



Efecto de una vacuna anticoccidial sobre parámetros fisiológicos e inmunológicos de pollos de engorda

Anticoccidial vaccine effect on physiological and immunological parameters in broiler chickens

Marco Antonio Juárez Estrada* Gerardo Manuel Nava Morales*
Rubén Merino Guzmán*

Abstract

The effect of an anticoccidial vaccine on broiler chickens challenged at 21st day of age with 6.0×10^4 *E. acervulina*; 5.0×10^3 *E. maxima*; and 4.0×10^4 *E. tenella* sporulated oocysts/bird, was evaluated. Four groups of 20 chicks each, one day old, were randomly assigned to: 1) unvaccinated, unchallenged control (UUC); 2) unvaccinated, challenged control (UCC); 3) vaccinated, challenged (VC); and 4) vaccinated, unchallenged (VU). All birds were weekly weighed. At 7 days post-challenged (PC), weight gain % (WG), intestinal pH (IpH), gut weight (GW), intestinal IgA concentration (IgAC), gut lesion score (GLS), oocyst output (OO) and percentage of specific coccidia species (SCS) in feces were recorded. At 14 and 26 days, gastrointestinal passage time (GPT) was measured. At 21 days of age, body weight from groups VC (544.8 ± 105) and VU (504.9 ± 88) were lower ($P < 0.05$) than group UUC (615.6 ± 100). At 28 days, group UUC was the heaviest (923.3 ± 126), and with the highest WG (49.97%). Group UCC had the lowest WG (24.60%), and at 26 days, it had the lowest GSF (212.4 ± 31), different ($P < 0.05$) from group VU with 43.81% of WG and 158.4 ± 52 for GSF. Both, IpH and GW did not differ among groups. The lowest IgAC was seen in ceca from group UUC. Group UCC had the highest GLS, whereas groups UUC and VU had the lowest GLS. Group VC showed higher GLS for *E. maxima* and *E. tenella* than groups UUC and VU. At 28 days, group UCC elicit higher OO; however, group VC showed higher OO than groups UUC and VU. At 7th day PC, the *E. acervulina* SAC for group VC was lower than groups UCC and VU, even though *E. maxima* and *E. tenella* SAC's for this group (VC) had increased. Molecular characterization for field strains and their comparison with commercial vaccines must be held forward to understanding antigenic differences.

Key words: IgA, AVIAN COCCIDIOSIS, FIELD ISOLATES, COCCIDIAL SPECIFIC SPECIES, GASTROINTESTINAL PASSAGE TIME.

Resumen

Se evaluó el efecto de una vacuna anticoccidial en pollos de engorda desafiados al día 21 de edad con 6.0×10^4 *E. acervulina*; 5.0×10^3 *E. maxima* y 4.0×10^4 *E. tenella* ooquistes esporulados/ave. De manera aleatoria se asignaron 20 aves de un día de edad a cada uno de cuatro grupos: 1) testigo no vacunado, no desafiado (NVND); 2) testigo no vacunado, desafiado (NVD); 3) vacunado desafiado (VD); y 4) vacunado no desafiado (VND). Las aves se pesaron semanalmente. A los siete días posdesafío (PD) se observó la ganancia porcentual de peso (GPP), el pH intestinal, el peso total del intestino (PTI), la concentración intestinal de IgA (CIlgA), el grado de severidad de las lesiones (GSL), la eliminación de ooquistes (EOH) y el porcentaje de la especie específica de coccidia (PEEC) en heces. A los días 14 y 26 se midió la velocidad de tránsito gástrico (VTG). Al día 21, el peso del grupo VD (544.8 ± 105) y VND (504.9 ± 88) fueron menores ($P < 0.05$) al grupo NVND (615.6 ± 100). Al día 28, el grupo NVND fue el más pesado (923.3 ± 126) y con mayor GPP (49.97%). El grupo NVD obtuvo la menor GPP (24.60%) y al día 26 la menor VTG (212.4 ± 31), diferente ($P < 0.05$) al grupo VND con 43.81% de GPP y 158.4 ± 52 de VTG. Los grupos no fueron diferentes en pH y PTI. El grupo NVND presentó la menor CIlgA en sacos ciegos. El grupo NVD mostró el mayor GSL, el NVND y el VND, el menor; el grupo VD presentó mayor GSL de *E. maxima* y *E. tenella* que los grupos NVND y VND. Al día 28, el grupo NVD mostró la mayor EOH, el VD tuvo mayor EOH que los grupos NVND y VND. A los siete días PD, el PEEC para *E. acervulina* del grupo VD fue menor al grupo NVND y VND, aun cuando el PEEC para *E. maxima* y *E. tenella* se incrementó. Con la finalidad de entender las diferencias antigénicas, debe efectuarse la caracterización molecular de las cepas de campo y compararse con las vacunas comerciales.

Palabras clave: IgA, COCCIDIOSIS AVIAR, AISLAMIENTOS DE CAMPO, ESPECIE ESPECÍFICA DE COCCIDIA, VELOCIDAD DE TRÁNSITO GÁSTRICO.

Recibido el 21 de noviembre de 2005 y aceptado el 6 de julio de 2006.

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

Introduction

Chemical and biological-fermentation compounds have been used during the last 50 years for avian coccidiosis control.^{1,2} However, the appearance of field strains resistant to these compounds have resulted on the formulation of new control strategies, such as vaccination,¹⁻⁶ which provides solid immunity against pathogenic coccidial infection.⁶⁻⁹ Even though vaccination yields good results in replacement chicks and breeding birds, an exacerbated replication of this protozoa in the broiler chicken intestine can affect immunity and performance of the flock.^{3,4,10,11} The main reasons to limit vaccine use is that alimentary efficiency and pigmentation are not the same to those seen in previously medicated chickens.^{1,2,4,11} Even though most of the protection achieved against *Eimeria* spp is related to how the vaccine is given,¹² the low immune response against *E. tenella* and the huge antigenic variability of the *E. maxima* field strains show that vaccination with live oocysts is not always effective at protecting against strains from different geographic places.¹³⁻¹⁹ Furthermore, it is important to establish a standard, reliable method to evaluate the real protection given by a multivalent coccidia vaccine.²⁰⁻²³

Most of the criteria used to prove anticoccidial drugs in birds,^{1,2} are not appropriate to efficiently evaluate the protection obtained by live-coccidia vaccines.^{5,20} Considering criteria, such as quantity of excreted oocysts or lesion scores, has led to elaborate mistaken judgments.^{3,5,20} Bedrnik *et al.*²⁴ suggested that evaluating lesion seriousness, fecal oocyst output and data interpretation on flock performance are the main guidelines to evaluate the efficacy of live-oocyst vaccines, which is confusing in most of the cases. Williams and Catchpole²⁰ propose coccidial vaccine evaluation in individual challenge protocols per *Eimeria* species, by comparing growth rates and alimentary efficiency. However, it is important to consider that most of the field challenges are caused by more than one *Eimeria* species.^{1,2,4,23} Because of this, it is important to analyze the effect of a non-attenuated oocyst vaccine from aboard against avian coccidiosis, on physiological and immunological parameters in broiler chickens when a mixed challenge with Mexican field strains is applied. By doing this, better evaluation criteria would be made for protection assessment for anticoccidial vaccine interpretation.

Material and methods

Experimental animals

The one-day-old broiler chickens (Ross 308 × Ross

Introducción

Durante los últimos 50 años se han empleado compuestos químicos y de fermentación biológica para el control de la coccidiosis aviar.^{1,2} Sin embargo, el surgimiento de cepas de campo resistentes a éstos ha dado como resultado la formulación de nuevas estrategias para su control, una de ellas es la vacunación,¹⁻⁶ que proporciona inmunidad sólida contra la infección por coccidias patógenas.⁶⁻⁹ Sin embargo, a pesar de proporcionar buenos resultados en pollonas de reemplazo y aves reproductoras, una replicación exacerbada de este protozoario en el intestino del pollo de engorda puede afectar la inmunidad y el rendimiento de la parvada.^{3,4,10,11} Los principales motivos para limitar el uso de vacunas es que la eficiencia alimentaria y la pigmentación no siempre son iguales a las observadas en pollos medicados preventivamente.^{1,2,4,11} Aunque gran porcentaje de la protección obtenida contra *Eimeria* spp se encuentra relacionada con la manera de administrar la vacuna,¹² la baja respuesta inmune contra *E. tenella* y la gran variabilidad antigénica de las cepas de campo de *E. maxima* muestran que la vacunación con ooquistes vivos no siempre es efectiva para proteger contra cepas de diferentes sitios geográficos.¹³⁻¹⁹ Además, es importante establecer un método estándar confiable para comprobar la protección real que confiere una vacuna de coccidia multivalente.²⁰⁻²³

Muchos de los criterios empleados para probar la eficacia de los fármacos anticoccidiales en aves^{1,2} no son apropiados para evaluar eficientemente la protección obtenida con las vacunas de coccidia vivas.^{5,20} El hecho de considerar como criterios de protección la cantidad de ooquistes eliminados, o la severidad de lesiones, ha conducido a elaborar juicios erróneos.^{3,5,20} Bedrnik *et al.*²⁴ plantearon que la calificación de la severidad de lesiones, la eliminación de ooquistes en heces y la interpretación de los datos de rendimiento de la parvada son las principales directrices para evaluar la eficacia de las vacunas vivas de coccidia, esto último, en la mayor parte de los casos, tiende a ser confuso. Por su parte, Williams y Catchpole²⁰ proponen la evaluación de las vacunas de coccidia en protocolos de desafíos individuales por especie de *Eimeria*, a través de la comparación de la tasa de crecimiento y la eficiencia alimentaria. Sin embargo, se tiene que considerar que la mayor parte de desafíos en campo son ocasionados por más de una especie de *Eimeria*,^{1,2,4,23} por lo cual es importante analizar el efecto que tiene una vacuna de ooquistes no atenuados de origen extranjero contra la coccidiosis aviar sobre algunos parámetros fisiológicos e inmunológicos de pollos de engorda, cuando se efectúa un desafío mixto con cepas de campo aisladas en México, lo

308) that were used, were obtained from a commercial incubator. Chickens were raised in 100 × 120 cm floor-pens with disinfected wood-shaving litter, with solid 120 cm high separations. Each pen was assisted by one person. A standard isoproteic and isocaloric diet for broiler chicken, based on sorghum and soybean, was given according to the requirements established by the NRC in 1994, without anticoccidials or growth-promoter antibiotics. Food and water were given *ad libitum*.

