
- Young, G., Alley, M.L., Foster, D.M., Smith, G.W., 2011. Efficacy of amprolium for the treatment of pathogenic *Eimeria* species in Boer goat kids. *Vet. Parasitol.* 178, 346–349. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.028>.
- Yvoré, P., Dupré, P., Esnault, A., Besnard, J., 1980. Experimental coccidiosis in the young goat: parasitic development and lesions. *Int. Goat Sheep Res* 1, 163–167.
- Yvoré, P., Esnault, A., Guillimin, P., 1981. La coccidiose du chevreau en élevage en chevrerie: importance du choix du moment du traitement. *Rev. Méd. Vét* 132, 205–208.
- Yvoré, P., Esnault, A., Naciri, M., 1985. La coccidiose caprine: effets de contaminations mono ou multispécifiques. *Rec. Med. Vet.* 161, 347–351.
- Zapa, D.M.B., Couto, L.F.M., Heller, L.M., Ferreira, L.L., Iuasse, H.V., Naves, R.B., Trindade, A.S.N., De Aquino, L.M., Soares, V.E., Lopes, W.D.Z., 2022. Long-term efficacy of toltrazuril in naïve calves prophylactically treated and experimentally infected with *Eimeria* spp. *Parasitol. Res.* 121, 2571–2578. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07601-9>.



## **5. CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

- **PRIMERA:** El tratamiento con diclazuril resulta eficaz frente a la coccidiosis en cabritos, aunque la estrategia de control óptima debería de adaptarse a las condiciones de manejo y a la importancia clínica de la coccidiosis del rebaño.
- **SEGUNDA:** En granjas con antecedentes de problemas graves de eimeriosis caprina clínica, el tratamiento con dosis doble (2 mg/kg) de diclazuril, además de la administración de un segundo tratamiento, sería la mejor estrategia de control en términos de reducción de excreción de ooquistes, el rendimiento del crecimiento, la alimentación conversión y la mejora de los signos clínicos.
- **TERCERA:** La administración de una dosis única de 1 mg/kg de diclazuril podría ser una alternativa de prevención adecuada para rebaños con buenas condiciones de manejo que prevengan la coccidiosis clínica severa en cabritos.
- **CUARTA:** El toltrazuril es altamente efectivo en la reducción los recuentos fecales de ooquistes, en particular para especies patógenas de *Eimeria*, siendo la eficacia del tratamiento más evidente en cabritos tratados en momentos más tempranos.
- **QUINTA:** La dosis doble de toltrazuril parece ser más eficaz en términos de reducción de la excreción de ooquistes en animales tratados a edades más avanzadas, pero la asociación correspondiente con el rendimiento del crecimiento no parece evidente, probablemente porque los signos clínicos de coccidiosis sólo se registraron ocasionalmente durante todo el período de investigación.
- **SEXTA:** Por primera vez, se ha descrito la utilidad de la inmunización con los ooquistes atenuados de *E. ninakohlyakimovae* como una herramienta de control frente a la coccidiosis caprina. La inmunización no indujo prácticamente signos clínicos de coccidiosis, pero sí suficiente inmunogenicidad en términos de inmunoprotección, en términos de reducción de los recuentos de ooquistes y de la intensidad del cuadro clínico.



## **6. RESUMEN - SUMMARY**





## 6. RESUMEN - SUMMARY

Los coccidios del género *Eimeria* son parásitos intracelulares de las células epiteliales del intestino delgado y grueso de los hospedadores. Los caprinos adultos suelen hacerse resistentes después de sobrevivir al periodo crítico durante las primeras semanas de vida. Por el contrario, los animales jóvenes son especialmente susceptibles a padecer la enfermedad, sobre todo durante el periodo de destete. La enfermedad, que se encuentra diseminada por todo el mundo, cursa con trastornos gastrointestinales asociados a diarrea, deshidratación, anorexia, deterioro del estado general y postración. En los casos más severos puede producir la muerte de los cabritos y, en general, se asocia a un importante retraso del crecimiento. Por todo ello, las infecciones por *Eimeria* spp. son responsables de cuantiosas pérdidas económicas. Tradicionalmente, el control de la coccidiosis se ha basado en la combinación de medidas de manejo y profilaxis terapéutica con anticoccidiósicos. Aunque hay disponibles numerosos fármacos en el mercado efectivos frente a *Eimeria* spp., actualmente no existe ninguno que esté registrado para los caprinos en la Unión Europea. De forma empírica, se emplean dosis similares a las recomendadas para ovinos o bovinos, con el consiguiente riesgo de subdosificación y, por tanto, de aparición de resistencia anticoccidiósica. Por este motivo, uno de los objetivos de la presente tesis doctoral fue evaluar la eficacia en cabritos de dos de los anticoccidiósicos más ampliamente utilizados en rumiantes, en concreto las triazinas diclazuril y toltrazuril. En el estudio realizado con diclazuril se evaluaron dos dosis del fármaco (1 y 2 mg/kg de peso vivo) y, con cada una de ellas, se realizaron tratamientos simples o dobles, separados dos semanas. De los datos obtenidos en este trabajo puede concluirse que el tratamiento con diclazuril es altamente eficaz frente la coccidiosis en cabritos. Sin embargo, la estrategia de control óptima debe adaptarse a las condiciones de manejo y a la presencia de coccidiosis clínica o subclínica en el rebaño. En el estudio realizado con el anticoccidiósico toltrazuril también se evaluaron dos dosis (20 mg/kg y 40 mg/kg), pero en este caso los tratamientos fueron únicos, aunque en dos tiempos diferentes (2 y 7 semanas de vida). En base a los resultados obtenidos, se concluye que los tratamientos metafilácticos con 20 mg/kg de peso corporal de toltrazuril a las 2 semanas de edad serían suficientes para controlar los síntomas clínicos de coccidiosis en cabritos; mientras que si se administra más tarde, a las 7 semanas de edad, coincidiendo así con el pico de excreción de ooquistes frecuentemente observado en cabritos en condiciones de campo, podría ser aconsejable una dosis doble. Ambos anticoccidiósicos se han venido utilizando en las explotaciones de caprinos de España en la última década, por lo que no se descarta que, en un futuro próximo, se desarrollen fenómenos de resistencia, tal y como ha sucedido en rebaños de ovinos en Noruega. En consecuencia, se hace necesaria la implantación de estrategias de control alternativas como la inmunoprofilaxis. En este sentido, en el tercer artículo de la tesis se evaluó el efecto inmunoprotector de ooquistes atenuados de *E. ninakohlyakimovae* frente a la coccidiosis en cabritos. Los datos del estudio mostraron que la inmunización prácticamente no mostró efecto patógeno, pero sí suficiente inmunogenicidad en términos de inmunoprotección. La protección se reflejó, no sólo en la reducción de los ooquistes excretados en heces, sino también en una reducción de la intensidad del cuadro clínico de los cabritos. En su conjunto, el compendio de artículos presentado en la presente tesis se ha pretendido que sea una contribución al control de la coccidiosis en ganado caprino.

