

Hallazgo de *Eimeria tenella* en células epiteliales de la bolsa de Fabricio

Xóchitl Hernández Velasco*
Marco A. Juárez Estrada*
Norma Calderón Apocada*
Guillermo Téllez Isafías*

Abstract

This paper describes the observations during an experiment designed to study the response of polymorphonuclear leukocytes in *E. tenella* infections with chickens treated with 5-fluorouracil as a granulocytopenic agent. One hundred and twenty broilers were randomly assigned into the following 4 groups of 30 birds each: Group 1, control group or white group; Group 2 treated with 200 mg/kg body weight of 5-fluorouracil (5-FU); Group 3 infected orally with 5,000 sporulated oocysts of *Eimeria tenella*, and Group 4 infected with *E. tenella* after 5-FU treatment. *E. tenella* was given to 5 chicks in each group at one of the following days: 2, 4, 6, 8, 10 and 12, 5-FU postinoculation (17 days of age). Seven days postinfection, histopathologic preparations of several organ tissues were made. Several life-stages of *E. tenella* were observed in the bursa of Fabricius in 25 and 24 chickens in Groups 3 and 4, respectively. Moderate or severe epithelial hyperplasia, subepithelial mononuclear infiltrate, and occasionally intraepithelial cysts were associated with the developing parasites.

KEY WORDS: *EIMERIA TENELLA*, *BURSA OF FABRICIUS*, *BROILERS*.

Resumen

En el presente trabajo se describen observaciones realizadas durante un experimento diseñado para estudiar el comportamiento de los leucocitos polimorfonucleares en infecciones con *E. tenella* en pollos tratados con 5-FU como agente granulocitopénico. Ciento veinte pollitos de engorda fueron asignados en 4 grupos con 30 pollitos cada uno: 1) testigo blanco, 2) tratado con 200 mg/kg de peso de 5-fluorouracilo (5-FU), 3) infectado oralmente con 5 000 ooquistes esporulados de *Eimeria tenella* y 4) infectado con *E. tenella* después del tratamiento con 5-FU. Se administró *E. tenella* a 5 pollos de cada grupo a los días: 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días posinoculación con 5-FU (17 días de edad). Siete días posinfección con *E. tenella* se tomaron muestras de tejidos de varios órganos, para su estudio histológico. Se observaron coccidias en diferentes estados de desarrollo en 25 y 24 pollos en los grupos 3 y 4 respectivamente. Se observó hiperplasia epitelial moderada a severa, infiltrado mononuclear en el subepitelio, y algunos quistes intraepiteliales, que fueron asociados con la presencia del parásito. Este hallazgo muestra que bajo ciertas circunstancias *E. tenella* es capaz no sólo de invadir el epitelio de la bolsa de Fabricio, sino también de desarrollarse en él.

PALABRAS CLAVE: *EIMERIA TENELLA*, BOLSA DE FABRICIO, POLLO DE ENGORDA.

Recibido el 14 de agosto de 1998 y aceptado el 4 de diciembre de 1998.

*Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

Introducción

La coccidiosis es una parasitosis causada por protozoarios del género *Eimeria* que debido a la explotación intensiva de las aves ha permanecido como una de las enfermedades económicamente más importantes para la industria avícola mundial¹.

Las *Eimeria* son parásitos con un alto grado de especificidad; son específicas de hospedero, infectan tejidos, órganos y regiones particulares, así como células específicas dentro de un tejido. Las especies de *Eimeria* que afectan a los pollos se caracterizan por parasitar diferentes regiones del intestino². Dentro del ciclo reproductivo, cada estado del desarrollo de una especie puede ser específico de ciertas regiones del intestino y para diferentes tipos celulares dentro de esa región³.

E. tenella se distingue de las demás especies de *Eimeria* que afectan a las aves, por localizarse en el epitelio, lámina propia, túnica y criptas de los ciegos⁴.

Con el propósito de confirmar la especificidad de *E. tenella* para invadir el ciego, se han administrado ooquistes por vía intravenosa, intramuscular o intraperitoneal, resultando en infecciones en la misma área del intestino en que se desarrolla cuando el parásito es administrado por la vía natural de infección⁵⁻⁸.