Vaccine

A commercial vaccine with non-attenuated sporulated oocyst from *E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella** was used, given to a thousand broiler chickens on day one of age by fine-drop spraying (0.03 µL) inside a cabin,** according to manufacturer recommendations.

Parasitic inoculum

A mixed compounded parasitic inoculum of non-attenuated oocysts of *E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella* from farm isolations in Puebla and Morelos, Mexico, was used according to Chapman² methodology. The inoculum was typified at the Animal Production Department: Birds, and titrated in three-week-old, susceptible birds (Ross 308 × Ross 308) according to Danforth⁴ and Williams¹⁰ in order to produce a 30% loss in weight gain (WG), without mortality, a week post-challenge (PC). Oocysts were sporulated at room temperature in 2.5% potassium dichromate, separately disinfected with 5% chloride and washed three times with distilled water before being mixed.

Challenge

A mixed dose of sporulated oocysts were given *per os* per bird (6.0×10^4 of *E. acervulina*; 5.0×10^3 of *E. maxima* and 4.0×10^4 of *E. tenella*) on day 21 of age.

Experimental design

Four experimental groups were made with 20, one-day-old, broiler chickens each (Ross 308 × Ross 308). Ten females and ten males were randomly assigned to each group. Groups were divided as follows: 1) unvaccinated, unchallenged control (UUC); 2) unvaccinated, challenged control (UCC); 3) vaccinated challenged (VC); and 4) vaccinated unchallenged (VU). The UCC and VC groups were challenged at 21 days of age, while the UUC and VU groups only received buffered solution (PBS).

que contribuirá a generar, además, un mejor criterio de evaluación de la protección para la interpretación de la vacunación anticoccidial.

Material y métodos

Animales de experimentación

Se utilizaron pollitos de engorda (Ross 308 × Ross 308) de un día de edad, obtenidos de una incubadora comercial. Las aves se criaron en corrales de piso de 100 × 120 cm con cama de viruta de madera desinfectada, con separaciones sólidas de 120 cm de alto; cada corral fue atendido por una persona. Se les proporcionó una dieta isoproteínica e isocalórica estándar para pollo de engorda, con base en sorgo y soya, de acuerdo con los requerimientos establecidos en el NRC de 1994, sin anticoccidiano y sin antibiótico promotor del crecimiento. El alimento y el agua se suministraron *ad libitum*.

Vacuna

Se utilizó vacuna comercial con ooquistes esporulados no atenuados de *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella** dosificada para mil pollos de engorda, administrada al día de edad por aspersión con gota fina (0.03 mL) en una cabina,** según las recomendaciones del fabricante.

Inóculo parasitario

Se utilizó un inóculo parasitario mixto compuesto de ooquistes no atenuados de *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*, a partir de aislamientos efectuados en granjas de Puebla y Morelos (México), según la metodología propuesta por Chapman.² El inóculo fue tipificado en el Departamento de Producción Animal: Aves, y de acuerdo con Danforth⁴ y Williams¹⁰ se tituló en aves (Ross 308 × Ross 308) susceptibles de tres semanas de edad, con la finalidad de producir una semana después del desafío, una baja de 30% en la ganancia de peso, sin ocasionar mortalidad. Los ooquistes fueron esporulados a temperatura ambiente en dicromato de potasio a 2.5%. Antes de mezclarlos se desinfectaron por separado con cloro a 5% y se lavaron con agua destilada estéril en tres ocasiones.

Desafío

Al día 21 de edad se administró *per os* una dosis mixta

*Coccivac B®. Shering-Plough Animal Health Corp., Nueva Jersey, Estados Unidos.

**Spraycox® II. Shering-Plough Animal Health Corp., Nueva Jersey, Estados Unidos.

Avian weight

Birds in four groups were individually weighed on days 7, 14, 21 and 28 of age, using a grain scale with gram ranks.*

Weight gain percentage

WG of each group was calculated as the percentage difference of the weight on day 28 and the weight of the same bird recorded seven days before; the last one was considered as 100%.

Assessment of intestinal content pH

Euthanasia by cervical dislocation was done to all survivor birds on day 28 of age.²⁵ Intestinal content pH was measured in five birds per group by inserting a crystal electrode** inside the cecum. Lectures were intertwined among groups and at least one minute was required per sample. Electrode was washed with distilled water and recalibrated with buffered solution between lectures.

Total intestine weight

Two cuts were done, one at the pylorus level and the other at the coprodeum level. Sections were weighed including the content in order to obtain total intestine weight from the 20 birds euthanized per group. Total weight was assessed using an electronic scale with gram ranks.***

Immunoglobulin A concentration (ng/ml) in the intestinal lumen

Five centimeter sections of duodenum (ascendant portion of the duodenal flexure), jejunum (2 cm after Meckel's diverticulum), ileum (2 cm before cecal tonsils) and cecum (central portion) were obtained and deposited in 5 mL of buffered solution (0.16 g KH_2PO_4 , 0.54 g Na_2HPO_4 , 8.5 g NaCl, 1 L distilled water). In order to obtain intestinal mucosa, samples were washed and extruded three times in the same solution and centrifuged for 30 minutes (1 000 g). Supernatant was retrieved, diluted 1:10 and frozen at -20°C until use. Sensitized plates* with goat anti-chicken IgA antibodies (Affinity)** diluted 1:100 in carbonate buffer pH 9.6 (1.59 g Na_2CO_3 , 2.93 g NaHCO_3 , 1 L distilled water) were used depositing 100 μL per microwell and incubating at 4°C for 12 h. After this, plates were washed twice with 0.02% Tween 20-0.002M imidazole saline solution, blocked with 200 μL of 1% bovine serum albumin (BSA) diluted in buffered solution pH 7.4 (8.0 g NaCl, 0.2 g KH_2PO_4 ,

de ooquistes esporulados por ave (6.0×10^4 de *E. acervulina*; 5.0×10^3 de *E. maxima* y 4.0×10^4 de *E. tenella*).

Diseño experimental

Se formaron cuatro grupos experimentales de 20 pollos de engorda de un día de edad (Ross 308 $\times$ Ross 308) por grupo, a cada grupo se le asignaron al azar diez hembras y diez machos.¹⁰ Los grupos se dividieron así: 1) testigo no vacunado, no desafiado (NVND); 2) testigo no vacunado, desafiado (NVD); 3) vacunado desafiado (VD); 4) vacunado no desafiado (VND). Los grupos NVD y VD fueron desafiados al día 21 de edad, los grupos NVND y VND únicamente recibieron solución tamponada (PBS).

Peso de las aves

Las aves de los cuatro grupos se pesaron individualmente a los días 7, 14, 21 y 28 de edad, con una báscula granataria con rangos de un gramo.*

Ganancia porcentual de peso

La ganancia de peso de cada grupo fue la diferencia porcentual calculada del peso obtenido al día 28, con respecto al peso de la misma ave registrado siete días antes, considerando éste como el 100%.

Medición del pH de contenido intestinal

A todas las aves sobrevivientes al día 28 de edad se les practicó eutanasia mediante dislocación cervical.²⁵ La lectura del pH del contenido intestinal se efectuó en cinco aves por grupo, insertando un electrodo de cristal** dentro del saco ciego. Las lecturas se efectuaron alternadamente entre grupos y se requirió al menos de un minuto por muestra. El electrodo se lavó con agua destilada y se recalibró con solución amortiguadora neutra entre lecturas.

Peso total del intestino

Para obtener el peso total del intestino a partir de 20 aves sacrificadas por grupo, se seccionó a nivel de píloro y del coprodeo, se pesó con todo y contenido; el peso total se determinó con una báscula electrónica con rangos de un gramo.***

*Sartorius®. Balanza analítica, modelo BP 110 S Sartorius AG, Göttingen, 37079, Alemania.

