

DETERMINACIÓN *IN VITRO* DEL TIEMPO DE ESPORULACIÓN DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE *EIMERIA* EN CAPRINOS

Time of Sporulation for Several Species of *Eimeria* in Goats: an *In Vitro* Assessment

Isaías Hernández¹ y Neyla Mendoza²

¹Unidad de Investigación de Caprinos y Ovinos. Tarabana, Cabudare, Edo. Lara. Decanato de Ciencias Veterinarias. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". ²Estudiante VI Semestre Programa de Tecnología Agropecuaria.

Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Decanato de Ciencias Veterinarias. Carora, Edo. Lara, Venezuela.

E-mail: ihernan@cantv.net, ihernans@hotmail.com

RESUMEN

La esporulación de oocistos del género *Eimeria* spp. consiste en la segmentación del protoplasma en cuatro esporocistos y cada uno contiene dos esporozoitos. Dependiendo de las condiciones de humedad, temperatura y aireación, puede variar el tiempo de esporulación (TE) en las diferentes especies de *Eimeria* en caprinos. El objetivo del presente trabajo es determinar el TE *in vitro* de las diferentes especies de *Eimeria* de caprinos. Al someter muestras de heces de caprinos a un proceso de esporulación, proporcionándoles un ambiente con humedad de 73,5% y una temperatura promedio de 25°C, en una solución al 2,5% K₂Cr₃O₇ se obtuvieron los siguientes resultados: entre 2 - 22 horas ninguna de las especies de *Eimeria* de caprinos se observaron esporuladas, a las 24 horas comenzaron a esporular en un 14% las especies *E. alijeivi*, (71,4%), *E. jolchijevi* (14,3%), *E. hirci* (7,2%), *E. caprina* (7,2%), no se observó la presencia de estructuras definidas como el cuerpo de "Stieda", cuerpo residual, gránulo polar que son reconocibles y sujetos a variación entre las especies. A las 26 horas esporularon las especies de *Eimeria* en un 61%, constatando las mismas especies anteriores diferenciándose solamente en el porcentaje (42,6%, 8,2%, 37,7% y 4,9% respectivamente) más *E. caprovina*, *E. ninakohlyakimovae*, y *E. arloingi* (1,6%, 3,3% y 1,6% respectivamente). A las 34 -36 horas se verificó la esporulación completa de siete especies de *Eimeria*, evidenciándose las estructuras definidas que sirven para la diferenciación de las especies y comienza la esporulación de *E. christenseni* (2,9%). A las 48-70 horas comienza la esporulación *E. apsheronica* (0,06%). A las 96 - 102 horas esporularon las nueve especies comunes en caprinos que señala la literatura.

Palabras clave: *Eimeria* spp, oocistos, esporulación, caprinos, *in vitro*.

ABSTRACT

Oocysts of the genus *Eimeria* spp. sporulate when its protoplasma is divided into four sporocysts and each one contains two sporozoites. The time of sporulation (TOS) of caprine *Eimeria* spp varies for different species according to conditions of relative humidity (RH), temperature and air ventilation. The main objective of this work was to assess *in vitro* TOS for different species of *Eimeria* in goats. Fecal samples were washed, off and cleaned *Eimeria* spp oocysts were placed to sporulate in Petri dishes under a 73.5% RH, 25°C room temperature, in a 2.5% K₂Cr₃O₇ solution. After 2-22 hours no sporulation of *Eimeria* species was observed. Sporulation began at 24 hours in a 14% of the following species: *Eimeria alijeivi*, (71.4%), *E. jolchijevi* (14.3%), *E. hirci* (7.2%) and *E. caprina* (7.2%). Differential structures like body of *Stieda*, residual body, and polar grain were not observed. At 26 hours, the *Eimeria* species sporulated in a 61%, and the species above mentioned sporulated in a 42.6%, 8.2%, 37.7% and 4.9% respectively. In addition, *E. caprovina*, *E. ninakohlyakimovae* and *E. arloingi* also sporulated at 1.6%, 3.3% and 1.6% respectively. These species of *Eimeria* had a complete sporulation at 34-36 hours, and sporulation of *E. christenseni*, began as to microscopically verified (2.9%) the interval differential structures of sporulated oocysts. Finally, between 96 - 102 hours all nine species of *Eimeria* had a complete sporulation besides *E. Apsheronica* (0,06%).

Key words: *Eimeria* spp, oocysts, sporulation, goats, *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

El caprino es un animal que ha sido utilizado por el hombre desde tiempos remotos y en la actualidad tiene gran importancia como recurso básico explotado en las zonas áridas y

semiáridas del país, ubicadas principalmente en los estados Falcón, Lara y Zulia.

