



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Vacunación de coccidiosis aviar

Vaccination of avian coccidiosis

Autor/es

Miguel Ángel Pereira Gómez

Director/es

Emilio del Cacho  
Malo

Facultad de Veterinaria

2018

# Índice

1. Resumen.....	2
2. Introducción.....	4
2.1 Ciclo biológico.....	4
2.2 Enfermedad.....	6
2.2.1 Patogenia.....	6
2.2.2 Formas clínicas y lesiones.....	7
2.2.3 Diagnóstico.....	9
2.2.4 Tratamiento.....	9
3. Justificación y objetivos.....	11
4. Material y métodos.....	11
5. Resultados y discusión.....	12
5.1 Vacunas constituidas por cepas patógenas.....	12
5.1.1 Fundamento de las vacunas comerciales de cepas patógenas.....	12
5.1.2 Desventajas de las vacunas de cepas patógenas.....	13
5.1.3 Vacunas comerciales de cepas patógenas.....	14
5.2 Vacunas atenuadas por precocidad.....	15
5.2.1 ¿Qué son las cepas atenuadas por precocidad?.....	15
5.2.2 Características de las cepas atenuadas por precocidad.....	16
5.2.3 Efecto de las cepas atenuadas por precocidad en los parámetros productivos del pollo.....	16
5.2.4 Parámetros parasitológicos en cepas atenuadas por precocidad.....	17
5.2.5 Utilización de las vacunas atenuadas por precocidad y vacunas comerciales.....	18
5.2.6 Pautas de utilización y mecanismo de acción de las vacunas constituidas por cepas precoces.....	20
5.2.7 Alternancia de vacunación y coccidiostáticos.....	21
5.3 Vacunas atenuadas mediante adaptación a embrión de pollo.....	22
5.3.1 Atenuación por adaptación a embrión de pollo.....	22
5.3.2 Vacuna con <i>E. tenella</i> atenuada por adaptación a embrión de pollo....	23
5.4 Vacuna constituida por subunidades antigénicas de <i>Eimeria</i> .....	24
5.4.1 Desarrollo y mecanismo de acción de la vacuna de subunidades.....	24
5.4.2 Utilización de la vacuna de subunidades.....	26
6. Conclusiones.....	27
7. Valoración personal.....	28
8. Bibliografía.....	28

# 1. Resumen

La coccidiosis es la enfermedad parasitaria más importante en la producción avícola, y como tal se ha ido buscando distintas formas de combatirla. Primero fueron los coccidiostáticos añadidos al pienso, pero con la aparición de las resistencias se tuvo que sustituir por el estudio e implantación de distintas vacunas.

De esta manera se han ido desarrollando distintas formas de profilaxis a medida que iba evolucionando la ciencia y los estudios realizados. Primero se intentó con cepas patógenas, forma de vacunación que quedó relegada debido al gran riesgo de aparición de signos clínicos y la necesidad de utilizar coccidiostáticos.

La forma de vacunación que se ha quedado como predominante es la de cepas atenuadas por precocidad. Basada en seleccionar durante varias generaciones los primeros ooquistes expulsados. De esta forma se disminuye el tamaño de la esquizogonia por el menor número de merozoitos. Y a su vez disminuye el periodo de prepatencia y patogenicidad con respecto a la cepa original. Estas vacunas disponen de una característica primordial como es que son genéticamente estables.

Otro tipo vacunal que se probó posteriormente es la protección por inmunidad maternal; de esta forma se pretendía que protegiendo a las madres, los pollitos estuvieran protegidos los primeros días de vida y luego su propio sistema inmune fuera el que se hiciera resistente contra las especies de *Eimeria*. No ha terminado de funcionar porque esta forma de vacunar puede ser útil para granjas extremadamente controladas sanitariamente, pero demasiado peligroso para la mayoría de explotaciones avícolas.

Por último, también se ha probado, sin éxito, la atenuación de las cepas en embrión de pollo. Y aunque experimentalmente se consigue que las cepas pierdan parte de su patogenicidad, tienen el grave problema de que no son estables genéticamente y por tanto puede revertir la atenuación.

## ABSTRACT

Coccidiosis is the most important parasitic disease in poultry production and as such it has been looking for different ways to combat it. First, coccidiostats were added to the feed, but with the emergence of resistances it had to be replaced by the study and implementation of different vaccines.

In this way, different forms of prophylaxis have been developed as science and studies have been carried out. First it tried with pathogenic strains, this form of vaccination was relegated due to the great risk of the appearance of clinical signs and the need to use coccidiostats.

The form of vaccination that has remained as predominant is the use of strains attenuated by precocity. This form is based on selecting the first oocysts expelled for several generations. In this way, the size of the schizogony is reduced by the smaller number of merozoites. And in turn decreases the period of prepatent and pathogenicity with respect to the original strain. These vaccines have a paramount characteristic as they are genetically stable.

Another type of vaccine that was subsequently tested is protection by maternal immunity; it was intended by protecting the mothers, the chicks were protected the first days of life and then their own immune system would be the one that became resistant against the *Eimeria* species. It has not finished working because this way of vaccinating can be useful for farms extremely controlled sanitarilly, but too dangerous for the majority of poultry farms.

Finally, the attenuation of chicken embryo strains has also been tested unsuccessfully. And although experimentally it is achieved that the strains lose part of their pathogenicity, they have the serious problem that they are not genetically stable and therefore can revert the attenuation.

## 2. Introducción

La coccidiosis aviar es una enfermedad parasitaria causada por protozoos del género *Eimeria* (filum Apicomplexa, clase Eimeriidae). Afecta a diversas especies de aves, pero en el pollo de carne y la gallina ponedora alcanza la mayor repercusión económica. Además, los coccidios constituyen una de las amenazas más importantes en estas aves debido a que presentan (Torrubia y col 2014):

- Ciclo biológico directo (sin necesidad de hospedadores intermediarios).
- Gran capacidad de multiplicación en un espacio corto de tiempo y ooquistes resistentes.
- Capacidad de generar resistencias frente a todos los coccidiostáticos (por ello el uso de vacunas frente a la enfermedad es muy importante).

Se produce mediante la ingestión de ooquistes esporulados, dando un proceso de carácter clínico o subclínico caracterizado por diarrea y descenso de la producción (disminuye el índice de crecimiento y aumenta el índice de conversión y la mortalidad).

### 2.1 Ciclo biológico

Estos protozoos presentan ooquistes con cuatro esporocistos, que contienen dos esporozoítos en su interior, así como un ciclo monoxeno.

Comprende dos fases claramente diferenciadas:

➤ **Fase endógena**

Consta de una fase asexual (esquizogonia) y otra sexual (gametogonia), que dará lugar al cigoto (ooquiste inmaduro) y al inicio de la fase exógena. Tiene lugar dentro del hospedador.

Los ooquistes esporulados (formas de resistencia infectantes) son ingeridos y deben liberarse de sus paredes protectoras para poder parasitar las células, en un proceso que se denomina desenquistamiento. En una primera fase el dióxido de carbono y la acción mecánica de la molleja consiguen alterar la permeabilidad y la estructura de la membrana del ooquiste, lo cual permite el paso de las sales biliares, la tripsina y la liberación de los esporocistos. En la segunda fase los esporozoítos abandonan los esporocistos mediante su propio movimiento (estimulado por la acción de los ácidos biliares y las enzimas intestinales); los ácidos biliares facilitan que las enzimas intestinales entren en los ooquistes, y se activa y altera el cuerpo de Stieda. Se estimula la movilidad de los esporozoítos en el interior de los esporocistos y los abandonan a través del orificio producido por la alteración del cuerpo de Stieda (del Cacho y col 2014).

Una vez que el esporozoíto penetra en la célula epitelial, se forma la vacuola parasitófora y sufre un proceso de redondeamiento, transformándose en trofozoíto, el cual mediante divisiones nucleares múltiples (esquizogonia) da lugar a los esquizontes de primera generación. Al final de su proceso de maduración se rompe la membrana de la célula hospedadora, liberándose los merozoítos. Estos tienen un complejo apical que les permite desplazarse e infectar a las células epiteliales vecinas del intestino, dando lugar a esquizontes de segunda generación (reproducción asexual). La tercera generación de esquizontes es muy discutida (McDonald y col 1986). La última generación de merozoítos penetra en nuevas células epiteliales de las criptas para desarrollar la gametogonia. De esta manera, a partir de los merozoítos se forman gamontes de dos tipos (Torrubia y col 2014):

1. Macrogamontes o gametos femeninos: maduran para formar el macrogameto.
2. Microgamontes o gametos masculinos: dan múltiples microgametos flagelados que invaden las células parasitadas por los macrogametos y lo fecundan, dando lugar al cigoto.