**Orion Research ionalizer/501, Orion Research Incorporated, Boston, MA, Estados Unidos de América.

***Ohaus®. Báscula modelo IP12KS, Ohaus Corporation, Florham Park, 07058, Estados Unidos de América.

2.16 g Na₂HPO₄, 7H₂O, 0.2 g KCl, 0.5 mL Tween 20, 1 L distilled water), and incubated for 30 minutes at room temperature. One hundred microliters of the samples and serum reference*** standards (2 000 ng/mL of IgA diluted 1:2 to 1:128—serial dilutions—in 1% BSA) were deposited and incubated for 60 minutes at room temperature. Plates were washed and 100 µL of the conjugate (goat anti-chicken IgA antibodies conjugated with peroxidase enzyme)† were added and incubated for 60 minutes at room temperature. After this, another washing was done and 100 µL of ABTS substrate‡ were transferred per well and incubated for 30 minutes. Finally, 100 µL of the stopping solution (1% sodium dodecyl sulfate, SDS) were added. Plates were read using an ELISA plate reader.° A regression analysis²⁶ of the optical densities (OD) of the samples and calibration curve, made from the diluted standards, was done to assess IgA concentrations as ng/mL, considering OD and their correspondent concentrations.

Gastrointestinal passage time

Analysis consisted of the difference of minutes* between the initial time of the oral administration of the marker agent (ferric oxide gelatin capsule, 200 mg/kg of body weight) and time of appearance in feces. Two lectures were done on days 14 (before challenge) and 26 of age (after challenge). For this, five birds per group were placed in clean cages. Birds were completely food restricted on hour before starting lecture, after which birds were returned to their respective pen. Results are expressed as mean in minutes ± standard deviation.

Lesion score and oocyst quantification

Intestinal lesions due to *Eimeria* spp were evaluated in 20 birds on day 28 of age, according to Johnson and Reid.²⁷ Feces from each yard were collected weekly. Oocysts were quantified as Long *et al.*²⁸ description and counts were validated in agreement to Juarez *et al.*²⁹

Percentage of specific *Eimeria* species in feces

Oocyst isolation from feces of each group was done on day 28 of age. Relative percentage of each species was assessed counting and sizing 200 oocysts with the 40X objective through a graduated millimeter scale,** as proposed by Joyner and Long.³⁰

Statistical analysis

A completely-randomized lineal model was used;

Concentración de inmunoglobulina A (ng/ml) en la luz del tubo gástrico

Se obtuvieron fracciones de 5 cm de duodeno (porción ascendente del asa duodenal), yeyuno (dos centímetros posteriores al divertículo de Meckel), íleon (dos centímetros anteriores a las tonsilas cecales) y sacos ciegos (porción central), se depositaron en 5 mL de solución amortiguadora (0.16 g KH₂PO₄, 0.54 g Na₂HPO₄, 8.5 g NaCl, 1 L agua destilada); para obtener la mucosa intestinal se lavaron y extruyeron tres veces en la misma solución, se centrifugó por 30 minutos (1 000 g), se obtuvo el sobrenadante y se diluyó 1:10, finalmente se congeló a -20°C hasta su uso. Para detectar la IgA, se utilizaron placas* sensibilizadas con anticuerpos de cabra anti IgA de pollo (Afinidad)** diluidos 1/100 en un amortiguador carbonatado pH 9.6 (1.59 g Na₂CO₃, 2.93 g NaHCO₃, 1 L de agua destilada) con 100 µL por micropozo, se incubaron a 4°C por 12 horas. Se lavó dos veces con solución salina-imidazol 0.002M-tween 20 0.02%, se bloqueó con 200 µL de albúmina sérica bovina (BSA) al 1%, diluida en solución amortiguadora pH 7.4 (8.0 g NaCl, 0.2 g KH₂PO₄, 2.16 g Na₂HPO₄, 7H₂O, 0.2 g KCl, 0.5 mL tween 20 en 1 L de agua destilada); se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se colocaron 100 µL de las muestras y los estándares de un suero de referencia*** con 2 000 ng/mL de IgA, diluido de 1:2 a 1:128 (diluciones doble seriadas) en 1% de BSA; se incubaron 60 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un lavado y se añadieron 100 µL de conjugado (anticuerpos de cabra anti-IgA de pollo conjugados con enzima peroxidasa)† y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente; después de otro lavado se agregaron 100 µL de sustrato ABTS‡ y se incubó por 30 minutos. Finalmente, se colocaron 100 µL de la solución inhibidora (duodecil sulfato de sodio al 1%; SDS). Las placas se leyeron en un lector de placas ELISA.° Para determinar la concentración de IgA en ng/mL, se empleó un análisis de regresión,²⁶ de la densidad óptica (DO) de las muestras en

*NUNC®, F96 Microwell TM Plate, Catálogo 269787, Nalge Nunc International, Rochester, NY, 14625-2385, Estados Unidos de América.

**Anticuerpos de cabra anti-IgA de pollo, purificados por afinidad, catálogo E30-103, Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, 77356, Estados Unidos de América.

***Suero de referencia IgA de pollo, catálogo RS10-102, Bethyl Laboratories INC., Montgomery, TX, 77356, Estados Unidos de América.

†Cat. E30 103, Bethyl Laboratorios INC, Estados Unidos de América.

‡[(2, 2'-azino-di-[3-etil-benzotiazolina sulfonato (6)], Syn-biotics Corporation, San Diego, CA, Estados Unidos de América.

°Dynatech® 650, con filtro de 405 nm. ELISA Plate Reader MR 650, catálogo 011-973-0500, Dynatech Laboratories Inc., Alexandria, VA, 22314, Estados Unidos de América.

treatment effects were evaluated by an analysis of variance. Differences among group means were verified by Tukey test at a 5 % significance level.³¹

Results

The vaccinated groups had lower weights than the unvaccinated ones on the third week of age; although the VC group showed a higher WG than the UCC group after seven days. This WG was lower than that of the UUC and VU groups. The UUC group was different to the rest of the groups ($P < 0.05$) at day 28 of age presenting a higher WG, followed by the VU and VC groups. WG for the UCC group was lower (25.37%) than that of the UUC group (Table 1).

Even though the VU group showed tendency to a lower intestine weight, this parameter had no significant difference in the vaccine evaluation criteria. The intestine weight of the rest of the groups was similar. Intestinal pH was not different among groups (Table 2). The UUC group presented the lowest IgA concentration in the ceca (Table 3).

Vaccine showed tendency to speed up food passage throughout the digestive tract seven days before challenge. However, it differed regarding unvaccinated challenged birds after 11 days. The UCC group presented the lowest gastrointestinal passage speed ($P < 0.05$) on day 26 and the VU group had the highest speed. The UUC and VC groups were statistically equal, but they were not different from the UCC and VU groups (Table 4). The VC group showed lower lesion score due to *E. acervulina* and *E. maxima* ($P < 0.05$) than the UCC group. However, lesions were more serious than those seen in the VU group. Regarding *E. tenella*, the VC group had higher lesion scores (Table 5). The UCC group released the highest oocysts amount seven days after challenge (AC). On this day, the VC group excreted a higher quantity of oocysts than the UUC and VU group (Table 6). *E. acervulina* oocyst percentage in the VC group was lower than in the UUC, UCC and VU groups at 28 days of age, while *E. maxima* and *E. tenella* percentages increased regarding the rest of the groups (Table 7).

Discussion

Weight difference between the UCC and VC groups is similar to the one observed by Williams and Catchpole,²⁰ who made individual challenge of seven *Eimeria* species. However, they found that the WG of the VC group was never different from that of the UUC group, even when the most pathogenic species was used (*E. necatrix*), in disagreement to this study. Certain amount of protection in the VC group was seen in this study, but it did not reach 100%. Difference

una curva de calibración construida con los estándares diluidos, que tomó en consideración las DO y sus concentraciones correspondientes.

Tiempo de tránsito gastrointestinal

Consistió en la diferencia en minutos* entre el tiempo inicial de la administración *per os* de un agente marcador (cápsula de gelatina de óxido férrico, 200 mg/kg de peso vivo) y su posterior aparición en heces. Se efectuaron dos lecturas, al día 14 (antes del desafío) y al día 26 de edad (después del desafío), para lo cual se colocaron cinco aves por grupo en una jaula limpia. Las aves fueron privadas de alimento una hora antes de iniciar la lectura, después de obtener la lectura las aves se regresaron a su respectivo corral. Los resultados se expresan en media de minutos $\pm$ desviación estándar.

Calificación de lesiones y cuantificación de ooquistes

Al día 28 de edad, las lesiones por *Eimeria* spp en el intestino fueron calificadas a partir de 20 aves de acuerdo con la escala de Johnson y Reid.²⁷ Las heces de cada corral se recolectaron semanalmente. Los ooquistes se cuantificaron de acuerdo con lo descrito por Long *et al.*²⁸ y los conteos se validaron de acuerdo con lo propuesto por Juárez *et al.*²⁹

Porcentaje de especies específicas de Eimeria en heces

Al día 28 de edad, se efectuó el reaislamiento de ooquistes a partir de las heces de cada grupo, el porcentaje relativo de cada especie se determinó al observar y medir 200 ooquistes con el objetivo 40X a través de una escala milimétrica graduada** de acuerdo con lo propuesto por Joyner y Long.³⁰

Análisis estadístico

Se utilizó un modelo lineal completamente aleatorizado, los efectos de los tratamientos se evaluaron por análisis de varianza, las diferencias entre las medias de los grupos se verificaron con la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5%.³¹

Resultados

A la tercera semana de edad, los grupos vacunados tuvieron menor peso que los no vacunados, aun cuando siete días después el grupo VD mostró mayor

*Cronómetro Casio® DBC-62, Corea DK, Corea.

