

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA FACULTAD DE
CIENCIAS VETERINARIAS**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

“Presencia de *Eimeria* spp. en *Gallus domesticus*
comerciales en las Provincias de Pichincha y Santo
Domingo de los Tsáchilas, Ecuador”

AUTOR: MVZ. MSc. Cevallos Gordon Ana Luisa

DIRECTOR: Dra. Gamboa María Inés

CODIRECTOR: Dr. Molina Alfonso

Lugares de realización:

**Laboratorios del Instituto de Zoonosis, Universidad Central del
Ecuador**

Miembros del Jurado

Dra. Ribicich Mabel

Dra. Carnevale Silvana

Dr. Unzaga Juan Manuel

2023

DEDICATORIA

A Dios

A mis padres

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma Inés Gamboa, por aceptar ser mi directora, estar siempre pendiente y guiarme en cada etapa de este proyecto.

Al Dr. Alfonso Molina por aceptar ser mi codirector y por abrirme las puertas de su laboratorio;

Al Dr. Lenin Ron, por prestar su apoyo en el análisis de datos. Gracias por la buena predisposición, amabilidad y amistad brindadas.

A la Dra. Nilda Radman por su guía y por sus enseñanzas compartidas.

A la Dra. Gabriela Giacoboni, por sus consejos que fueron de mucha utilidad.

A todas las empresas que me abrieron la puerta para el muestreo, y a todas las personas que me apoyaron: Dr. Oscar Porras, Dr. Alejandro Torres, Dra. Poma, Ing. Santiago Irregui, Dr. Fernando Corredor, Dr. Manuel Acosta, Dr. Marco Chango, Dr. Santiago Moreno, Dr. Juan Carlos Báez, Dr. Juan Carlos Ríos, Dr. Néstor Iza, Ing. Juan Carlos Cevallos, al Dr. Fausto Aigaje.

A la Dra. Paola Cretton. MSD salud animal, por la donación de vacuna que sirvió como control positivo, y al Dr. Fernando Ponce por su ayuda con la logística de entrega.

Al Dr. Aristides Garbi de La Plata Lab. y al Dr. Juan Carlos Báez de Integración ORO por la donación de vacuna anticoccidial

A Agrocalidad por su apoyo con la entrega de información de la encuesta avícola del 2015, y a la Dra. Verónica Villareal por su gestión en la

obtención de permisos de importación.

A Ma. Inés y a todos mis colegas de la FMVZ – UCE, quienes siempre me apoyaron y estuvieron pendientes en este proyecto.

A los investigadores, docentes, personal administrativo, pasantes y estudiantes de Laboratorios del Instituto de Zoonosis, Universidad Central del Ecuador

GRACIAS

CITAS BIBLIOGRÁFICAS DE PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS

- Ana Luisa Cevallos-Gordon, C. Alfonso Molina, Nilda Radman, Lenin Ron, María Inés Gamboa, Prevalence and Risk Factors of *Eimeria* spp. in Broiler Chickens from Pichincha and Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. *Pathogens* 2024, Volume 13, Issue 1, 48. <https://doi.org/10.3390/pathogens13010048>
- Cevallos-Gordon Ana Luisa, Molina Alfonso, Radman Nilda, Ron Lenin, Gamboa María Inés. Factores de riesgo para coccidiosis en pollo de engorde de Ecuador. XXVI Congreso Latinoamericano de Microbiología – ALAM 2023. Quito, 23- 25 de agosto 2023. Primer lugar en presentación de póster.
- Ana Luisa Cevallos, Maritza Celi, Lenin Ron, Alfonso Molina, María Inés Gamboa. Coccidiosis (*E. tenella*) en pollo de engorde de Sto. Domingo y Pichincha, Ecuador. Seminario: Tendencias en Ciencias Veterinarias: Aves. Universidad Internacional del Ecuador (UIDE). 30 de marzo 2023. Presentación Oral.
- Ana Luisa Cevallos, Maritza Celi, Lenin Ron, Alfonso Molina, María Inés Gamboa. Coccidiosis en pollo de engorda de Sto. Domingo y Pichincha, Ecuador. Factores de riesgo. 11vo Congreso del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la salud y producción animal.

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México D.F., 7 de diciembre 2023. Presentación Oral.

- Cevallos-Gordon Ana Luisa, Molina Alfonso, Radman Nilda, Gamboa María Inés. Determinación de la carga parasitaria de *Eimeria* spp. en granjas comerciales de pollos parrilleros en Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. XXXII Jornada sobre Enfermedades Infecciosas, Emergentes y Reemergentes. XXX Jornada sobre Cambio Global y Desarrollo Sostenible. V Jornada de Salud Pública, Jornada Precongresos VII CC Y DS 2022. Revista de Enfermedades Infecciosas Emergentes REIE. Volumen 16, Pág. 10. ISSN (versión Electrónica) 0329-8507 (versión Impresa) 0329-8493.
- Cevallos-Gordon Ana Luisa, Molina Alfonso, Gamboa María Inés. Coccidiosis aviar. Curso de Patología Aviar. Primer módulo. Asociación de médicos veterinarios especialista en avicultura del Ecuador (AMEVEA -E). Modalidad Virtual. 16 de junio del 2021.
- Cevallos-Gordon Ana Luisa, Molina Alfonso, Gamboa María Inés. Coccidiosis aviar, el enemigo silencioso. IX Taller de Capacitación Avícola – Broilers. Asociación de médicos veterinarios especialista en avicultura del Ecuador (AMEVEA -E). Sto Domingo de los Tsáchilas, 26 de julio del 2019.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CARATULA.....	I
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
CITAS BIBLIOGRÁFICAS DE PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS	V
INDICE DE TABLAS	XII
INDICE DE FIGURAS.....	XIV
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	XVI
RESUMEN.....	XVII
ABSTRACT.....	XIX
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. Clasificación taxonómica.....	22
1.2. Ciclo biológico.....	23
1.3. Importancia de la coccidiosis para la industria avícola.....	25
1.4. Coccidiosis en pollo parrillero en Latinoamérica y Ecuador	28
1.5. Patología.....	30
1.6. Diagnóstico	33

