

PREVALENCIA EUROPEA DE EIMERIA PRAECOX. RESULTADOS PRELIMINARES DE UN ESTUDIO LLEVADO A CABO EN GRANJAS COMERCIALES DE BROILERS EN BÉLGICA, ESPAÑA E ITALIA.

M. Dardi¹, M. Pagès Bosch², E. Martínez Benítez³, E. del Cacho⁴ y J. Rubio¹

¹ Unidad de Negocio Coccidia, Laboratorios Hipra S.A.

² I+D Biológicos Avicultura, Laboratorios Hipra, S.A.

³ Diagnos, Laboratorios Hipra, S.A.

⁴ Departamento de Patología Animal, Facultad de veterinaria, Universidad de Zaragoza

La coccidiosis aviar es una de las enfermedades más importantes que afectan al sector avícola a nivel mundial. Se trata de una enfermedad intestinal causada por parásitos protozoarios del género *Eimeria* (Apicomplexa) y que se caracteriza por una fase de replicación del parásito (esquizogonia) en la pared intestinal que causa la mayor parte del daño en el ave hospedadora. Se reconocen habitualmente siete especies de *Eimeria* que parasitan a las aves del género *Gallus gallus* (pollos, gallinas ponedoras y reproductoras) y que varían en su capacidad de producir diarrea, morbilidad y mortalidad (Williams 1998). Estas especies son: *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria mitis*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria praecox* y *Eimeria tenella*. Estas especies aparecen en cualquier parte del mundo donde se crían pollos. Las siete especies de *Eimeria* se han detectado en estudios sobre granjas comerciales en varios países: República Checa (Kucera, 1990), Francia (Williams y col. 1996), Suecia (Thebo y col. 1998), Reino Unido (Eckert y col. 1995), Argentina (Mcdougald y col. 1997; Mattiello y col. 2000) y Australia (Jorgensen y col. 1997, Morris y col. 2007).

Mientras que *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. máxima*, *E. necatrix* y *E. tenella* son especies bien estudiadas y reconocidas como patógenas a diferentes grados, *E. mitis* y especialmente, *E. praecox* son especies que se pasan por alto en el campo y que se han considerado virtualmente inocuas. La presencia de estas dos especies, a pesar de no causar lesiones macroscópicas a nivel intestinal, ha sido objeto de discusión en varios países. Los estudios que han utilizado otras técnicas de diagnóstico, más allá del uso del índice de lesiones, han demostrado la presencia común de *E. mitis* y *E. praecox* (la presencia de *E. praecox* se muestra en tabla 1)

Lo más probable es que estas dos especies, a menudo, no sean identificadas al no provocar lesiones macroscópicas patognomónicas (Chapman, 1982). A modo de ejemplo, Jeffers (1974) caracterizó las especies presentes en 1166 aislamientos de *Eimeria* recogidos en Estados Unidos de acuerdo con las lesiones producidas en la mucosa intestinal del pollo. *E. acervulina* estuvo presente en el 90,6% de los aislamientos, mientras que *E. praecox* no fue reportada.

Las diferentes especies tienden a desarrollarse en diferentes partes del intestino y podrían identificarse por la naturaleza y la localización de las lesiones que producen durante su multiplicación. (Long y col. 1976, Lon y col. 1982). Sin embargo, para realizar un diagnóstico definitivo es necesaria, además, la investigación laboratorial. Hace algunos años, uno de los métodos más comunes era el análisis por isoenzima (Chapman 1982, Kucera 1990).

Actualmente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la identificación morfométrica de las especies de *Eimeria* se utilizan conjuntamente como medio de diferenciación de las muestras de heces y yacijas obtenidas de muestras de campo (Haug y col. 2008).