Joyner⁹ propuso que el intervalo entre las infecciones con ooquistes y la liberación de los esporozoitos estaba relacionado con el sitio específico de invasión de cada especie. Sin embargo, otros estudios atribuyen la gran especificidad con la que *E. tenella* invade el epitelio del ciego a la presencia de epitopos comunes en los esporozoitos de *E. tenella* y en las células del epitelio cecal. Estas moléculas fueron identificadas por medio de anticuerpos monoclonales y se sugiere que participan en la orientación de los esporozoitos hacia el sitio de invasión¹⁰.

En el presente trabajo se describe el hallazgo de diferentes estados de desarrollo de *E. tenella* en el epitelio de la bolsa de Fabricio (BF), en las aves tratadas con 5-FU como inductor de granulocitopenia y posteriormente infectadas con el parásito, así como en las que únicamente fueron infectadas con el parásito; de igual manera, se describen las lesiones que están asociadas a la presencia del parásito.

Material y métodos

En el Departamento de Producción Animal: Aves (DPA:Aves), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, se utilizaron 120 pollos de un día de edad, de la estirpe Peterson X Avian Farm, provenientes de una incubadora comercial. Los pollos fueron criados en jaulas

con calefacción eléctrica, dispuestas en batería* en una de las unidades de aislamiento del DPA:Aves. Las aves fueron alimentadas con una dieta balanceada estándar sin coccidiostato y agua ad libitum a lo largo del estudio. Al día 14 de edad se realizó una prueba de flotación con heces. A los 15 días de edad los pollos se distribuyeron en 4 grupos de 30 aves cada uno. También en forma aleatoria se les asignó uno de los siguientes tratamientos: 1) testigo (grupo no tratado y no infectado), 2) 5-FU, 3) *E. tenella*, 4) 5-FU/*E. tenella*.

A los 17 días de edad a cada ave de los grupos 2 y 4 se les administró por vía intravenosa en la vena yugular 5-fluorouracilo (5-FU) a dosis de 200 mg/kg de peso, mientras que a las aves de los grupos 1 y 3 se les aplicó por la misma vía solución fosfatada buferada (SFB) estéril con pH de 7.4 en un volumen promedio de 2 ml. A uno de seis diferentes días (2, 4, 6, 8, 10 y 12 días postratamiento con 5FU), 5 aves de cada uno de los grupos 3 y 4 fueron inoculadas con 5 000 ooquistes esporulados de *E. tenella* en un volumen de 2 ml, mientras que las aves de los grupos 1 y 2 fueron inoculadas con un volumen igual de SFB estéril. Se utilizó una cepa de *E. tenella* proveniente de campo, moderadamente patógena, los ooquistes fueron cosechados, esporulados en el DPA: Aves. El inóculo fue cuantificado en hemocitómetro y se administró por vía oral por medio de una cánula que se introdujo hasta el buche de cada pollo. A los siete días posinfección, las aves fueron sacrificadas y se tomó una sección transversal de la zona media de 2 mm de espesor de la zona media de la BF, además de muestras de otros tejidos (ciego, hígado, bazo, riñón y timo). Los tejidos fueron fijados en formalina al 10% amortiguada, procesados y teñidos con hematoxilina-eosina, para su estudio histológico.

En las pruebas de flotación con heces no se encontraron ooquistes, con lo cual se confirmó que las aves estaban libres de coccidias antes de iniciar la prueba.

No se observaron lesiones macroscópicas o microscópicas, ni coccidias en las muestras de hígado, bazo, riñón y timo de las aves de todos los grupos, así como en los ciegos y las BF pertenecientes a las aves de los grupos que no fueron infectados con el parásito.

Los ciegos de las aves infectadas tenían una cantidad excesiva de coccidias que invadían el epitelio, criptas intestinales y lámina propia. Mientras que en el epitelio de la BF en 24 de 30 aves tratadas y en 25 de 30 no tratadas con el fármaco pero infectadas con el parásito (Cuadro 1), se observó gran cantidad de *E. tenella* en diferentes estados de desarrollo, hiperplasia epitelial leve a moderada, presencia de algunos quistes intraepiteliales, infiltración mononuclear en el subepitelio de leve a moderada y focos de necrosis coagulativa (Figuras 1 y 2).