El sistema de producción predominante en las explotaciones caprinas del centro occidente del país es el tipo extensivo, donde las medidas de manejo, especialmente sanitaria del rebaño son escasas.

Estas precarias condiciones de manejo provocan deterioro progresivo de los animales, que se traduce en abortos, alta mortalidad de cabritos, baja producción de leche, bajos pesos al nacer e incremento en la prevalencia de enfermedades como las parasitosis causadas por artrópodos, helmintos y protozoarios. Entre las parasitosis que pueden afectar a los caprinos y que además constituyen una enfermedad con alta morbilidad y mortalidad, se encuentran las ocasionadas por el género *Eimeria* spp, donde se pueden mencionar las siguientes especies *E.arloingi* (Marotel, 1905), *E. christenseni*, (Levine, Ivens y Fritz, 1962), *E. jolchijevi* (Musaev, 1970), *E. hirci* (Chevalier, 1966), *E. ninakohlyakimovae* (Yakimoff & Rastegaieff, 1930), *E. alijevi* (Musaev, 1970), *E. apsheronica* (Musaev, 1970), *E. caprina* (Lima, 1979), *E. caprovina* (Lima, 1980).

La morfología y el tamaño de las diferentes especies de *Eimeria* es muy variable, siendo las formas más comunes las esféricas, subesféricas, ovoides o elipsoidales. Poseen una pared compuesta por dos o más capas (una a base de queratina y otra proteica) y generalmente es clara y transparente con un contorno doble bien definido pudiendo estar limitada por una membrana, sin embargo algunas especies pueden tener la pared del ooquiste de color amarillo e incluso verde. El ooquiste puede o no tener una abertura en el extremo anterior, cubierto o no por un tapón llamado capuchón polar. En el interior del ooquiste esporulado se encuentran cuatro esporoquistes y a su vez dos esporozoitos, cada esporoquiste posee un cuerpo de "Stieda" que cuando esta bien definido indica que el ooquiste esta completamente esporulado, Quiroz [10] y Levine [8].

Las especies del género *Eimeria* son protozoarios que se encuentran en diversos lugares parasitando varias especies animales, incluyendo los caprinos, provocando la eimeriosis, enfermedad infecciosa autolimitante relativamente común que se manifiesta en mayor grado en cabritos, disminuyendo a medida que avanza de edad, debido a la adquisición de inmunidad, como lo afirman Aumont y col. [1] y Blood y col. [2].

El proceso de esporulación consiste en la segmentación del protoplasma en pequeños cuerpos infectivos llamados esporozoitos que se encuentran dentro de los esporoquistes y estos a su vez se encuentran dentro del ooquiste. En el género *Eimeria* spp. el ooquiste esporulado posee cuatro esporoquistes conteniendo cada uno dos esporozoitos. Es necesario para que ocurra ese proceso, proporcionar condiciones favorables de humedad, temperatura y oxígeno en el ambiente. Por tal motivo, en el presente trabajo se proporcionó a los ooquistes obtenidos de las muestras de heces las condiciones ideales *in vitro* para alcanzar su máximo desarrollo y hacerse infes-

tante. Obtenido el tiempo de esporulación de las diferentes especies de *Eimeria*, se podría extrapolar estos resultados al campo y hacer la recomendación a los caprinocultores de la región en relación a las medidas sanitarias pertinentes, controles con productos químicos y la eficiencia de su aplicación.

En el presente trabajo se planteó el siguiente objetivo:

Determinar el tiempo de esporulación de los ooquistes del género *Eimeria* spp. de caprinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área

El trabajo se realizó en el Laboratorio de la Unidad de Investigación de Caprinos y Ovinos (UNICO) del Decanato de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", ubicada en Tarabana, municipio Palavecino, estado Lara.

Tipo y Tamaño de la Muestra

Se utilizaron las muestras de heces de los caprinos recolectadas por manipulación rectal mensualmente durante seis meses en tres municipios del estado Lara: Iribarren 600 muestras (parroquias: Aguedo Felipe Alvarado, Tamaca, El Cují, Buena Vista, Juan de Villegas), Jiménez 840 muestras (parroquias: Tintorero, Cuara, Diego de Lozada, San Miguel, Cabo José Dorante, Juan B. Rodríguez, Coronel Mariano Peraza) y Urdaneta 420 muestras (parroquias: Siquisique, Baragua y San Miguel).

La metodología empleada para cuantificar los ooquistes de *Eimeria* spp fue la técnica de flotación de Gordon y Whitlock [5], modificada, la cual utiliza la cámara McMaster.