La fusión de los cuerpos de envoltura I y II del macrogameto da lugar a las capas externas del ooquiste no esporulado. Al romperse la célula que lo alberga, el ooquiste alcanza la luz cecal y posteriormente el medio ambiente a través de las heces.

➤ **Fase exógena**

Multiplicación asexual (esporogonia) fuera del hospedador.

Los ooquistes no esporulados (eliminados con las heces del hospedador) encierran, mediante una doble membrana, una masa citoplasmática no diferenciada (esporonte). El proceso de esporulación (esporogonia) se inicia cuando las condiciones de oxigenación, temperatura y humedad son las adecuadas (12-39 °C; el rango óptimo es de 28-31 °C).

El esporonte da cuatro masas ovaladas (esporoblastos) que se recubren de una doble membrana, se forman cuatro esporocistos, cada uno de los cuales contiene dos esporozoítos (células infectantes). La esporulación de los ooquistes da como resultado ocho esporozoítos haploides a partir de un único ooquiste inicial diploide, por meiosis (Campos 2011).

## 2.2 Enfermedad

### 2.2.1 Patogenia

La concentración del material infectivo (así como su viabilidad en el medio) y la densidad de población receptora son factores importantes en la infección por coccidios, de modo que las

actuales condiciones de explotación industrial de la avicultura son las ideales para la transmisión (Biarnés y col 2006).

La gravedad de la infección (lesión intestinal) depende de la especie de *Eimeria* que intervenga, pues condiciona el poder patógeno según la localización, número de esquizogonias y el tamaño de los esquizontes. También intervienen factores como la edad, el estado sanitario/inmunitario de las aves en la infección, genética, número de ooquistes...

La destrucción de las células epiteliales es el principal mecanismo de patogenicidad que subyace en la pérdida de productividad. La infección masiva determina la destrucción de un gran número de células epiteliales intestinales e incluso la destrucción de las vellosidades. Como consecuencia, se desencadena un síndrome de malabsorción. Además, se produce pérdida de peso, descenso de la puesta y alteraciones en la calidad de la carne y de los huevos.

La patogenicidad intrínseca de las especies de *Eimeria* parece estar directamente relacionada con el lugar de desarrollo, de manera que las especies más patógenas son las que penetran más profundamente en la mucosa. Además, se desarrollan en determinadas porciones intestinales y los ooquistes de cada especie muestran características morfológicas propias.

En la actualidad, se considera que a la gallina y el pollo les parasitan siete especies de *Eimeria*: *E. acervulina*, *E. tenella*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. mitis* y *E. praecox*. De éstas, las cinco primeras se consideran patógenas, ya que desarrollan formas clínicas, y las dos últimas apatógenas, pues no desarrollan manifestaciones clínicas, aunque su presencia implica disminución muy significativa de la ganancia de peso y del índice de conversión (Shirley y col 2007).

Las siete especies de *Eimeria* citadas tienen un ciclo biológico similar (siempre de localización intestinal), pero se diferencian en aspectos como el fragmento intestinal que parasitan, número de esquizogonias, tamaño de los esquizontes y número de merozoítos, o situación intracelular de los diferentes estadios evolutivos (Campos 2011). Además, presentan una marcada especificidad del hospedador y confieren inmunidad específica (la resistencia a la reinfección obtenida con una especie no protege frente a otras).

- *E. acervulina* (descrita por primera vez por Tyzzer en 1929): se asocia con enteritis catarral y produce, principalmente, diarreas mucosas que originan menor ganancia de peso. Se localiza en la parte superior del intestino delgado (duodeno) y en tramo inicial de yeyuno (casos graves). Los ooquistes son ovoides y de pequeño tamaño, la pared es lisa, más delgada en el polo estrecho y con un micropilo poco apreciable. Lesiones

gastrointestinales típicas: placas blancas en la serosa del intestino delgado, intestino pálido y contenido intestinal posiblemente acuoso. Además, presentan menor aumento de peso, peor índice de conversión, menos producción de huevos y baja mortalidad.

- *E. tenella* (descrita por primera vez por Railliet y Lucet en 1891): hemorragias entre el 4º y 5º día PI (asociadas a la maduración de los esquizontes de segunda generación) y causan una elevada tasa de mortalidad. Se localiza en los ciegos. Los ooquistes son ovoides y de tamaño medio; la pared es lisa y carece de micropilo. Lesiones gastrointestinales típicas: inflamación hemorrágica de los ciegos y coágulos en la luz (presentes también en heces). Además, presentan anemia y menor aumento de peso. La interacción entre distintas especies de *Eimeria* se potencia especialmente cuando las dos especies que están implicadas en la infestación son específicas de zonas anatómicas diferentes del intestino.

## 2.2.2 Formas clínicas y lesiones

Por la localización anatómica, se pueden clasificar en coccidiosis cecal, producida por *E. tenella*, y coccidiosis intestinal, por *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* y *E. brunetti*.

Coccidiosis cecal: puede cursar con un cuadro sobreagudo, agudo o crónico (del Cacho y col 2014).

- Sobreagudo: en jóvenes o sin protección. Deben ingerir gran cantidad de ooquistes en un corto periodo de tiempo. Eliminan heces diarreicas con gran cantidad de sangre, que se solidifica en forma de coágulos de color oscuro. A los 2-3 días se produce una alta mortalidad (puede llegar al 80-100 %).
- Agudo: parecido al anterior, pero más atenuado. Se observa eliminación de heces diarreicas sanguinolentas de rápida propagación. Se muestran hipoactivos e hipotérmicos y como consecuencia se agrupan e introducen la cabeza debajo del ala en un intento de mantener la temperatura corporal. Presentan anemia (las mucosas, la cresta y las barbillas están pálidas). La mortalidad puede alcanzar el 50-80 % y los que sobreviven muestran un notable retraso en el crecimiento.
- Crónico: en adultos que han superado la relación continuada con el parásito (buen estado de inmunidad). El proceso clínico se desencadena por la ingestión de una gran cantidad de ooquistes o por una cepa de *E. tenella* con diversidad antigénica respecto a la que estableció la inmunidad. Se aprecia un descenso en las producciones, posible diarrea sanguinolenta y la mortalidad puede alcanzar el 5-10 %.

Las lesiones son detectables en los cuadros sobreagudo y agudo. En la necropsia de aquellos que muestran diarrea hemorrágica se observa tiflitis hemorrágica, con los ciegos notablemente dilatados. En la mucosa se observan desde petequias a hemorragias, dependiendo de la gravedad del proceso. En la luz se detecta contenido hemorrágico, frecuentemente con coágulos de sangre. Estas lesiones se producen por la ruptura de los esquizontes subepiteliales.

Los animales que superan esta fase muestran en los ciegos un contenido solidificado que se define como moldes cecales, que corresponden a la coagulación del contenido cecal que se produjo como consecuencia de la esquizogonia. La mucosa cecal está completamente destruida, la submucosa edematosa y presenta una intensa infiltración celular. Es frecuente que bacterias como *Clostridium* o *Salmonella* produzcan la muerte de las aves.

- Coccidiosis intestinal: se puede observar un cuadro agudo o crónico (del Cacho y col 2014).
  - Agudo: jóvenes sin contacto previo con el parásito. Se observa un brusco descenso en la producción y diarrea, cuyo aspecto depende de la especie. *E. acervulina* produce una diarrea mucosa de color blanco-amarillenta (*E. tenella* presenta diarreas con estrías sanguinolentas). La mortalidad también varía según la especie (*E. acervulina* no produce bajas).
  - Crónico: en animales que ingieren gran cantidad de ooquistes y presentan cierto grado de protección frente al parásito. Eliminan heces pastosas y se produce disminución brusca de las producciones.

Las lesiones se observan en cuadros agudos y se localizan en intestino delgado y grueso, pero nunca en los ciegos. En *E. acervulina* se observa duodenitis catarral, que puede evolucionar a mucosa con un contenido de color amarillento. En la mucosa del duodeno se observan lesiones puntiformes que pueden fusionarse hasta formar bandas orientadas en sentido transversal al intestino y con aspecto escaleriforme. Estas lesiones corresponden a acúmulos de ooquistes. Tras la eliminación de los ooquistes, las vellosidades del duodeno se observan desprovistas de células epiteliales.

### 2.2.3 Diagnóstico

La coccidiosis se debe diferenciar de otros procesos clínicos que cursan con diarrea sanguinolenta o hemorrágica y con alteraciones en la mucosa del ciego, por lo que requiere el diagnóstico diferencial con (del Cacho y col 2014):

- Salmonelosis: lesiones en la mucosa del ciego y diarreas de tipo sanguinolento.
- Micotoxicosis: diarreas de tipo hemorrágico.
- Histomoniasis: acúmulos purulentos caseificados en los ciegos y en el hígado. Afecta al pavo principalmente, en pollo es menos frecuente.

