

# Comparación entre el efecto de *Lactobacillus casei* y el de una vacuna comercial en pollos contra la coccidiosis

## Comparative effect between *Lactobacillus casei* and a commercial vaccine against coccidiosis in broilers

Carlos Ramón Bautista Garfias<sup>a,c</sup>, María Teresa Arriola González<sup>b</sup>, Lauro Trejo Castro<sup>c</sup>, Olga Ixta Rodríguez<sup>c</sup>, Edmundo Rojas Ramírez<sup>a</sup>

### RESUMEN

El estudio se llevó a cabo para determinar el efecto protector de *L. casei* en pollos contra la infección por *Eimeria* spp. En la fase I (FI), 165 pollos fueron usados para aislar *Eimeria* spp. de granjas comerciales. En la fase II (FII), 300 pollos fueron distribuidos al azar en cinco grupos, cada uno con tres repeticiones (20 pollos/repetición). Las aves del grupo A recibieron una vacuna comercial, por vía oral 15 días antes de la confrontación (a.c.). Cada uno de los pollos del grupo B fue inoculado por vía intraperitoneal (i.p.) con *L. casei* viables siete días a.c. Los animales del grupo C fueron inoculados por vía i.p. con sobrenadante del cultivo de *L. casei* siete días a.c. Las aves del grupo D fungieron como Testigo-no tratado-infectado y las del grupo E permanecieron como Testigo-no tratado-no infectado. La protección se evaluó usando el índice anticoccidial (IA). En la FI se determinó utilizar una mezcla de ooquistes de *Eimeria acervulina* (125,000), *E. tenella* (100,000) y *E. maxima* (100,000) por pollo en la confrontación. El IA obtenido en la FII, fue de 189 (apropiado), 177 (moderado), 86 (malo), 65 (malo) y 200 (bueno) para los grupos A, B, C, D y E, respectivamente. En el día 33 posconfrontación el peso promedio de los pollos tratados con la vacuna y el de los inoculados con *L. casei* fue similar. Los resultados sugieren que *L. casei* podría ser usado en pollos de engorda como alternativa para el control de la coccidiosis.

**PALABRAS CLAVE:** Resistencia inespecífica, Pollos de engorda, *Lactobacillus casei*, *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, *E. maxima*.

### ABSTRACT

This study was carried out to determine a possible protective effect of *Lactobacillus casei* against *Eimeria* spp. infection in broilers. In Stage I (SI), 165 broilers were used to isolate *Eimeria* spp. in commercial farms and to determine the number of oocysts to be used per bird in a challenge. In Stage II (SII), 300 broilers were distributed at random into five groups, each with three replicates (20 birds/replicate). Birds in group A were treated with a commercial vaccine, orally 15 d before the challenge (b.c.). Each bird in group B was inoculated intraperitoneally (i.p.) with viable *L. casei* organisms 7 d b.c. Animals in group C were inoculated i.p. with a supernatant from *L. casei* growth media seven d b.c. Birds in group D acted as non-treated infected control and those from group E performed as non-treated uninfected control. Protection was assessed through the anticoccidial index (AI). In SI a combination of *Eimeria acervulina* (125,000), *E. tenella* (100,000) and *E. maxima* (100,000) oocysts per bird was used as an inoculum in the challenge. The AI obtained in SII for groups A, B, C, D, and E was 189 (adequate), 177 (moderate), 86 (bad), 65 (bad) and 200 (good), respectively. On d 33 a.c. mean weight of broilers treated with the vaccine and of those inoculated with *L. casei* was similar. These results suggest that *L. casei* could be considered as an alternative for coccidiosis control in broilers.

**KEY WORDS:** Nonspecific resistance, Broilers, *Lactobacillus casei*, *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, *E. maxima*.

Recibido el 30 de agosto de 2002 y aceptado para su publicación el 10 de abril de 2003.

a Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km 11.5 Carretera Cuernavaca-Cuautla. Col. Progreso. 62550. Jiutepec, Morelos. Tel (777) 319-2850; bautir@pavet.inifap.conacyt.mx. Correspondencia y solicitud de separatas al primer autor.

b Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal, SAGARPA.

c Departamento de Parasitología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN.

Los agentes causantes de la coccidiosis intestinal son protozoarios parásitos pertenecientes al género *Eimeria*. Esta enfermedad, caracterizada por una enteritis, produce pérdidas económicas significativas particularmente a la industria avícola en todo el mundo; por ejemplo, en la Gran Bretaña se estimó para 1995 un costo total de 38'588,795 libras esterlinas por coccidiosis aviar<sup>(1)</sup>. Sin embargo, esta enfermedad se controla principalmente por medio de la administración de fármacos en el alimento; en este sentido, la rápida aparición de cepas resistentes a los fármacos<sup>(2)</sup>, los costos prohibitivos para el desarrollo y registro de nuevos fármacos<sup>(3)</sup>, así como las dificultades para producir vacunas basadas en antígenos definidos en el corto plazo<sup>(3,4)</sup>, ha estimulado el interés por desarrollar nuevas alternativas de control. Cabe señalar que el uso de inmunoestimulantes es una de tales alternativas, y se ha demostrado que distintos inmunoestimulantes aplicados en diferentes especies animales inducen resistencia no específica contra la infección por parásitos como *Fasciola hepatica*<sup>(5)</sup>, *Haemonchus contortus*<sup>(6)</sup>, *Toxoplasma gondii*<sup>(7)</sup>, *Eimeria tenella*<sup>(8)</sup> y *Trichinella spiralis*<sup>(9)</sup>. En experimentos relacionados, también se demostró que *Lactobacillus casei* viable administrado por las vías intraperitoneal y oral en ratones NIH generó una resistencia significativa contra la infección por *T. spiralis*<sup>(10,11)</sup> e *Hymenolepis nana*<sup>(12)</sup>. El objetivo del presente trabajo fue comparar la protección generada por una vacuna comercial y la inducida por la administración intraperitoneal (ip) de *Lactobacillus casei* viable en pollos de engorda contra la infección mixta de *Eimeria acervulina*, *E. tenella* y *E. maxima*.