**Microscopio compuesto Karl Zeiss® MC-80, México.

might be attributable to the fact that they used the Paracox®* vaccine (attenuated-oocysts). Allen and Fetterer¹ report that this type of vaccine has a low reproductive potential and, in consequence, intermediate phases (merozoites) do not saturate specific areas of the intestinal mucosa, favoring optimal immunity development with minimal intestinal damage.^{1,10} Weight losses in the VC group caused by the effect of this type of vaccines, should be recuperated in a period no longer than three to four weeks, according to Juárez *et al.*³² and Danforth.⁴

William and Catchpole²⁰ recorded that the vaccine strain properly protected without affecting weight in the VC group, using a heterologous strain of *E. maxima* as challenge strain, in disagreement with this study in which it started to affect vaccinated-bird weights since the first day, which may have reduced the strength of the immune system. Opportune negative effect on WG by Coccivac B®,* agrees with Danforth *et al.*¹² observations evaluating Immucox®** (non-attenuated-oocyst). This situation contrast to the use of attenuated-oocyst vaccine (Paracox®* and Liva-cox®**), in which weights are not affected.^{3,5,8,9,20,33-35}

Bradley and Radhakrishnan³⁶ and Qin *et al.*³⁷ have reported that lesions induced by cellular destruction during *Eimeria* replication might change pH, making the environment more alkaline. In this study, intestinal pH showed this tendency only in the jejunum of the vaccinated and UCC groups. Because of this, chronic affecting grade (vaccine) must be differentiated from acute affecting grade (challenge).

The UUC group had the lowest IgA amount in ceca. The higher IgA quantities observed in the rest of the groups were possibly caused by *E. tenella* action. Asexual and sexual phases of this protozoa damage

ganancia de peso con respecto al grupo NVND; esta ganancia fue menor a la observada en los grupos NVND y VND. Al día 28 de edad, el grupo NVND fue diferente ($P < 0.05$) al resto de los grupos. El grupo NVND presentó la mayor ganancia de peso, seguido por el grupo VND y por el grupo VD. La ganancia de peso en el grupo NVD fue menor (25.37%) a la obtenida en el grupo NVND (Cuadro 1).

Aun cuando el grupo VND mostró tendencia hacia un menor peso de los intestinos, este parámetro no mostró significancia dentro de los criterios de evaluación de la vacuna, ya que el peso de los intestinos del resto de los grupos fue similar. El pH intestinal no fue diferente entre los grupos (Cuadro 2). El grupo NVND presentó la menor concentración de IgA en sacos ciegos (Cuadro 3).

La vacuna mostró tendencia a acelerar el tránsito del bolo alimentario a lo largo del tubo digestivo siete días antes del desafío; sin embargo, 11 días después difirió con respecto a las aves desafiadas, que no habían sido vacunadas. Al día 26, el grupo NVD presentó la menor velocidad de tránsito gastrointestinal ($P < 0.05$), en tanto que el grupo VND mostró la mayor, los grupos NVND y VD fueron indistinguibles estadísticamente; sin embargo, no fueron diferentes a los grupos NVD y VND (Cuadro 4). El grupo VD presenta menos severidad de lesiones por *E. acervulina* y *E. maxima* ($P < 0.05$) que el grupo NVD; sin embargo, éstas fueron más severas que las observadas en el grupo VND. En cuanto a *E. tenella*, el grupo VD presentó las lesiones más severas (Cuadro 5). El grupo NVD eliminó la mayor cantidad de ooquistes a los siete días posdesafío (PD); en esta fecha, el grupo VD eliminó mayor número de ooquistes que los grupos NVND y VND (Cuadro 6). A los 28 días de edad, el

Cuadro 1

PESO SEMANAL, EN GRAMOS, DE POLLOS DE ENGORDA VACUNADOS Y SIN VACUNAR, E INCREMENTO PORCENTUAL DE PESO 7 DÍAS POSDESAFÍO CON UN AISLAMIENTO DE CAMPO DE *E. acervulina*, *E. maxima* Y *E. tenella*
WEEKLY WEIGHT IN GRAMS, OF VACCINATED AND UNVACCINATED BROILER CHICKENS AND PERCENTAGE WEIGHT-INCREASE SEVEN DAYS POST-CHALLENGE WITH *E. acervulina*, *E. maxima* AND *E. tenella* FIELD STRAINS

Group	Day 7	Day 14	Challenge Day 21	Day 28	Weight-increase on day 28
1. Control (-)	*133.1 ± 18.3 ^a	321.8 ± 54.6 ^a	615.6 ± 100.1 ^a	923.3 ± 126.2 ^a	49.97%
2. Control (+)	125.7 ± 14.7 ^a	313.4 ± 51.6 ^a	622.0 ± 72.7 ^a	775.0 ± 99.0 ^b	24.60%,
3. Vaccine + Challenge	127.2 ± 19.2 ^a	309.5 ± 53.1 ^a	544.8 ± 105.9 ^b	731.5 ± 120.6 ^b	34.25%
4. Vaccine	122.4 ± 20.0 ^a	292.4 ± 42.7 ^a	504.9 ± 88.5 ^b	726.2 ± 130.7 ^b	43.81%

*Mean values expressed as grams ± standard deviation; values in the same column with different letter are statistically different ($P < 0.05$).

Cuadro 2

pH INTESTINAL Y PESO TOTAL EN GRAMOS, DE LOS INTESTINOS AL DÍA 28 DE EDAD DE POLLOS DE ENGORDA VACUNADOS Y SIN VACUNAR CONTRA *Eimeria* spp, PREVIAMENTE DESAFIADOS AL DÍA 21 DE EDAD

INTESTINAL pH AND TOTAL WEIGHT IN GRAMS, IN 28-DAY-OLD BROILER CHICKENS VACCINATED AND UNVACCINATED AGAINST *Eimeria* spp, PREVIOUSLY CHALLENGED AT 21 DAYS OF AGE

Group	Duodenum	Jejunum	Ileum	Ceca	Intestinal weight
1. Control (–)	*6.2 ± 0.2 ^a	*5.9 ± 0.5 ^a	*6.6 ± 0.9 ^a	*7.5 ± 0.2 ^a	**71.4 ± 10.0 ^a
2. Control + Challenge	6.3 ± 0.4 ^a	5.9 ± 0.8 ^a	7.1 ± 0.7 ^a	7.0 ± 0.4 ^a	73.9 ± 16.2 ^a
3. Vaccine + Challenge	6.4 ± 0.3 ^a	6.3 ± 0.2 ^a	6.4 ± 1.1 ^a	7.5 ± 0.3 ^a	71.2 ± 14.0 ^a
4. Vaccine	6.1 ± 0.2 ^a	6.3 ± 0.2 ^a	6.4 ± 0.9 ^a	7.4 ± 0.3 ^a	69.4 ± 15.3 ^a

*Mean values as hydrogenion potential ± standard deviation of five birds per group, values in the same column with different letter are statistically different (P < 0.05).

**Mean values as grams ± standard deviation of 20 birds per group; values in the same column with different letter are statistically different (P < 0.05).

Cuadro 3

CONCENTRACIÓN DE IgA INTESTINAL AL DÍA 28 DE EDAD, DE POLLOS DE ENGORDA VACUNADOS Y SIN VACUNAR, DESAFIADOS AL DÍA 21 DE EDAD CON UN AISLAMIENTO DE CAMPO MEXICANO DE *Eimeria* spp

INTESTINAL IgA CONCENTRATION OF VACCINATED AND UNVACCINATED 28-DAY-OLD BROILER CHICKENS, CHALLENGED ON DAY 21 OF AGE WITH A *Eimeria* spp FIELD STRAIN ISOLATED IN MEXICO

Group	Duodenum	Jejunum	Ileum	Ceca
1. Control (–)	*980 ^a	*928 ^a	*1.055 ^a	*817 ^b
2. Control + Challenge	1.012 ^a	1.111 ^a	1.159 ^a	1.142 ^a
3. Vaccine + Challenge	924 ^a	895 ^a	1.109 ^a	1.189 ^a
4. Vaccine	810 ^a	1.009 ^a	1.022 ^a	1.047 ^a

**Mean values as ng/ml ± standard deviation in five birds per group; values in the same column with different letter are statistically different (P < 0.05).

cecum epithelium producing serious inflammatory responses that favor higher intestine weights of the challenged groups. Because of this, the apparently lower intestine weight of the VU group may have been resulted from a post-vaccinial healing process. IgA increase in the cecum lumen in this study is not considered as a specific humoral immune response. Girard *et al.*³⁸ observed that specific IgA and IgG antibodies only rose until the second week PC, after *E. acervulina* and *E. tenella* infection during a 21-day-

porcentaje de *E. acervulina* en el grupo VD fue menor al grupo NVND, NVD y VND, mientras que los porcentajes de *E. maxima* y *E. tenella* se incrementaron en relación con el resto de los grupos (Cuadro 7).