Para la esporulación de los ooquistes se tomó un "pool" de la solución acuosa resultante de la técnica anterior y se colocó en una cápsula de "Petri", tomando 5 cc en un tubo de ensayo para centrifugar, lavar y colocar con solución de "Sheater" para permitir la flotación de los ooquistes, permitiendo la adhesión de los ooquistes en una laminilla para observarlos al microscopio.

Se verificó la esporulación de las diferentes especies de *Eimeria* cada dos horas hasta encontrar un 100% de esporulación de cada una de la especies. Se realizaron un total 135 repeticiones de los tiempos estipulados (desde dos hasta 102 h) con un promedio de tres repeticiones por cada uno de los tiempos, con el fin de hacer más confiable los resultados obtenidos. Se tomó en cuenta el tiempo desde el momento de la toma de muestra hasta realizar el proceso de esporulación. Fueron monitoriadas todas las variables intervinientes que pudieran alterar el proceso de esporulación como temperatura, humedad, cantidad de agua y $K_2Cr_3O_7$ al 2.5% utilizado.

Manejo del Rebaño

Todas las explotaciones seleccionadas mantienen el mismo tipo de manejo extensivo donde los animales salen en la mañana a pastoreo luego del ordeño y regresan en la tarde. El rebaño está compuesto de 80 a 90 animales en promedio. Las razas explotadas son Nubian, La Mancha, Alpino Francés y sus mestizos.

No hay separación de los animales por sexo o edad, tampoco existe control de monta, ni hay identificación. Se realizaron desparasitaciones periódicamente, principalmente para el control de las helmintiasis.

La alimentación se sustentó en el pastoreo de la vegetación natural *Prosopis juliflora*, *Acacia macracantha*, *Bulnesia arborea*, *Upuntia caracasana*, *Malphigia glaba*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de muestras analizadas, se recolectaron en promedio heces de cuatro animales por finca tomando en cuenta los animales con mayor número de ooquistes, según la cuantificación realizada, utilizando la técnica de flotación y sometidos a una temperatura promedio de laboratorio de 25°C, humedad relativa ambiental de 73,5 %, encontrándose lo siguiente: se constató la esporulación de un total de 2942 ooquistes de *Eimeria* spp, las cuales se observaron cada dos horas hasta completar un período de 102 horas, realizándose 135 repeticiones (tres repeticiones en promedio por cada dos horas), exceptuando las horas 2-14-16-18, que solo se hizo una repetición, observando las siguientes especies: *E. arloingi* (8,9%), *E. christenseni* (5,05%), *E. jolchijevi* (36,8%), *E. hirci* (22,5%), *E. ninakohlyakimovae* (9,2%), *E. alijevi* (7,98%), *E. caprovina* (14,13%), *E. caprina* (5,27%) y *E. apsheronica* (0,05%).

A partir de las 2 horas hasta las 22, todas las muestras observadas eran positivas para *Eimeria* spp no encontrándose ooquistes esporulados TABLA I.

A partir de las 24 horas se observó que los ooquistes comenzaban su proceso de esporulación, pudiéndose constatar el inicio de la segmentación protoplasmática, donde se forman los cuatro esporoquistes y dentro de ellos no existe diferenciación clara de los dos esporozoitos, tampoco hubo presencia de estructuras definidas como el cuerpo de "Stieda", cuerpo residual, gránulo polar reconocibles y sujetos a variación entre las especies. Entre las especies que esporularon a las 24 horas: solo se observó 14% de ooquistes esporulados diferenciándose las especies *E. alijevi*, (71,4%) *E. jolchijevi* (14,3%), *E. hirci*, (7,2%), y *E. caprina* (7,2%), es de hacer notar que de las tres repeticiones que se hicieron, solo una resultó con ooquistes en fase inicial de esporulación, indicando que no todas las especies comienzan dicho proceso a las 24 horas TABLA I. Parecidos resultados encontraron Lapage [7], Carmel y col. [3], quie-

nes afirman que las diferentes especies de *Eimeria* esporulan a partir de un día hasta los seis días.

A partir de las 26 horas, de las tres repeticiones realizadas sólo una se observó con ooquistes esporulados en un 61%, constatando las mismas especies anteriores diferenciándose solamente en el porcentaje (42,6%, 8,2%, 37,7% y 4,9%, respectivamente) más *E. caprovina*, *E. ninakohlyakimovae* y *E. arloingi* (1,6%, 3,3% y 1,6%, respectivamente) TABLA I.