El estudio consistió de dos fases: la primera para obtener el material biológico (inóculo) a partir de granjas avícolas del estado de Morelos y la segunda para comparar la protección conferida por *Lactobacillus casei* y la inducida por una vacuna comercial.

#### Fase 1

Para la obtención de aislados mixtos de ooquistes de las diferentes especies de *Eimeria* en pollos de engorda, se procesaron muestras de heces frescas provenientes de granjas comerciales de pollos de

Parasitic protozoa belonging to the genus *Eimeria* are the causal agents of intestinal coccidiosis. This illness, characterized by diarrhea, produces significant economic losses in the broiler industry worldwide. For example in the UK, losses owing to this illness in 1995 were estimated at £ 38'588,795<sup>(1)</sup>. However, this disease is customarily controlled with drugs added to feed, but new drug resistant strains keep coming up<sup>(2)</sup> giving rise to increased costs in new drug development<sup>(3)</sup>, which added to the practical impossibility to produce vaccines based on antigens defined in a very short space of time<sup>(3,4)</sup>, has encouraged an interest to develop new control methods. It should be stated that immunostimulants could be a valid alternative. Immunostimulants have been tested in several animal species and it is a proven fact that they induce non specific resistance to parasite infection, as is the case of *Fasciola hepatica*<sup>(5)</sup>, *Haemonchus contortus*<sup>(6)</sup>, *Toxoplasma gondii*<sup>(7)</sup>, *Eimeria tenella*<sup>(8)</sup> and *Trichinella spiralis*<sup>(9)</sup>. In related experiments, *Lactobacillus casei* administered intraperitoneally and orally to NIH mice generated significant resistance to infections due to *T. spiralis*<sup>(10,11)</sup> and *Hymenolepis nana*<sup>(12)</sup>. The object of the present study was to compare protection generated by a commercial vaccine with one induced by viable *Lactobacillus casei* inoculated intraperitoneally in broilers against a combined infection due to *Eimeria acervulina*, *E. tenella* and *E. maxima*.

This study was performed in two stages, the first one to obtain inoculum from commercial broiler farms in the State of Morelos and the second to compare protection conferred by *Lactobacillus casei* and that induced by a commercial vaccine.

#### Stage 1

In order to obtain oocyst isolates of different species belonging to the genus *Eimeria* in broiler farms, samples of fresh faeces were collected from farms located in each of the following municipalities in the State of Morelos, where coccidiosis is endemic, Jiutepec (JIU), Cuernavaca (CUER), Villa de Ayala (VAY), Oaxtepec (OAX), Jonacatepec (JON) and Puente de Ixtla (PIX). Only one farm per municipality was sampled.

engorda, a razón de una granja por cada uno de los siguientes seis municipios del estado de Morelos, considerados como endémicos de coccidiosis aviar: Jiutepec (JIU), Cuernavaca (CUER), Villa de Ayala (VAY), Oaxtepec (OAX), Jonacatepec (JON) y Puente de Ixtla (PIX).

De cada caseta en cada granja se colectaron de 200 a 500 g de heces frescas al azar, directamente de la cama de heces recién evacuadas, de cinco sitios diferentes (cuatro de los extremos y uno del centro). Las muestras de heces se depositaron en bolsas de plástico, utilizando refrigerante para su conservación, y se transportaron al laboratorio; se examinaron por medio de la técnica de McMaster<sup>(13)</sup> para obtener el número de ooquistes por gramo de heces (OPG).

Posteriormente, las muestras se analizaron para la identificación de las diferentes especies de *Eimeria*, de acuerdo a las características de los ooquistes esporulados<sup>(14)</sup>. Las coccidias se aislaron de acuerdo a Ryley *et al.*<sup>(15)</sup>, se dejaron esporular por dos días a temperatura ambiente y se guardaron en refrigeración a 4 °C hasta su uso. Posteriormente se administraron por vía oral, 100 ooquistes puros de cada especie/ave (pollos de engorda de la línea “Hubbard”) y luego, para obtener el inóculo necesario, se administraron oralmente 5,000 ooquistes/ave para el caso de *E. tenella*, 50,000 ooquistes/ave para el de *E. acervulina* y 25,000 ooquistes/ave para el de *E. maxima*/ave en grupos de cinco pollos por cada especie de *Eimeria*.

Para evaluar la patogenicidad de los aislados de las tres especies de *Eimeria* identificadas, 165 pollos de engorda de la línea “Hubbard”, de 14 días de edad y libres de *Eimeria* spp., fueron confinados en jaulas en grupos de cinco aves/dosis. Las dosis de ooquistes/pollo evaluadas (administradas por vía oral) fueron de 20,000; 50,000 y 100,000 para *E. tenella* (de CUER, JIU, JON y OAX) y *E. maxima* (de OAX y VAY) y de 60,000; 125,000 y 250,000 para *E. acervulina* (de CUER, JIU, JON, VAY y PIX). Después de la inoculación, diariamente se tomaron muestras de heces hasta el día siete para determinar el índice de excretas (IE)<sup>(13)</sup>; asimismo, en esta fecha todas las aves fueron sacrificadas y

From each shed in each farm, between 200 and 500 g of fresh faeces were collected at random from five different locations, (four from the sides and one from the middle). Samples were placed in plastic bags, set in refrigerated containers and taken to the laboratory. Oocyst concentration (OPG) was determined through McMaster<sup>(13)</sup> technique.