1.6.1. Diagnóstico convencional	33
1.6.2. Diagnóstico molecular	34
1.7. Prevención y control.....	35
1.7.1. Anticoccidiales	36
1.7.2. Vacunas	38
1.7.3. Alternativas naturales.....	39
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	41
2.1. Hipótesis	41
2.2. Objetivo general	42
2.3. Objetivos específicos	42
3. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1. Área de estudio	43
3.2. Tamaño muestral	44
3.3. Obtención de la muestra	45
3.4. Análisis de laboratorio: Técnicas cuali-cuantitativas	48
3.4.1. Técnicas cualitativas: Flotación de Willis	48
3.4.2. Identificación de ooquistes de <i>Eimeria</i> spp. por esporulación.	49

3.4.3. Técnicas cuantitativas: Mac Master modificada	51
3.4.4. Biología Molecular.....	52
3.4.4.1.Extracción de ADN de muestras fecales de pollos	52
3.4.4.2.Vacunas usadas como control positivo.....	53
3.4.4.3.Métodos de extracción de ADN usados.....	54
3.4.4.3.1.Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (pH-CIA) tomado y modificado de Surzycki, 2000	54
3.4.4.3.2.CTAB modificado de Oklander y col., 2004	55
3.4.4.3.3. Extracción de ADN de ooquistes lisados	56
3.4.4.3.4. QIAamp DNA Stool Mini Kit	57
3.4.4.3.5. QIAamp DNA Stool Mini Kit modificado	58
3.4.4.3.6. FastDNA Spin Kit por Feces (MP)	59
3.4.4.4. Extracción de ADN – Control Positivo	60
3.4.4.5. Validación de los métodos de extracción.....	61
3.4.4.6. Estandarización de PCR.....	61
3.4.4.7. Identificación de especies de <i>Eimeria</i> a partir de ADN de muestras de heces de pollo	62
3.4.4.7.1...Estandarización PCR multiplex para <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> y <i>E. tenella</i>	63
3.4.4.7.2. Estandarización PCR para <i>E. necatrix</i> y <i>E. praecox</i>	63
3.4.4.7.3. Estandarización PCR convencional para <i>E. brunetti</i>	64
3.5. Factores de riesgo	66
3.5.1. Información general de las granjas	66

3.5.2. Características de las granjas	68
3.5.3. Características del agua de bebida	71
3.5.4. Características del alimento balanceado y alimentación.....	72
3.5.5. Control anticoccidial	73
3.5.6. Características de la cama.....	74
3.5.7. Características de las aves	75
3.5.8. Tiempo de repoblación y vacío sanitario	76
3.6. Análisis estadístico.....	76
4. RESULTADOS.....	78
4.1. Resultados parasitológicos	78
4.1.1. Técnica cualitativa de Willis	78
4.1.2. Carga Parasitaria	79
4.1.3. Identificación de ooquistes de <i>Eimeria</i> spp. por esporulación.....	79
4.2. Biología Molecular.....	79
4.2.1. Extracción de ADN de muestras fecales de pollos.....	79
4.2.2. Especies de <i>Eimeria</i> spp. identificadas a través de PCR.....	81
4.3. Características de las granjas evaluadas.....	85

4.4. Análisis de los datos	88
4.4.1. Prevalencia de <i>Eimeria</i> spp. en la población de granjas	88
4.4.2. Asociación entre factores de riesgo y carga parasitaria de <i>Eimeria</i> spp.	89
4.4.3. Asociación entre factores de riesgo y presencia de las diferentes especies de <i>Eimeria</i> spp.	91
5. DISCUSIÓN	104
6. CONCLUSIONES	136
7. BIBLIOGRAFÍA	138
8. ANEXOS	158
ANEXO 1. Encuesta epidemiológica.....	158
ANEXO 2. Secuencia de primers, de <i>Eimeria</i> spp. de aves domésticas para el ensayo PCR multiplex.....	160
ANEXO 3. Características de las granjas evaluadas	161
ANEXO 4. Relación ooquistes por gramo de heces (OPG) y especies de <i>Eimeria</i> spp. halladas con las características y medidas de control aplicadas en las granjas estudiadas.	162

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lesiones y patogenicidad de las especies de <i>Eimeria</i> spp. en pollos parrilleros	31
Tabla 2. Capacidad de las granjas avícolas de pollos parrilleros de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas	85
Tabla 3. Prevalencia de las especies de <i>Eimeria</i> spp. en la población de pollos parrilleros de las provincias de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas.....	88
Tabla 4. Especies de <i>Eimeria</i> spp. y carga parasitaria (OPG) identificadas en 159 muestras de pollos parrilleros de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas.....	89
Tabla 5. Asociación entre factores de riesgo y carga parasitaria de <i>Eimeria</i> spp. (OPG).....	90
Tabla 6. Asociación de factores de riesgo y carga parasitaria de <i>Eimeria</i> spp. (OPG) utilizando un modelo de regresión logística multivariable.	91
Tabla 7. Factores asociados a la presencia de <i>E. acervulina</i> en pollos parrilleros de la provincia de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas	92
Tabla 8. Factores asociados a la presencia de <i>E. brunetti</i> en pollos parrilleros de la provincia de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas	94
Tabla 9. Factores asociados a la presencia de <i>E. máxima</i> en pollos parrilleros de la provincia de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas.	95
Tabla 10. Factores asociados a la presencia de <i>E. necatrix</i> en pollos	