Tabla 1. Datos de prevalencia de *E. praecox* en la literatura

País	Referencia	%
Reino Unido	Chapman 1982	74
Rep. Checa	Kucera 1990	31
Francia	Williams y col. 1996	45
Argentina	Mcdougald y col. 1997	51
	Mattiello y col. 2000	20
Australia	Morris y col. 2007	44
Noruega	Haug y col. 2008	10

E. mitis y *E. praecox*, a pesar de no estar asociadas con mortalidad en manadas de pollos ni causar lesiones patognomónicas, se han asociado directamente con problemas de enteritis y diarreas bajo infección experimental cuando se han usado aislamientos puros (Williams, 1998). Además, varios estudios han confirmado sus efectos adversos sobre resultados zootécnicos: incremento del índice de conversión y reducción en la ganancia de peso incluso en aves que clínicamente aparecen como normales. (Williams, 1998, Llong 1968, Gore y col. 1982, Shirley y col. 1983, Jorgensen y col. 1997). De hecho, Morris y col. (2007) recientemente afirmó que, dado el alto porcentaje de estas dos especies, debería reconsiderarse su importancia.

El presente estudio se llevó a cabo en 2003 y 2005 en Bélgica, en 2003, 2005 y 2007 en España y en la primera mitad de 2008 en Italia para determinar las especies más comunes en granjas comerciales de broilers en Europa y, especialmente, para evaluar la presencia de *E. praecox*. En cada país, se tomaron muestras de yacijas de diferentes granjas. En cada granja, se seleccionó una nave avícola y se tomaron al azar, 10 muestras de 10 puntos diferentes de dicha nave para formar un "pool" por granja. De hecho, la composición en especies de las poblaciones de coccidios se repite ampliamente entre diferentes instalaciones dentro de la misma granja (Jeffers 1974)

El número total de muestras analizadas fue de 35 en Bélgica, 61 en España y 59 en Italia. Cada granja usaba diferentes métodos profilácticos frente a la coccidiosis. De cara a simplificar el análisis de los datos diferenciaremos sólo entre granjas que emplearon aditivos anticoccidióticos ó vacunas (Paracox®5, Schering-Plough). Todas las muestras se analizaron

mediante evaluación morfométrica y PCR en el mismo laboratorio (Diagnos, Laboratorios Hipra S.A., Amer, España). Los "primers" utilizados para la técnica de PCR se diseñaron específicamente para la detección de ITS desde el r-DNA ya que esta región es la más duradera en cada una de las especies.

Debido al hecho de que *E. necatrix* se ha documentado como causante de enfermedad en animales de ciclo largo (Williams y col. 1996, Williams, 1998) y *E. brunetti* se considera poco frecuente en animales de ciclo corto -broilers- (Long y col. 1982, Williams y col. 1996, Graat y col. 1998) se decidió aplicar el PCR sólo para la búsqueda de las cinco especies de *Eimeria* que, normalmente, afectan a broilers: *Eimeria acervulina*, *Eimeria máxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria praecox* y *Eimeria tenella*. En un estudio reciente aportado por Haugh y col. (2008) *E. brunetti* no fue reportada.

Finalmente, todas las granjas estudiadas se eligieron al azar según la voluntad de veterinarios y granjeros que quisieron tomar parte en el estudio. Debido a los diferentes sistemas de muestreo, los diferentes métodos profilácticos frente a coccidiosis y la imposibilidad de recolectar las muestras siguiendo un criterio epidemiológico uniforme, el propósito de este estudio es ofrecer un primer paso para el conocimiento de la etiología y las dinámicas de población de infecciones mixtas en broilers en Europa con particular atención a la presencia de *E. praecox*.

BELGICA

En Bélgica se recogieron un total de de 35 muestras de diferentes áreas en dos diferentes periodos: 18 muestras en 2003 y 27 en 2005. Se analizó la prevalencia de todas las especies de *Eimeria* sólo en aquellas granjas que mostraron un nivel superior a 20.000 ooquistes/gr. (21 sobre 35). Todas las granjas investigadas estaban usando aditivos anticoccidiósicos. La tasa de prevalencia en granjas con recuentos superiores a 20.000 ooquistes/gr. fue, respectivamente: *E. acervulina* 95,2 %, *E. máxima* 47,6 %, *E. mitis* 38,1 %, *E. praecox* 90.5 %, *E. tenella* 81% (Tabla 2).