Afterwards, samples were examined to help identify different species of *Eimeria*, in accordance with their spored oocysts<sup>(14)</sup>. Coccidia were isolated through what is recommended by Ryley *et al.*<sup>(15)</sup>, then left to spore for two days and kept refrigerated at 4 °C until needed. Afterwards they were administered orally at the rate of 100 oocysts of each species per bird to “Hubbard” broilers and, to obtain an adequate quantity of inoculum; 5,000 oocysts/bird of *Eimeria tenella*, 50,000 oocysts/bird of *E. acervulina* and 25,000 oocysts/bird of *E. maxima* were administered orally in groups of five birds each for each *Eimeria* specie.

To evaluate pathogenicity of the three identified species of *Eimeria* isolates, 165 fourteen days old “Hubbard” broilers free of *Eimeria* spp., were placed in cages in groups of five birds per dose. Assessed oocyst/bird doses (administered orally) were 20,000; 50,000 and 100,000 for *E. tenella* (from CUER, JIU, JON and OAX) and *E. maxima* (from OAX and VAY) and 60,000, 125,000 and 250,000 for *E. acervulina* (from CUER, JIU, JON, VAY and PIX). After inoculation, faeces samples were collected daily for seven days to determine an excret index (EI)<sup>(13)</sup>. On day seven all birds were killed and their intestines examined to determine an oocyst index (OI) and also an intestinal injury index (IL)<sup>(13)</sup>. Pathogenicity was determined through IL, in accordance with this scale: IL0= 0 % pathogenicity, IL+1= 25 % pathogenicity, IL+2= 50 % pathogenicity, IL+3= 75 % pathogenicity and IL+4= 100 % pathogenicity<sup>(13)</sup>. Based on these three indices, isolates of each species were selected to carry out stage two at the Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal, SAGARPA, in Jiutepec, Morelos.

### Stage 2

Three hundred one day old “Hubbard” broilers were distributed at random in five groups of 60

se examinaron sus intestinos para determinar los índices de ooquistes (IO) y de lesión intestinal (IL)<sup>(13)</sup>. El porcentaje de patogenicidad se estimó de acuerdo al IL, de la siguiente manera: IL0= patogenicidad 0 %, IL+1= patogenicidad 25 %, IL+2= patogenicidad 50 %, IL+3= patogenicidad 75 %, IL+4= patogenicidad 100 %<sup>(13)</sup>. Con base en los tres índices indicados, se seleccionaron los aislados de cada especie para llevar a cabo la segunda fase del estudio en las instalaciones del Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal, SAGARPA, en Jiutepec, Morelos.

### Fase 2

Se utilizaron 300 pollos de engorda de la línea "Hubbard", de un día de edad que fueron distribuidos aleatoriamente en cinco grupos de 60 aves, divididos en tres repeticiones de 20 pollos cada una. Las aves de cada grupo fueron mantenidas en jaulas individuales en donde consumieron alimento comercial sin coccidiostato y agua *ad libitum* durante todo el experimento.

Se utilizó la cepa ATCC7469 de *Lactobacillus casei*, la cual fue cultivada en caldo MRS (Man-Rogosa-Sharpe), incubando en estufa bacteriológica a 35 °C durante 18 h, tiempo en que se cosechó la bacteria para ajustar el inóculo a administrar y que consistió en  $1.8 \times 10^9$  organismos viables/dosis. Adicionalmente, se preparó el sobrenadante libre de lactobacilos por medio de centrifugación del medio de cultivo a 3,000 xg a 4 °C por 10 min.

Se utilizó la vacuna "Coccivac B" que consiste en una mezcla de cepas atenuadas de *E. acervulina*, *E. tenella*, *E. mivati* y *E. maxima* (Laboratorios Sterwin, USA; Schering-Plough, México) y se administró de acuerdo a las instrucciones del laboratorio fabricante.

De acuerdo a los resultados de la F1 se determinó utilizar como inóculo para cada ave, una mezcla de ooquistes de las siguientes aislados de *Eimeria* del estado de Morelos: aislado "Cuernavaca" de *Eimeria acervulina*, aislado "Oaxtepec" de *E. maxima* y aislado "Jiutepec" de *E. tenella*.

birds each, in three replicates of 20 birds each. Birds in each group were placed in individual cages and fed with commercial feed without coccidiostates and provided with water *ad libitum*.

Strain ATCC7469 of *Lactobacillus casei* was used, which was nurtured in MRS (Man-Rogosa-Sharpe) broth, at 35 °C in a bacteriological stove for 18 h, then harvested and the inoculum prepared at a concentration of  $1.8 \times 10^9$  viable cells/dose. In addition, a supernatant free of lactobacilli was prepared by centrifuging the growth media at 3,000 xg for 10 min at 4 °C.

Avian coccidiosis "Coccivac B" vaccine was used. This vaccine is prepared by Sterwin Laboratories in the US and Schering-Plough in Mexico and consists of a combination of *E. acervulina*, *E. tenella*, *E. mivati* and *E. maxima* attenuated strains, and was administered in accordance with the manufacturer.

According with the results obtained in stage 1, an inoculum consisting of the following *Eimeria* isolates collected in the State of Morelos: *E. acervulina* "Cuernavaca", *E. maxima* "Oaxtepec" and *E. tenella* "Jiutepec" was prepared.

Each one of the 60 chickens in Group A was vaccinated orally with the "Coccivac B" vaccine 15 d before the challenge. Feed was restricted briefly for 24 h prior to vaccination. The vaccine administered was mixed with 150 g of feed. Each bird in Group B was inoculated intraperitoneally with  $1 \times 10^9$  viable *Lactobacillus casei* cells seven days before the challenge, in accordance with information provided by previous studies<sup>(10,11,12)</sup>. In Group C, each bird was inoculated intraperitoneally with 0.2 ml of *L. casei* cell free supernatant seven days before the challenge. Group D acted as infected non treated control and Group E as non treated, uninfected control. On challenge day, each 16 day chicken was administered orally the following mixture of *Eimeria* oocysts: *E. acervulina*, "Cuernavaca" isolate (125,000 oocysts), *E. maxima*, "Oaxtepec" isolate (100,000 oocysts) and *E. tenella* "Jiutepec" isolate (100,000 oocysts), for a grand total of 325,000 *Eimeria* oocysts.