parrilleros de la provincia de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas	96
Tabla 11. Factores asociados a la presencia de <i>E. praecox</i> en pollos parrilleros de la provincia de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas	97
Tabla 12. Factores asociados a la presencia de <i>E. tenella</i> en pollos parrilleros de la provincia de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas.	99
Tabla 13. Variables explicativas de riesgo para la presencia de <i>E. acervulina</i> y <i>E. brunetti</i> utilizando un modelo de regresión logística binaria multivariable.	102
Tabla 14. Variables explicativas de riesgo para la presencia de <i>E. maxima</i> y <i>E. necatrix</i> utilizando un modelo de regresión logística binaria multivariable.	102
Tabla 15. Variables explicativas de riesgo para la presencia de <i>E. praecox</i> y <i>E. tenella</i> utilizando un modelo de regresión logística binaria multivariable.	103

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Eimeria</i> spp. modificado de Mesa-Pineda y colaboradores (2021).....	26
Figura 2. Mapa de Ecuador. Área relevada: Provincias: Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas.....	43
Figura 3. Galpón avícola (A). Toma de muestras (B). Pollos parrilleros (C). Heces frescas (D).....	46
Figura 4. Laboratorio de Parasitología del Instituto de Investigación en Salud Pública y Zoonosis de la Universidad Central del Ecuador.....	47
Figura 5. Filtrado en triple gasa (A). Flotación de Willis (B). Observación microscópica (C).....	49
Figura 6. Incubación de heces con dicromato de potasio 2.5%	50
Figura 7. Ooquistes esporulados de <i>Eimeria</i> spp. (400x).....	50
Figura 8. Llenado de la cámara de Mac Master (A). Observación microscópica (100x) (B).....	52
Figura 9. Galpón abierto (A). Galpón de ambiente controlado (B).....	69
Figura 10. Galpón con estructura de madera (A). Galpón con estructura de metal (B).....	70
Figura 11. Galpón con piso de cemento (A). Galpón con piso de tierra (B).	70
Figura 12. Tipos de bebederos avícolas. Sistemas de bebederos abiertos (A). Sistemas de bebederos cerrados (B).....	71
Figura 13. Tipos de comederos avícolas. Comederos manuales (A). Comederos mecánicos (B).....	73

Figura 14. <i>Alphitobius diaperinus</i> en cama (A). Fase adulta ("Alphitobius diaperinus (lesser mealworm)") (B).....	75
Figura 15. Distribución de las granjas avícolas analizadas.....	78
Figura 16. Validación de seis métodos de extracción de ADN de heces.	81
Figura 17. Identificación PCR de <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> y <i>E. tenella</i> . ..	82
Figura 18. Identificación PCR de <i>E. necatrix</i> y <i>E. praecox</i>	83
Figura 19. Identificación PCR de <i>E. brunetti</i> , <i>E. necatrix</i> y <i>E. praecox</i>	84
Figura 20. Distribución geográfica de <i>E. acervulina</i> en granjas de pollos parrilleros de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas.....	92
Figura 21. Distribución geográfica de <i>E. brunetti</i> en granjas de pollos parrilleros de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas.....	93
Figura 22. Distribución geográfica de <i>E. maxima</i> en granjas de pollos parrilleros de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas.....	94
Figura 23. Distribución geográfica de <i>E. necatrix</i> en granjas de pollos parrilleros de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas.....	96
Figura 24. Distribución geográfica de <i>E. praecox</i> en granjas de pollos parrilleros de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas.....	97
Figura 25. Distribución geográfica de <i>E. tenella</i> en granjas de pollos parrilleros de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas.....	98

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

°C: Centígrados

μl: Microlitro

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ATCC: microorganismos certificados por American Type Culture Collection

aves/m²: aves por metro cuadrado

EE. UU.: Estados Unidos

g: gramo

IC: Intervalo de Confianza

INEC: Instituto Nacional de Estadísticas y Censos

Kg/m²: kilogramos por metro cuadrado

M: molar

mg: Miligramos

ml: Mililitro

mM: Milimolar

NaCl: Cloruro de Sodio

OPG: Ooquistes por gramo de heces

pb: Pares de Bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

pH: Potencial de Hidrógeno

g: Gravedades

rpm: Revoluciones por minuto

spp: Especies

U: Unidades

RESUMEN

“Presencia de *Eimeria* spp. en *Gallus domesticus* comerciales en las Provincias de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador”

La coccidiosis aviar es una parasitosis de importancia económica para la industria avícola. En Ecuador existe escasa información sobre la presencia de *Eimeria* spp. en las granjas comerciales de pollos parrilleros, por lo que se analizaron 155 establecimientos en las provincias de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas. A través del análisis de heces frescas se determinó la carga parasitaria y por PCR las diferentes especies de *Eimeria*. Además, se realizó una encuesta epidemiológica para determinar los factores de riesgo de infección. Se observó que todas las muestras eran positivas a la presencia de *Eimeria* spp., pese a que todas mantenían medidas profilácticas; aun así, en ninguna se observó coccidiosis clínica. La carga parasitaria varió entre 25 y 169.700 OPG. La prevalencia por especie fue *E. maxima* 80.4%, *E. acervulina* 70.6%, *E. praecox* 55.4%, *E. tenella* 53.6%, *E. necatrix* 52,2% y *E. brunetti* 30.8%. A través de regresión logística multivariable, se observó que las granjas de productores independientes tenían alta probabilidad de presentar mayor carga de *Eimeria* spp., *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. praecox* y *E. tenella*. Los galpones avícolas que estaban a menos de 1300 msnm se asociaron con mayor OPG y presencia de *E. brunetti*. Las aves menores de 35 días de edad y los galpones avícolas abiertos (con rudimentario control ambiental), tenían mayor probabilidad de presentar *E. maxima*. Si el agua de bebida provenía