Se puede diagnosticar (con frecuencia) teniendo en cuenta el cuadro clínico y las lesiones, pero es conveniente realizar el diagnóstico laboratorial, basado en la observación de ooquistes mediante un análisis coprológico de concentración por flotación. Mediante el estudio morfométrico, el cuadro clínico y las lesiones, se pueden diferenciar las especies de *Eimeria*, observando minuciosamente todas las partes del intestino (Martínez-Alesón 2011).

En los brotes sobreagudos de coccidiosis cecal (*E. tenella*) mueren en el curso de la esquizogonia y, por tanto, es posible no observar ooquistes en los análisis coprológicos.

El examen *post mortem*, realizando raspados en diferentes zonas del intestino, constituye el método de diagnóstico más adecuado, ya que puede comprobarse la presencia de diferentes fases del parásito en porciones concretas del intestino y de esta forma diferenciar fácilmente las especies que producen el proceso clínico (McDougald y Fitz-Coy 2008).

### 2.2.4 Tratamiento

Una gran cantidad de fármacos manifiestan efectos anticoccidiales inhibiendo la esquizogonia y, por tanto, las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Pueden ser clasificados en dos grandes grupos, según sean coccidiostáticos (detienen el ciclo biológico de los coccidios sin llegar a matarlos) o coccididas (matan el coccidio). Pero esta clasificación no siempre es fácil y no es clara, ya que depende de la duración del tratamiento, dosis y especie de *Eimeria* del coccidio y del hecho de que el mismo fármaco se comporte como coccidiostático o coccidida (Biarnés y col 2006).

Con el fin de regular el uso de compuestos medicinales en la industria avícola, la UE prohibió una larga lista de coccidiostáticos, limitando esa lista de autorizados como aditivos a la siguiente (Reglamento (CE) Nº 2205/2001): robenidina, halofuginona, diclazuril, decoquinato,

narasina/nicarbacina, lasalocid, salinomocina sódica, maduramicina de amonio, monensina de sodio y narasina. Y posteriormente se ha permitido el uso de nicarbacina como aditivo (Reg. (UE) N° 875/2010) y de clinacox, maxiban y monteban sin periodo de retirada (Reg. (CE) N° 976/2008, Reg. (UE) N° 885/2010 y Reg. (UE) N° 884/2010).

Las especies de *Eimeria* responsables de la coccidiosis son capaces de desarrollar resistencias frente a todos los fármacos descritos. La formación de cepas resistentes se ve facilitada cuando se usan dosis bajas durante largos períodos de tiempo (Chapman 2014). Cuando se producen brotes clínicos debido al desarrollo de resistencias es recomendable realizar una prueba de sensibilidad anticoccidiósica para establecer el tratamiento adecuado, aunque en la mayoría de las veces es suficiente con cambiar el coccidiostático.

Para evitar la aparición de resistencias se han propuesto dos pautas de tratamiento preventivo (Chapman 2014):

- El sistema rotacional: propone cambiar el coccidiostático cada 4-6 meses de producción.
- El sistema dual: consiste en cambiar el coccidiostático a la mitad de un ciclo de cría (entre 21-25 días de vida).

En el curso de los tratamientos preventivos, si no hay resistencia a los coccidiostáticos, no desarrollan inmunidad y, por tanto, cuando dejan de recibir coccidiostáticos presentan alta receptividad a la infección. Si se genera inmunidad frente a *Eimeria* durante la quimioprofilaxis la causa es la existencia de poblaciones resistentes al coccidiostático con una tasa antigénica suficiente para generar una respuesta inmune eficaz frente al parásito (del Cacho y col 2014).

El tratamiento curativo se aplica en caso de que se desencadene un brote clínico de coccidiosis aviar. Se utilizan los mismos fármacos que se han propuesto en el tratamiento preventivo y se añaden al agua de bebida de las aves durante 5 días. Se administran dosis que varían desde el 0.1% (sulfamidas) hasta el 0.01% (amprolio).

### 3 Justificación y objetivos

Se ha elegido llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre las vacunas utilizadas frente a la coccidiosis del pollo y de la gallina porque es la enfermedad parasitaria más importante a nivel mundial en la producción avícola.

El uso de la quimioprofilaxis de forma continuada e indiscriminada ha desarrollado cepas de *Eimeria* resistentes a todas las moléculas utilizadas frente al parásito. Además, estas resistencias, cada vez aparecen más rápido y de forma más peligrosa. Por tanto, ha sido necesario buscar otras alternativas para prevenir la aparición de procesos clínicos de coccidiosis aviar.

Con este trabajo buscamos las ventajas e inconvenientes de cada uno de los tipos de vacunas que existen o han existido. Con ello pretendemos encontrar cuál es la mejor forma de prevenir que se muestren signos patológicos y qué vacuna se adapta mejor a cada sistema de producción. Esta revisión bibliográfica puede ayudar a tener una visión más amplia de la inmunoprofilaxis frente a la coccidiosis con la finalidad de mejorar el rendimiento productivo de la industria aviar.

Las vacunas que se han estudiado en este trabajo fin de grado son: vacunas constituidas por cepas patógenas, vacunas atenuadas por precocidad, vacunas atenuadas en embrión de pollo, y vacunas de subunidades.

### 4 Material y métodos

Al tratarse de una revisión bibliográfica, nos propusimos conseguir el máximo número posible de documentación con relación al tema de la vacunación frente a la coccidiosis aviar. Se ha buscado material diverso en cuanto a autores, países de procedencia y años de publicación en fuentes bibliográficas *on line* como *scopus* y *science Direct*. Así como en fuentes bibliográficas físicas como las revistas en papel de la biblioteca de la Facultad de Veterinaria y la biblioteca de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza. El objetivo de la búsqueda realizada en las diversas fuentes bibliográficas utilizadas en este trabajo fin de grado fue exponer una visión global del desarrollo y evolución de las vacunas utilizadas frente a la coccidiosis del pollo y de la gallina.

Con todas las publicaciones científicas recopiladas de revistas, tesis, libros, congresos, ponencias, debates y mesas redondas, se ha hecho un trabajo de traducción y resumen para plasmar, en estas páginas, las ideas más importantes para el ejercicio de la profesión veterinaria.

## 5 Resultados y discusión

### 5.1 Vacunas constituidas por cepas patógenas

Los trabajos de Tyzzer (1929) demostraron que los animales que superaban una infección por *Eimeria* desarrollaban un estado de protección frente al parásito. Lo que significaba que era posible el desarrollo de una vacuna frente a la coccidiosis aviar. Bachman (1930) y Becker (1935) aislaron antígenos a partir de diferentes fases parasitarias y los utilizaron como vacuna con la finalidad de desencadenar la síntesis de anticuerpos protectores frente a *Eimeria*. Como consecuencia de la inoculación de los antígenos se produjeron anticuerpos frente al parásito, pero se comprobó que la respuesta inmune mediada por anticuerpos aportaba una escasa protección frente a *Eimeria*. En los años 50, con escasos conocimientos sobre los mecanismos inmunológicos que se activan en el curso de una infección por *Eimeria*, intuyeron que la respuesta inmune celular era más importante que la humoral en la lucha frente a los parásitos (Glick 1954). Además Burnet y col (1950) mediante infecciones con varias especies de *Eimeria* demostraron que la inmunidad frente a *Eimeria* era específica de especie. Únicamente se desencadenaba un estado de protección frente a la especie de *Eimeria* con la que se realizaba la infección. No había protección cruzada entre las diferentes especies de *Eimeria*. Por tanto la única forma de desencadenar inmunidad eficaz frente a la coccidiosis aviar era reproducir, de forma controlada, una infección con las especies de *Eimeria* que desencadenan la coccidiosis del pollo y de la gallina.

#### 5.1.1 Fundamento de las vacunas comerciales de cepas patógenas

A partir de esta idea en 1955 se lanzó al mercado Coccivac. Una vacuna constituida por ooquistes esporulados de *Eimeria maxima*, *E. acervulina*, *E. tenella* y *E. necatrix* fabricada para prevenir la coccidiosis del pollo de carne. En 1964 se fabricó MF-Coccivac-t/D. Una vacuna constituida por ooquistes esporulados de *E. maxima*, *E. acervulina*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. mitis*, *E. praecox* y *E. brunetti* fabricada para controlar la coccidiosis de la gallina de puesta.