Coccidia of the genus *Eimeria* are intracellular parasites of the epithelial cells of the small and large intestine of hosts. Adult goats usually become resistant after surviving the critical period during the first weeks of life. In contrast, young animals are particularly susceptible to the disease, especially during the weaning period. The disease, which is widespread throughout the world, causes gastrointestinal disorders associated with diarrhoea, dehydration, anorexia, impairment of the general condition and prostration. In the most severe cases, it can lead to the death of goat kids and, in general, it is associated with significant growth delay. For all these reasons, *Eimeria* spp. infections are responsible for considerable economic losses. Traditionally, coccidiosis control has been based on a combination of management measures and therapeutic prophylaxis with anticoccidials. Although numerous drugs effective against *Eimeria* spp. are available on the market, none are currently registered for goats in the European Union. Empirically, doses similar to those recommended for sheep or cattle are used, with the consequent risk of underdosing and, therefore, the appearance of anticoccidial resistance. For this reason, one of the objectives of the present doctoral thesis was to evaluate the efficacy in kids of two of the most widely used anticoccidial agents, namely the triazines diclazuril and toltrazuril. In the study carried out with diclazuril, two doses of the drug were evaluated (1 and 2 mg/kg of live weight) and, with each dose, single or double treatments were carried out, separated by two weeks. From the data obtained in this work, it can be concluded that diclazuril treatment is highly effective against coccidiosis in kids. However, the optimal control strategy should be adapted to the management conditions and the presence of clinical or subclinical coccidiosis in the flock. In the study conducted with the anticoccidial toltrazuril, two doses (20 mg/kg and 40 mg/kg) were also evaluated, but in this case the treatments were single, although at two different times (2 and 7 weeks of age). Based on the results obtained, it is concluded that metaphylactic treatments with 20 mg/kg body weight of toltrazuril at 2 weeks of age would be sufficient to control clinical symptoms of coccidiosis in kids; while if administered later, at 7 weeks of age, thus coinciding with the peak of oocyst excretion frequently observed in kids under field conditions, a double dose might be advisable. Both anticoccidials have been used in goat farms in Spain in the last decade, so it is not excluded that, in the near future, resistance phenomena may develop, as it has happened in sheep flocks in Norway. Consequently, it is necessary to implement alternative control strategies such as immunoprophylaxis. In this sense, the third article of the thesis evaluated the immunoprotective effect of attenuated oocysts of *E. ninakohlyakimovae* against coccidiosis in goat kids. The data of the study showed that immunization had practically no pathogenic effect, but sufficient immunogenicity in terms of immunoprotection. The protection was reflected not only in the reduction of oocysts excreted in faeces, but also in a reduction of the intensity of the clinical picture of the animals. The compendium of articles presented in this thesis is intended as a contribution to the control of coccidiosis in goats.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Agyei A.D., Odonkor M., Osei-Somuah A. (2004). Concurrence of *Eimeria* and helminth parasitic infections in West African Dwarf kids in Ghana. *Small Rum. Res.* 51: 29-35.
- 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.
- Alzieu J.P., Mage C., Maes L., De Mûelenaere C. (1999). Economic benefits of prophylaxis with diclazuril against subclinical coccidiosis in lambs reared indoors. *Vet. Rec.* 144: 442-444.
- Argüello H.M.R., Cordero del Campillo M. (1999). Parasitosis del aparato digestivo. *Parasitología Veterinaria*, Cordero del Campillo M., Rojo Vázquez F.A. (eds.). McGraw Hill Interamericana, Madrid (España).
- Aumont G., Yvoré P., Esnault A. (1984). Experimental coccidiosis in goats. Experimental model. Effects of parasitism on the feeding behaviour and the growth of animals; intestinal lesions. *Ann. Vet. Res.* 15: 467-473.
- Awasthi, S., Bagherwal, R.K., Mehta, H.K., Jayraw, A.K., Singh, R. (2022). Comparative efficacy of amprolium, toltrazuril and neem leaf powder against caprine coccidiosis. *Indian J. Vet. Sci. Biotechnol.* 18: 110-112.
- Balicka-Ramisz A. (1999). Studies on coccidiosis in goats in Poland. *Vet. Parasitol.* 81: 347-349.
- Balicka-Ramisz A., Ramisz A., Vovk S., Snitynskyj V. (2012). Prevalence of coccidia infection in goats in Western Pomerania (Poland) and West Ukraine region. *Ann. Parasitol.* 58: 167-71.
- Ball S.J., Pittilo M.R., Snow K.R., (2014). Observations on oocyst development of *Eimeria stiedai* in rabbits. *Acta Parasitol.* 59: 544-547.
- Bangoura B., Daughchies 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.
- Bedrnik P. (1989). The role of different *Eimeria* spp. in a prospective coccidiosis vaccine. In: Yvore. P. (ed). *Coccidian and intestinal cocidiomorphs*. Inra, France: tours, pp. 667-670.
- Beltrán D.M., Maffini L., Mendes L., Monteiro L. F., Costa L.V., López L., Vektorato L.F., Barufí F., de Oliveira H., Marín R., Bazaglia R., de Castro D., Sakamoto C.A., Edésio V., da Costa A.J., Zanetti W.D. (2024). Toltrazuril + fenbendazole for cattle: Pharmacokinetics and efficacy against *Eimeria* spp. and gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol. Regional Studies and Reports.* 47:100968
- Berriatua E., Green L.E., Morgan K.L. (1993). A descriptive epidemiological study of coccidiosis in early lambinghoused flocks. *Vet. Parasitol.* 54: 337-351.
- Bohrmann R. (1991). Treatment with toltrazuril in a natural outbreak of coccidiosis in calves. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 98: 343-345.
- Bürger H.J. (1983). *Eimeria*-Infektionen beim Rind. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 96: 350-357.
- Burke J.M., Miller J.E., Terrill T.H., Orlik S.T., Acharya J.J., Mosjidis J.A. (2013). *Sericea lespedeza* as an aid in the control of *Eimeria* ssp. in lambs. *Vet. Parasitol.* 193: 39-46.
- Carvalho F.S., Wenceslau A.A., Teixeira M., Albuquerque G.R. (2011). Molecular diagnosis of *Eimeria* spp. affecting naturally infected *Gallus gallus*. *Genet. Mol. Res.* 31: 996-1005.