de pozos, el riesgo de *E. praecox* era mayor. El tiempo de vacío sanitario, tamaño de las granjas avícolas, desinfectantes, y el resto de los factores evaluados, no presentaron riesgo ni protección en relación a la presencia de *Eimeria* spp. Serían necesarias más investigaciones tendientes al diseño de estrategias de control para mejorar la gestión en las granjas avícolas.

Palabras Clave: Coccidiosis, *Eimeria*, OPG, factores de riesgo, avicultura, Ecuador.

ABSTRACT

“Presence of *Eimeria* spp. in commercial *Gallus domesticus* in the provinces of Pichincha and Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador”

Avian coccidiosis is a parasitic disease of economic importance for the poultry industry. In Ecuador, there is limited information about the presence of *Eimeria* spp. in commercial broiler chicken farms. Therefore, a total of 155 establishments in the provinces of Pichincha and Santo Domingo de los Tsáchilas were analyzed. The parasitic load was determined through the analysis of fresh feces, and the different species of *Eimeria* were identified through PCR. In addition, an epidemiological survey was conducted to determine the risk factors for infection. It was observed that all samples tested positive for the presence of *Eimeria* spp., despite maintaining prophylactic measures. However, no clinical coccidiosis was observed in any of the samples. The parasitic load ranged from 25 to 169,700 OPG (oocysts per gram of feces). The prevalence by species was as follows: *E. maxima* 80.4%, *E. acervulina* 70.6%, *E. praecox* 55.4%, *E. tenella* 53.6%, *E. necatrix* 52.2%, and *E. brunetti* 30.8%. Through multivariable logistic regression, it was observed that farms run by independent producers had a higher probability of having a greater load of *Eimeria* spp., *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. praecox*, and *E. tenella*. Poultry houses located at an altitude of less than 1300 meters above sea level were associated with higher OPG and the presence of *E. brunetti*. Birds younger than 35 days of age and open

poultry houses (with rudimentary environmental control) had a higher probability of presenting *E. maxima*. If the drinking water came from wells, the risk of *E. praecox* was higher. The duration of sanitary vacuum, size of poultry farms, disinfectants, and the other evaluated factors did not show any risk or protection regarding the presence of *Eimeria* spp. Further research is necessary to design control strategies and improve management in poultry farms.

Keywords: coccidiosis, *Eimeria*, OPG, fact risk, poultry, Ecuador.

1. INTRODUCCIÓN

La coccidiois aviar es una enfermedad parasitaria de gran importancia en pollos parrilleros (McDonald y Shirley, 2009; Witcombe y Smith, 2014; Gottardo y col., 2021; Mesa-Pineda y col., 2021; Andreopoulou y col., 2022; Djemai y col., 2022; El-Shall y col., 2022).

Las infecciones por *Eimeria* afectan la capacidad del tracto digestivo y la función intestinal, lo que conduce a un crecimiento y eficiencia alimentaria insuficientes (Kim y col., 2022). La coccidiosis del pollo parrillero es una enfermedad extremadamente común, letal y epidémica (Huang y col., 2022). Tiene un alto impacto económico y está presente en la industria avícola a nivel mundial (Peek, 2010; Kant y col., 2013; Shivaramaiah y col., 2014; Kumar y col., 2015; Moraes y col., 2015; Cervantes, 2017; Snyder y col., 2021; Flores y col., 2022).

Varios factores facilitan su desarrollo, entre ellos: ciclo de vida directo, transmisión fecal-oral, presencia de cepas de *Eimeria* spp. resistentes, falta de protección cruzada entre especies de *Eimeria*, producción potencial de ooquistes (El-shall y col., 2022) determinada por el número de merogonias en el ciclo biológico de cada especie (De Franceschi, 2011), alta densidad de población en galpones avícolas y condiciones ambientales ideales para la esporulación de ooquistes (El-shall y col., 2022).

Se han planteado varias formas de prevención; sin embargo, la coccidiosis aviar continúa siendo una de las enfermedades más costosas para la industria avícola (Mesa-Pineda y col., 2021).

1.1. Clasificación taxonómica

Eimeria spp. es agente etiológico de la enfermedad parasitaria conocida como Coccidiosis (Dalloul y Lillehoj, 2006; Chengat y col., 2017). Los primeros reportes de la enfermedad fueron en 1891, cuando Railliet y Lucet hallaron ooquistes en heces de pollo, denominándolos *Coccidium tenellum*, microorganismos que más tarde fueron designados como ooquistes de *Eimeria tenella* (Chapman, 2014).

Los parásitos del género *Eimeria* spp. son protozoos que pertenecen al Phylum Apicomplexa (Duszynski y col., 2000; Dalloul y Lillehoj, 2006). Este phylum incluye muchos agentes causales de enfermedades de interés en medicina humana y animal; entre ellos: *Cryptosporidium* spp., *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Theileria* spp. y *Plasmodium* spp. (Beck y col., 2009). Los parásitos del Phylum Apicomplexa, tienen diferencias significativas en sus ciclos de vida, transmisión y también en los grados de diversidad genética (Beck y col., 2009).