El análisis de varias combinaciones de especies encontradas en las granjas del estudio se muestra en la Tabla 3. En Bélgica, se encontraron solamente infecciones multiespecie (100%) y las combinaciones de 3 especies juntas fueron las más frecuentes (33,3%)

Tabla 2. Prevalencia de *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. tenella* en granjas que usan anticoccidiósicos (Recuento > 20.000 ooq./gr)

Granja	Año	Nº. ooquistes/gr	PCR				
			<i>E. acervulina</i>	<i>E. maxima</i>	<i>E. mitis</i>	<i>E. praecox</i>	<i>E. tenella</i>
1	2003	121.000	POS	POS	NEG	POS	POS
2	2003	92.701	POS	POS	NEG	POS	POS
3	2003	11.656	POS	NEG	POS	NEG	POS
4	2003	206.522	POS	NEG	NEG	POS	NEG
5	2003	306.000	POS	POS	POS	POS	POS
6	2003	30.000	POS	NEG	NEG	POS	NEG
7	2003	76.382	POS	NEG	NEG	POS	POS
8	2003	90.000	NEG	NEG	POS	POS	POS
9	2003	140.000	POS	POS	NEG	POS	POS
10	2003	87.000	POS	POS	POS	POS	POS
11	2003	65.000	POS	NEG	NEG	POS	POS
% 2003			90,9	45,5	36,4	90,9	81,8
12	2005	273.793	POS	POS	POS	POS	POS
13	2005	334.516	POS	POS	POS	POS	POS
14	2005	83.472	POS	POS	NEG	POS	POS
15	2005	58.614	POS	POS	NEG	NEG	POS
16	2005	93.494	POS	NEG	NEG	POS	POS
17	2005	61.546	POS	NEG	NEG	POS	POS
18	2005	79.751	POS	NEG	NEG	POS	NEG
19	2005	71.577	POS	NEG	NEG	POS	NEG
20	2005	78.900	POS	NEG	POS	POS	POS
21	2005	430.200	POS	POS	POS	POS	POS
% 2005			100	50	40	90	80
% TOTAL			95,2	47,6	38,1	90,5	81

Tabla 3. Diferentes combinaciones de especies de *Eimeria* en yacaja de 21 granjas que usan anticoccidíacos

Nº de especies	Especies	Nº de granjas	Nº total de granjas
2	a+p	4	4
3	a+mi+t	1	7
	a+p+t	4	
	mi+p+t	1	
	a+ma+t	1	
4	a+ma+p+t	4	5
	a+mi+p+t	1	
5	a+ma+mi+p+t	5	5

a = *E. acervulina*, ma = *E. maxima*, mi = *E. mitis*, p = *E. praecox*, t = *E. tenella*

ESPAÑA

En España, se recogieron 61 muestras procedentes de diferentes áreas (Galicia, Zona Centro, Aragón y Cataluña) y en 3 periodos diferentes: 20 muestras en 2003, 26 en 2005 y 15 en 2007 (en todos los años en el periodo de septiembre a enero). Se analizó la prevalencia de todas las especies de *Eimeria* que pueden afectar a los broilers sólo en aquellas granjas que presentaron un recuento superior a 20.000 ooquistes/gr -31 sobre 61- (tabla 4). Entre estas 31 granjas sólo dos habían sido vacunadas por lo que se decidió analizarlas por separado (tabla 5).

La prevalencia en las granjas con más de 20.000 ooquistes/gr. y que usan anticoccidíacos fue, respectivamente: *E. acervulina* 100%, *E. máxima* 55,2%, *E. mitis* 13,8%, *E. praecox* 44,8% y *E. tenella* 79,3% (tabla 4)

Table 4. Prevalencia de *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. tenella* en granjas que usan anticoccidiósicos (Recuentos > 20.000 ooquistes/gr.)