La estrategia de vacunación consistía en la administración de la vacuna en agua de bebida en la primera semana de vida. Para conseguir la vacunación de todos los animales se retiraba el agua durante 3-4 horas. Transcurrido ese tiempo la vacuna se añadía a una cantidad de agua que los animales pudieran beber en un máximo de 30 min y se permitía el acceso de los animales a la solución de vacuna en agua. Los animales ingerían ooquistes esporulados de cepas patógenas y por tanto experimentaban una infección por cepas patógenas de *Eimeria*. Para evitar el desarrollo de un brote de coccidiosis clínica como consecuencia de la patogenicidad de los ooquistes vacunales se administraban coccidiostáticos entre los 5-7 días postvacunación coincidiendo con el desarrollo de la esquizogonia de las cepas vacunales. Tizzer (1929) demostró que la esquizogonia es la fase más patógena del ciclo del parásito y más tarde Gardiner y Wehr (1950) concluyeron que también es la más inmunógena. Por tanto para conseguir la inmunización de los animales es necesario que se realice la formación y multiplicación de esquizontes en la cantidad adecuada para activar una respuesta inmune eficaz, pero evitando el desarrollo de un proceso clínico de coccidiosis, que desencadenaría pérdida de productividad de las aves.

### 5.1.2 Desventajas de las vacunas de cepas patógenas

Al usarse cepas patógenas era necesario minimizar el riesgo de aparición de signos clínicos e incluso bajas debido al efecto de la vacuna. Por tanto se hizo necesario el uso de coccidioestáticos para evitar la aparición de brotes de coccidiosis clínica debido a la patogenicidad de los ooquistes vacunales.

Como coccidiostático se propuso la utilización de los dos fármacos más utilizados en los años 50 y 60 frente a *Eimeria*: sulfamidas y Trithiadol. Lo cierto es que en 1955 existían muy pocas moléculas con efecto anticoccidial pero se eligieron las sulfamidas para evitar los efectos deletéreos de la vacuna ya que se pueden administrar en el agua de bebida. Los animales afectados por coccidiosis dejan de ingerir alimentos sólidos pero la ingesta de agua se mantiene incluso en procesos graves de coccidiosis aviar. Sin embargo a finales de los años 50 y comienzo de los 60 algunos autores propusieron que el Trithiadol permitía el desarrollo de la inmunidad frente a *Eimeria* mientras que las sulfamidas podían bloquear el efecto de la vacunación (Arnold y Coulston (1959), Stuart y col (1963)). Así que se decidió abandonar el uso de las sulfamidas y utilizar Trithiadol para controlar la patogenicidad de las cepas vacunales.

### 5.1.3 Vacunas comerciales de cepas patógenas

La vacunación con Coccivac MF-Coccivac-t/D siguiendo la estrategia descrita anteriormente se utilizó ampliamente en los países de mayor producción avícola del mundo como EEUU, Canadá, Argentina y Reino Unido. Hasta que en 1985 se lanzó al mercado la vacuna denominada Immucox. Se fabricó en Canadá y su presentación comercial fue una vacuna para broilers y otra para gallinas ponedoras denominadas respectivamente Immucox C1 e Immucox C2. Immucox C1 estaba constituida por cepas patógenas de *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* y *E. tenella*. Immucox C2 contenía *E. brunetti* además de las cepas patógenas de Immucox C1. Esta vacuna aportaba algunos cambios con respecto a Coccivac. En la formulación de Immucox C1 se añadieron dos cepas de *Eimeria maxima* debido a que Shirley (1985) propuso que existía una gran diversidad antigénica entre cepas de *E. maxima* aisladas en diferentes regiones geográficas. Con las dos cepas de *E. maxima* elegidas para formar parte de Immucox se pretendían generar un estado inmunidad que protegiera a los animales de cualquier cepa de *E. maxima* (Smith y col 2002).

Otra diferencia importante con respecto a Coccivac era la forma de administración de la vacuna. La solución de ooquistes vacunales se mezclaba con un gel que conseguía una solución homogénea de ooquistes. La utilización del gel intentaba solucionar uno de los problemas que fue la causa de algunos fracasos en el intento de conseguir un estado de protección frente al parásito mediante la administración de Coccivac. Los ooquistes en solución acuosa se hunden en unos pocos minutos. Por tanto la administración de Coccivac en agua de bebida no conseguía una inmunización homogénea en todo el lote de aves ya que los animales ingerían diferente cantidad de ooquistes en función de que fueran los primeros o los últimos en beber. Al añadir el gel a la mezcla de agua y ooquistes se conseguía una distribución homogénea de los ooquistes vacunales en el agua de bebida.

Por tanto, mediante la utilización del gel todos los animales ingerían una cantidad similar de ooquistes (Dasgupta y Lee, 2000), ya que la distribución de ooquistes en el agua de bebida se mantenía homogénea durante todo el tiempo que durara la vacunación. Además Immucox propuso la utilización de amprolio para prevenir la aparición de brotes clínicos de coccidiosis como consecuencia de la patogenicidad de las cepas vacunales. Amprolio se administra en el agua de bebida no se acumula en los tejidos, de hecho en la actualidad no tiene periodo de retirada, y es conocido que su efecto anticoccidial se produce sobre el 70-80% de la carga parasitaria (Mathis y McDougald 1981). Por tanto la utilización de Amprolio permite la supervivencia de suficientes esquizontes para que se complete la multiplicación de *Eimeria* y

los pollos ingieran una escasa cantidad de ooquistes de forma constante. La ingestión diaria de una pequeña cantidad de ooquistes se había demostrado como la mejor estrategia para conseguir un sólido estado de protección frente al parasito (Joyner y Norton 1973, 1976).

En la actualidad tanto Coccivac como Immucox se siguen utilizando ampliamente en explotaciones avícolas de América del Norte, América del sur, Asia y Australia aunque están siendo sustituidas por vacunas atenuadas por precocidad.

## 5.2 Vacunas atenuadas por precocidad

Este tipo de vacunas son las que más se utilizan en la actualidad y las que más éxito han tenido desde que se realiza la inmunoprophilaxis frente a la coccidiosis. La atenuación por precocidad se basa en elegir los primeros ooquistes expulsados de forma consecutiva en varios ciclos de multiplicación de *Eimeria* para conseguir una cepa menos patógena que la original.

### 5.2.1 ¿Qué son las cepas atenuadas por precocidad?

Jeffers en 1975 fue el primero en describir las líneas atenuadas por precocidad.

Tizzer (1929) describió el ciclo de las especies de *Eimeria* que infectan al pollo y a la gallina como una secuencia temporal de eventos parasitológicos. Lo que significa que se puede prever en qué fase se encuentra el parasito conociendo el tiempo transcurrido desde la infección. La excreción de ooquistes también es una secuencia temporal de forma que se ajusta a una curva similar a la campana de Gauss. La excreción del 90% de los ooquistes se realiza en un periodo de tres días, alcanzando el máximo a las 48 horas de comenzar la excreción. El estudio de Jeffers se basó en recoger los primeros ooquistes excretados e infectar pollos con esos ooquistes. Realizo esta operación a lo largo de varios ciclos de multiplicación de *Eimeria* y comprobó que al elegir siempre los ooquistes más precoces se había reducido el periodo de prepatencia y la patogenicidad de la cepa original. Jeffers realizo su trabajo con *Eimeria tenella*. Más tarde, diversos autores siguieron esta metodología para conseguir cepas precoces de todas las especies de *Eimeria* que desencadenan los procesos clínicos de coccidiosis en el pollo y en la gallina.

### 5.2.2 Características de las cepas atenuadas por precocidad

La principal característica y más importante para su desarrollo es que estos ooquistes precoces se producen por una mutación en el ADN, y por tanto, son genéticamente estables (del Cacho 2009). Esta particularidad es la que permite que estas vacunas se puedan usar con total seguridad, ya que las cepas atenuadas por precocidad no revierten a la patogenicidad.

La mutación que se produce en la selección por precocidad provoca una reducción de tamaño de los esquizontes, y como consecuencia, disminuye el número de los merozoitos que se producen en cada esquizonte. Esta particularidad acaba teniendo como consecuencia una disminución del periodo de prepatencia y de la capacidad de multiplicación de la cepa atenuada. Además como se ha comentado anteriormente es bien conocido que la esquizogonia es la fase más patógena del ciclo de *Eimeria*. Por tanto al reducir el tamaño y el número de los esquizontes se reduce la patogenicidad de la cepa. Cuanto más precoces son los ooquistes la reproducción asexual es más rápida y corta, por tanto baja el tiempo de prepatencia y la patogenicidad. El periodo de prepatencia se puede bajar de 88 a 49 horas en 15 generaciones en caso de *E. Brunetti* lo que reduce la patogenicidad de esta cepa en un 95% (Shirley 1989).