Discusión

La diferencia de peso entre el grupo NVD y el VD es similar a la observada por Williams y Catchpole,²⁰ quienes efectuaron el desafío de forma individual con

Cuadro 4

TIEMPO EN MINUTOS DE TRÁNSITO GASTROINTESTINAL EN POLLOS DE ENGORDA VACUNADOS Y SIN VACUNAR, QUE FUERON DESAFIADOS AL DÍA 21 DE EDAD CON UN AISLAMIENTO DE CAMPO MEXICANO DE *Eimeria* spp

GASTROINTESTINAL PASSAGE TIME IN MINUTES, IN VACCINATED AND UNVACCINATED BROILER CHICKENS, CHALLENGED ON DAY 21 OF AGE WITH A *Eimeria* spp FIELD STRAIN ISOLATED IN MEXICO

Group	Day 14	Day 26
1. Control (–)	*155.6 ± 16.1 ^a	*175.0 ± 44.5 ^{bc}
2. Control + Challenge	143.4 ± 27.1 ^a	212.4 ± 31.2 ^{ab}
3. Vaccine + Challenge	156.6 ± 60.0 ^a	173.0 ± 30.6 ^{bc}
4. Vaccine	139.6 ± 28.0 ^a	158.4 ± 52.2 ^c

*Mean values as minutes ± standard deviation of five birds per group; values in the same column with different letter are statistically different (P < 0.05).

Cuadro 5

CALIFICACIÓN DE LA SEVERIDAD DE LAS LESIONES INTESITNALES DE *Eimeria* spp* AL DÍA 28 DE EDAD, EN POLLOS DE ENGORDA VACUNADOS Y SIN VACUNAR, DESAFIADOS AL DÍA 21 DE EDAD

EVALUATION OF THE *Eimeria* spp INTESITNAL-LESION SCORES* ON DAY 28 OF AGE IN VACCINATED AND UNVACCINATED BROILER CHICKENS, CHALLENGED ON DAY 21 OF AGE

Group	<i>E. acervulina</i>	<i>E. maxima</i>	<i>E. tenella</i>
1. Control (–)	**0.87 ± 0.76 ^b	**0.05 ± 0.22 ^c	**0.05 ± 0.22 ^b
2. Control + Challenge	2.35 ± 0.49 ^a	1.75 ± 0.64 ^a	0.25 ± 0.55 ^a
3. Vaccine + Challenge	0.94 ± 0.43 ^b	1.17 ± 0.73 ^b	0.71 ± 0.89 ^a
4. Vaccine	0.28 ± 0.46 ^c	0.11 ± 0.32 ^c	0.11 ± 0.32 ^b

*Lesion score evaluation according to Johnson and Reid (1970) scale.

**Mean values ± standard deviation in 20 birds per group; values in the same column with different letter are statistically different (P < 0.05).

period, using intestine fragments in an *ex vivo*-culture assay. According to this, it is recommendable to use an ELISA test with specific antigens for each of the strains used for challenge for at least 2 weeks.

Birds in the UCC group had a slow food passage along the digestive tract because enterocytes are involved in a serious inflammatory process, which is responsible for the functional loss. In this case, it was manifested as atony of the intestinal muscle tissue.³⁹ A decrease in the intestinal peristaltic and anti-peristaltic waves might favor infection by the intermediate *Eimeria* phases.³⁹ Clinical frame gets more serious because UCC birds cannot eliminate that huge quantity of intermediate phases.⁴⁰ According to Williams,¹⁰ the UCC group was more seriously affected, probably

siete especies de *Eimeria*. Sin embargo, a diferencia del presente estudio, observaron que aún con la especie más patógena que emplearon (*E. necatrix*), el grupo VD nunca fue diferente en ganancia de peso con el grupo NVND. En el presente estudio existe cierto grado de protección en el grupo VD, pero no alcanza 100%. La diferencia quizá se deba a que ellos emplearon la vacuna Paracox®* (ooquistes atenuados). Allen y Fetterer¹ mencionan que este tipo de vacuna tiene un bajo potencial reproductivo, por lo cual las fases intermedias (merozoitos) no saturan un área específica de la mucosa intestinal, ello favorece el óptimo desarrollo de inmunidad con mínimo daño del tejido

*Schering Plough Animal Health Corp., Reino Unido.

Cuadro 6 NÚMERO DE OOQUISTES DE <i>Eimeria</i> spp POR GRAMO DE HECES EN POLLOS DE ENGORDA VACUNADOS Y SIN VACUNAR, DESAFIADOS AL DÍA 21 DE EDAD CON UN AISLAMIENTO DE CAMPO MEXICANO <i>Eimeria</i> spp OOCYST OUTPUT PER GRAM OF FECES IN VACCINATED AND UNVACCINATED BROILER CHICKENS, CHALLENGED ON DAY 21 OF AGE WITH A FIELD STRAIN ISOLATED IN MEXICO				
Group	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
1. Control (–)	*0 ± 0 ^b	*0 ± 0 ^c	*0 ± 0 ^c	*406 000 ± 35 072 ^c
2. Control + Challenge	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^c	3 626 667 ± 828 986 ^a
3. Vaccine + Challenge	626 ± 750 ^a	49 600 ± 1 995 ^b	1 598 667 ± 837 835 ^a	2 280 000 ± 573 860 ^b
4. Vaccine	421 ± 512 ^a	260 000 ± 31 451 ^a	718 667 ± 104 126 ^b	62 667 ± 10 927 ^c
**Oocyst number mean values ± standard deviation in 20 birds per group; values in the same column with different letter are statistically different (P < 0.05).				

Cuadro 7 ESPECIE ESPECÍFICA DE <i>Eimeria</i> PRESENTE EN HECES AL DÍA 28 DE EDAD, DE POLLOS DE ENGORDA VACUNADOS Y SIN VACUNAR, DESAFIADOS AL DÍA 21 DE EDAD SPECIFIC <i>Eimeria</i> SPECIES IN FECES OF VACCINATED AND UNVACCINATED 28-DAY-OLD BROILER CHICKENS, CHALLENGED ON DAY 21 OF AGE						
Group	<i>E. acervulina</i> *		<i>E. maxima</i> *		<i>E. tenella</i> *	
	Day 21	Day 28	Day 21	Day 28	Day 21	Day 28
1. Control (–)	0%	87%	0 %	0%	0%	13%
2. Control + Challenge	0%	54%	0%	22%	0%	24%
3. Vaccine + Challenge	80%	21%	8%	41%	12%	38%
4. Vaccine	83%	84%	4%	4%	13%	12%

*Mean percentage of the assessment in 20 birds per group.

because of the big amount of intermediate phases, which were indirectly assessed in a lower quantity of excreted oocysts in vaccinated birds.

Even though it was expected for the VC group to be more protected by the vaccine, lesions due to *E. tenella* were more serious. Williams¹⁰ reports that a VC group may show marginal immunity, favoring a higher amount of excreted oocysts or even increased lesion-seriousness for some *Eimeria* species, than the seen in an unvaccinated group challenged with the same oocyst quantity. Williams¹⁰ says that it is attributable to the oocyst quantity in the inoculum, since it was observed that there is a specific challenge amount (saturation shoot dose). This amount allows the intermediate phases to invade all available enterocytes and saturate the correspondent intestine portion, expressing the maximum oocyst reproductive potential. Wil-

intestinal.^{1,10} De acuerdo con lo observado por Juárez *et al.*³² y Danforth,⁴ el peso que pierde el grupo VD por efecto de este tipo de vacuna se debe recuperar en un periodo de tres a cuatro semanas.

William y Catchpole,²⁰ al usar como cepa de desafío una cepa heteróloga de *E. maxima*, registraron que la cepa vacunal protegió adecuadamente sin afectar el peso del grupo VD, a diferencia de la vacuna empleada en el presente estudio, la cual comenzó a afectar el peso de las aves vacunadas desde el primer día, ello quizá contribuyó a tener un sistema inmune no fortalecido. La afectación oportuna sobre la ganancia de peso por Coccivac B®,* coincide con lo observado por Danforth *et al.*,¹² al evaluar Immucox®**

*Schering Plough Animal Health, Corp. Estados Unidos de América.

**Vetech Laboratories Inc., Canadá.

liams¹⁰ found out that if oocysts are increased to this specific amount, the rest of the inoculum (saturation dose) causes that the oocyst output in feces tends to decrease. It is possible that, because of the existence of certain amount of immunity in the VC group in the present study, the number of *E. tenella* oocysts in this group may have been reduced to the saturation dose, favoring the maximum protozoan replication. Meanwhile, the UCC group, that may have received *E. tenella* saturation dose, presented a lower *E. tenella* oocyst number in feces than the expected seven days PC. *E. maxima* and *E. tenella* caused the more serious lesions, in contrast to the low lesion scores caused by *E. acervulina*, along with a low percentage of this species in the VC group feces seven days PC, meaning a better crossed-immunity for this species.