Granja	Año	Nº. ooquistes/gr.	PCR				
			<i>E. acervulina</i>	<i>E. maxima</i>	<i>E. mitis</i>	<i>E. praecox</i>	<i>E. tenella</i>
1	2003	37.879	POS	POS	NEG	NEG	POS
2	2003	34.576	POS	POS	NEG	NEG	NEG
3	2003	68.343	POS	NEG	POS	POS	POS
4	2003	54.429	POS	POS	NEG	POS	POS
5	2003	154.807	POS	POS	POS	NEG	POS
6	2003	67.990	POS	NEG	NEG	POS	POS
7	2003	107.430	POS	POS	POS	NEG	POS
8	2003	34.483	POS	NEG	NEG	NEG	POS
9	2003	46.512	POS	POS	NEG	NEG	NEG
10	2003	43.692	POS	NEG	NEG	POS	POS
11	2003	86.000	POS	POS	NEG	POS	POS
% 2003			100	63,6	27,3	45,5	81,8
12	2005	95.300	POS	POS	NEG	POS	POS
13	2005	30.318	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
14	2005	48.887	POS	POS	POS	NEG	NEG
15	2005	114.997	POS	POS	NEG	POS	POS
16	2005	75.415	POS	NEG	NEG	POS	POS
17	2005	67.000	POS	POS	NEG	NEG	POS
18	2005	31.179	POS	NEG	NEG	NEG	POS
19	2005	56.200	POS	NEG	NEG	POS	POS
20	2005	87.200	POS	POS	NEG	POS	POS
21	2005	77.076	POS	POS	NEG	NEG	NEG
% 2005			100	60	10	50	70

22	2007	93.603	POS	NEG	NEG	POS	POS
23	2007	172.991	POS	NEG	NEG	NEG	POS
24	2007	38.070	POS	NEG	NEG	NEG	POS
25	2007	45.972	POS	NEG	NEG	POS	POS
26	2007	82.888	POS	NEG	NEG	POS	POS
27	2007	78.511	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
28	2007	178.683	POS	NEG	NEG	NEG	POS
29	2007	20.832	POS	POS	NEG	NEG	POS
% 2007			100	12,5	0	37,5	87,5
% TOTAL			100	55,2	13,8	44,8	79,3

Tabla 5. Prevalencia de *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. tenella* en granjas vacunadas (Recuentos > 20.000 ooc./g)

Granja	Año	Nº. ooquistes/gr.	PCR				
			<i>E. acervulina</i>	<i>E. maxima</i>	<i>E. mitis</i>	<i>E. praecox</i>	<i>E. tenella</i>
1	2007	110.085	POS	POS	POS	POS	POS
2	2007	71.800	POS	POS	POS	POS	POS
%			100	100	100	100	100

En los grupos vacunados (tabla 5), la presencia de *E. acervulina*, *E. máxima*, *E. tenella* y *E. mitis* es normal ya que son especies contenidas en el producto vacunal usado en estas granjas (Paracox®-5). Sin embargo, *E. praecox* también apareció en estas dos granjas (100%) siendo una especie no presente en la vacuna.

Finalmente, se analizaron varias combinaciones de especies que se encontraron en las granjas. Las infecciones multiespecie fueron más comunes (93,1%) que las mono especie (6,9%). Las combinaciones de 3 especies fueron las más frecuentes (37,9%)

Tabla 6. Diferentes combinaciones de especies de *Eimeria* en muestras de yacija de 29 granjas que usaban anticoccidíacos

Nº de especies	Especies	Nº de granjas	Nº total de granjas
1	a	2	2
2	a+ma	3	8
	a+t	5	
3	a+ma+t	3	11
	a+p+t	7	
	a+ma+mi	1	
4	a+mi+p+t	1	8
	a+ma+p+t	5	
	a+ma+mi+t	2	

a = *E. acervulina*, ma = *E. maxima*, mi = *E. mitis*, p = *E. praecox*, t = *E. tenella*

ITALIA

En Italia se recogieron muestras procedentes de 59 granjas de broiler de diferentes áreas del país. El periodo de recolección fue diferente si comparamos con las muestras tomadas en Bélgica y España. De hecho, las muestras se tomaron entre Febrero y Abril. Por ello, el umbral de ooquistes/gr. elegido para analizar los datos fue más bajo ya que el número de ooquistes excretado por las aves, en este periodo del año es más bajo. Para los otros países las muestras se recogieron en otoño donde, normalmente, podemos encontrar un mayor número de ooquistes/gr. en yacija debido a unas mejores condiciones para la replicación del parásito (humedades relativas altas y temperaturas medias más suaves).