Cada uno de los 60 pollos del grupo A recibió la vacuna “Coccivac B” por vía oral en el alimento, 15 días antes de la confrontación de acuerdo al fabricante. Brevemente, durante 24 h se restringió el consumo de alimento a los pollos, para después administrar la vacuna mezclada en 150 g de alimento. A cada ave del grupo B se le inoculó  $1 \times 10^9$  *Lactobacillus casei* viable por vía intraperitoneal (i.p.) siete días antes de la confrontación, de acuerdo a la experiencia de estudios previos<sup>(10,11,12)</sup>. En el grupo C, cada pollo recibió por vía i.p. 0.2 ml de sobrenadante de cultivo de *L. casei*, libre de lactobacilos, siete días antes de la confrontación. Los pollos del grupo D permanecieron como testigo-no tratado-infectado; mientras que los del grupo E quedaron como testigo-no tratado-no infectado. El día de la confrontación, cada pollo de 16 días de edad recibió por vía oral una mezcla de ooquistes de *Eimeria acervulina*, aislado “Cuernavaca” (125,000 ooquistes), *E. maxima*, aislado “Oaxtepec” (100, 000 ooquistes) y *E. tenella*, aislado “Jiutepec” (100,000 ooquistes), para un total de 325,000 ooquistes.

Desde el inicio del experimento hasta el día 33 (edad de peso comercial), en que fueron sacrificados, los pollos fueron examinados diariamente. Los parámetros evaluados<sup>(8,13)</sup> fueron: a) Determinación del peso de las aves en los días 3, 15, 25 y 33; b) Porcentaje de ganancia relativa de peso (% GRP) = aumento del peso en grupo x 100/aumento del peso promedio de las aves del grupo no tratado-no infectado; c) Ganancia de peso = peso final - peso inicial; d) Porcentaje de sobrevivencia (% S) en los días 5, 6, 7 y 8 posinfección (p.i.); e) IE en los días 4, 5, 6 y 7 p.i. = Calificación total de excretas en el grupo x 100/número de aves evaluadas; f) IL (día 33); g) IO (día 33) = Calificación total de lesiones en el grupo x 10/número de aves evaluadas; h) Evaluación del índice anticoccidial (día 33) = (% S + % GPR) - (IL - IO)

Los resultados obtenidos en cuanto a ganancia de peso en el día 33 fueron sometidos a un análisis de varianza y cuando hubo diferencias entre grupos se utilizó la prueba de Tukey<sup>(16)</sup>.

En la Fase 1, en cinco (83.3 %) de los seis municipios del estado de Morelos examinados, se

From the beginning of the experiment to day 33 (commercial weight age) in which they were killed, chickens were examined daily. Evaluated parameters<sup>(8,13)</sup> were: a) Body weight at 3, 15, 25 and 30 d; b) Relative weigh gain (% RWG) as a ratio between weight gain per group and the average weight gain of Group E (non treated, non infected control); c) Weight gain final weight - initial weight; d) Survival percentage (% S) on d 5, 6, 7 and 8 post infection; e) EI on d 4, 5, 6, and 7 post infection; f) IL (d 33); g) OI (d 33) ratio between injury grading inside the group and total of assessed animals; h) Anticoccidial index assessment (d 33), a ratio between %S + % RWG and IL - OI.

Weight gain data were subjected to variance analysis and differences checked with Tukey’s test<sup>(16)</sup>.

In Stage 1, oocysts of the three species were found in five of the six municipalities (83.3 %) being studied. OPG showed the higher average in Puente de Ixtla (858,000) and the lower average in Jiutepec (82,850) (Table 1).

Pathogenicity was 100 % for *E. acervulina* “Cuernavaca” isolate and “Oaxtepec” isolate for *E. maxima*. For *E. tenella*, four isolates showed 100 % Pathogenicity, “Cuernavaca” (CUER), “Jiutepec” (JIU), “Jonacatepec” (JON) and

Cuadro 1. Especies de *Eimeria* aisladas de granjas comerciales de pollos de engorda del estado de Morelos y promedio de ooquistes por gramo de heces

Table 1. *Eimeria* species isolated in commercial broiler farms in the State of Morelos and oocysts in faeces

Municipality	Number of sheds	Isolated <i>Eimeria</i> species			Oocysts*
		<i>acervulina</i>	<i>tenella</i>	<i>maxima</i>	
Cuernavaca	6	+	+	+	174,400
Jiutepec	5	+	+	+	82,850
Jonacatepec	8	+	+	+	149,000
Villa de Ayala	4	+	+	+	310,000
Puente de Ixtla	6	+	+	+	858,000
Oaxtepec	10	+	-	+	199,200

\* Average per gram of faeces/shed

+ = presence; - = absence

observó la presencia de ooquistes de las tres especies. El municipio de Puente de Ixtla fue el que presentó el mayor promedio de OPG (858,000) en comparación con el municipio de Jiutepec, que presentó el menor promedio (82,850) (Cuadro 1).

La patogenicidad observada fue de 100 % tanto para *E. acervulina* aislado “Cuernavaca” como para *E. maxima* aislado “Oaxtepec”. Para el caso de *E. tenella* se encontraron cuatro aislados que presentaron un 100 % de patogenicidad, a una dosis de 100,000 ooquistes, y procedieron de los municipios de CUER (aislado “Cuernavaca”), JIU (aislado “Jiutepec”), JON (aislado “Jonacatepec”) y OAX (aislado “Oaxtepec”). Para llevar a cabo la segunda fase del estudio, se seleccionaron los aislados de *Eimeria* que presentaron 100 % de patogenicidad. En el caso particular de *E. tenella* se seleccionó el aislado “Jiutepec” ya que fue el que más ooquistes esporulados produjo. De acuerdo a lo anterior, el inóculo mixto a utilizar fue el siguiente: *Eimeria acervulina*, aislado “Cuernavaca” (125,000 ooquistes), *E. maxima*, aislado “Oaxtepec” (100,000 ooquistes) y *E. tenella*, aislado “Jiutepec” (100,000 ooquistes), para un total de 325,000 ooquistes/ave.