Es importante señalar que en una de las repeticiones realizadas la muestra se sometió a un período de conservación en frío por un tiempo aproximado de 18 horas, motivado al traslado de las mismas desde el municipio Urdaneta hasta el Laboratorio de la Unidad de Investigación de Caprinos y Ovinos, presumiendo que bajas temperaturas retardan la esporulación.

Las horas siguientes, 28-30 y 32 respectivamente, se observaron las mismas especies de *Eimeria*, nombradas anteriormente, con variación de sus porcentajes únicamente TABLA I.

Para las 34 y 36 horas, los ooquistes esporulados encontrados alcanza el 100%, observándose las mismas especies señaladas en las horas anteriores, lo que indica que a partir de las 34 horas los ooquistes de las diferentes especies de *Eimeria* comienzan su esporulación, sin la presencia y naturaleza de estructuras definidas. Se evidenció que la *E. christenseni* se presentó en pequeñas proporciones 2,9%, (4 ooquistes de un total de 140 esporulados observados) TABLA I, lo que corrobora lo expresado por Cordero del Campillo y Rojo Vázquez [4], quienes afirman que *E. christenseni* se presenta generalmente en cabritos, haciéndose necesario el muestreo en animales con una edad comprendida entre 2-3 meses.

A partir de las 38 horas hasta las 46 horas las muestras se sometieron nuevamente a períodos de conservación en frío por los mismos motivos expresados anteriormente, constatando igualmente que probablemente el frío retarda la esporulación TABLA I.

A partir de 48 horas hasta las 70 horas se observó un mayor número de ooquistes esporulados que alcanza el 100% con un proceso de esporulación incipiente, excepto *E. jolchijevi* que a las 60 horas presentaba una esporulación casi completa TABLA I, evidenciándose sin mucha claridad el cuerpo de "Stieda" y el gránulo polar.

A las 78 horas continuaron todas las especies nombradas anteriormente en proceso de esporulación excepto *E. christenseni* y *E. arloingi* que presentaban un proceso de esporulación casi completa TABLA I, es decir, cuerpo de "Stieda" más o menos visible. Diferentes resultados encontraron Jubb y Kennedy [6], quienes concluyen que *E. arloingi* esporula de 24-48 horas y Soulsby [11], describe el período de esporulación de *E. arloingi* entre 48-72 horas y *E. apsheronica* de 1-2 días. Cordero del Campillo y Rojo Vázquez [4] señalan que *E. arloingi* esporula a 20°C a las 60 horas y a temperatura am-

TABLA I
PORCENTAJE DE ESPECIES DE *EIMERIA* ESPORULADAS DE CAPRINOS DESDE 2 HORAS HASTA 102 HORAS

Horas	<i>Eimeria alijeivi</i>	<i>Eimeria. arloingi</i>	<i>Eimeria apsheronica</i>	<i>Eimeria caprina</i>	<i>Eimeria caprovina</i>	<i>Eimeria christenseni</i>	<i>Eimeria hirci</i>	<i>Eimeria jolchijevi</i>	<i>Eimeria ninakohlyak imovae</i>	Total
2-22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24 *	10 (71,4)	-	-	1 (7,2)	-	-	1 (7,2)	2 (14,3)	-	14
26	26 (42,6)	1 (1,6)	-	3 (4,9)	1 (1,6)	-	23 (37,7)	5 (8,2)	2 (1,6)	61
28-32	2 (5,3)	8 (21)	-	1 (2,6)	-	-	6 (15,8)	17 (44,7)	4 (10,5)	38
34-36**	9 (6,7)	4 (3)	-	3 (2,2)	4 (3)	4⊙ (2,9)	19 (14)	84 (62,7)	7 (5,2)	134
38-46 [√]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48-70	239 (14)	122 (7,2)	1 (0,06)	82 (4,8)	68 (4)	65 (3,8)	358 (21)	659 (39)	114 (7)	1708
78	15 (8,2)	16 (8,8)	-	22 (12)	17 (9,3)	39 (21,4)	3 (1,6)	53 (29,1)	17 (9,3)	182
***	50 (6,2)	93 (11,6)	1 (0,12)	53 (6,6)	43 (5,3)	32 (3,9)	149 (18,5)	288 (35,8)	96 (11,9)	805
96-102										
Total	351	244	2	165	133	140	559	1108	240	2942

* Inicio de las esporulaciones ** Todas las especies inician su esporulación, excepto *E. apsheronica* *** Esporulaci3n completa de todas las especies de *Eimeria*. Muestras conservadas en fr3o. Muestras de cabritos

biente a las 24-48 horas. *E. christenseni*, seg3n el mismo autor, esporula a los seis d3as a temperatura ambiente.