- Catchpole J., Nolan A., Gregory M.W., Arthur M.J. (1986). Observations on the effects of monensin on the production of antibodies to coccidia in lambs. *Vet. Rec.* 118: 75-76.
- Cavalcante A.C., Teixeira M., Monteiro J.P., Lopes C.W. (2012). *Eimeria* spp. in dairy goats in Brazil. *Vet. Parasitol.* 183: 356-358.
- Chapman H.D. (1974). The effects of natural and artificially acquired infections of coccidia in lambs. *Res. Vet. Sci.* 16: 1-6.
- Chartier C., Paraud C. (2012). Coccidiosis due to *Eimeria* in sheep and goats, a review. *Small Rum. Res.* 103: 84-92.
- Chartier C., Pellet M.P., Pors I. (1992). Effects of toltrazuril on oocyst discharge and growth in kids with naturally-acquired coccidial infections. *Small. Rumin. Res.* 8: 171-177.
- Chartier C., Yvoré P., Pors I., Mancassola R. (1994). Absence of protection against *Eimeria ninakohlyakimovae* after primo-infection with *E. ovinoidalis* in new-born kids. *Vet. Res.* 25: 66-70.
- Collins J.E., Dubey J.P., Rossow K.D. (1988). Hepatic coccidiosis in a calf. *Vet. Pathol.* 25: 98-100.
- Conlogue G., Foreyt W.J., Wescott. R.B. (1984). Bovine coccidiosis: protective effects of low-level infection and coccidiostat treatments in calves. *Am. J. Vet. Res.* 45: 863-866.
- Constable, P.D., Hinchcliff, K., Done, S.H., Grünberg, W., (2012). *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats, and horses.* 11th ed, 401-408. Elsevier Ltd., St. Louis, Missouri.
- Cordero del Campillo M., Rojo Vázquez F.A. (2000). *Parasitología Veterinaria McGraw-Hill Interamericana de España.* S.A.U. (España), pp. 319-362.
- Craig T.M. (1986). Epidemiology and control of coccidia in goats. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2: 389-395.
- Dai Y.B., Lin M.C., Zhang S.X., Fu A.Q. (1991.) Hepatic coccidiosis in the goat. *Int. J. Parasitol.* 21: 381-382.
- 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: 60-149.
- Das, G., Atasoglu, C., Akbag, H.I., Tölü, C., Yurtman, I.Y., Savas, T., (2012). Effects of kefir on coccidial oocysts excretion and performance of dairy goat kids following weaning. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 1049-1055.
- Dauguschies A., Agneessens J., Goossens L., Mengel H., Veys P. (2007). The effect of a metaphylactic treatment with diclazuril (Vecoxan®) on the oocysts excretion and growth performance of calves exposed to a natural *Eimeria* infection. *Vet. Parasitol.* 149: 199-206.
- Dauguschies A., Böse R., Marx J., Teich K., Friedhoff K.T. (2002). Development and application of a standardized assay for chemical disinfection of coccidia oocysts. *Vet. Parasitol.* 103: 299-308.
- Dauguschies A., Najdrowski M. (2005). Eimeriosis in cattle: current understanding. *J. Vet. Med. B. Inf. Ect. Dis. Vet. Public. Health* 52: 417-27.
- Dauguschies, A., Bangoura, B., Lendner, M., (2013). Inactivation of exogenous endoparasite stages by chemical disinfectants: current state and perspectives. *Parasitol. Res.* 112, 917-932.
- de Andrade A.L.F. Jr., Silva P.C., Aguiar E.M., Araujo F.G. (2012). Use of coccidiostat in mineral salt and study on ovine eimeriosis. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21: 16-21.
- de la Fuente C., Alunda J.M. (1992). A quantitative study of *Eimeria* infections of goats from central Spain. *Vet. Parasitol.* 41: 7-15.