Al final de la Fase 2 (día 33) se observó que el peso promedio de las aves fue de 998, 985, 620, 629 y 1,154 g para los grupos A, B, C, D y E, respectivamente (Cuadro 2). La ganancia promedio

“Oaxtepec” (OAX). To carry out Stage 2, only isolates showing 100 % pathogenicity were chosen. In the case of *E. tenella*, the “Jiutepec” isolate was selected because it was the one which produced more spored oocysts. Owing to this, the inoculum used was a blend made up by *Eimeria acervulina* “Cuernavaca” isolate 125,000 oocysts, *E. maxima* “Oaxtepec” isolate 100,000 oocysts and *E. tenella* “Jiutepec” isolate 100,000 oocyst, for a grand total of 325,000 oocysts per bird.

At the end of Stage 2 (d 33), average weight was 998, 985, 620, 629 g and 1,154 g for groups A, B, C, D, and E, respectively (Table 2). Average weight gains for animals treated with vaccine (Group A) and *Lactobacillus casei* (Group B) was very similar and slightly lower than for Group E (non tread, uninfected). However, average weight for groups A and B was significantly higher than those of groups C (*L.actobacillus casei* supernatant) and D (non treated, infected) (Table 2).

Average OPG in faeces was similar in groups A (43,100) and B (52,166) but significantly lower ( $P < 0.05$ ) than those of groups C (287,000) and D (409,250) (Table 3).

The intestinal injury index (IL) determined through necropsy was higher in group D (non treated, infected) than in all the other groups. Besides, groups A and B showed intestinal injuries only in

Cuadro 2. Peso promedio en cuatro fechas posinfección y ganancia promedio de peso en pollos de engorda tratados o no con diversos esquemas e infectados con tres especies de *Eimeria* (g)

Table 2. Average weight and average weight gain of broilers on four post infection dates, under diverse treatments and infected with three *Eimeria* species (g)

	N°	Days				Average weight gain
		3	15	25	33	
A (Coccivac B)	60	53	210	510	998 <sup>b</sup>	945 <sup>b</sup>
B ( <i>L. casei</i> )	60	52	259	550	985 <sup>b</sup>	933 <sup>b</sup>
C (Supernatant <i>L. casei</i> )	60	53	250	530	620 <sup>c</sup>	567 <sup>c</sup>
D (Non treated-infected)	57	52	246	554	629 <sup>c</sup>	577 <sup>c</sup>
E (Non treated-uninfected)	60	52	260	647	1154 <sup>a</sup>	1102 <sup>a</sup>

abc Values showing different letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.01$ )

de peso de los animales de los grupos tratados con la vacuna (grupo A, 945 g) y con *L. casei* (grupo B, 933 g) fue muy similar entre éstos y ligeramente inferior al peso observado en el grupo no tratado-no infectado (grupo E, 1,102 g). Sin embargo, los pesos de los grupos A y B fueron significativamente mayores ( $P < 0.01$ ) a los de los grupos tratado con sobrenadante de *L. casei* (grupo C, 567 g) y no tratado-infectado (grupo D, 577 g) (Cuadro 2).

El promedio total de OPG de heces fue similar en los grupos A (43,100) y B (52,166) pero significativamente menor ( $P < 0.05$ ) que los valores obtenidos en los grupos C (287,000) y D (409,250) (Cuadro 3).

ileum, while groups C and D showed injuries in ileum, duodenum and caecum (Table 4).

The oocyst index (IO) on day 33 was higher in groups C (31.8) and D (40.0) than in groups A (6.4) and B (8.7). Groups A and B presented only *Eimeria maxima* oocysts, while groups C and D presented oocysts belonging to the three *Eimeria* species (Table 5).

With reference to the anticoccidial index (AI), obtained values were: 200 (excellent) for Group E (non treated, non infected), 189 (adequate) for Group A (vaccine), 177 (moderate) for group B (*Lactobacillus casei*), 86 (low) for group C

Cuadro 3. Promedio de ooquistes de *Eimeria* por gramo de heces del día 5 al día 8 posinfección en pollos tratados o no con diversos esquemas e infectados con tres especies de *Eimeria*

Table 3. Average *Eimeria* oocyst load per gram of faeces from day 5 to day 8 post infection in broilers, under diverse treatments and infected with three *Eimeria* species

	Days post infection				Average
	5	6	7	8	
A (Coccivac B)	21,000	85,000	14,400	52,000	43,100.0 <sup>b</sup>
B ( <i>L. casei</i> )	71,000	102,000	25,600	10,066	52,166.5 <sup>b</sup>
C (Supernatant <i>L. casei</i> )	305,000	432,000	282,000	129,000	287,000.0 <sup>a</sup>
D (Non treated-infected)	546,000	428,000	498,000	165,000	409,250.0 <sup>a</sup>
E (Non treated-uninfected)	0	0	0	0	0

ab Values showing different letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ )

Cuadro 4. Promedio del índice de lesión intestinal a la necropsia (día 33 posinfección) en pollos tratados o no con diversos esquemas e infectados con tres especies de *Eimeria*

Table 4. Average intestinal injury index in necropsy (d 33 post infection) in broilers, under diverse treatments and infected with three *Eimeria* species

	Intestine				Average
	Duodenum	Ileum	Jejunum	Caecum	
A (Coccivac B)	0	0.42	0	0	0.42
B ( <i>L. casei</i> )	0	0.53	0	0	0.53
C (Supernatant <i>L. casei</i> )	0.3	0.49	0	0.15	0.68
D (Non treated-infected)	2.1	1.8	0	1.53	5.43
E (Non treated-uninfected)	0	0	0	0	0

El índice de lesión intestinal a la necropsia fue mayor en el grupo no tratado-infectado que en los otros grupos. Asimismo en los grupos A y B sólo se observó lesión intestinal en el íleon en comparación con los grupos C y D, en los que hubo lesiones en el duodeno íleon y ciegos (Cuadro 4).