A las 96 hasta las 102 horas se observ3 esporulaci3n completa de nueve especies de *Eimeria* spp (*E. arloingi*, *E. alijeivi*, *E. apsheronica*, *E. christenseni*, *E. caprina*, *E. caprovina*, *E. hirci*, *E. jolchijevi*, y *E. ninakohlyakimovae*), observando en forma n3tida el cuerpo de "Stieda", gr3nulo polar y cuerpo residual. Diferentes resultados encontraron Viera y Lima [12] estudiando la especie *E. ninakohlyakimovae* encontraron un per3odo de esporulaci3n de 2-3 d3as a una temperatura de 30°C, Lima [9], describiendo por primera vez la especie *E. caprina* donde encontr3 un per3odo de esporulaci3n igualmente de 2-3 d3as y Cordero del Campillo y Rojo V3zquez [4] quienes se3alan un per3odo de esporulaci3n para *E. ninakohlyakimovae* de 60 horas a una temperatura de 20°C y de 24-48 horas a temperatura ambiente TABLA I.

CONCLUSIONES

No se observ3 esporulaci3n de ninguna especie de *Eimeria* de caprinos a partir de dos horas hasta las 22 horas de incubaci3n en el lugar y condiciones ofrecidos a los ooquistes.

La especie que primero mostr3 indicios de esporulaci3n (antes de las 24 horas) fue *E. jolchijevi*.

Se observ3 comienzo de esporulaci3n a partir de la 24 horas de las especies *E. jolchijevi*, *E. hirci*, *E. caprina*, *E. alijeivi*.

A las 96 horas (4^{to} d3a) se observ3 esporulaci3n completa de ocho especies de *Eimeria* (*E. jolchijevi*, *E. arloingi*, *E. christenseni*, *E. hirci*, *E. alijeivi*, *E. caprina*, *E. caprovina*, *E. ninakohlyakimovae*).

A las 102 horas (cuatro d3as y seis horas) esporul3 *E. apsheronica*.

A una temperatura promedio de 25°C y a una humedad relativa de 73,5% los ooquistes de *Eimeria* spp de caprinos esporulan de forma completa a los cuatro d3as y seis horas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AUMONT, G.; YVORE, P.; ESNAULT, A. Experimental coccidiosis in goat. 1. Experimental model effects of parasitism on the feeding behavior and the growth of animal and intestinal lesion. **Ann. Rech. Vet.** 15:(4) 467 - 473. 1984.
- [2] BLOOD, D.C.; RADOSTITIS, O.M.; HENDERSON, J.A. **Medicina Veterinaria**. 6 Ed. M3xico. Interamericana. 1441. 1986.
- [3] CARMEL, D.K.; BARAO, S.M.; CASSEL, E.K. Coccidia infection in ruminants. **Collection: herd and Animal Health**. Massachusetts. 1992.
- [4] CORDERO DEL CAMPILLO, M.; ROJO V3ZQUEZ, F.A. **Parasitolog3a Veterinaria**. Mc Graw-Hill. Interamericana de Espa3a, S.A.U. Madrid, Espa3a. 968 pp. 1999.
- [5] GORDON, H. McL.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode egg in faeces. **J. Counc. Sci. Ind. Res.** Aust. (12): 50 - 22. 1939.
- [6] JUBB, P.C.; KENNEDY, V.F. **Patolog3a de los animales dom3sticos**. Ed. Labor S.A. Tomo Segundo. 169-171 pp. 1974.
- [7] LAPAGE, G. **Parasitolog3a Veterinaria**. Compa3a Editorial Continental. S.A. M3xico. 642 pp. 1979

- [8] LEVINE, N.D.; IVENS, V. **The coccidian parasites (Protozoa, Sporozoa) of ruminants.** Urbana. Illinois University Press. 278 pp. 1970.
- [9] LIMA, J.D. *Eimeria caprina* sp. From the domestic goat *Capra hircus*, from the USA. **J. Parasitol.** v. 65. 902-903. 1979.
- [10] QUIROZ, R.H. **Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos.** Ed. Limusa. México. 280pp. 1990.
- [11] SOULSBY, E.J.L. Immune response in parasitic infection: **Inmunology, immunopathology and immunoprophylaxis.** v. I: Nematodes. 1987
- [12] VIERA, L.; LIMA, J.D.; ROSA, J.S. Development of *Eimeria ninakohlyakimovae* (Yakimoff & Rastegaieff, 1930) emend. Levine, 1961 in experimentally infected goats (*Capra Hircus*). **J. Parasitol.** 1015-1018. 1997.