- de Venevelles, P., Chich, J.F., Faigle, W., Lombard, B., Loew, D., Péry, P., Labbé, M., (2006). Study of proteins associated with the *Eimeria tenella* refractile body by a proteomic approach. *Int. J. Parasitol.* 36: 1399-1407.
- del Cacho, E., Pagés, M., Gallego, M., Barbero, J.L., Monteagudo, L., Sánchez-Acedo, C., (2010). Meiotic chromosome pairing and bouquet formation during *Eimeria tenella* sporulation. *Int. J. Parasitol.* 40: 453-462.
- Diaferia M., Veronesi F., Morganti G., Nisoli L., Fioretti D.P. (2013). Efficacy of Toltrazuril 5% suspension (Baycox<sup>®</sup>, Bayer) and Diclazuril (Vecoxan<sup>®</sup>, Janssen-Cilag) in the control of *Eimeria* spp. In lambs. *Parasitol. Res.* 112: 163-168.
- Diao N.C., Zhao B., Chen Y., Wang Q., Chen Z.Y., Yang Y., Sun Y.H., Shi J.F., Li J.M., Shi K., Gong Q.L., Du R. (2022). Prevalence of *Eimeria* spp. Among Goats in China: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Cell Infect. Microbiol.* 12: 806085.
- Dilek A., Hande S.Y., Selim S., Murat B., Veli Y.C., Erol A., Cengiz G. (2015). Comparative pharmacokinetics and bioavailability of albendazole sulfoxide in sheep and goats, and dose-dependent plasma disposition in goats. *Bmc. Vet. Res.* 11: 124.
- Ding X., Lillehoj H.S., Dalloul R.A., Min W., Sato T., Yasuda A., Lillehoj E.P. (2005). In ovo vaccination with the *Eimeria tenella* etmic2 gene induces protective immunity against coccidiosis. *Vaccine.* 23: 3733-3740.
- Drugueri, L.Y. (2002). Coccidiosis en bovinos, *Tecnocampo* 2: 34.
- Eckert J., Braun R., Shirley M.W., Coudert P. (1995). Cost 89/820 Biotechnology. Guidelines on techniques in coccidiosis research. Official for official publications of the european communities. Luxembourg (Belgium), pp. 113-116.
- Epe C., Von Samson-Himmelstjerna G., Wirthenle N., Von der Heyden V., Welz C., Beening J., Radeloff I., Hellman K., Schnieder T., Knieger K. (2005). Efficacy of Toltrazuril as a metaphylactic and therapeutic treatment of coccidiosis in first year grazing calves. *Parasitol. Res.* 97: 127-133.
- Eysker M., Ploeger H.W. (2000). Value of present diagnostic methods for gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Parasitology.* 120: 109-S119.
- Faber J.E., Kollmann D., Heise A., Bauer C., Failing K., Bürger H.J., Zahner H. (2002). *Eimeria* infections in cows in the periparturient phase and their calves: oocyst excretion and levels of specific serum and colostrum antibodies. *Vet. Parasitol.* 104: 1-17.
- Faizal A.C., Rajapakse R.P. (2001). Prevalence of coccidia and gastrointestinal nematode infections in cross bred goats in the dry areas of Sri Lanka. *Small Rum. Res.* 40: 233-238.
- Fayer R., (1989). Epidemiology and control of bovine coccidiosis. En: *Coccidia and Coccidiomorphs. Vth Intern. Coccidiosis Conf.* p. 445-456.
- Fayer R., Reid, W.M. (1982). Control of coccidiosis. In Long, P.L. (Ed.) *The biology of the coccidia.* University Park Press. 453-487.
- Fetterer R.H., Jenkins M.C., Miska K.B., Cain G.D. (2010). Metam sodium reduces viability and infectivity of *Eimeria* oocysts. *J. Parasitol.* 96, 632-637.
- Fiege N., Klatter D., Kollmann D., Zahner H., Bürger H.J. (1992). *Eimeria bovis* in cattle: colostrum transfer of antibodies and immune response to experimental infections. *Parasitol. Res.* 78: 32-38.
- Foreyt W.J. (1986). Epidemiology and control of coccidia in sheep. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2: 383-388.
- Fox J.E. (1985). Coccidiosis in cattle. *Mod Vet. Pract.* 66: 113-116.

- Galarini, R., Fioroni, L., Angelucci, F., Tovo, G.R., Cristofani, E., (2009). Simultaneous determination of eleven quinolones in animal feed by liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. A* 1216, 8158-8164
- García M.I., Navarro J.L., González J., López S., Rojas C.A., Chaparro J.J. (2023). Occurrence of *Eimeria* spp. in Wayúu goat herds in the Municipality of Maicao, La Guajira, Colombia. *Vet. Parasitol. Reg. Stud Reports*. 44: 100914.
- Gerhold R.W., McDougald L.R., Beckstead R.B. (2011). Construction of PCR primers to detect and distinguish *Eimeria* spp. in northern bobwhites and a survey of *Eimeria* on gamebird farms in the United States. *J. Parasitol.* 97: 892-895.
- Gjerde B., Enemark J.M.D., Apeland M.J., Dahl J. (2010). Reduced efficacy of diclazuril and toltrazuril against *Eimeria* spp. of sheep on a farm in Rogaland County, Norway. *Nor. Veterinærtidsskrift* 301–304.
- Gouet P., Yvone P., Naciri M., Contrepolis M. (1984). Influence of digestive microflora on parasite development and the pathogenic effect of *Eimeria ovinoidalis* in the axenic, gnotoxenic and conventional lamb. *Res. Vet. Sci*, 36: 21-23.
- Graat E.A., Henken A.M., Ploeger H.W., Noordhuizen J.P., Vertommen M.H. (1994). Rate and course of sporulation of oocysts of *Eimeria Acervulina* under different environmental conditions. *Parasitology* 108: 497-502.
- Gräfner G., Graubmann H.D., Daetz H., Müller H., Meinke N. (1985a): Zur Epizootologie der *Eimeria-alabamensis*-Kokzidiose bei Jungrindern. *Mh. Vet-Med.* 40: 44–47.
- Gräfner G., Graubmann H.D., Schwartz K., Hiepe T.H., Kron A. (1985b). Weitere Untersuchungen zu Vorkommen, Epizootologie und Bekämpfung der *Eimeria-Kokzidiose* des Rindes unter den Bedingungen der intensiven Stallhaltung. *Mh. Vet.Med.*40: 41–44.
- Gregory M.W., Catchpole J. (1989). Ovine coccidiosis: heavy infection in young lambs increases resistance without causing disease. *Vet Rec.* 124: 458-461.
- Gregory M.W., Catchpole J. (1990). Ovine coccidiosis: the pathology of *Eimeria crandallis* infection *Int. J. Parasitol.* 20: 849-60.
- Gregory M.W., Catchpole J., Joyner L.P., Parker B.N. (1983). Observations on the epidemiology of coccidial infections in sheep under varying conditions of intensive husbandry including chemoprophylaxis with monensin. *Parasitology.* 87: 421-427.
- Gregory M.W., Catchpole J., Norton C.C. (1989). Observations on the endogenous stages of *Eimeria crandallis* in domestic lambs (*Ovis aries*). *Int. J. Parasitol.* 19: 907-914.
- Guimarães Jr., José S., Gomel B., Alexey L., Da Cunha T.C.B., Garcia J.L. (2007). In vitro evaluation of the disinfection efficacy on *Eimeria tenella* unsporulated oocysts isolated from broilers. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, vol. 16: 67-71.
- Haberkorn A., Stoltefuss J. (1987). Studies on the activity spectrum of toltrazuril, a new anti-coccidial agent. *Vet. Med. Rev.* 1, 22-32.
- Hammond D.M., Chobotar B., Ernst J.V. (1968). Cytological observations on sporozoites of *Eimeria bovis* and *Eimeria auburnensis*, and an *Eimeria* ssp. from the Ord kangaroo rat. *J. Parasitol.* 54: 550-558.
- Hammond D.M., Ernst J.V., Chobotar B., (1970). Composition and function of the substiedal body in the sporocysts of *Eimeria utahensis*. *J. Parasitol.* 56: 618-619.
- Harper C.K., Penzhorn B.L. (1999). Occurrence and diversity of coccidia in indigenous, Saanen and crossbred goats in South Africa. *Vet. Parasitol.* 82: 1-9.