Johnson *et al.*⁴¹ have already observed bad cross-protection with this vaccine since 1979. However, it was verified for *E. tenella*, but not for *E. maxima*. Lack of immunity against *E. tenella* and *E. maxima* in the VC group, expressed as an increase in lesion seriousness, was observed in 1992 by Fitz-Coy.¹³ Interpretation of the protection provided by coccidial vaccines against *E. tenella* throughout lesion evaluation is confusing. Several researchers have observed huge variability in the pathogenic grade of the strains of this species.^{13,41-45} *E. tenella* and mainly *E. acervulina* strains produced contamination in the UUC group, which was confirmed by the participation percentage of this species in the feces collected seven days PC.

Chapman² does not recommend inclusion of control groups (UUC) in floor tests, because of the high contamination probability. However, he suggests its inclusion in grate-cage tests. In this study a control group was included due to the information that it did yield. Contamination did not affect the objectives of the study, since the UUC group showed a WG similar to those assessed by Danforth,⁴ Smith *et al.*¹⁶ and Allen *et al.*,^{18,22} in this type of group.

Oocyst output seven days PC in the UCC group feces was higher than those of the other groups. Relative participation of the excreted amounts of the three species in the UCC group agreed to the ones reported by Williams.¹⁰ The VU group behavior was similar to Goletič *et al.*³⁵ observations. However, when this output pattern was compared to that of the VC group, the relative percentage of *E. maxima* oocysts had an important increase in the later group (37%). Chapman *et al.*²¹ point out that the lesions peak produced by Coccivac B®* is seen between days 18 and 28 of age. This condition could be the reason why birds did not develop a proper immunity on time in the present study. Because of the lesions caused by vaccinal strains, it is necessary to produce immunity before the challenge date, since 21-day-old chickens have more

(ooquistes no atenuados), situación que contrasta con el empleo de vacunas con ooquistes atenuados (Paracox®* y Livacox**), donde se ha observado que los pesos no se afectan.^{3,5,8,9,20,33-35}

Bradley y Radhakrishnan³⁶ y Qin *et al.*³⁷ han descrito que en la replicación de *Eimeria* spp las lesiones inducidas por la destrucción celular pueden modificar el pH, alcalinizando el medio. En el presente estudio el pH intestinal mostró únicamente esta tendencia en el yeyuno de las aves de los grupos vacunados y no en el grupo NVD, por lo cual se debe diferenciar el grado crónico de afectación (vacuna) del agudo (desafío).

El grupo NVND presentó menor cantidad de IgA en sacos ciegos, posiblemente la mayor cantidad de IgA observada en el resto de los grupos fue por la acción de *E. tenella*; las fases asexual y sexual de este protozoo ocasionan daño en el epitelio cecal y producen un proceso inflamatorio severo,^{26,38} que favorece mayor peso en los intestinos de los grupos desafiados, por lo cual el aparente menor peso de los intestinos en el grupo VND, posiblemente se debió al proceso de recuperación posvacunal. El aumento de IgA en la luz de los sacos ciegos del presente estudio no se considera respuesta inmune humoral específica; Girard *et al.*,³⁸ en un ensayo de cultivo *ex vivo*, al emplear fragmentos intestinales, después de la infección con *E. acervulina* y *E. tenella* durante un periodo de 21 días, observaron que los anticuerpos específicos IgA e IgG sólo se incrementan después de la segunda semana PD. Lo recomendable, de acuerdo con lo observado por Girard *et al.*,³⁸ es emplear una prueba de ELISA con antígenos específicos de cada una de las cepas utilizadas para el desafío durante un periodo mínimo de dos semanas.

Las aves del grupo NVD muestran un tránsito lento del bolo alimentario a lo largo del tubo digestivo, debido a que los enterocitos se encuentran involucrados en un proceso inflamatorio severo, responsable de la pérdida de función observada aquí como atonía muscular del tejido intestinal,³⁹ lo cual quizá contribuye a aumentar la infección por las fases intermedias de *Eimeria*, pues al disminuir las ondas peristálticas y antiperistálticas del intestino,³⁹ las aves NVD no pueden eliminar esta gran cantidad de fases intermedias,⁴⁰ ello agrava el cuadro clínico. Según Williams,¹⁰ la mayor afección del grupo NVD probablemente se debió a este gran número de fases intermedias, las cuales se cuantificaron indirectamente en menor cantidad de ooquistes excretados en las aves vacunadas.

Aun cuando se esperaba que el grupo VD estuviera protegido por la vacuna, se observó que las lesiones por *E. tenella* fueron las más severas. Williams¹⁰ describe que un grupo como el VD puede mostrar inmu-

*Schering Plough Animal Health Corp., Reino Unido.

**Biopharm Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, República Checa.

probability of infection under field conditions.^{3,4,7-9} After vaccination, immunity is achieved by a continuous re-infection process of the vaccinal oocysts in the litter; the more quickly immunity is established, the lower the quantity of excreted oocysts.^{3,9,10,34,35} Difference in the oocyst amount between the VC and VU groups on days 14 and 21 may have been related to a immunization delay in the VC group.

The fast oocyst excretion towards the litter is mainly observed with oocysts of the precocious attenuated strains, according to Zorman-Rojs *et al.*³³ In this study vaccinal oocysts were not attenuated. Because of that, re-infection process might have been accelerated in the VU group by humidity, ventilation and temperature of the litter in that pen, conditions that favor a better sporulation and, in consequence, better immunization according to Williams.⁵

It is possible to assess a serious fault in the vaccine protection by the *Eimeria* species percentage observed seven days PC in the VC group. Even though a mild protection against *E. acervulina* was seen, there was an increase in the *E. maxima* and *E. tenella* percentage regarding the VU group. The low *E. tenella* immunity,¹³ along with the high immunogenic variability of several *E. maxima* and *E. tenella* strains isolated from different geographic places,^{14,17-19,22,46} point out that one-type live-oocyst vaccine is not always effective against field strains from different geographic regions.^{12,14-16} The VC group showed low protection in the *E. tenella* challenge, verified by the huge amount of excreted oocysts, the lesion seriousness of the ceca and the high *E. tenella* percentage in feces seven days PC. Kimura *et al.*⁴⁷ suggest that *E. tenella* infection causes weight loss and that clinical signs are more related to the presence of non-beneficial microbiota than to the oocyst output amount per se.

The previous discussion may explain some of the differences observed in this study between the UCC and VC groups concerning *E. tenella* oocyst excretion in feces and lesion seriousness, according to Bradley and Radhakrishnan.³⁶ However, it does not explain those between the VC and VU groups since it was expected for the VC group to have a response similar to the one in the VU, but they were different. Even though *E. maxima* is the most immunogenic species in homologous challenges,^{10,16,18} in the present study vaccinal *E. maxima* strain did not protect against the field strain. The lack of protection among *E. maxima* heterologous strains was described by Long and Millard;⁴⁶ characterization was done by Danforth *et al.*,¹² Barta *et al.*,¹⁵ Smith *et al.*¹⁶ and Allen *et al.*,¹⁸ who observed a considerable immunevariation among different *E. maxima* strains from several geographic places in England and North America. Danforth *et al.*¹² reported low crossed protection against different *E. maxima*

strain, esto favorece la mayor cantidad de ooquistes excretados o incluso mayor severidad de lesiones por parte de alguna especie de *Eimeria*, que la observada en un grupo no inmunizado y que fue desafiado con la misma cantidad de ooquistes; Williams¹⁰ lo atribuye a la cantidad de ooquistes del inóculo, ya que observó que existe una cantidad específica de desafío (dosis de disparo para saturación) en la cual las fases intermedias invaden todos los enterocitos disponibles y saturan la porción del intestino correspondiente, expresando el máximo potencial reproductivo de los ooquistes. Williams¹⁰ determinó que si se incrementan los ooquistes en esta cantidad específica, el inóculo resultante (dosis de saturación) ocasiona que la cantidad de ooquistes en heces tienda a descender. En el presente estudio es posible que al existir cierto grado de inmunidad en el grupo VD, la cantidad de ooquistes de *E. tenella* en este grupo se haya reducido a la dosis de disparo para saturación, lo cual favoreció la máxima replicación del protozoario. Mientras que en el grupo NVD, que posiblemente recibió la dosis de *E. tenella* tipo dosis de saturación, se observó menor número de ooquistes de *E. tenella* en heces siete días PD que el esperado para un grupo NVD. La mayor severidad de lesiones la ocasionaron las cepas de *E. maxima* y *E. tenella*, en contraste con las lesiones observadas por *E. acervulina*, las cuales fueron menos severas, lo que junto con un menor porcentaje de esta especie en las heces del grupo VD siete días PD, indica mejor inmunidad cruzada para esta especie.

Johnson *et al.*⁴¹ ya habían observado mala protección cruzada con esta vacuna desde 1979; sin embargo, lo verificaron con *E. tenella*, pero no con *E. maxima*. La falta de inmunidad para *E. tenella* y *E. maxima* expresada como incremento en la severidad de las lesiones en el grupo VD fue observada en 1992 por Fitz-Coy.¹³ La interpretación de protección por parte de las vacunas de coccidia contra *E. tenella* por medio de la calificación de lesiones es confusa, ya que diferentes investigadores han observado gran variabilidad en el grado de patogenicidad de las cepas de esta especie.^{13,41-45} Las cepas de *E. tenella* y principalmente de *E. acervulina* del inóculo produjeron contaminación en el grupo NVND, lo que se confirmó al observar el porcentaje de participación de estas especies en las heces recolectadas siete días PD.