El índice de ooquistes en el día 33 fue mayor en los grupos C (31.8) y D (40) que el de los grupos A (6.4) y B (8.7). En estos dos últimos grupos sólo se observaron ooquistes de *E. maxima*, en

(*Lactobacillus casei* supernatant) and 65 (low) for group D (non treated, infected) (Table 6).

In six of the farms studied in the State of Morelos, one for each municipality, infections owing to the three *Eimeria* species were present and in one farm only, infection was due to two species. These data concur with the assertion that it is virtually impossible to find infections caused by only one *Eimeria* species in the domesticated fowl<sup>(17)</sup>. Besides, the fact that diverse isolates of the same

Cuadro 5. Promedio del índice de ooquistes a la necropsia (día 33 posinfección) en pollos tratados o no con diversos esquemas e infectados con tres especies de *Eimeria*

Table 5. Average oocyst index in necropsy (d 33 post infection) in broilers, under diverse treatments and infected with three *Eimeria* species

	Oocyst average			Total average oocysts	Oocyst index
	<i>E. acervulina</i>	<i>E. maxima</i>	<i>E. tenella</i>		
A (Coccivac B)	0	38	0	38 (+1)	6.4
B ( <i>L. casei</i> )	0	52	0	52 (+2)	8.7
C (Supernatant <i>L. casei</i> )	40	82	67	189 (+3)	31.8
D (Non treated-infected)	45	94	98	237 (+4)	40.0
E (Non treated-uninfected)	0	0	0	0 (+0)	0

Cuadro 6. Índice anticoccidial en pollos tratados o no con diversos esquemas e infectados con tres especies de *Eimeria*\*

Table 6. Anticoccidial index in broilers, under diverse treatments and infected with three *Eimeria* species\*

	% S	% RWG	IL	OI	AI
A (Coccivac B)	100	96	0.4	6.4	189
B ( <i>L. casei</i> )	100	86	0.5	8.7	177
C (Supernatant <i>L. casei</i> )	100	18	0.7	31.8	86
D (Non treated-infected)	95	15	5.4	40.0	65
E (Non treated-uninfected)	100	100	0	0	200

\* Challenge inoculum = 325,000 oocysts per bird (125,000 oocysts of *Eimeria acervulina*, "Cuernavaca" isolate + 100,000 oocysts of *E. maxima*, "Oaxtepec" isolate + 100, 000 oocysts of *E. tenella*, "Jiutepec" isolate).

% S= survival percentage.

% RWG= experimental group weight gain x 100 / control group weight gain.

IL= total intestinal injuries in group x 10 / total birds in group.

OI= oocysts in group x 0.4 x 100 / average oocysts in control.

AI= (% S + % RWG) – (IL + OI).

comparación con los grupos C y D, en los que se detectaron ooquistes de las tres especies de *Eimeria* (Cuadro 5).

En cuanto al índice anticoccidial (IA), los valores obtenidos fueron de 200 (óptimo) para el grupo E, no tratado-no infectado. El grupo A, tratado con la vacuna, presentó un IA de 189 considerado como adecuado y el grupo B, tratado con *L. casei*, obtuvo un IA de 177 que se considera como moderado. En los grupos C, tratado con sobrenadante de *L. casei*, y D, no tratado-infectado, se observaron índices anticoccidiales bajos de 86 y 65, respectivamente (Cuadro 6).

En seis de las granjas examinadas en el estado de Morelos, cada una en un municipio diferente, se encontraron infecciones mixtas por tres especies de *Eimeria* y sólo en una se presentaron dos especies del parásito, lo que concuerda con la aseveración de que es muy difícil encontrar infecciones por una sola especie en la gallina doméstica<sup>(17)</sup>. Asimismo, la observación de que distintos aislados de una misma especie hayan presentado diferentes grados de patogenicidad, es apoyada por los hallazgos de otros investigadores<sup>(18,19)</sup> en el sentido de que distintas cepas de la misma especie de *Eimeria*, pero provenientes de diferentes regiones, muestran distintos grados de patogenicidad y de antigenicidad<sup>(20,21,22)</sup>.

Llama la atención el hecho de que el tratamiento de las aves con *L. casei* produjo resultados similares a los obtenidos con los pollos inmunizados con la vacuna comercial. Clínicamente, las aves de los grupos A y B no mostraron signos de coccidiosis, mientras que las de los grupos C y D sí. La mortalidad fue de 0 % para los grupos A, B, C y E, mientras que en el grupo D fue de 5 %. Independientemente de la baja mortalidad observada, el inóculo de confrontación fue suficiente para mermar de manera significativa la ganancia de peso en las aves de los grupos C y D.

En la última década se han llevado a cabo estudios para esclarecer los mecanismos responsables de la respuesta inmune protectora adquirida de los pollos contra la infección por especies de *Eimeria*<sup>(23)</sup>. En esos estudios se ha indicado que la inmunidad

species showed differences in pathogenicity, agrees with what was found by other researchers<sup>(18,19)</sup>, in the sense that different strains of the same *Eimeria* species coming from different regions show variations in pathogenicity and antigenicity<sup>(20,21,22)</sup>.