### 5.2.3 Efecto de las cepas atenuadas por precocidad en los parámetros productivos del pollo

Para comprobar la disminución de la patogenicidad de las cepas de *E. tenella* atenuadas por precocidad, Jeffers (1975) aplicó un protocolo que se sigue utilizando en la actualidad. Utilizó tres lotes de pollos que se mantuvieron en jaulas elevadas del suelo durante todo el ensayo. Las jaulas tenían como base una rejilla metálica que permitió que las heces cayeran al suelo fuera del alcance de los animales. Un grupo de pollos se infectó con la cepa patógena original. El segundo grupo se infectó con la cepa atenuada por precocidad y el tercer grupo se mantuvo sin infectar como grupo control. Se fueron tomando datos parasitológicos (número de ooquistes excretados, mortalidad por coccidiosis y valoración de las lesiones intestinales) así como parámetros productivos (ganancia en peso, peso final, ingestión de pienso e índice de conversión). Los resultados fueron muy clarificadores; mientras que la infección con la cepa

patógena desencadenó un brote de coccidiosis clínica con varios animales muertos, en los animales infectados con la cepa atenuada no se detectaron ni síntomas ni bajas debido a coccidiosis. Las lesiones mostradas en los animales infectados con la cepa atenuada fueron significativamente menores que en los animales infectados con la cepa patógena. Los parámetros de productividad fueron mejores en los animales infectados con la cepa atenuada con respecto a los animales infectados con la cepa patógena original. Además no hubo diferencia entre las características zootécnicas de los animales infectados con la cepa atenuada con respecto a los animales “control no infectados”.

Shirley y col (1986) en un experimento muy similar al de Jeffers pero utilizando *E. brunetti* comprobó que el peso final de los animales infectados con cepas precoces apenas varía del peso final de los animales control no infectados, las diferencias no fueron significativas. El estudio estadístico demostró que ninguno de los parámetros zootécnicos era diferente entre los animales infectados con cepas precoces y los animales no infectados del grupo control. Estos hallazgos se han repetido constantemente en todos los ensayos realizados por diferentes autores.

#### 5.2.4 Parámetros parasitológicos en cepas atenuadas por precocidad

Los parámetros parasitológicos más representativos son: cuantificación de lesiones en el intestino delgado y número de ooquistes expulsados (Witcombe y Smith 2014).

Las lesiones en el intestino siguen un método de clasificación internacional desarrollado por Johnson y Reid (1970), de tal forma que hace que el grado de lesión sea lo más objetivo posible para todos los científicos del mundo. En este sistema se gradúan las lesiones del cero al cuatro (sin lesión/máxima lesión). En los distintos estudios que hemos podido leer y profundizar, las lesiones a simple vista son menores en caso de los animales infectados con cepas precoces, aunque en ambos (cepas atenuadas y cepas patógenas originales) se muestran cierto grado de lesión. Esto es lógico ya que las cepas atenuadas consiguen inmunizar al animal mediante el desarrollo de una infección leve. Sin embargo, esta infección por cepas atenuadas por precocidad nunca (salvo grave inmunodepresión) llegará a suponer un problema a la hora del desarrollo del animal y su productividad (Kawaguchi y col 1987).

En cuanto a los ooquistes expulsados es uno de los parámetros más importante para saber la verdadera eficacia de la vacuna. Y, aunque las líneas precoces tienen baja capacidad de

multiplicación son muy inmunogénicas ya que producen suficientes ooquistes para desarrollar un estado de protección (Shirley y Bedrnik 1997). Esto justifica que las cepas atenuadas por precocidad activan los mecanismos inmunológicos que desencadenan un estado de protección frente a la coccidiosis aviar.

En la actualidad existen cepas atenuadas de todas las especies de *Eimeria* que infectan al pollo y a la gallina. Todas ellas se han probado para inmunizar a las aves frente a la coccidiosis y las que mejor funcionan son *E. maxima* y *E. praecox*. Las menos inmunogénicas son *E. tenella* y *E. necatrix* (Long y Johnson 1988). Sin embargo diferentes autores demuestran que todas las cepas atenuadas por precocidad mantienen un alto grado de inmunogenicidad, entre el 95 y el 100% de la cepa original

La cepa atenuada tiene potencial para activar el sistema inmunitario del hospedador, pero una patogenicidad tan baja que no llega a desarrollar manifestaciones clínicas. Únicamente animales muy inmunodeprimidos podrían presentar síntomas clínicos detectables por el cuidador (Jeffers 1975).

### 5.2.5 Utilización de las vacunas atenuadas por precocidad y vacunas comerciales

Las primeras vacunas comerciales atenuadas por precocidad se usaron distribuyéndolas en el agua de bebida intentado conseguir una distribución homogénea de los ooquistes vacunales (Chapman y Cherry 1997). Esta idea pretendía que fueran los propios pollitos los que se vacunara a sí mismos al beber y ahorrar así el tiempo y coste de la mano de obra. Por tanto las vacunas constituidas por ooquistes atenuados se empezaron a utilizar con el mismo sistema que las vacunas formadas por cepas patógenas. Y por supuesto se plantearon los problemas descritos anteriormente para las vacunas de cepas patógenas. Los ooquistes vacunales precipitaban y quedaban en el fondo del agua. Por tanto no se podía asegurar que todos los animales fueran vacunados por igual, ya que los animales enfermos o débiles tienen dificultades para acceder a la vacuna puesto que las aves compiten por el agua. Por tanto esta primera forma de vacunar tuvo que ser sustituida porque no resultó del todo satisfactoria.

Se intentó mejorar la administración de los ooquistes vacunales mediante la utilización de una solución viscosa que conseguía una distribución homogénea de los ooquistes en el agua y en la comida. Para que el tiempo de vacunación fuera corto los animales se mantenían alejados de

la comida o bebida durante horas. Pero aunque la vacuna en sí funcionaba, no alcanzaba todo el potencial que era capaz.

Así que se probó una vía bastante inusual en los animales de producción industrial. Se usó la técnica de aspersión en el ojo. Los ooquistes consiguen llegar al intestino a través de la orofaringe, que conecta con la cavidad nasal y a su vez está relacionado con la conjuntiva y conducto nasolagrimal (Chapman y Cherry 1997). Con esta técnica se consiguen buenos resultados y una protección suficiente para toda la etapa productiva de las aves. No obstante, posteriormente se desarrollaron otras formas más simples y prácticas.

En la actualidad la forma de administración más utilizada es el goteo de ooquistes vacunales vehiculizados en un medio líquido de gran densidad. El primer día de vida los pollitos se colocan en bandejas y se pasan por debajo de un dosificador que gotea los ooquistes vacunales. Antes de su utilización los ooquistes vacunales se mezclan con una solución líquida de gran densidad y que contiene saborizantes y colorantes que atraen la atención de los pollitos. Las aves ingieren la solución de estos ooquistes que ha sido goteada sobre la bandeja y sobre los pollitos. A esta solución se le añade un colorante que marca durante unas horas la cavidad bucal y la faringe de los animales que han ingerido ooquistes. Al finalizar la vacunación se hace un control mediante el contaje de los animales que presentan colorante en boca y faringe. Los diversos autores que han utilizado este método sugieren que más del 90% de los pollitos reciben la dosis vacunal adecuada para desarrollar un estado de protección frente al parásito (Lillehoj 2012).

Recientemente se ha probado la inoculación en embrión de pollo. Con ella se pretende conseguir que el animal esté protegido muy pronto, minimizando al máximo los riesgos de que aparezca un brote de coccidiosis clínica en nuestra explotación. La administración de la vacuna *in ovo* consiste en la inoculación de ooquistes vacunales en el líquido amniótico a los 18 días de incubación. Los pollitos ingieren el líquido amniótico los últimos días de incubación y de esta forma ingieren los ooquistes vacunales inoculados en el líquido amniótico. Con la inoculación *in ovo* se ahorra mucho en coste de la vacuna porque no se desperdicia nada y todas las aves reciben la dosis vacunal completa. Cabría pensar que mediante la vacunación *in ovo* todos los individuos estarían protegidos al mismo tiempo y toda la manada mostrara un estado de protección similar frente a la coccidiosis aviar. Sin embargo los resultados obtenidos por esta vía de administración no han sido muy satisfactorios. En la actualidad se desconocen las causas del fracaso de la vacunación *in ovo*. Algunos autores han propuesto que los ooquistes vacunales son ingeridos a los 19-20 días de incubación y por tanto la primera generación de

ooquistes será excretada entre el 2 y el 4 día de vida. La temperatura de confort para los pollitos de esa edad es de entre 30 y 32°C. Es una temperatura demasiado alta para que los ooquistes esporulen. Por tanto la primera generación de ooquistes no esporula o lo hace en muy baja cantidad y al detenerse la reciclación de los ooquistes vacunales los animales no se inmunizan frente al parásito.

La primera vacuna que se consiguió comercializar con atenuación por precocidad fue "Paracox" por Mallinckrodt en 1989. Esta vacuna marco un antes y un después en la producción intensiva de aves. Especialmente en la producción de gallinas ponedoras. El resto de marcas comerciales siguieron la estela de Paracox, intentando mejorar la eficiencia y eficacia de la vacuna. Paracox sustituyó a Coccivac (1950) e Inmucox (1980) que como se ha comentado anteriormente son vacunas constituidas por cepas patógenas con un alto riesgo de desencadenar brotes de coccidiosis clínica.