- Hashemnia M., Khodakaram-Tafti A., Razavi S.M., Nazifi S. (2011). Changing patterns of acute phase proteins and inflammatory mediators in experimental caprine coccidiosis. *Korean J. Parasitol.* 49:213-219.
- Hashemnia M., Khodakaram-Tafti A., Razavi S.M., Nazifi S. (2014). Hematological and serum biochemical analyses in experimental caprine coccidiosis. *J. Parasit. Dis.* 38: 116-123.
- Helle O. (1970). Winter resistant oocysts in the pasture as a source of coccidial infection in lambs. *Acta Vet. Scand.* 11: 545-564.
- Hiepe T., Romeyke D., Jungmann R. (1978). Studies of coccidia infections in calves under intensive rearing conditions and recommendations for their control. *Mh. Vet. Med.* 33: 904-910.
- Holst H., Svensson C. (1994.) Changes in the blood composition of calves during experimental and natural infections with *Eimeria alabamensis*. *Res. Vet. Sci.* 57: 377-383.
- Horton-Smith C., Long P.L. (1954). Preliminary observations on the physical conditions of built up of litter and possible effect on the parasite populations. In: *Proc. 10th World's Poultry Congress*. Edinburgh (UK), pp. 266-272.
- Iqbal A., Tariq K.A., Wazir V.S., Singh R. (2013a). Antiparasitic efficacy of *Artemisia absinthium*, toltrazuril and amprolium against intestinal coccidiosis in goats. *J. Parasit. Dis. Off. Organ Indian Soc. Parasitol.* 37: 88-93.
- Iqbal A., Tariq K.A., Wazir V.S., Singh R., (2013). Antiparasitic efficacy of *Artemisia absinthium*, toltrazuril and amprolium against intestinal coccidiosis in goats. *J. Parasit. Dis.* 37: 88-93.
- Iqbal A., Wazir V.S., Singh R. (2013b). Comparative studies on the efficacy of toltrazuril and amprolium in the treatment of caprine coccidiosis. *Intas. Polivet.* 14: 102-104.
- Jalila A., Dorny P., Sani R., Salim N.B., Vercruyse J., (1998). Coccidial infections of goats in Selangor, peninsular Malaysia. *Vet. Parasitol.* 74: 165-172.
- Jeffers T.K. (1975). Attenuation of *Eimeria tenella* through selection for precociousness. *J. Parasitol.* 61: 1083-1090.
- Jenkins M.C., Parker C., O'brien C., Persyn J., Barlow D., Miska K., Fetterer R. (2013). Protecting chickens against coccidiosis in floor pens by administering *Eimeria* oocysts using gel beads or spray vaccination. *Avian Dis.* 57: 622-626.
- Joachim A. (2002). Coccidiosis also exists in calves. *DLZ Agrarmagazin* 8: 92 - 94.
- Jolley W.R., Bardsley K.D. (2006). Ruminant coccidiosis. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 22: 613-621.
- Kanyari P.W. (1988). Experimental infections with coccidiosis and serum antibody quantitation in two breeds of goats. *Vet. Parasitol.* 28: 11-8.
- Kawahara F., Zhang G., Mingala C.N., Tamura Y., Koiwa M., Onuma M., Nunoya T. (2010). Genetic analysis and development of species-specific PCR assays based on ITS-1 region of rRNA in bovine *Eimeria* parasites. *Vet. Parasitol.* 24: 49-57.
- Kawas J.R., Andrade-Montemayor H., Lu C.D., 2010. Strategic nutrient supplementation of free-ranging goats. *Small Rum. Res.* 89: 234-243.
- Keeton S.T.N., Navarre C.B., (2018). Coccidiosis in large and small ruminants. *Vet. Clin. Food Anim.* 34: 201-208.
- Kheirandish R., Nourollahi-Fard S.R., Yadegari Z., (2014). Prevalence and pathology of coccidiosis in goats in southeastern Iran. *J. Parasit. Dis.* 38: 27-31.
- Khodakaram-Tafti A., Hashemnia M., (2017). An overview of intestinal coccidiosis in sheep and goats. *Revue Méd. Vét.* 167: 9-20.



- Kimbita E.N., Silayo R.S., Mwegu E.D., Mtau A.I., Mroso J.B. (2009). Studies on the *Eimeria* of goats at Magadu Dairy Farm SUA, Morogoro, Tanzania. *Trop. Anim. Health Prod.* 41: 1263-1265.
- Knox M., Del Acero J. (1996). Nutritional enhancement of parasite control in small ruminant production systems in developing countries of South-East Asia and the Pacific. *Int. J. Parasitol.* 26: 963-970.
- Kommuru D.S., Barker T., Desai S., Burke J.M., Ramsay A., Mueller-Harvey K., Miller J.E., Mosjidis J.A., Kamisetti N., Terrill T.H., (2014). Use of pelleted *sericea lespedeza* (*Lespedeza cuneata*) for natural control of coccidia and gastrointestinal nematodes in weaned goats. *Vet. Parasitol.* 204: 191-198.
- Kusiluka L., Kambarage D. (1996). Disease of small ruminants a handbook. 1st ed. Veterinary Aid. Scotland (UK) pp. 87-89.
- Lefevre P., Blancou J. (2010). Infectious and parasitic diseases of livestock. 1st ed. Lavoisier. France. 2: 1753-1768.
- Levine N.D. (1985). Veterinary Protozoology. Iowa State University Press. Ames, IA (USA).
- Levine N.D. (1988). The protozoan phylum *Apicomplexa*. Chemical Rubber Company Press, Boca Raton. Florida (USA) 1: 203.
- Liang G., Yang X., Liu D., Li Y., Wang J., Chen X., Zhao G., Song J. (2022). Molecular Characterization of 18S rDNA, ITS-1, ITS-2, and COI from *Eimeria christensenii* and *E. arloingi* in Goats from Shaanxi Province, Northwestern China. *Animals.* 24: 1340.
- Lima J. (1981). Life cycle of *Eimeria christensenii* Levine, Ivens & Fritz, 1962 from the domestic goat, *Capra hircus* L. *J. Protozool.* 28: 59-64.
- Ma D., Ma C., Pan L., Li G., 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.
- Madibela O.R., Kelemogile K.M., (2008). Exposure of *Melia azedarach* fruits to *Eimeria* lowers oocyst output in yearling Tswana goats. *Small Rum. Res.* 76: 207-210.
- Mahmoud O.M., Haroun E.M., Sulman A. (1994). Hepato-biliary coccidiosis in a dairy goat. *Vet. Parasitol.* 53: 15-21.
- Maphosa V., Masika P.J., (2012). In vivo validation of *Aloe ferox* (Mill). *Elephantorrhiza elephantina* Bruch. Skeels. and *Leonotis leonurus* (L) R. BR as potential anthelmintics and antiprotozoals against mixed infections of gastrointestinal nematodes in goats. *Parasitol. Res.* 110: 103-108.
- Marshall A.J., Williams W.D. (1985). Textbook of Zoology. Tratado de Zoología. Invertebrados. Edt. Reverte.
- Matos L., Muñoz M.C., Molina J.M., Ferrer O., Rodríguez F., Pérez D., López A.M., Martín S., Hermosilla C., Taubert A., Ruiz A. (2017b). Humoral immune responses of experimentally *Eimeria ninakohlyakimovae*-infected goat kids. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 51: 60-65.
- Matos L., Muñoz M.C., Molina J.M., Rodríguez F., Pérez D., López A., Ferrer O., Hermosilla C., Taubert A., Ruiz A. (2017a). Protective immune responses during prepatency in goat kids experimentally infected with *Eimeria ninakohlyakimovae* *Vet. Parasitol.* 242: 1-9.
- Matos L., Muñoz M.C., Molina J.M., Rodríguez F., Pérez D., López A.M., Hermosilla C., Taubert A., Ruiz A. (2018). Age-related immune response to experimental infection with *Eimeria ninakohlyakimovae* in goat kids. *Res. vet. Sci.* 118: 155-163.
- Mcdonald V., Shirley M.W. (2009). Past and future: Vaccination against *Eimeria*. *Parasitol.* 136: 1477-1489.