A striking fact is that the treatment with *Lactobacillus casei* practically produced similar results to those of birds vaccinated with a commercial vaccine. Clinically, birds in groups A and B showed no signs of coccidiosis, while those in groups C and D did so. Mortality in groups A, B, C and E was 0 % while that of group D was 5 %. Even though observed mortality was very low, the challenge inoculum was enough to decrease sharply the weight gain of groups C and D.

In the course of the last decade several studies have been carried out to clarify mechanisms responsible for a protective immune response acquired by chicks against infections caused by *Eimeria* spp<sup>(23)</sup>. These studies indicate that immunity mediated by cells is more important for protection than humoral immunity, and that immune cells such as macrophages<sup>(24)</sup>, and T-cells<sup>(25)</sup> as well as cytokines such as gamma interferon (IFN- $\gamma$ )<sup>(26,27)</sup> participate in the process. Based on this knowledge, a search has gone on to obtain antigens from sporozoites which in turn activate T-cells for protective response induction through vaccines which contain this type of antigens<sup>(28)</sup>. In this sense, it should be worth mentioning that very few studies have been carried on the effect of immunostimulants as alternative methods for *Eimeria* infection control. Thus, as was demonstrated in a previous study, Freund's complete adjuvant, Concanavalin A and a non proteic derivative of *Mycobacterium* cell wall, inoculated intraperitoneally, induce a protective response against infections by *Eimeria tenella*, similar to one conferred by a commercial vaccine, assessed through the Anticoccidial Index<sup>(8)</sup>, however, these substances are hard to obtain or very expensive.

In this study, based on previous studies, through a bacterium considered as probiotic and administered intraperitoneally<sup>(10,11,12)</sup>, highly encouraging results were obtained. It should be considered as a possibility that part of the protective mechanism(s),

mediada por células es más importante en la protección, que la inmunidad humoral, y que participan tanto células inmunitarias como los macrófagos<sup>(24)</sup> y las células T<sup>(25)</sup>, así como citocinas como el interferon gamma (IFN- $\gamma$ )<sup>(26,27)</sup>; inclusive con base en estos conocimientos se ha buscado obtener antígenos de esporozoítos que activen células T para generar respuestas protectoras por medio de vacunas que contengan esa clase de antígenos<sup>(28)</sup>. En este sentido cabe señalar que muy poco se ha estudiado sobre el efecto de sustancias inmunoestimulantes en la infección contra especies de *Eimeria* como alternativa de control. Así, en un estudio previo se pudo demostrar que el adyuvante completo de Freund, la Concanavalina A y un derivado no proteico de la pared celular de *Mycobacterium*, inoculados por vía intraperitoneal, indujeron respuestas protectoras contra la infección por *E. tenella*, evaluadas como índice anticoccidial, semejantes a la conferida por una vacuna comercial<sup>(8)</sup>; sin embargo, esas sustancias tienen el inconveniente de ser muy caras o no se consiguen fácilmente.

En el presente estudio, por medio del uso de una bacteria considerada como probiótica y administrada por vía intraperitoneal con base en estudios previos<sup>(10,11,12)</sup>, se obtuvieron resultados muy alentadores. Es probable que parte del mecanismo(s) protector (es), aunque no se determinó, se deba a la estimulación de la producción de IFN- $\gamma$ . En este contexto, se ha demostrado que dicha citocina es importante en la protección del huésped contra protozoarios parásitos relacionados como *Toxoplasma gondii*<sup>(29)</sup> y *Babesia microti*<sup>(30)</sup> y también contra helmintos parásitos como *Hymenolepis nana*<sup>(31)</sup>. En apoyo a lo anterior, el tratamiento intraperitoneal de ratones con *L. casei* viable generó una producción de IFN- $\gamma$  superior a la observada en animales no tratados y que probablemente contribuyó en la respuesta protectora contra la infección con *Trichinella spiralis*<sup>(10)</sup>.

Con base en los resultados del presente estudio, se concluye que la inoculación intraperitoneal de *Lactobacillus casei* viable en pollos de engorda, siete días antes de la confrontación, genera una respuesta inmune protectora no específica contra la infección con una mezcla de ooquistes infectivos de *Eimeria acervulina*, *E. tenella* y *E. maxima*.

could be due to a stimulus of IFN- $\gamma$  production, although this has not yet been proven. In this context, it has been determined that this cytokine is of importance in host protection against related parasite protozoans as *Toxoplasma gondii*<sup>(29)</sup> and *Babesia microti*<sup>(30)</sup> and also against parasite helminthes as *Hymenolepis nana*<sup>(31)</sup>. In support of this, mice inoculated intraperitoneally with viable *Lactobacillus casei* gave rise to a higher IFN- $\gamma$  production than in non treated animals and which most probably contributed to a protective response against a *Trichinella spiralis* infection<sup>(10)</sup>.

Based on the results of the present study, it can be concluded that *Lactobacillus casei* inoculated intraperitoneally to broilers seven days before challenge, is able to generate a non specific protective immune response against a mixture of infective *Eimeria acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella* oocysts. This response is similar to that conferred by a commercial vaccine, and because of that, *Lactobacillus casei* could be considered as a viable alternative for coccidiosis control in broilers and which should be studied more thoroughly.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To CONACYT for partial funding of this study through project key 31524-B.