Discusión

A pesar del alto grado de especificidad de *E. tenella* al tejido que parasita, bajo condiciones de inmunodepresión, infecciones masivas o con cepas

* Petersime Brood-Unit, Incubator Company Getsburg, Ohio, USA.

Cuadro 1

FRECUENCIA DE EIMERIA TENELLA EN LA BOLSA DE FABRICIO DE POLLOS INFECTADOS CON EL PARÁSITO A DIFERENTES DÍAS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE 5-FLUOROURACILO

	Día de infección con <i>E. tenella</i> * postratamiento con 5-fluorouracilo						
Grupos	2	4	6	8	10	12	Total
PBS/ <i>E.t.</i>	3/5	4/5	4/5	5/5	5/5	4/5	25/30
5-FU/ <i>E.t.</i>	4/5	4/5	5/5	3/5	4/5	4/5	24/30

*5 000 ooquistes esporulados administrados por vía oral

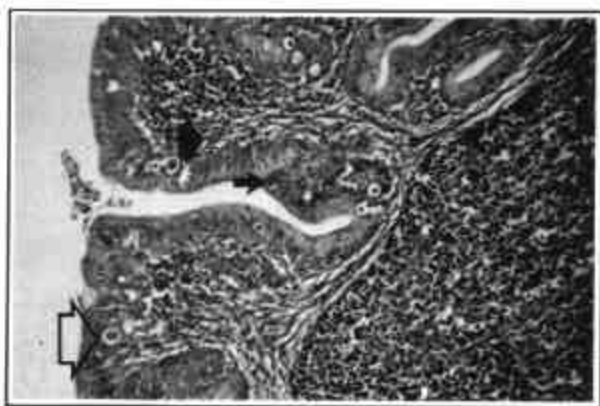


Figura 1. Corte histológico de la bolsa de Fabricio de un pollo infectado con *Eimeria tenella*. Se observa hiperplasia epitelial moderada (flecha negra delgada), infiltrado mononuclear moderado en el subepitelio (flecha negra ancha), la flecha con contorno negro muestra un macrogametocito maduro. Tinción hematoxilina-eosina, 40X.

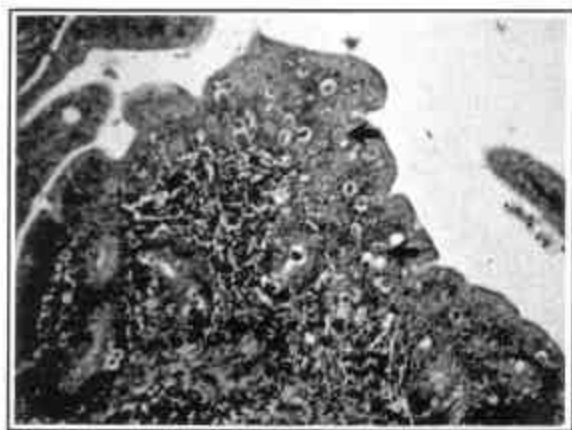


Figura 2. Zona con hiperplasia epitelial severa e infiltrado mononuclear severo subepitelial en la bolsa de Fabricio de un pollo infectado con *Eimeria tenella*. Se observa gran número de coccidias en diferentes estados de desarrollo; el estado con gránulos oscuros en la periferia son macrogametocitos (flechas negras pequeñas). Tinción hematoxilina-eosina, 40X.

altamente virulentas, los sitios de invasión pueden ser diferentes; ocasionalmente cuando se presenta una fuerte infección o se practica una tiflectomía se ha observado que *E. tenella* puede invadir el intestino grueso¹¹. En ausencia de factores inmunológicos del hospedero muchas especies son capaces de completar sus ciclos de vida en cultivos celulares con pérdida de la especificidad^{3,12}. El parásito también ha completado su ciclo endógeno en hospederos inespecíficos inmunocomprometidos que han sido tratados con dexametasona¹³, hidrocortisona y ciclosporina A^{14,15}, sílica¹⁶, así como en aves atímicas¹⁷.