#### 5.2.6 Pautas de utilización y mecanismo de acción de las vacunas constituidas por cepas precoces

La llegada de las vacunas atenuadas por precocidad permitió realizar estudios experimentales con la finalidad de establecer estrategias vacunales más eficaces frente a la coccidiosis aviar. Los trabajos de diversos autores (Shirley y Millard 1986; McDonald y col 1986) demuestran que es necesario que se produzcan tres infecciones consecutivas para que los animales desarrollen un estado completo de protección frente a *Eimeria*. Las cepas patógenas tienen un periodo de prepatencia medio de 7 días. Por tanto la administración de la dosis vacunal hace que a los 7 días postvacunación los animales excreten ooquistes derivados del primer ciclo de multiplicación de los ooquistes vacunales. Los ooquistes una vez expulsados necesitan al menos dos días para esporular y hacerse infectivos. Los pollos ingieren los ooquistes esporulados al comer o picotear en el suelo y así se produce la segunda infección. La tercera infección debido a los ooquistes vacunales se produce cuando los ooquistes de la segunda infección esporulan después haber sido excretados por los pollos. El estado de máxima protección se alcanza en el curso de la esquizogonia de la tercera infección consecutiva. Esto significa que si la vacuna se administra el primer día de vida los animales no estarán completamente protegidos hasta los 19-21 días de vida. Las cepas precoces se caracterizan porque el periodo de prepatencia es más corto.

Así que se algunos autores (Long y Johnson 1988) sugieren que los animales vacunados con cepas precoces el primer día de vida están completamente protegidos frente a *Eimeria* entre los 15-17 días de vida.

Hay que tener muy en cuenta que la estrategia de vacunación frente a la coccidiosis aviar previene contra la enfermedad pero nunca contra la infección. Es decir, es lógico que después de la vacunación nos encontremos ooquistes circulando por nuestra explotación ya que la vacunación no pretende terminar con el parásito, sino prevenir contra los síntomas clínicos. Además esta circulación continua de ooquistes es positiva, ya que si tenemos toda la explotación vacunada sólo circularán ooquistes de cepas atenuadas, y por tanto se realizarán reinfecciones continuas y los animales se estarán autovacunando continuamente (Shirley 1989).

Es importante remarcar que si se decide tratar con esta vacuna está totalmente desaconsejado usar coccidiostáticos, ya que anularía completamente el efecto de la vacuna. Como hemos dicho, la vacuna basa su éxito en una continua reinfección con una cepa que es muy poco patógena para el animal. Si utilizamos coccidiostáticos pararemos el ciclo de multiplicación y los animales no se inmunizarán adecuadamente frente a *Eimeria* (Chapman 2000).

Como consecuencia del mecanismo de funcionamiento de la vacuna atenuada por precocidad es imprescindible que las aves tengan la crianza en el suelo, para facilitar el ciclo coccidial. Así mismo el sistema de producción tiene que seguir la mecánica del todo dentro/todo fuera. Asegurando así que no existe contaminación de unas camas con otras y todos los animales están perfectamente vacunados. Además es necesario que la cama de los animales vacunados mantenga una humedad relativa del 60-70% para permitir la esporulación de los ooquistes.

### 5.2.7 Alternancia de vacunación y coccidiostáticos

En los últimos años se ha comprobado que la utilización masiva de los coccidiostáticos ha facilitado el desarrollo de numerosas cepas de *Eimeria* resistentes a todas las moléculas utilizadas contra el parásito (Chapman 1994). Se ha podido comprobar que en pocos meses la mayoría de las cepas de *Eimeria* de una explotación presentan una resistencia parcial a varios coccidiostáticos (Chapman 2014). El avance hacia la resistencia completa a un coccidiostático se hace más lento cuando se cambia el fármaco. Especialmente si la nueva molécula presenta un mecanismo de acción frente al parásito diferente al del coccidiostático sustituido. Sin

embargo la única forma de reducir, e incluso eliminar, la resistencia a coccidiostáticos es evitar la relación del parásito con los coccidiostáticos. Basándose en estos conocimientos Chapman (2000) propuso una nueva estrategia frente a la coccidiosis. La alternancia de coccidiostáticos y vacuna. Este autor propuso la rotación de 4 coccidiostáticos desde octubre a mayo y la utilización de vacuna de junio a octubre. La utilización de 4 coccidiostáticos diferentes a lo largo de 8 meses dificulta la aparición de cepas resistentes. Sin embargo es seguro que en 8 meses se desarrollara cierta resistencia a coccidiostáticos. Por tanto, Chapman (2000) propone la utilización de vacuna durante 4 meses para evitar la relación del parásito con los coccidiostáticos durante el tiempo suficiente para hacer desaparecer la resistencia a los fármacos. Este método de alternancia de coccidiostáticos y vacuna es impecable en cuanto a su planteamiento teórico pero muy difícil de llevar a la práctica ya que requiere demasiados cambios de pienso y de manejo de los animales. Su adaptación a la producción industrial del pollo de carne ha consistido, en la mayoría de los casos, en hacer una rotación de coccidiostáticos y vacuna cada 6 meses. De noviembre a finales de abril se utilizan coccidiostáticos y de mayo a finales de octubre se utiliza vacuna. De forma empírica se ha comprobado que este método funciona muy bien ya que la vacunación disminuye hasta hacer desaparecer la resistencia a coccidiostáticos. Diferentes empresas productoras de carne de pollo han manifestado que los lotes de broilers que se crían después del periodo de vacunación muestran una mejora muy significativa en sus características productivas con respecto a los lotes que se producen el resto del año (Witcombe y Smith 2014).

### 5.3 Vacunas atenuadas mediante adaptación a embrión de pollo

Es conocido que numerosos agentes patógenos pueden ser atenuados mediante pases en embrión de pollo. Por tanto algunos autores intentaron este sistema de atenuación con cepas de *Eimeria*. El primer problema que se encontraron es que era necesario adaptar la cepa de *Eimeria* a las características físicas y bioquímicas del embrión de pollo que son muy diferentes a las condiciones habituales de multiplicación del parásito en las células epiteliales del intestino.

#### 5.3.1 Atenuación por adaptación a embrión de pollo

El método de atenuación en embrión de pollo está descrito en los trabajos de Nakai y Ogimoto (1987) y Shirley y Bedrnik (1997). Se inocularon  $1 \times 10^3$  esporozoitos en cada embrión. A partir

de ahí, los embriones que morían antes de los tres días postinoculación se desechaban para el estudio, sin embargo, los que morían a partir del cuarto día se consideraban como baja a causa de la infección de *Eimeria*. En los primeros pases los autores debían de recoger los merozoitos y volver a inocularlos ya que la cepa de *Eimeria* no podía llegar a la gametogonia. Cuando la cepa de *Eimeria* se adaptó para llegar a la gametogonia el problema fue que los macrogametos no eran fecundados por los microgametos. Cuando algunas cepas se adaptaron a las condiciones del embrión de pollo y fueron capaces de completar la fase endógena del ciclo coccidial en la membrana corioalantoidea hicieron falta cuarenta y cuatro ciclos para conseguir la atenuación del parásito (Nakai y Ogimoto 1987). Utilizando un protocolo similar al descrito por Nakai y Ogimoto (1987) numerosos autores han intentado la atenuación de todas las especies de *Eimeria* que desencadenan la coccidiosis del pollo y de la gallina pero únicamente se han podido atenuar cepas de *E. tenella*.

### 5.3.2 Vacuna con *E. tenella* atenuada por adaptación a embrión de pollo

En 1992 se lanzó al mercado una vacuna que contenía cepas atenuadas por precocidad (*E. acervulina*, *E. maxima* y *E. necatrix*) y una cepa de *E. tenella* atenuada mediante pases en embrión de pollo. Livacox fue la denominación comercial de esta vacuna.

Se han realizado numerosas pruebas de campo y se ha podido comprobar que Livacox presenta un grado de atenuación y eficacia similar a otras vacunas constituidas por cepas atenuadas por precocidad. Los animales vacunados presentan un buen estado de protección frente al parásito y muestran excelentes parámetros productivos y parasitológicos en caso de infección con *Eimeria*. Sin embargo, la utilización de Livacox a lo largo de estos años ha demostrado que la atenuación mediante pases en embrión de pollo no es genéticamente estable. Se ha comprobado que las cepas de *E. tenella* adaptadas a embrión de pollo revierten a la patogenicidad mediante infecciones consecutivas en broilers (Nakai y Ogimoto 1987). La utilización de las vacunas frente a la coccidiosis constituidas por parásito vivo está basada en que la inmunización de los animales se consigue mediante infecciones consecutivas a partir de la ingesta de ooquistes vacunales. Por tanto la utilización de Livacox conlleva el riesgo de que la cepa vacunal de *E. tenella* revierta a la patogenicidad en el curso del proceso de inmunización de los animales, incluso antes de que hayan desarrollado un estado completo de protección frente al parásito.