- Mcdougald L.R. (1981). Anticoccidial drug resistance in the southeastern united states: polyether, ionophorous drugs. *Avian Dis.* 25: 600-609.
- McKenna P.B. (1988). The efficacy of toltrazuril against naturally-acquired coccidial infections in goats. *Vet. Med. Rev.* 59: 157-161.
- Mehlhorn H. (2004). *Encyclopedic reference of parasitology*. 2th ed. Springer-Verlag Heidelberg. Düsseldorf (Germany).
- Mehlhorn H., Ortmann-Falkenstein G., Haberkorn A., (1984). The effects of sym. triazinones on developmental stages of *Eimeria tenella*, *Eimeria maxima* and *Eimeria acervulina*: a light and electron microscopical study. *Z. Parasitenkd.* 70: 173-182.
- Mohammed R.A., Idris O.A., el Sanousi S.M., Abdelsalam E.B. (2000). The effect of coccidian infection on the gut microflora of Nubian goat kids. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 107: 414-416.
- Molloy J.B., Eaves F.W., Jeston P.J., Minchin C.M., Stewart N.P., Lew A.E., Jorgensen W.K. (1998). Detection of *Eimeria acervulina* using the polymerase chain reaction. *Avian Dis.* 42: 119-123.
- Morgan K.J., Alley M.R., Pomroy W.E., Gartrell B.D., Castro I., Howe L. (2013). Extraintestinal coccidiosis in the kiwi (*Apteryx spp.*). *Avian. Pathol.* 42: 137-146.
- Mundt H.C., Bangoura B., Rinke M., Rosenbruch M., Dausgchies A. (2005). Pathology and treatment of *Eimeria zuernii* coccidiosis in calves: investigations in an infection model. *Parasitol. Int.* 54: 223-230.
- Mundt H.C., Dausgchies A., Uebe F., Rinke M. (2003). Efficacy of Toltrazuril against Artificial Infections with *Eimeria Bovis* in calves. *Parasitol. Res.* 90: 166-S167.
- Nachman K.E., Baron P.A., Raber G., Francesconi K.A., Navas-Acien A., Love D.C., (2013). Roxarsone, inorganic arsenic, and other arsenic species in chicken: a U.S.-based market basket sample. *Environ. Health Perspect* 121: 818-824.
- Nunes D.M., Cruz J.F., Teixeira Neto M.R., (2015). Uso preventivo do toltrazuril para controle da coccidiose em cabritos de corte criados em região semiárida. *Rev. Bras. Saúde E Produção Anim.* 16: 179-189.
- O'Grady M.R., Slocombe J.O. (1980). An investigation of variables in a fecal flotation technique *Can. J. Comp. Med.* 44: 148-157.
- Odden A., Denwood M.J., Stuen S., Robertson L.J., Ruiz A., Hamnes I.S., Hektoen L., Enemark H.L., (2018). Field evaluation of anticoccidial efficacy: A novel approach demonstrates reduced efficacy of toltrazuril against ovine *Eimeria* spp. in Norway. *I.J.P.: Drugs and Drug Resistance* 8: 304-311.
- Parker R.J., Jones G.W. (1990). Destruction of bovine coccidial oocysts in simulated cattle yards by dry tropical winter weather. *Vet. Parasitol.* 35: 269-272.
- Parker R.J., Jones G.W., Ellis K.J., Heater K.M., Schroter K.L., Tyler R., Holroyd R.G. (1986). Post-weaning coccidiosis in beef calves in the dry tropics: experimental control with continuous monensin supplementation via intra-ruminal devices and concurrent epidemiological observations. *Trop. Anim. Health Prod.* 18: 198-208.
- Patison M., McMullin P., Bradbury M., Alexander D. (2007). *Poultry disease*. 6th ed. Butterworth. India, pp.444-456.
- Penzhorn B.L., Rognlie M.C., Hall L.L., Knapp S.E. (1994). Enteric coccidia of Cashmere goats in southwestern of Montana. *Veterinary Parasitology.* 55: 1 and 2: 137-142.