Existen pocos estudios que describen la presencia de coccidias en el epitelio de la bolsa de Fabricio; uno de ellos describe la presencia de pocas coccidias de *E. brunetti* en pollos gnotobióticos¹⁸; al igual que Anderson et al.¹⁹ notificaron la presencia de *E. tenella* tanto en aves inoculadas con el virus de la BF, así como en aves que sólo habían sido infectadas con el parásito; la presencia de *E. tenella* en la BF fue atribuida a una infección severa, relacionada con alta mortalidad y solamente se observó hiperplasia epitelial como una lesión asociada a la presencia del parásito en la BF. En el presente estudio no se presentó mortalidad asociada a la infección con *E. tenella*, pero sí se observó hiperplasia epitelial en diferentes grados de severidad como una lesión asociada a la presencia del parásito en la BF; además de infiltrado linfocitario interfolicular leve, la presencia de algunos quistes intraepiteliales y focos de necrosis coagulativa atribuibles posiblemente a una lesión tisular por el parásito y a una invasión bacteriana posterior.

Los esporozoitos de *E. tenella* son capaces de invadir una variedad de cultivos celulares de riñón, embrión de pollo y tejidos de otras aves in vitro, pero los esquizontes se desarrollan principalmente en células epiteliales al igual que los gametocitos²⁰. Las células de riñón comúnmente utilizadas en los cultivos carecen de las moléculas notificadas por Vervelde et al.,¹⁰ por lo que es muy probable que existan otros mecanismos involucrados en el proceso de invasión. Probablemente existan también receptores en el epitelio de la BF; sin embargo, esto no se estudió y sólo se menciona la presencia de estos epitopos

en el colon proximal, aunque en mucho menor cantidad que en el epitelio cecal. Por otro lado, se ha informado que en infecciones masivas otras porciones del intestino pueden ser invadidas por *E. tenella*¹¹. Esto concuerda con lo observado en el presente estudio donde se observó una excesiva cantidad de oocistos en los ciegos de las aves infectadas (órgano blanco de *E. tenella*), por lo que suponemos que esta cepa tiene un alto potencial de replicación y al verse saturado el tejido blanco invadió otros tejidos cercanos.

Por lo tanto, es posible que además de la presencia de moléculas de interacción entre los esporozoitos de *E. tenella* y las células epiteliales del ciego, existan otros mecanismos o factores inmunológico y nutricionales que puedan favorecer la invasión y el desarrollo del parásito a otros tejidos^{3,21}.

Es posible que la presencia de coccidias en diferentes estados de desarrollo en el epitelio de la BF, se deba a la gran producción de coccidias en el epitelio cecal y a la subsecuente saturación del tejido de primera elección, como fue observado en el presente estudio. Debido a que existe un conducto a través del cual se comunican la cloaca y la BF, los esporozoitos pueden pasar e invadir el epitelio bajo condiciones normales. Lo anterior supone que el intestino grueso adyacente de estas aves también estaba invadido por coccidias. Es evidente que el epitelio de la BF puede ser un sitio adecuado para la invasión, replicación y el desarrollo de cepas de *E. tenella* con alta capacidad de replicación e invasión una vez que el tejido blanco ha sido saturado.

Dentro del ciclo reproductivo de *E. tenella*, los estados infectantes (esporozoitos) invaden las células epiteliales superficiales del ciego, posteriormente son transportados por leucocitos intraepiteliales (LIE) a través de las células epiteliales, lámina propia y muscular de la mucosa²². En las infecciones primarias los esporozoitos abandonan los LIE (caracterizados como LT CD8+ y en menor número LT CD4+ y macrófagos por Lillehoj y Trout,²³ mediante anticuerpos monoclonales e inmunofluorescencia) y se desarrollan en las células epiteliales de las criptas intestinales. Sin embargo, en el presente estudio las coccidias únicamente invadieron el epitelio de la BF y no se presentó esta migración a capas más profundas.