## 5.4 Vacuna constituida por subunidades antigénicas de *Eimeria*

Este tipo de vacunas se basan en un principio biológico conocido desde hace tiempo. Y es la transmisión de protección de la madre al pollito frente a ciertas enfermedades. Wallach y col (1992) propusieron que los pollitos de aquellas gallinas que habían sido infectadas con cepas de *Eimeria* mostraban prácticamente un 100% de inmunidad contra el parásito. A pesar de que este dato no ha sido confirmado por otros autores, Wallach y col (1992) sugirieron que con la inmunización de las madres se podría conseguir que los pollitos estuvieran protegidos frente a *Eimeria* sin ninguna otra protección adicional. Esta estrategia de protección frente a la coccidiosis ahorraría muchos costes en material y mano de obra; ya que no haría falta vacunar los pollitos.

La idea principal propuesta por Wallach y col (1995) es que con la protección que otorga la transmisión maternal de anticuerpos frente a *Eimeria*, el sistema inmune del pollito será capaz de hacer frente a los ooquistes patógenos que pueda ingerir en los primeros días de vida. Una pequeña parte de los ooquistes ingeridos completaran el ciclo de multiplicación y reforzaran el estado de protección frente al parásito.

Es un planteamiento que en teoría debería de funcionar. Sin embargo, tiene un serio problema; este sistema sólo funciona si los pollitos ingieren una escasa cantidad de ooquistes. Si los animales ingieren una gran cantidad de ooquistes, el aún inmaduro sistema inmune del pollito, se ve superado y se produce un brote clínico de coccidiosis aviar. Así pues, esta profilaxis funciona en explotaciones con un buen estatus sanitario y medidas extremas de limpieza. Pero aunque la explotación tenga pocos antecedentes de coccidiosis clínica difícilmente podremos asegurar que siempre haya la cantidad de ooquistes que le conviene a la vacuna.

### 5.4.1 Desarrollo y mecanismo de acción de la vacuna de subunidades

Una vez conocida y probada la forma de transmisión de la protección frente a *Eimeria* de la madre al pollito hacía falta diseñar la forma de llevarla a cabo a nivel comercial. Los autores propusieron que la opción más adecuada sería aislar antígenos de *Eimeria* para inmunizar a las madres. Tenían que ser antígenos que desencadenaran una respuesta inmune humoral eficaz frente al parásito. Esto suponía un gran reto porque había que buscar cuáles eran los antígenos responsables de la inmunidad frente a *Eimeria* para poder replicarlos. Wallach y col

(1995) publicaron que los antígenos responsables de la inmunidad frente a *Eimeria* eran pocos y además muy fáciles de replicar y reproducir para conseguir una vacuna comercial. Por tanto Wallach y su equipo desarrollaron la primera vacuna comercial compuesta por subunidades antigénicas de *Eimeria*. Y en 2002 la lanzaron al mercado con la denominación comercial de Coxabic.

Los antígenos que componen la vacuna se aíslan a partir de los gametocitos de *Eimeria*. La inoculación de estos antígenos producen anticuerpos que bloquean el desplazamiento de las vesículas que contienen las proteínas que forman la pared del ooquiste. La capacidad de los anticuerpos para bloquear el movimiento de estas vesículas impide que se complete de forma adecuada la pared del ooquiste (Belli y col 2009). Las alteraciones morfológicas o estructurales de la pared quística hacen que los ooquistes no puedan esporular y por tanto mueren en un periodo muy corto de tiempo una vez que son expulsados a través de las heces (Belli y col 2009). Hay que destacar que esta estrategia de inmunización está destinada a disminuir la viabilidad de los ooquistes pero no interfiere en la esquizogonia. Como se ha comentado anteriormente la esquizogonia es la fase más patógena pero también la más inmunógena del ciclo de *Eimeria*; permitiendo el desarrollo de los esquizontes se corre el riesgo de sufrir lesiones intestinales pero es el único método para que los pollitos desarrollen un estado de protección frente al parásito.

En la estrategia de inmunización diseñada mediante la administración de Coxabic es imprescindible el desarrollo de la respuesta inmune humoral para activar la síntesis de anticuerpos específicos contra los antígenos vacunales. Por tanto el mejor control que se puede establecer para comprobar si la vacunación se ha realizado correctamente es cuantificar la tasa de anticuerpos generados por la vacuna. La técnica de elección para medir la tasa de anticuerpos en suero de las gallinas vacunadas es la aplicación de la técnica ELISA (Ziomko y col 2005).

## 5.4.2 Utilización de la vacuna de subunidades

La vacuna se administra mediante inoculación intramuscular antes de que la gallina empiece su etapa vital de producción de huevos. En la mayoría de los casos la administración de dos dosis vacunales es suficiente para activar la síntesis de anticuerpos durante toda la vida productiva de la gallina (Ziomko y col 2005).

En los distintos estudios realizados con este tipo de vacunas no se ha visto ninguna cambio adverso en las madres; ni en términos productivos y reproductivos, ni de salud del propio individuo. De tal forma estas vacunas se puede decir que son seguras a corto y largo plazo para las madres progenitoras (Wallach y col 2008).

En cuanto a los resultados en los pollitos de esas madres vacunadas se puede decir que experimentalmente son satisfactorios; expulsan menos ooquistes que los no vacunados y las lesiones intestinales son menores. Pero en algunas ocasiones se observan síntomas clínicos y bajas por coccidiosis. Los parámetros productivos de los pollitos de gallinas vacunadas fueron positivos, en prácticamente todos los experimentos que hemos tenido acceso para realizar esta revisión bibliográfica. Principalmente en los parámetros más importantes y que más se miden: índice de conversión, crecimiento diario y peso final.

Sin embargo, la utilización de Coxabic en explotaciones de broilers ha demostrado que es una estrategia de vacunación con altas posibilidades de error. Se han descrito fallos en la eficacia de Coxabic en diferentes países como Dinamarca, Alemania y Francia (Lillehoj 2012). La causa del fallo de esta vacuna es el alto número de ooquistes que hay en todas las explotaciones de aves. La protección maternal dura de 7 a 10 días, luego es el propio sistema inmune del broiler el que se tiene que defender contra la enfermedad causada por *Eimeria* (Ziomko y col 2005; Wallach y col 2008). Así pues, esta profilaxis funciona si los pollos ingieren poco a poco los ooquistes de *Eimeria*; en aquellas explotaciones con un buen estatus sanitario. Pero aunque la explotación tenga pocos antecedentes de problemas con *Eimeria* el riesgo de que aparezca un brote de coccidiosis clínica es muy alto.

## 6. Conclusiones

1. La coccidiosis es la enfermedad parasitaria más importante en la avicultura.
2. La aparición de resistencias a la quimioprofilaxis hacen imprescindibles la prevención con vacunas.
3. La vacunación con cepas patógenas ha quedado obsoleta.
4. La principal forma de inmunoprofilaxis contra la coccidiosis aviar es la utilización de vacunas atenuadas por precocidad.
5. La característica más importante para la seguridad de estas vacunas es la estabilidad genética.
6. La vacunación por inmunidad maternal es una buena forma de prevención en lugares muy controlados, pero peligrosa para la mayoría de explotaciones.
7. La atenuación en embrión de pollo no tiene estabilidad genética y por tanto es peligrosa porque revierte su atenuación.

## Conclusions

1. Coccidiosis is the most important parasitic disease in poultry farming.
2. The emergence of resistance to chemoprophylaxis makes prevention with vaccines essential.
3. Vaccination with pathogenic strains has become obsolete.
4. The main immunoprophylaxis strategy against avian coccidiosis is the use of attenuated vaccines by precocity.
5. The most important characteristic for the safety of these vaccines is genetic stability.
6. Vaccination by maternal immunity is a good strategy for prevention in very controlled places, but dangerous for most farms.
7. Chicken embryo attenuation has no genetic stability and is therefore dangerous because it reverses its attenuation.

## 7. Valoración personal

Este trabajo me ha permitido adentrarme en dos campos diferentes. Por un lado profundizar en las técnicas para realizar una revisión bibliográfica; búsqueda de información, canales de comunicación científica, síntesis de contenidos, organización de documentos etc. Y por otro lado me ha servido para profundizar en el conocimiento de las enfermedades parasitarias y de la avicultura.

Este tipo de trabajos ayudan a conocer la complejidad de la investigación y cuáles son los métodos y canales internacionales para la divulgación de los conocimientos científicos.