*End of english version*

---

Dicha protección es similar a la conferida por una vacuna comercial, por lo que el uso de *L. casei* representa una alternativa viable para el control de coccidiosis en pollos de engorda que deberá ser estudiada de manera más amplia.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio se financió parcialmente con recursos del proyecto CONACYT clave 31524-B

## LITERATURA CITADA

1. Williams RB. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *Int J Parasitol* 1999;29:1209-1229.
2. Chapman DD. Resistance to anticoccidial drugs in fowl. *Parasitol Today* 1993;9:159-162.
3. Breed DGJ, Schetters TPM, Verhoeven NAP, Boot-Groenink A, Dorrestein J, Vermeulen AN. Vaccination against *Eimeria tenella* infection using a fraction of *E. tenella* sporozoites selected by the capacity to activate T cells. *Int J Parasitol* 1999;29:1231-1240.
4. Watts AM, Kennedy RC. DNA vaccination strategies against infectious diseases. *Int J Parasitol* 1999;29:1149-1163.
5. Bautista Garfias CR, Gómez A, Morilla A, Vera Y, Ibarra F. Inducción de resistencia inespecífica contra la infección por *Fasciola hepatica* en ovinos con adyuvante completo de Freund. *Rev Mex Parasitol* 1992;3:1-3.
6. Bautista-Garfias CR, Flores-Hernández O, Quiróz-Romero H. Non-specific resistance of sheep against *Haemonchus contortus* with Freund's complete adjuvant. *Parasite Immunol* 1991;13:565-569.
7. Bautista-Garfias CR, Daza H, Ixta O, Martínez F. Inducción de resistencia contra *Toxoplasma gondii* en ratones NIH tratados con Concanavalina A. *Vet Mex* 1995;26:113-116.
8. Bautista-Garfias CR, Trejo L, Rojas E, Pérez P. Efecto del adyuvante completo de Freund, Equimune y Concanavalina A sobre la resistencia a la infección experimental por *Eimeria tenella* en pollos. *Téc Pecu Méx* 1996;34:183-188.
9. Bautista-Garfias CR, Zerón-Bravo F, De La Jara-Alcocer F, Flores-Castro R. Effect of three immunostimulants on the resistance against *Trichinella spiralis* infection in mice. (Preliminary Report). *Arch Med Res* 1995;26:91-93.
10. Bautista-Garfias CR, Ixta O, Orduña M, Martínez F, Aguilar B, Cortés A. Enhancement of resistance in mice treated with *Lactobacillus casei*: Effect on *Trichinella spiralis* infection. *Vet Parasitol* 1999;89:251-260.
11. Bautista-Garfias CR, Ixta-Rodríguez O, Martínez-Gómez F, López MG, Aguilar-Figueroa BR. Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organisms administered orally to mice on resistance against *Trichinella spiralis* infection. *Parasite* 2001;8:S226-S228.
12. Bautista-Garfias CR, Ixta-Rodríguez O, Aguilar Figueroa BR, Martínez-Gómez F, Miralrío-Flores L. Induction of resistance against *Hymenolepis nana* infection in NIH mice treated intraperitoneally with *Lactobacillus casei*. In: Proceedings of the 10th international congress of parasitology, Vancouver, Canada, August 4-9, 2002.
13. Long PL, Malcom RW. A guide for the diagnosis of coccidiosis in chickens. University of Georgia, Coll Agri Exp Sta Res Rep 1982;404:1-17.
14. Levine ND. *Veterinary Protozoology*. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press; 1985.
15. Ryley JF, Meade R, Hazelhurst J, Robinson TE. Methods in coccidiosis research: separation of oocysts from faeces. *Parasitology* 1976;73:311-326.
16. Olivares-Saénz E. Paquete de diseños experimentales FAUANL, versión 2.5 Marín (NL):Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, 1994.
17. Williams RB. Epidemiological studies of coccidiosis in the domesticated fowl (*Gallus gallus*): I. The fate of ingested oocyst of *Eimeria tenella* during the prepatent period in susceptible chicks. *Appl Parasitol* 1995;46:83-89.
18. McDougald LR. La coccidiosis y su control. EUA: Am Cyanamid Comp Agric Res Div; 1984.
19. McDougald LR. Conferencias sobre coccidiosis en Georgia: nuevos avances comprueban que la investigación se mantiene activa. *Avic Prof* 1986;4:31-34.
20. Fitz-Coy SH. Antigenic variation among strains of *Eimeria maxima* and *E. tenella* of the chicken. *Avian Dis* 1992;36:40-43.
21. 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.
22. Lillehoj HS, Lillehoj EP Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Dis* 2000;44:408-425.
23. Lillehoj HS, Trout JM. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:349-360.
24. Laurent F, Mancassola R, Lacroix S, Menezes R, Naciri M. Analysis of chicken mucosal immune response to *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infection by quantitative reverse transcription-PCR. *Infect Immun* 2001;69:2527-2534.
25. Yun CH, Lillehoj H, Choi KD. *Eimeria tenella* infection induces local gamma interferon production and intestinal lymphocyte subpopulation changes. *Infect Immun* 2000;68:1282-1288.
26. Lillehoj HS, Choi KD. Recombinant chicken interferon-gamma mediated inhibition of *Eimeria tenella* development *in vitro* and reduction of oocyst production and body weight loss following *Eimeria acervulina* challenge infection. *Avi Dis* 1998;42:307-314.
27. Choi KD, Lillehoj HS, Zalenga DS. Changes in local ifn-gamma and TGF-beta 4 mRNA expresión and intraepithelial lymphocytes following *Eimeria acervulina* infection. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;71:263-275.
28. Breed DGJ, Schetters TPM, Verhoeven NAP, Boot-Groenink A, Dorrestein J, Vermeulen AN. Vaccination against *Eimeria tenella* infection using a fraction of *E. tenella* sporozoites selected by the capacity to activate T cells. *Int J Parasitol* 1999;29:1231-1240.
29. Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon-g: The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 1988;240:516-518.
30. Igarashi I, Suzuki R, Waki S, Tagawa Y, Seng S, Tum S, Omata Y, Saito A, Nagasawa H, Iwakura Y, Suzuki N, Mikami T, Toyoda Y. Roles of CD4+ T cells and gamma interferon in protective immunity against *Babesia microti* infection in mice. *Infect Immun* 1999;67:4143-4148.
31. Asano K, Muramatsu K. Importance of interferon-gamma in protective immunity against *Hymenolepis nana* cysticercoid derived from challenge infection with eggs in BALB/c mice. *Int J Parasitol* 1997;27:1437-1443.