Referencias

1. McDougal RL, Reid MW. Coccidiosis. In: Calnek BW, Barnes HJ, Raid WM, Yoder HW, editors. Diseases of poultry. Ames (IO): Iowa State University Press, 1991:780-787.
2. Long PL. Coccidiosis in poultry. Poultry Biol 1987;95:1-25.
3. Long, PL. Coccidiosis of man and domestic animals. Boca Ratón (FL): CRC Press, 1990:63-84.
4. Fernando MA, Rose ME, Millard BJ. *Eimeria* spp. of domestic fowl: the migration of sporozoites intra- and extra-enterically. J Parasitol 1987;73:561-567.
5. Davies SFM, Joyner LP. Infection of the fowl by the parenteral inoculation of oocysts of *Eimeria*. Nature 1962;194:996-997.
6. Sharma NN. Response of the fowl (*Gallus domesticus*) to parenteral administration of seven coccidial species. J Parasitol 1964;50:509-517.
7. Long PL, Rose ME. Active and passive immunization of chickens against intravenously induced infections of *Eimeria tenella*. Exp Parasitol 1965;16:1-8.
8. Rose ME, Hesketh P. *Eimeria tenella*: localization of the sporozoites in the caecum of the domestic fowl. Parasitology 1991;102:317-324.
9. Joyner LP. Host and site specificity. In: Long PL, editor. The biology of the coccidia. Baltimore (MA): University Park Press, 1990:35-65.
10. Vervelde L, Vermeulen AN, Jeurissen SHM. Common epitopes on *Eimeria tenella* sporozoites and cecal epithelium of chickens. Infect Immun 1993;61:4504-4506.
11. Leatham WD. Organ specificity of *E. tenella* in cecectomized chickens. J Protozool 1968;15:18-23.
12. Zhan J, Wilson E, Yang S, Healey MC. Increasing the yield of *Eimeria tenella* oocysts in primary chicken kidney cells. Avian Dis 1996;40:63-67.
13. McLoughlin DK. The influence of dexamethasone on attempts to transmit *Eimeria meleagridis* to chickens and *E. tenella* to turkeys. J Protozool 1969;16:145-147.
14. Kogut HM, Eirmann L. The effect of cyclosporin A on the development of *Eimeria* in non-specific host. Int J Parasitol 1991;21:979-983.
15. Kronke M, Leonard WJ, Depper JM, Arya SK, Wong-Stau F, Gallo RC, et al. Cyclosporine A inhibits T cell growth factor at the level of mRNA transcription. Proc Natl Acad Sci 1984;81:5214-5218.
16. Kogut MH, Long PL. The effect of silica injections on the rejection of *Eimeria* from nonspecific hosts. J Parasitol 1981;67:960-961.
17. Long PL. Schizogony and gametogony of *E. tenella* in the liver of chick embryos. J Protozool 1971;18:17-18.
18. Rodriguez R, Dykstra DD, Fletcher OJ. *Eimeria brunetti* in epithelial cells of bursa of Fabricius in gnotobiotic chickens. Avian Dis 1975;19:366-369.
19. Anderson WI, Giambrone JJ, Fletcher OJ, Eidson CS, Reid WM. Demonstration of *Eimeria tenella* in bursa of Fabricius of chickens. Avian Dis 1976;20:752-755.
20. Strout RG, Ouellette CA. Gametogonia of *E. tenella* in cell cultures. Science 1969;163:695-696.
21. Alroy J, Goyal V, Luckacs NW, Taylor RL, Strout RG, Ward HD, Pereira MEA. Glucoconjugates of the intestinal epithelium of the domestic fowl (*Gallus domesticus*): a lectin histochemistry study. Histochem J 1989;21:187-193.
22. Lawn AM, Rose ME. Mucosal transport of *Eimeria tenella* in the cecum of the chicken. J Parasitol 1982;68:1117-1123.
23. Lillehoj HS, Trout JM. CD8+ T cell-coccidia interactions. Parasitol Today 1994;10:10-14.