Eimeria spp. son parásitos intracelulares obligados que invaden la mucosa intestinal de las aves y otras especies domésticas y silvestres (Duszynski y col., 1995; Chapman y col., 2010; Clark y col., 2016).

Según Duszynski y colaboradores (2000), los coccidios reportados que infectan a galliformes pertenecientes a la familia Phasianidae, agrupan a las siguientes especies: *Eimeria acervulina* (Tyzzer, 1929), *Eimeria brunetti* (Levine, 1942), *Eimeria hagani* (Levine, 1938), *Eimeria máxima* (Tyzzer, 1929), *Eimeria mitis* (Tyzzer, 1929), *Eimeria mivati* (Edagar y Seibold, 1964), *Eimeria necatrix* (Johnson, 1930), *Eimeria praecox*

(Johnson, 1930), *Eimeria tenella* (Railliet y Lucet, 1891), *Isospora galliformica* (Musaev y Alyva, 1963), *Isospora gallinae* (Scholtyseck 1954), *Isospora gallinarum* (Kornienko y Glebezdin, 1964) e *Isospora* sp. (De Shah y Joshi, 1965).

Sin embargo, actualmente las especies de *Eimeria* spp. que afectan a pollos parrilleros más frecuentemente son *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. máxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* y *E. tenella*, las cuales se han reportado en los seis continentes (Chapman, 2014; Clark y col., 2016). Sin embargo, Cantacessi y col. (2008), reportaron la existencia de variantes genéticas, es decir, nuevas unidades taxonómicas operativas, OTY-x, OTU-y y OTU-z, identificadas en pollos de Australia. Más tarde fueron identificadas en otros países y continentes, por lo que se menciona una posible diversidad alopatrica de las especies (Clark y col., 2016). La presencia de OTUs ha sido reportada en el hemisferio sur: Australia, Venezuela, India, Zambia, Uganda, Tanzania, China y Ghana (Venkatas y Adeleke, 2019). Por otro lado, Blake y colaboradores (2021) sugieren que estas tres *Eimerias* crípticas (OTY-x, OTU-y y OTU-z) poseen suficiente diversidad genética y biológica para ser consideradas como nuevas especies y proponen los nombres: *Eimeria nata* n. sp., *Eimeria nagambie* n. sp. y *Eimeria zaria* n. sp. respectivamente.

1.2. Ciclo biológico

La infección ocurre cuando el ave ingiere uno o varios ooquistes esporulados (estado infectivo) del ambiente (Fatoba y Adeleke, 2018).

Estos ooquistes contienen cuatro esporocistos con dos esporozoítos cada uno (McDougald, 1998; Lillehoj y Trout, 2007; Conway y McKenzie, 2008). Los ooquistes ingeridos por las aves son triturados por la molleja, liberando los esporocistos, que por acción de la tripsina y bilis se activan, liberando los esporozoítos. Estos invaden la mucosa del intestino, para convertirse en trofozoítos en 12 a 48 horas (McDougald, 1998; Lillehoj y Trout, 2007). Luego ocurre una rápida fisión múltiple (merogonia), en la que se generan cientos de células hijas llamadas merozoítos. Estas ingresan a las células de la mucosa intestinal y crecen, dando la segunda y tercera generación de merontes (McDougald, 1998; Conway y McKenzie, 2008). Los merozoítos producidos por los merontes de segunda y tercera generación, se diferencian en formas sexuales llamadas gamontes (gametogonia), siendo los microgamontes los que forman los microgametocitos masculinos y los macrogamontes, los que originan los macrogametocitos femeninos. Los microgametocitos móviles fecundan a los macrogametocitos por singamia, dando como resultado un huevo o cigoto, que al generar la pared quística se llamará ooquiste (Lillehoj y Trout, 1993; Conway y McKenzie, 2008). De esta forma, miles de ooquistes inmaduros (dependiendo de la especie de *Eimeria*) son producidos por cada unidad infectante de coccidia (McDougald, 1998). Los ooquistes posteriormente son eliminados a través de las heces al ambiente, donde han demostrado ser muy estables y ubicuos (Dalloul y Lillehoj, 2006). En condiciones apropiadas, los ooquistes inmaduros esporulan en las camas avícolas en alrededor de 24 a 72 horas, mediante 2 divisiones, dando como resultado un ooquiste maduro con 4

esporocistos en su interior, conteniendo 2 esporozoítos cada uno (Conway y McKenzie, 2008). El ooquiste es la forma de resistencia e infectante del parásito y permanece viable por largos períodos (Soulsby, 1987). El ciclo biológico se puede observar en la Figura 1.

Por otro lado, si el ave ingiere ooquistes no esporulados, estos han demostrado ser más resistentes a la ruptura en la molleja, sobreviven intactos al paso por el intestino del hospedador, para luego esporular en el ambiente y transformarse en su forma infectiva (Williams, 1995).