- Pérez D., Muñoz M.C., Molina J.M., Muñoz-Caro T., Silva L.M.R., Taubert A., Herмосilla C., Ruiz A. (2016). *Eimeria ninakohlyakimovae* induces NADPH oxidase-dependent monocyte extracellular trap formation and upregulates IL-12 and TNF- $\alpha$ , IL-6 and CCL2 gene transcription. *Vet. Parasitol.* 227: 143-150.
- Piekarski G., Pelster B., Witte H.M. (1971). Endopolygenie bei *Toxoplasma gondii*. *Z. Parasitenk.* 36: 122-30.
- Platzer B., Prosl H., Cieslicki M., Joachim A. (2005). Epidemiology of *Eimeria* infections in an austrian milking sheep flock and control with diclazuril. *Vet. Parasitol.* 129: 1-129.
- Quilez J., Sanchez Acedo C., Avendaño C., del Cacho E., Lopez Bernard F. (2005). Efficacy of two Peroxygen based disinfectants for inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocyst. *Appl. Environ. Microb.* 71: 2479-2483.
- Raj G.D., Aarthi S., Selvabharathi R., Raman M., Blake D.P., Tomley F.M. (2013). Real-time PCR-based quantification of *Eimeria* genomes: a method to outweigh underestimation of genome numbers due to PCR inhibition. *Avian Pathol.* 42: 304-308.
- Ruiz A., Muñoz M.C., Molina J.M., Herмосilla C., Andrada M., Lara P., Bordón E., Pérez D., López A.M. (2014). Immunization with *Eimeria ninakohlyakimovae*-live attenuated oocysts protect goat kids from clinical coccidiosis. *Vet. Parasitol.* 199: 8-17.
- Ruiz A., Behrendt J.H., Zahner H., Herмосilla C., Pérez D., Matos L., Muñoz M.C., Molina J.M., Taubert A. (2010). Development of *Eimeria Ninakohlyakimovae* in vitro in primary and permanent cell lines. *Vet. Parasitol.* 173: 2-10.
- 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 Infect. Dis. Vet. Public. Health* 53: 399-402.
- Ruiz A., Guedes A.C., Muñoz M.C., Molina J.M., Herмосilla C., Martín S., Hernández Y.I., Hernández A., Pérez D., Matos L., López A.M., Taubert A. (2012). Control strategies using diclazuril against coccidiosis in goat kids. *Parasitol. Res.* 110: 2131-2136.
- Ruiz A., Matos L., Muñoz M.C., Herмосilla C., Molina J.M., Andrada M., Rodríguez F., Pérez D., López A., Guedes A., Taubert A. (2013a). Isolation of an *Eimeria ninakohlyakimovae* field strain (Canary Islands) and analysis of its infection characteristics in goat kids. *Res. Vet. Sci.* 94: 277-284.
- Ruiz A., Muñoz M.C., Molina J.M., Herмосilla C., Andrada M., Lara P., Bordón E., Pérez D., López A.M., Matos L., Guedes A.C., Falcón S., Falcón Y., Martín S., Taubert A. (2013b). Immunization with *Eimeria ninakohlyakimovae* -live attenuated oocysts protect goat kids from clinical coccidiosis. *Vet. Parasitol.* 199: 8-17.
- Samaha H.A., Haggag Y.N., Nassain M.A., Habib H.M. (2013). Assessment efficiency of some chemical disinfectants commonly used against coccidia in poultry farms. *Alexandria J. Vet. Sci.* 39: 82-90.
- Sánchez R.O., Romero J.R., Founroge R.D. (2008). Dynamics of *Eimeria* oocyst excretion in dairy calves in the Province of Buenos Aires (Argentina), during their first 2 months of age. *Vet. Parasitol.* 151: 133-138.
- Sanz J. (2000). Las Coccidiosis en pequeños rumiantes. *NANTA*, SA. España.
- Sayin F., Dincer S., Milli U. (1980). The life cycle and pathogenicity of *Eimeria arloingi* (Marotel, 1905) Martin, 1909, in Angora kids and an attempt at its transmission to lambs. *Zbl. Vet. Med. B* 27: 382-397.
- Schafer K.A., Stevenson G.W., Kazacos K.R. (1995). Hepatic coccidiosis associated with hepatic necrosis in a goat. *Vet. Pathol.* 32: 723-727.

- Shirley M.W., Millar B.J. (1986). Studies on the immunogenicity of seven attenuated lines of *Eimeria* given as a mixture to chickens. *Avian Pathol.* 15: 629-638.
- Silva L.M.R., Vila-Vicosa M.J.M., Maurelli M.P., Morgoglione M.E., Cortes H.C.E., Cringoli G., Rinaldi L. (2013). Mini-FLOTAC for the diagnosis of *Eimeria* infection in goats: An alternative to Mc master. *Small Rumin. Res.* 114: 280-283.
- Silva L.M.R., Vila-Vicosa M.J.M., Nunes T., Taubert A., Hermosilla C., Cortes H.C.E. (2014). *Eimeria* infections in goats in southern Portugal. *Vet. Parasitol.* 2: 280-286.
- Silva, L.M.R., Vila-Viçosa, M.J.M., Cortes, H.C.E., Taubert, A., Hermosilla, C., (2015). Suitable in vitro *Eimeria arloingi* macromeront formation in host endothelial cells and modulation of adhesion molecule, cytokine and chemokine gene transcription. *Parasitol. Res.* 114: 113-124.
- Šlosárková S., Chroust K., Skrivanek M. (1998). Effects of toltrazuril and monensin in kids naturally infected with coccidiosis. *Vet. Med.-UZPI (Czech Repub).* 43.
- Smith M.C., Sherman D.M. (1994). *Goat medicine.* Lea and Febiger, Philadelphia, PA.
- Smith M.C., Sherman D.M. (2009). *Goat Medicine.* 2<sup>nd</sup> ed. Wiley-Blackwell.
- Soe A.K., Pomroy W.E. (1992). New species of *Eimeria* (*Apicomplexa: Eimeriidae*) from the domesticated goat *Capra hircus* in New Zealand. *Syst. Parasitol.* 23: 195-202.
- Soulsby E.J.L. (1982). *Helminth, Arthropod and protozoan of domesticated animals.* 7<sup>a</sup> ed. William claus. London (UK), pp.599–606.
- Soulsby E.J.L. (1987). *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos.* Séptima ed. Interamericana; México D.F. p 823.
- Stephan B., Rommel M., Dauschies A., Haberkorn A. (1997). Studies of resistance to anticoccidials in *Eimeria* field isolates and pure *Eimeria* strains. *Vet. Parasitol.* 69: 19-29.
- Stockdale P.H. (1980). A brief review of bovine coccidiosis in Western Canada. *Can. Vet. J.* 8: 227-230.
- Striepen B., Jordan C.N., Reiff S., Van Dooren G.G. (2007). Building the perfect parasite: cell division in *Apicomplexa*. *Plo. Pathog.* 3: 78.
- Tadayon S., Razavi S.M., Nazifi S. (2016). Dynamic patterns innate immunity and inflammatory associated factors in experimental caprine coccidiosis. *Parasitol. J. coreano* 54: 719-724.
- Taylor M.A. (2009). Changing patterns of parasitism in sheep. *In Practice* 31: 474-483.
- Taylor M.A., Catchpole J. (1994). Review article: coccidiosis of domestic ruminants. *Appl parasitol.*
- Taylor M.A., Catchpole J., Marshall J., Marshall R.N., Hoeben D. (2003). Histopathological observations on the activity of diclazuril (Vecoxan®) against the endogenous stages of *Eimeria crandallis* in sheep. *Vet. Parasitol.* 116: 305-314.
- Taylor M.A., Coop R.L., Wall R. (2007). *Veterinary Parasitology*, 3rd ed., Blackwell, Oxford (UK). 35: 73-86.
- Taylor M.A., Marshall R.N., Marshall J.A., Catchpole J., Bartram D. (2011). Dose-response effects of diclazuril against pathogenic species of ovine coccidia and the development of protective immunity. *Vet Parasitol.* 178: 48-57.
- Taylor R.L., Coop R.L., Wall R.L. (2015) *Veterinary Parasitology* 4<sup>o</sup> ed. Wiley-Blackwell. pp.1032.
- Thienpont D., Rochette F., Van Parijs O.F.J. (1979). Diagnosis helminthiasis by coprological examination. Janssen Research Foundation. Beerse p 187.

- Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M., Jennings F.W. (1996). *Vet. Parasitol.* 2nd ed. Blackwell science. Scotland (UK).
- Velkers F.C., Blake D.P., Graat E.A., Vernooij J.C., Bouma A., de Jong M.C., Stegeman J.A. (2010). Quantification of *Eimeria acervulina* in faeces of broilers: comparison of McMaster oocyst counts from 24h faecal collections and single droppings to real-time PCR from cloacal swabs. *Vet. Parasitol.* 19: 1-7.
- Verheyen, A., Maes, L., Coussement, W., Vanparijs, O., Lauwers, F., Vlamincx, E., Borgers, M., Marsboom, R., (1988). In vivo action of the anticoccidial diclazuril (Clinacox) on the developmental stages of *Eimeria tenella*: an ultrastructural evaluation. *J. Parasitol.* 74: 939-949.
- Veronesi F., Diaferia M., Viola O., Fioretti D.P. (2011). Long-term effect of toltrazuril on growth performances of dairy heifers and beef calves exposed to natural *Eimeria zuernii* and *Eimeria bovis* infections. *The Vet. J.* 190: 296-299.
- Veronesi F., Nisoli L., Diaferia M., Falcini R., Ficola E., Fioretti D.P. (2013). Influence of a metaphylactic treatment with Baycox<sup>®</sup> Bovis on the reproductive performances of fresian Heifers: a preliminary study. *Parasitol. Res.* 112: 2137-2142.
- Viera L., Lima J., Rosa J. (1997). Development of *Eimeria ninakohlyakimovae*. Yakimoff y Rastigaieff, 1930 Emend Levine, 1961 in experimentally infected goats (*Capra hircus*). *J. Parasitol.* 83: 1015-1018.
- Vihan V. S., Singh N. and Singh S. V. (1988). Prevalence of clinical coccidiosis in kids under semi-arid conditions. *Indian J. Anim. Sci.* 58: 1178–1180.
- Woji A.Y., Little D.A., Ikwuegbu O.A. (1994). Prevalence of coccidial infections in the west african Dwarf goat in the subhumid zone of Nigeria. *Trop. Anim. Health Prod.* 26: 1-6.
- Wright S.E., Coop R.L. (2007). Cryptosporidiosis and coccidiosis. In: *Diseases of sheep*, 4th ed. Blackwell Publishing, Oxford (UK).
- Yang Z., Peng H., Lu X., Liu Q., Huang R., Hu B., Kachanoski G., Zuidhof M.J., Le X.C. (2016). Arsenic metabolites, including N-acetyl-4-hydroxy-m-arsanilic acid, in chicken litter from a roxarsone-feeding study involving 1600 chickens. *Environ. Sci. Technol.* 50: 6737-6743.
- Yanyang Y., Li'nan Y., Qingyu Z., Lei X., Ming Y., Xun S., Zhihui H. (2024). Ponazuril: Clinical efficacy, ultrastructure, and histopathology studies of in vivo anticoccidial action against *Eimeria tenella*. *Vet. Parasitol.* 326: 110098
- You M. J. (2014). Detection of four important *Eimeria spp.* by multiplex PCR in a single assay. *Parasitol. Int.* 63: 527-532.
- Young G., Alley M.L., Foster D.M., Smith G.W. (2011). Efficacy of amprolium for the treatment of pathogenic *Eimeria spp.* in Boer goat kids. *Vet. Parasitol.* 178: 346-349.
- Yvone P., Esnault A., Naciri M. (1985). La coccidiose caprine: effect de contaminations mono ou multispécifiques. *Recl. Med. Vet. EC Alfort* 161: 347-351.
- Yvone P., Raynaud J.P., Conan L., Naciri M., Virat M. (1980). Method of evaluating the efficiency of anticoccidial drugs in floor-pen trials with multiple in-feed infection versus "seeding" model. *Ann Rech Vet.* 11: 99-108.
- Zhao G.H., Lei L.H., Shang C.C., Gao M., Zhao Y.Q., Chen C.X., Chen D.K. (2012). High prevalence of *Eimeria* infection in dairy goats in Shaanxi province, northwestern China. *Trop Anim Health Prod Jun.* 44: 943-946.

- Zhao P., Wang C., Ding J., Zhao C., Xia Y., Hu Y., Zhang L., Zhou Y., Zhao J., Fang R. (2021). Evaluation of immunoprotective effects of recombinant protein and DNA vaccine based on *Eimeria tenella* surface antigen 16 and 22 in vivo. *Parasitol Res.* 120: 1861-1871.
- Zhou B., Wang H., Xue F., Wang X. Fei C., Wang M., Zhang T., Yao X., He P. (2010) Effects of diclazuril on apoptosis and mitochondrial transmembrana potential in second generation merozoites of *Eimeria tenella*. *Vet. Parasitol.* 168: 217-220.
- Zvinorova P.I., Halimani T.E., Muchadeyi F.C., Matika O., Riggio V., Dzama K., (2016). Prevalence and risk factor of gastrointestinal parasitic infections in goats in low-input low-output farming systems in Zimbabwe. *Small Rum. Res.* 143: 75-83.