30 muestras procedieron de granjas vacunadas. La prevalencia de *E. praecox* (la única especie no presente en la vacuna usada) en aquellas granjas con un número de ooquistes superior a 10.000 ooquistes/gr. (9 sobre 30) fue del 44,4% (tabla 7) La tabla 7 muestra también los resultados de prevalencia de las otras especies de *Eimeria* en las mismas granjas donde tuvo lugar la vacunación.

En las 29 muestras de yacija procedentes de de granjas que usaron aditivos anticoccidiósicos, se analizó la prevalencia de todas las especies de Eimeria que pueden afectar a los broilers solamente en las granjas con un umbral superior a 1.000 ooquistes/gr. (15 sobre 29): *E. acervulina*93,3%, *E. maxima*33,3%, *E. mitis*20%, *E. praecox*60%, *E. tenella*80% (Tabla 8)

Tabla 7. Prevalencia de *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. tenella*en granjas vacunadas (Recuentos>10.000 ooq./gr)

Granja	Nº ooquistes/gr	PCR				
		<i>E. acervulina</i>	<i>E. maxima</i>	<i>E. mitis</i>	<i>E. praecox</i>	<i>E. tenella</i>
4	68.213	POS	POS	NEG	NEG	POS
16	49.404	POS	POS	NEG	NEG	POS
17	49.405	POS	POS	NEG	NEG	POS
18	49.406	POS	POS	NEG	NEG	POS
24	52.533	POS	POS	NEG	NEG	POS
32	23.837	POS	POS	POS	POS	POS
41	27.710	POS	POS	POS	POS	POS
45	20.860	POS	NEG	NEG	POS	POS
50	16.476	POS	POS	NEG	POS	NEG
%		100	88,8	22,2	44,4	44,4

Table 8. Prevalencia de *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. tenella*en granjas que usan anticoccidiósicos (Recuentos> 1.000 ooq./gr)

Granja	Nº ooquistes/gr.	PCR				
		<i>E. acervulina</i>	<i>E. maxima</i>	<i>E. mitis</i>	<i>E. praecox</i>	<i>E. tenella</i>
3	119.576	POS	POS	POS	POS	POS
8	8.208	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
10	3.345	POS	NEG	NEG	POS	POS
12	30.918	POS	NEG	NEG	POS	POS

18	7.436	POS	POS	NEG	POS	POS
19	6.593	POS	POS	NEG	NEG	POS
20	3.236	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
26	3.631	POS	POS	POS	POS	POS
27	2.250	POS	NEG	POS	POS	POS
30	21.559	POS	NEG	NEG	POS	POS
31	3.923	POS	POS	NEG	POS	POS
34	2.542	POS	NEG	NEG	NEG	POS
36	1.802	POS	NEG	NEG	POS	POS
37	1.336	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
59	1.332	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
%		93,3	33,3	20	60	80

Tabla 9. Diferentes combinaciones de las especies de *Eimeria* en muestras de yacija de 15 granjas que usaron coccidiostatos

Nº de especies	Especies	Nº de granjas	Nº total de granjas
1	a	3	4
	t	1	
2	a+t	1	1
3	a+p+t	4	5
	a+ma+t	1	
4	a+ma+p+t	2	3
	a+mi+p+t	1	
5	a+ma+mi+p+t	2	2

a = *E. acervulina*, ma = *E. maxima*, mi = *E. mitis*, p = *E. praecox*, t = *E. tenella*