Chapman² no recomienda incluir en pruebas de piso un grupo testigo de este tipo (NVND), debido a la probabilidad de contaminación cruzada que existe; sin embargo, sugiere su inclusión en pruebas de batería; en el presente estudio se decidió su inclusión debido a la información que efectivamente proporcionó. La contaminación no afectó los objetivos del

*Schering Plough Animal Health, Corp. Estados Unidos de América.

field strains evaluating Immucox®, and so they recommend isolation of immunevariants from the geographic sites where this protection failure exist, and use them as substitutes in the vaccine. However, this type of vaccines keep the problem originated by non-attenuated oocyst vaccines.^{4,12}

An autogenous vaccine should be attenuated by precocious strain selection, according to Williams,⁵ or by chicken embryo passage according to Shirley and Bedrník.⁴⁸

In Mexico there are commercial vaccines that include more than one *E. maxima* strain,³² and vaccines with *E. tenella* strains attenuated in chicken embryo.³³ However, there are no studies about cross-protection evaluation for these vaccines. Even though this paper worked on this problem, it only analyzed the behavior of one *E. maxima* strain against a vaccinal *E. maxima* strain. It is concluded that, before choosing vaccination for broiler chicken flocks in Mexico, it is recommendable to determine the antigenic differences between field coccidia isolations and vaccinal oocyst, especially for *E. maxima* and *E. tenella* strains.

Although some authors consider WG and carotenoid serum levels as primary criteria for vaccinal protection evaluation,^{18,20,22} the possibility of assessing gastric passage and relative percentage of *Eimeria* species in feces AC should be considered according to the present study and aiming to create a unique and useful criterion, in order to do protection comparisons between *Eimeria* spp field strains and the anticoccidial vaccines that will be developed in the following years.^{49,50}

Referencias

1. Allen PC, Fetterer RH. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. Clin Microbiol Rev 2002;15:58-65.
2. Chapman HD. Evaluation of the efficacy of anticoccidial drugs against *Eimeria* species in the fowl. Inter J Parasitol 1998;28:1141-1144.
3. Williams RB. Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. Inter J Parasitol 1998;28:1089-1098.
4. Danforth HD. Use of live oocyst vaccines in the control of avian coccidiosis: experimental studies and field trials. Int J Parasitol 1998;28:1099-1109.
5. Williams RB. Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to success. Avian Pathol 2002;31:317-353.
6. Dalloul RA, Lillehoj HS. Recent advances in immunomodulation and vaccination strategies against coccidiosis. Avian Dis 2005;49:1-8.
7. Williams RB, Johnson JD, Andrews SJ. Anticoccidial vaccination of broiler chickens in various management programmes: relationship between oocyst accumula-

estudio, ya que el grupo NVND mostró ganancia de peso similar a la registrada por Danforth,⁴ Smith *et al.*¹⁶ y Allen *et al.*,^{18,22} para este tipo de grupo.

El número de ooquistes excretados siete días PD en heces por el grupo NVD fue mayor que el observado en el resto de los grupos; la participación relativa de las cantidades eliminadas de las tres especies en el grupo NVD coinciden con las notificadas por Williams.¹⁰ El grupo VND mostró un comportamiento similar al observado por Goletič *et al.*,³⁵ sin embargo, cuando se comparó este patrón de eliminación con el del grupo VD, el porcentaje relativo de ooquistes de *E. maxima* en este último grupo se incrementó en gran proporción (37%). Chapman *et al.*²¹ indican que el pico de lesiones por Coccivac B®* se observa entre los días 18 y 28 de edad, condición que en el presente estudio pudo originar que las aves no desarrollaran una inmunidad oportuna adecuada. Debido principalmente al daño ocasionado por las lesiones de las cepas vacunales, se requiere generar esta inmunidad antes de la fecha señalada para el desafío, ya que en condiciones de campo, a esta edad (21 días) se tiene la mayor probabilidad de infección.^{3,4,7-9} Después de la vacunación, la inmunidad se obtiene por medio de un proceso continuo de reinfección a partir de los ooquistes vacunales de la cama; entre más rápido se establezca la inmunidad, menor cantidad de ooquistes se eliminarán.^{3,9,10,34,35} La diferencia en la cantidad de ooquistes entre el grupo VD y VND a los días 14 y 21 se debió quizá a un retraso de la inmunización en el grupo VD.

De acuerdo con Zorman-Rojs *et al.*,³³ la rápida eliminación de ooquistes hacia la cama se observa principalmente con ooquistes de cepas precoces atenuados. En el presente estudio, los ooquistes vacunales fueron no atenuados, por lo que los factores que pudieron acelerar este proceso de reinfección en el grupo VND, de acuerdo con lo observado por Williams,⁵ fueron posiblemente la humedad, la ventilación y la temperatura particular de la cama de este corral; esas condiciones pudieron favorecer una mejor esporulación y, en consecuencia, mejor inmunización.

De acuerdo con el porcentaje de la especie de *Eimeria* observada durante siete días PD en el grupo VD, es posible determinar una falla seria en la protección por parte de la vacuna, si bien se observa protección moderada contra *E. acervulina*, hubo incremento en el porcentaje de *E. maxima* y *E. tenella* con respecto al grupo VND. La baja generación de inmunidad por parte de *E. tenella*,¹³ junto con la alta variabilidad inmunogénica por parte de diferentes cepas de *E. maxima* y *E. tenella* aisladas de distintos sitios geográficos,^{14,17-19,22,46} indican que la vacunación con ooquistes

*Vetech Laboratories Inc., Canadá.

- tion in litter and the development of protective immunity. *Vet Res Commun* 2000;24:309-325.
8. Holková J, Bedrník P. Livacox®T: Ten-year experience in broiler fattening. *Praxis Vet* 2002;50:213-220.
 9. Williams RB, Carlyle WWH, Bond DR, Brown IAG. The efficacy and economic benefits of Paracox®, a live attenuated anticoccidial vaccine, in commercial trials with standard broiler chickens in the United Kingdom. *Inter J Parasitol* 1999;29:341-355.
 10. Williams RB. Quantification of crowding effect during infection with the seven *Eimeria* species of the domesticated fowls: its importance for the experimental designs and the production of oocyst stocks. *Inter J Parasitol* 2001;31:1056-1069.
 11. Voeten AC, Braunius WW, Orthel FW, Van Rijel MA. Influence of coccidiosis on growth rate and feed conversion in broilers after experimental infections with *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima*. *Vet Q* 1988;10:256-264.
 12. Danforth HD, Lee EH, Martin A, Dekich M. Evaluation of a gel-immunization technique used with two different Immucox vaccine formulations in battery and floor-pen trials with broiler chickens. *Parasitol Res* 1997;83:445-451.
 13. Fitz-Coy SH. Antigenic variation among strains of *Eimeria maxima* and *E. tenella* of the chicken. *Avian Dis* 1992;36:40-43.
 14. Martin AG, Danforth HD, Barta JR, Fernando MA. Analysis of immunological cross-protection and sensitivities to anticoccidial drugs among five geographical and temporal strains of *E. maxima*. *Inter J Parasitol* 1997;27:527-533.
 15. Barta JR, Coles BA, Schito ML, Fernando MA, Martin A, Danforth HD. Analysis of infraspecific variation among five strains of *Eimeria maxima* from North America. *Inter J for Parasitol* 1998;28:485-492.
 16. Smith AL, Hesketh P, Archer A, Shirley MW. Antigenic diversity in *Eimeria maxima* and the influence of host genetics and immunization schedule on cross-protective immunity. *Infect Immun* 2002;70:2472-2479.
 17. Beattie SE, Fernando MA, Barta JR. A comparison of sporozoite transport after homologous and heterologous challenge in chickens immunized with the Guelph strain or the Florida strain of *Eimeria maxima*. *Parasitol Res* 2001;87:116-121.
 18. Allen PC, Jenkins MC, Miska KB. Cross protection studies with *Eimeria maxima* strains. *Parasitol Res* 2005;97:179-185.
 19. Schnitzler B E, Shirley MW. Immunological aspects of infections with *Eimeria maxima*: a short review. *Avian Pathol* 1999;28:537-543.
 20. Williams RB, Catchpole J. A new protocol for a challenge test to asses the efficacy of live anticoccidial vaccines for chickens. *Vaccine* 2000;18:1178-1185.
 21. Chapman HD, Cherry TE, Danforth HD, Richards G, Shirley MW, Williams RB. Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. *Inter J Parasitol* 2002;32:617-629.
 22. Allen PC, Danforth HD, Vinyard BL. Development of a protective index to rank effectiveness of multiple treat-

vivos de un solo tipo no siempre es efectiva para proteger contra cepas de campo procedentes de diferentes sitios geográficos.^{12,14-16} En el desafío con la cepa de *E. tenella*, el grupo VD presentó baja protección, verificada por la gran cantidad de ooquistes eliminados, la mayor severidad de lesiones en sacos ciegos y el alto porcentaje de *E. tenella* en las heces a los siete días PD. Kimura *et al.*⁴⁷ sugieren que en la infección por *E. tenella*, la pérdida de peso y los signos clínicos se relacionan más con la presencia de microbiota de tipo no benéfica que con la cantidad *per se* de ooquistes eliminados en heces.