1.3. Importancia de la coccidiosis para la industria avícola

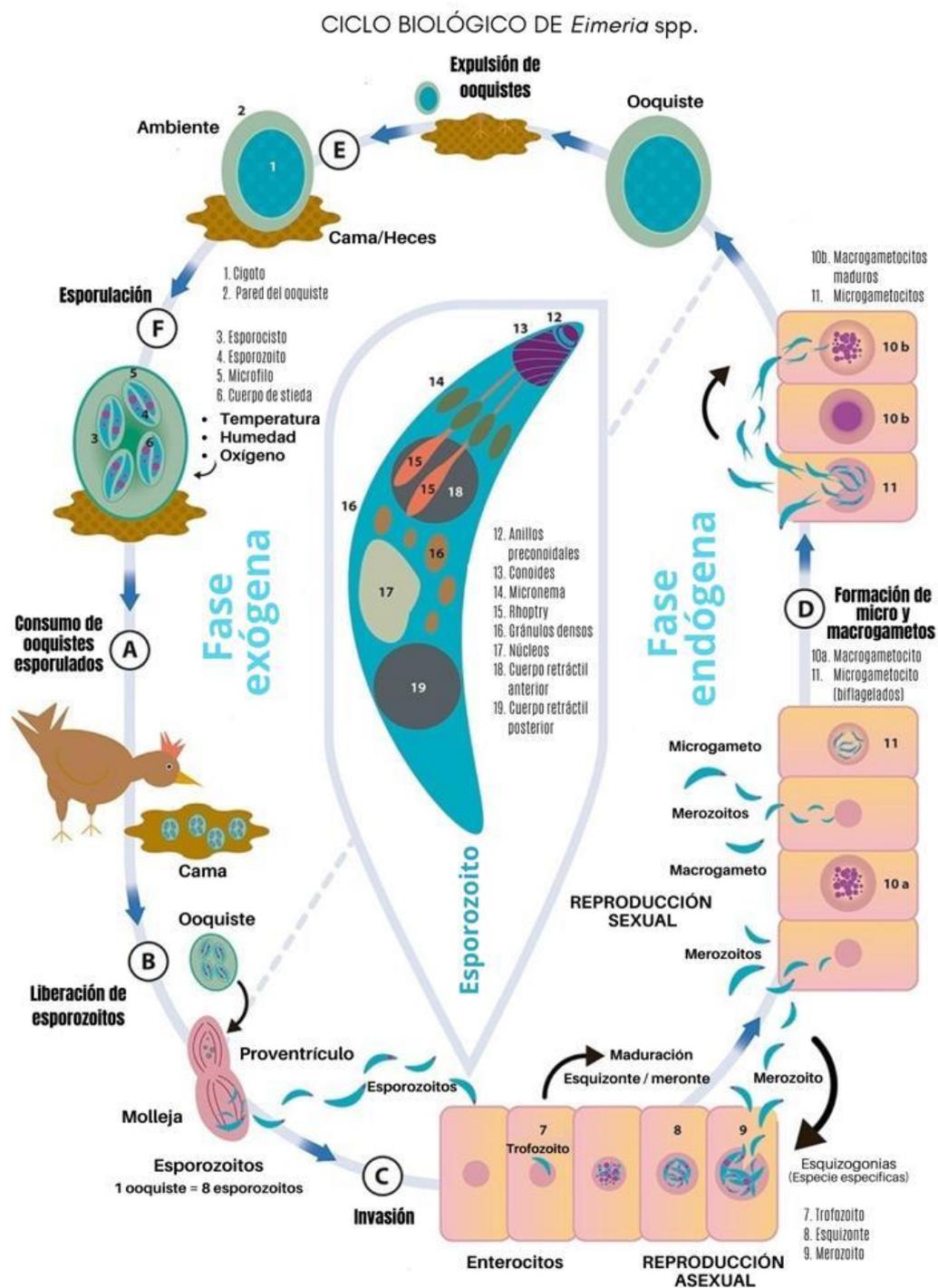
La coccidiosis aviar causa grandes pérdidas económicas en la producción avícola mundial (Kant y col., 2013; Kumar y col., 2015; Moraes y col., 2015; Cervantes, 2017). Su presencia conlleva pérdidas por estar relacionada directamente con deficientes índices de conversión alimenticia, ocasionando reducción del incremento de peso, aumento de la mortalidad e incremento de los costos en prevención y tratamiento (Peek, 2010).

Se estima que las pérdidas anuales en EEUU sobrepasan el billón de dólares; mientras que a nivel mundial se calcula entre 10 (Jenkins, 2019) y 14 billones de dólares (Campos y col., 2022). Para cuantificar las pérdidas económicas que ocasiona la coccidiosis, se realizan estimaciones considerando las mermas de producción, gastos en medidas profilácticas y terapéuticas (Dalloul y Lillehoj, 2006; Pegg y col., 2016); por lo que la coccidiosis se ha convertido en uno de los mayores desafíos que enfrenta la industria avícola en el mundo (Kant y col., 2013; Chengat y col., 2017).

En 1984, de acuerdo a la incidencia e importancia en la industria avícola de

Centro y Sur América, se reportó la coccidiosis aviar como la cuarta enfermedad más relevante (Mitchell, 1984).

Figura 1. Ciclo biológico de *Eimeria* spp. modificado de Mesa-Pineda y colaboradores (2021).



Sin embargo, en Latinoamérica no se dispone de información exacta (Toledo y col., 2011). En 2019 en Colombia fue catalogada como una de las diez enfermedades avícolas más importantes económicamente (Avila, 2019). En Ecuador, pocas investigaciones se han realizado sobre la coccidiosis aviar, hasta la fecha no hay reportes de prevalencia ni pérdidas económicas en aves domésticas. Por muchos años ha sido la causa más frecuente de bajo rendimiento y productividad en la avicultura y en otros animales de granja (Chapman y col., 2010). Las aves infectadas presentan menor capacidad de aprovechamiento del alimento y, por lo tanto, su crecimiento y producción se ven afectados, reduciendo drásticamente la rentabilidad (Dalloul y Lillehoj, 2006). La destrucción de las células del epitelio intestinal es el principal mecanismo de patogenicidad, que desencadena un síndrome de malabsorción, pérdida de peso y descenso en la calidad de la carne, que derivan en cuantiosas pérdidas económicas (Cunningham y Klein, 2009).