Por otro lado también ha supuesto un reto para mí, al enfrentarme a un trabajo desde cero, distinto al pensado primeramente, y con el reloj de finalización puesto en marcha. Sirve para mejorar los valores de responsabilidad y esfuerzo.

Pero principalmente quisiera agradecer al tutor, Emilio del Cacho, por su confianza puesta en mí, por creer que este reto era posible y por atreverse a realizarlo conmigo. Sin él esto no hubiera sido posible.

## 8. Bibliografía

Arnold A.A., Coulston F. 1959. A laboratory evaluation of the effect of the coccidiostat, trithiadol® on the growth of chickens. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 15: 475-486

Bachman G. W. 1930. Serological studies in coccidiosis of rabbits. *American Journal of Hygiene*, 12: 624–640.

Becker E. R. 1935. The mechanism of murine coccidiosis. *American Journal of Hygiene* 21: 389–401.

Belli S.I., David J.P. Ferguson, Katriba M., Slapetova I., Mai K., Slapeta J., Flowers S.A., Miska K.B., Tomley F.M., Shirley M.W., Wallach M.G, and Smith N.C. 2009. Conservation of proteins involved in oocyst wall formation in *Eimeria maxima*, *Eimeria tenella* and *Eimeria acervulina*. *Int J Parasitol* 10: 1063–1070.

Biarnés S. M, Borrell Valls J, Domínguez Bartes F, et al. 2006. Higiene y patología aviar: 190-211.

Burnet F. M., Stone J. D., Edney M.A. 1950. *J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 28: 291

Campos Rodríguez R. 2011. Selecciones avícolas: La coccidiosis en el pollo de carne. *Métodos actuales de control*: 19-23.

Chapman, H.D. 1994. Sensitivity of field isolates of *Eimeria* to monensin following the use of a coccidiosis vaccine in broiler chickens. *Poult. Sci.* 73: 476–478.

- Chapman, H.D. 2000. Practical use of vaccines for the control of coccidiosis in the chicken. *World Poultry Sci. J.* 56: 7–20.
- Chapman H.D. 2014. Vaccination of chickens against coccidiosis ameliorates drug resistance in commercial poultry production. *International Journal of Parasitology*, 4: 214–217.
- Chapman H.D., Cherry T.E. 1997. Comparison of two methods of administering live coccidiosis vaccines to newly hatched chicks: infectivity and development of immunity to *Eimeria* species. In: Shirley, M.W., Tomley, F.M., Freeman, B.M. (Eds.). *Control of Coccidiosis into the Next Millennium*, VIIth International Coccidiosis Conference, Institute for Animal Health, Compton, Newbury: 133.
- Dasgupta T. and Lee E.H. 2000. A gel delivery system for coccidiosis vaccine: uniformity of distribution of oocysts. *Can Vet J.* Aug, 41: 613–616.
- Del Cacho E. 2009. Mecanismos inmunológicos de la coccidiosis aviar. 46º Symposium científico de avicultura. Zaragoza: 121-131.
- Del Cacho E., Pagés M. 2014. Coccidiosis: La enfermedad, consecuencias y tratamiento. *Selecciones avícolas*, 56: 13-17.
- Gardiner T.L. and Wehr E.E. 1950. Selecting experimental groups of chicks by weight. *Proc. Helminthol. Soc. Wash*, 17: 25-26.
- Glick B. C. 1954. State University, Columbus: The bursa of Fabricius and antibody production: 1-102.
- Jeffers TK. 1975. Attenuation of *Eimeria tenella* through selection for precociousness. *J Parasitol*, 61: 1083-1090.
- Johnson J., Reid W.M. 1970. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp Parasitol*, 1: 30-36.
- Joyner L.P., Norton C.C. 1973. The immunity arising from continuous low-level infection with *Eimeria tenella*. *Parasitology* 67: 333-40.
- Joyner L.P., Norton C.C. 1976. The immunity arising from continuous low-level infection with *Eimeria maxima* and *Eimeria acervulina*. *Parasitology* 72: 115-25.
- Kawaguchi H., Konidhi T., Nakamura T. 1987. Characteristics of a precocious line of *Eimeria tenella*: pathogenicity and endogenous development. *Jpn. J. Vet. Sci.* 50: 445-452.
- Lillehoj H. S. 2012. Approaches to improve poultry vaccination using novel poultry adjuvants against coccidiosis. "Recent Update on Poultry Vaccination" Meeting Abstract: 14.
- Long P.L., Johnson J.k. 1988. *Eimeria* of American chickens: characteristics of six attenuated strains produced by selection for precocious development. *Avian pathology*, 17: 305-314.
- Martínez-Alesón Sanz R. 2011. Nuestra cabaña. *Clínica avícola: en una integración avícola*: 85-87.
- Mathis G.F., McDougald L.R. 1981. Effect of amprolium and dinitolmide on sporulation of oocysts of field isolates of *Eimeria acervulina*. *Parasitology*, 83: 281-4.
- McDonald V., Rose M.E., Jeffers TK. 1986. *Eimeria tenella*: immunogenicity of first generation of schyzogony. *Parasitology*, 93: 1-7.

- Mcdougald L.R., Jeffers T.K. 1976. Comparative in vitro development of precocious and normal strains of *Eimeria tenella* (Coccidia). J. Protozool, 23: 530-534.
- McDougald L.R., Fitz-Coy S. 2008. La coccidiosis. 12<sup>a</sup> ed. YM Saif, ed. Blackwell Publishing, Ames, IA: 1068-1085.
- Nakai Y., Ogimoto K. 1987. Attenuation of *Eimeria tenella* by serial passage in chicken embryos. Jpn. J. Vet. Sci, 49: 245-249.
- Shirley M.W. 1985. New methods for the identification of species and strains of *Eimeria*. Research in avian coccidiosis. In: McDougald, L.R. (ed.) Proc. Georgia Coccidiosis Conf., 18: 1–35.
- Shirley M.W. 1989. Development of a live attenuated vaccine against coccidiosis of poultry. Parasite immunology 11: 117-124.
- Shirley M.W., Bedrnik P. 1997. Live attenuated vaccines against avian coccidiosis: success with precocious and egg-adapted lines of *Eimeria*. Parasitology today, 13: 481-484.
- Shirley M.W., Bellati M.A. 1998. Live attenuated coccidiosis vaccine: selection of a second precocious line of *Eimeria maxima*. Research in veterinary science, 44: 25-28.
- Shirley M.W., McDonald V., Bellati M.A. 1986. *Eimeria brunette*: selection and characteristics of a precocious (and attenuated) line. Avian pathology, 15: 705-717.
- Shirley M.W., Millard B.J. 1986. Studies on the immunogenicity of seven attenuated lines of *Eimeria* given as a mixture to chickens. Avian pathology, 15: 629-638.
- Shirley M.W, Smith A.L, Blake D.P. 2007. Challenges in the successful control of the avian coccidia. Vaccine 25: 5540-5547.
- Smith A.L., Hesketh P., Archer A. and Shirley M.W. 2002. Antigenic Diversity in *Eimeria maxima* and the Influence of Host Genetics and Immunization Schedule on Cross-Protective Immunity. Infect Immun. 70: 2472–2479.
- Stuart E.E., Bruins H.W., Keenum R.D. 1963. The immunogenicity of a commercial coccidiosis vaccine in conjunction with Trithiadol and Zoalene. Avian Dis.Feb, 7: 12-18.
- Torrubia Díaz F.C., Gómez Martínez C., et al. 2014. Vacunación en Avicultura. Servet: 153-168.
- Tyzzer E. E. 1929. Coccidiosis in gallinaceous birds. American Journal of Hygiene 10: 269–383.
- Wallach M.G., Ashash U., Michael A., Smith N.C. 2008. Field application of a subunit vaccine against an enteric protozoan disease. PLoS ONE 3(12), e3948. doi:10.1371/journal.pone.0003948
- Wallach M.G., Halabi A., Pillemer G., Sar-Shalom O., Mencher D., Gilad M., Bendheim U., Danforth H.D., Augustine P.C. 1992. Maternal immunization with gametocyte antigens as a means of providing protective immunity against *Eimeria maxima* in chickens. Inf. Immun, 60: 2036–2039.
- Wallach M., Smith N.C., Petracca M., Miller C.M.D., Eckert J., Braun R. 1995. *Eimeria maxima* gametocyte antigens: potential use a subunit maternal vaccine against coccidiosis in chickens. Vaccine 13: 347-354.
- Witcombe D.M., Smith N.C. 2014. Strategis anti-coccidial prophylaxis. Parasitology 141: 1379-1389.
- Ziomko I., Karamon J., Cencek T., Gornowicz E., Skoracki A., Ashash U. 2005. Prevention of broiler chick coccidiosis using the inactivated subunit vaccine coxabic. Bull vet inst pulawy, 49: 299-302