De acuerdo con lo observado por Bradley y Radhakrishnan,³⁶ lo anterior posiblemente explica algunas de las diferencias observadas en el presente estudio entre el grupo NVD y el VD con respecto a la eliminación de ooquistes en heces y la severidad de las lesiones por *E. tenella*, pero no entre los grupos VD y VND, ya que se esperaba que el grupo VD mostrara respuesta similar a la del grupo VND; sin embargo, fueron diferentes. Aun cuando *E. maxima* es la especie más inmunogénica frente a desafíos homólogos,^{10,16,18} en el presente estudio la cepa de *E. maxima* contenida en la vacuna no protegió contra el aislamiento de campo. La falta de protección entre cepas heterólogas de *E. maxima* fue descrita por Long y Millard,⁴⁶ la caracterización de esta falta de protección fue realizada por Danforth *et al.*,¹² Barta *et al.*,¹⁵ Smith *et al.*¹⁶ y Allen *et al.*,¹⁸ quienes observaron una considerable inmunovariación entre diferentes cepas de *E. maxima* procedentes de distintos sitios geográficos de Inglaterra y Norteamérica. Al evaluar Immucox®, Danforth *et al.*¹² observaron baja protección cruzada contra diferentes aislamientos de campo de *E. maxima*, por lo cual recomiendan aislar las cepas inmunovariantes de los sitios geográficos donde existe esta falla de protección, para emplearlas como sustitutos dentro de la vacuna. Sin embargo, este tipo de vacunas mantienen el problema generado por las vacunas de ooquistes no atenuados.^{4,12}

De acuerdo con Williams,⁵ una vacuna autógena debe atenuarse por medio de la selección de cepas precoces, o bien según Shirley y Bedrník,⁴⁸ a través de su pasaje en embrión de pollo.

En México existen vacunas comerciales que contienen más de una cepa de *E. maxima*³² y vacunas con cepas de *E. tenella* atenuadas en embrión de pollo;³³ sin embargo, no existen estudios que cuantifiquen el grado de protección cruzada de éstas. Aunque el presente trabajo aborda esta problemática, sólo se estudió el comportamiento de una cepa de *E. maxima* frente a una cepa de *E. maxima* vacunal. Se concluye que antes de optar por la vacunación de las parvadas de pollo de engorda en México, es recomendable determinar las diferencias antigénicas entre los aislamientos de coc-

- ments within an experiment: application to a cross-protection study of several strains of *Eimeria maxima* and a live vaccine. *Avian Dis* 2004;48:370-375.
23. Chapman HD, Roberts B, Shirley MW, Williams RB. Guidelines for evaluating the efficacy and safety of live anticoccidial vaccines, and obtaining approval for their use in chickens and turkeys. *Avian Pathol* 2005;34:279-290.
 24. Bedrník P, Yvoré P, Hiepe T, Mielke D, Drössigk U. Guidelines for evaluating the efficacy and safety in chickens of live vaccines against coccidiosis and recommendations for registration. In: Eckert J, Braun R, Shirley MW, Codert P, editors. *Cost 89/820 Biotechnology: guidelines on techniques in coccidiosis research*. Luxembourg: European Commission, 1995:190-201.
 25. Andrews EJ, Bennet BT, Derrell CJ, Hought KA, Pascoe PJ, Robinson GW *et al.* Report of the AVMA panel on euthanasia. *J Am Vet Med Assoc* 1993;202:229-249.
 26. Zigterman GJW, Van de Ven W, Van Geffen C, Loeffen AHC, Panhuijzen JHM, Rijke EO *et al.* Detection of mucosal immune responses in chickens after immunization or infection. *Vet Immunol Immunopathol* 1993;36:281-291.
 27. Johnson J, Reid WM. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp Parasitol* 1970;28:30-36.
 28. Long PL, Millard BJ, Joyner LP, Norton CC. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Vet Lat* 1976;6:200-217.
 29. Juarez EMA, Cabriaes JJJ, Petrone GVM, Tellez IG. Evaluation of *Eimeria tenella* oocyst total count carried out with both the McMaster camera and the Neubauer haemocytometer from faeces or caecal tissue samples. *Vet Mex* 2002;33:73-79.
 30. Joyner LP, Long PL. The specific characters of the *Eimeria* with special reference to the coccidia of the fowl. *Avian Pathol* 1974;3:145-157.
 31. Gill JL. Design and analysis of experiments in the animal and sciences. Ames (Io): The Iowa State University Press, 1978.
 32. Juarez MA, Davila V, Martinez F, Gonzalez G, Rios F, Avila E. Performance improvement with Nobilis Cox ATM® and Sacox® in broilers challenged with Mexican coccidial isolates. Abstracts from 24th Annual Meeting (SPSS); 2003 January 20-21; Atlanta (Georgia) U.S.A. Atlanta (Georgia): The Southern Poultry Science Society, 2003:54.
 33. Zorman-Rojs O, Rataj AV, Krapež U, Dovč A, Čajavec S. Evaluation of safety of anticoccidial vaccine Livacox®T in broiler chickens in experimental condition. *Praxis Vet* 2002;50:231-238.
 34. Terzić K, Kračun F, Čajavec S, Džakula N. Monitoring of the efficacy of the vaccine Livacox®T during two years of use in Croatia. *Praxis Vet* 2004;52:55-66.
 35. Goletić T, Gagić A, Grbić E, Kustura A, Rešidbegović E. Evaluation of production and parasitological parameters in parent birds Cobb provenance after vaccination with Livacox®Q vaccination. *Praxis Vet* 2004;52:67-76.
 36. Bradley RE, Radhakrishnan CV. Coccidiosis in chickens: obligate relationship between *Eimeria tenella* and certain species of ceca microflora in the pathogenesis of the disease. *Avian Dis* 1973;17: 461-476.
 37. Qin ZR, Fukata T, Baba E, Arakawa A. Effect of lactose and *Lactobacillus acidophilus* on the colonization of *Salmonella enteritidis* in chicks concurrently infected with *Eimeria tenella*. *Avian Dis* 1995;39:548-553.
 38. Girard F, Fort G, Yvoré P, Quéré P. Kinetics of specific immunoglobulin A, M and G production in the duodenal and caecal mucosa of chicken infected with *Eimeria acervulina* or *Eimeria tenella*. *Int J Parasitol* 1997;27:803-809.
 39. Denbow MD. Gastrointestinal anatomy and physiology. In: Whittow GC, editor. *Sturkie's avian physiology*. 5th ed. New York: Academic Press, 2000:306-313.
 40. Entzeroth R, Matting FR, Werner-Meier R. Structure and function of parasitophorous vacuole in *Eimeria* species. *Inter J Parasitol* 1998;28:1015-1018.
 41. Johnson J, Reid WM, Jeffers TK. Practical immunization of chickens against coccidiosis using an attenuated strain of *Eimeria tenella*. *Poult Sci* 1979;58:37-41.
 42. Garg R, Banerjee DP, Gupta SP. Immune responses in chickens against *Eimeria tenella* sporozoite antigens. *Vet Parasitol* 1999;81:1-10.
 43. Tennyson SA, Barta JR. Localization and immunogenicity of a low molecular weight antigen of *Eimeria tenella*. *Parasitol Res* 2000;86:453-460.
 44. Barta JR, Tennyson SA, Shito ML, Danforth HD, Martin DS. Partial characterization of a non-proteinaceous, low molecular weight antigen of *Eimeria tenella*. *Parasitol Res* 2000;86:461-466.
 45. Miska KB, Fetterer RH, Barfield RC. Analysis of transcripts expressed by *Eimeria tenella* oocysts using subtractive hybridization methods. *J Parasitol* 2004;90:1245-1252.
 46. Long PL, Millard BJ. Immunological differences in *Eimeria maxima*: effect of a mixed immunizing inoculum on heterologous challenge. *Parasitology* 1979;79:451-457.
 47. Kimura N, Mimura F, Nishida S, Kobayashi A. Studies on the relationship between intestinal flora and cecal coccidiosis in chicken. *Poult Sci* 1976;55:1375-1383.

- | | |
|--|--|
| <p>48. Shirley MW, Bedrník P. Live attenuated vaccines against avian coccidiosis: Success with precocious and egg-adapted lines of <i>Eimeria</i>. <i>Parasitol Today</i> 1997;13:481-487.</p> <p>49. Vermeulen AN. Progress in recombinant vaccine devel-</p> | <p>opment against coccidiosis a review and prospects into the millennium. <i>Inter J Parasitol</i> 1998;28:1121-1130.</p> <p>50. Vermeulen AN, Shaap DC, Schetter TPM. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. <i>Vet Parasitol</i> 2001;100:13-20.</p> |
|--|--|

La mención u omisión de cualquier marca o producto comercial en el presente estudio no favorece, recomienda o desalienta el empleo o uso de los mismos, los nombres, marcas y productos comerciales mencionados se emplean únicamente como referencia de investigación.