A medida que se incrementa la población, también aumenta el riesgo de infección parasitaria (Chengat y col., 2017). La industrialización avícola, la fuerte tendencia a aumentar la densidad de aves en los galpones, así como la reducción del tiempo de vacío sanitario entre lotes, contribuyen al incremento de la concentración de ooquistes en las camas y conducen a un mayor riesgo de infección (Barragán, 2006).

Por otro lado, la coccidiosis predispone a los pollos a enfermedades bacterianas del intestino, particularmente enteritis necrótica causada por *Clostridium perfringens*, enfermedad que también produce pérdidas

económicas y mortalidad de aves (Jenkins, 2019). Se ha demostrado que infecciones por *E. tenella* alteran el equilibrio de la microbiota luminal y la mucosa en los pollos parrilleros (Campos y col., 2022). Por lo que la coccidiosis aviar es considerada como el factor predisponente de enteritis necrótica más conocido, debido al daño que causa en las mucosas (Van Immerseel y col., 2004). Es así, que la incidencia de enteritis necrótica ha aumentado en países que dejaron de usar antibióticos promotores del crecimiento (Van Immerseel y col., 2004). Debido a la creciente demanda de productos libres de antibióticos, pollos RWA (Raised without antibiotics), NAE (no antibiotics ever) y ABF (antibiotics free); y la inminente eliminación global del uso de antibióticos en forma preventiva, es imperativo estudiar holística y eficazmente la distribución y dinámica poblacional de *Eimeria* spp. reduciendo así la amenaza asociada a enteritis necrótica (Snyder, y col., 2021).

Las estrategias de prevención consistentes en bioseguridad, buenas prácticas de manejo, uso profiláctico de anticoccidiales y vacunación, han demostrado no ser suficientes en el control de las coccidiosis (Toledo y col., 2011).

1.4. Coccidiosis en pollo parrillero en Latinoamérica y Ecuador

En Latinoamérica no se dispone de información sobre las pérdidas económicas producidas por coccidiosis, ni el impacto de éstas en los costos de producción (Toledo y col., 2011). Así, en México, estado de Veracruz (Moreno y Ibarra, 2002), Brasil, estado de Tocantins (Toledo y col., 2011) y

estado de Bahía (Carvalho y col., 2011)), hay reportes de *Eimeria* spp. en el 100% de las granjas comerciales. En el estado de Santa Catarina, la frecuencia fue 96% (Moraes y col., 2015); y 77.8% en el departamento de Cochabamba, Bolivia (Carvajal, 2019). En Argentina se reportó 88.4% (McDougald, 1998), en Colombia 92.8% (Mesa y col., 2021). Incluso en galpones con ambiente controlado de Brasil se ha reportado 87.5% de prevalencia de *Eimeria* spp. (Gottardo y col., 2021).

En Ecuador la industria avícola comercial está constituida por diversos tipos de sistemas de producción, que de acuerdo con el nivel tecnológico, van desde artesanales hasta automatizados (Pomboza y col., 2018).

Según el último Censo Avícola Ecuatoriano ("Censo avícola 2015") la producción de aves comerciales alcanzó 28.465.585 aves, alojadas en 1558 granjas comerciales. Esta población avícola se encuentra repartida en los siguientes tipos de explotación: pollo parrillero (18.850.808 de aves en 1223 granjas avícolas), gallina de postura (7.940.606 aves en 284 granjas de postura comercial) y aves reproductoras (1.673.300 aves en 51 granjas avícolas).

En Ecuador no existen registros de prevalencia de coccidios en aves de corral, pero hay reportes de presencia en 100% de las granjas comerciales de Pichincha (Garcés-Gudiño y col., 2018). Por otro lado, se identificó en el matadero que 5% de las aves presentaba lesiones de coccidiosis (Villareal, 2010). También en las Galápagos se hallaron pollos parrilleros con lesiones de *E. acervulina* y *E. tenella*, siendo el primer reporte que evidencia la exposición a *Eimeria* spp. en la región insular (Whitehead y col., 2018).

Lo antedicho marca la necesidad de realizar un estudio detallado sobre la presencia de las distintas especies de *Eimeria* spp. en la región y su asociación con los factores de riesgo que determinan su presencia.

1.5. Patología

El grado de infección y los signos clínicos de la coccidiosis están influenciados por múltiples factores, que incluyen la especie de *Eimeria*, la dosis infectiva, la relación hospedador-parásito y las condiciones ambientales del sitio de crianza (Mesa-Pineda y col., 2021).

Las especies de *Eimeria* presentan diferentes niveles de patogenicidad que van de moderada a severa (Conway y Mckenzie, 2007; Tewari y Maharana, 2011). Algunas especies pueden causar pérdida de líquidos y disminución en la absorción de nutrientes (*E. acervulina* y *E. mitis*), inflamación de la pared intestinal con petequias y daño epitelial (*E. brunetti* y *E. maxima*), o destrucción completa de las vellosidades, produciendo hemorragias y muerte (*E. necatrix* y *E. tenella*). Cada especie causa signos reconocibles, diferentes, e independientes de las otras especies (Joyner y Long, 1974; Chapman, 2014) (ver Tabla 1).

La gravedad de la coccidiosis está relacionada con la cantidad de ooquistes ingeridos, porque el ciclo de vida de estos parásitos es autolimitado (McDonald y Shirley, 2009; Chapman y col., 2013). Por lo tanto, la severidad de la enfermedad depende inicialmente de dos aspectos, la especie infectiva y la carga parasitaria del inóculo (Kant y col., 2013).