Finalmente, la tabla 9 muestra las diferentes combinaciones de especies que podemos encontrar en las granjas investigadas. Las infecciones multiespecie fueron más comunes (73,3%) que las monoespecie (26,7%). Las combinaciones de 3 especies juntas fueron las más frecuentes (33,3%)

CONCLUSIONES

En términos generales, analizando las tres especies de reconocido potencial patogénico (*E. acervulina*, *E. máxima* y *E. tenella*) *Eimeria acervulina* aparece como la especie de mayor difusión en los tres países europeos examinados en este estudio. En lo que se refiere a las otras dos especies, su presencia se confirmó con porcentajes altos en los tres países con prevalencias de alrededor de un 80% para *E. tenella* y entre un 33,3 % (Italia) y un 55.2 % (España) para *E. maxima*

Si analizamos las especies que podrían provocar infecciones subclínicas y afectar a rendimientos productivos (*E. mitis* y *E. praecox*), cabe mencionar la baja presencia de *E. mitis* en los tres países. Por el contrario, *E. praecox* es fácil de encontrar y su difusión, en todos los países analizados, alcanza valores altos.

Analizando cada país por separado y, centrándonos en particular en la distribución de *E. praecox*, se han encontrado diferentes situaciones. En Bélgica, donde sólo se analizaron granjas que usaban aditivos anticoccidióticos, la segunda especie más difundida después de *E. acervulina*, fue, sorprendentemente, *E. praecox* con un 90,5% de prevalencia (la misma situación se encontró en Reino Unido por Chapman en 1982: *E. acervulina* 83% de prevalencia seguida por *E. praecox* con un 74%). En España, los porcentajes de *E. praecox* en animales tratados con anticoccidióticos y animales vacunados fueron, respectivamente 44.4% y 100%. Por el contrario, en Italia, la situación fue diferente mostrando una mayor prevalencia de *E. praecox* (60%) las granjas tratadas con anticoccidióticos comparadas con las vacunadas (44,4%). Teniendo en cuenta que, solo hubo seguimiento de 2 granjas vacunadas en España, los datos procedentes de Italia parecen más significativos.

En cualquier caso, los resultados confirman la presencia de *E. praecox* con altos valores de prevalencia incluso en granjas vacunadas (las vacunas usadas no contienen esta especie). Los resultados también indicarían que no existe ningún grado de protección cruzada entre las diferentes especies que afectan a *Gallus gallus*

Finalmente, es muy interesante recalcar que, en los tres países analizados, la mayor parte de las infecciones por coccidiosis fueron multiespecie. Además, las combinaciones más comunes fueron aquellas en las que *E. praecox* concurre junto con *E. acervulina* y *E. tenella*. Estudiando la composición de las infecciones multiespecie en las cuales encontramos *E. praecox*, aparece una alta asociación con *E. acervulina*. Este hallazgo contrasta con las indicaciones de Williams (1973 y 2001) según las cuales, *E. acervulina* interfiere la reproducción de otras especies debido a su alta tasa reproductiva. Por tanto, aparece una necesidad de nuevos estudios para clarificar este punto ya que *E. praecox* comparte con *E. acervulina* el mismo lugar para su desarrollo endógeno en el duodeno y la parte superior del intestino medio.

En conclusión, las prevalencias de *E. praecox* que se han encontrado en estos tres países coinciden con datos previos reportados en la literatura con la excepción de Bélgica, donde el porcentaje fue mucho mayor al esperado. Estos resultados confirman, una vez más, la presencia de *E. praecox* en Europa y, como consecuencia, el riesgo de infecciones subclínicas que “se mantienen como una de las infecciones más importantes que causan detrimento en los resultados productivos” (Haugh y col. 2008)

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer la colaboración de todos los granjeros, veterinarios y técnicos avícolas en la recogida de muestras. Un especial agradecimiento para Mireia Blanch Freixa por la asistencia técnica fundamental en el laboratorio DIAGNOS (HIPRA) y también para Noelia López Peralta por su asistencia técnica en el laboratorio R&D (HIPRA)