Witcombe y Smith (2014) señalan que en condiciones naturales (dosis

bajas de ooquistes), se daría un equilibrio inofensivo entre el parásito y el hospedador. Sin embargo, en condiciones intensivas de alojamiento, el grado de reinfección es elevado.

Se han reportado dos tipos de infección: coccidiosis clínica y subclínica. En la forma clínica, las aves presentan signos típicos de la enfermedad, como son: heces sanguinolentas, incremento de la mortalidad y bajo rendimiento del lote, además de lesiones macroscópicas y microscópicas a lo largo de los intestinos, localizadas según el tipo de especie (Cervantes, 2013). En el pasado han causado una morbilidad y mortalidad sustanciales en criaderos de pollos parrilleros (Chapman, 2009). Esta presentación ya no es común, debido a las exhaustivas medidas de prevención, que incluyen las buenas prácticas de manejo y bioseguridad (Kant y col., 2013).

Tabla 1. Lesiones y patogenicidad de las especies de *Eimeria* spp. en pollos parrilleros

Especie	Localización	Lesión	Patogenicidad
<i>E. acervulina</i>	Duodeno, yeyuno	Numerosos parches blanquecinos, ovalados o alargados, en la mitad anterior del intestino delgado, fácilmente distinguibles en el examen macroscópico.	++
<i>E. brunetti</i>	Ileón, recto, ciego y cloaca	Mucosa pálida e interrumpida, pero carente de focos discretos, puede estar engrosada. En infecciones graves, necrosis coagulativa y desprendimiento de la mucosa a lo largo de gran parte del intestino delgado.	+++
<i>E. maxima</i>	Duodeno, yeyuno e ileón	Dilatación y engrosamiento de la pared; hemorragia petequiral; viscosidad rojiza, anaranjada o rosada, exudado mucoso y líquido.	++

<i>E. mitis</i>	Duodeno, yeyuno	Lesiones indistintas, pero puede parecerse a infecciones moderadas de <i>E brunetti</i> .	+
<i>E. mivati</i>	Duodeno, yeyuno	Lesiones similares a <i>E. acervulina</i> .	+
<i>E. necatrix</i>	Yeyuno, ciegos, Intestino delgado, parte media y anterior.	Pequeñas manchas blancas, generalmente entremezcladas con manchas redondeadas, brillantes o de color rojo opaco de varios tamaños, se puede ver en la superficie serosa.	+++
<i>E. praecox</i>	Duodeno, yeyuno	Disminución de la tasa de crecimiento. Contenido intestinal acuoso.	+
<i>E. tenella</i>	Ciegos	Acumulación de sangre en los ciegos.	+++

+++ Patogenicidad alta, ++Patogenicidad media, + Patogenicidad baja
Modificado de (Gerhold, 2023).

El control de la coccidiosis clínica en avicultura, consiste en una combinación de mejoras en el manejo, uso profiláctico de drogas anticoccidiales en el alimento, y/o el uso de vacunas anticoccidiales. Sin embargo, estas infecciones no se han erradicado de las producciones comerciales, donde pueden generarse pérdidas económicas (Chapman y col., 2013).

La coccidiosis subclínica es más común y difícil de diagnosticar, ya que las aves no presentan signos, sólo se confirma por la presencia de lesiones intestinales en las necropsias y por la presencia de ooquistes de *Eimeria* spp. en las heces, lo que hace que esta grave enfermedad pase desapercibida por los avicultores (Barragán, 2006; Dalloul y Lillehoj, 2006; Cervantes, 2017). El problema más significativo de la coccidiosis subclínica son las pérdidas económicas, que representan casi las tres cuartas partes

del total estimado (El-shall y col., 2022). La presencia de *Eimeria* en aves causa reducciones drásticas en el rendimiento, afecta el estado general de salud de las aves e induce la mortalidad (Shivaramaiah y col., 2014). Además, esta forma de presentación (coccidiosis subclínica), afecta negativamente la digestibilidad y utilización de aminoácidos como cisteína, arginina, metionina, alanina, tirosina y treonina (Kim y col., 2022).

Por otro lado, a medida que la industria avícola se aleja del uso de antibióticos, se requiere una mejor comprensión de la microbiota para desarrollar otras soluciones, como probióticos, prebióticos y suplementos nutricionales (Campos y col., 2022).

1.6. Diagnóstico

1.6.1. Diagnóstico convencional

El diagnóstico convencional de coccidiosis aviar se basa en lesiones patológicas macroscópicas y microscopía de ooquistes en las heces.

Debido a la especificidad del sitio de la invasión, el diagnóstico sigue dependiendo de la necropsia y la presencia de lesiones en diferentes áreas del intestino (Chapman y col., 2013). Estas lesiones fueron descritas, estandarizadas y categorizadas en las distintas especies de *Eimeria*, para determinar el nivel de patogenicidad (Johnson y Reid, 1970).

Este diagnóstico puede ser corroborado por el análisis microscópico de la forma y el tamaño de los ooquistes en las heces de las aves infectadas (Chapman y col., 2013). También se puede usar la técnica de raspado seriado de la mucosa intestinal (De Franceschi, 2011).

El diagnóstico a través de necropsias debe ser rutinario, ya que contribuye a conocer si la coccidiosis es la única enfermedad presente. En ese caso, se debe revisar todo el intestino; la observación de lesiones será dividiendo el intestino en tres partes: intestino anterior, medio y posterior, y adicionalmente los ciegos (Conway y Mckenzie, 2007).

La identificación final de una determinada especie de *Eimeria* basada en criterios morfológicos y patológicos, requiere personal altamente capacitado, ya que ciertas características de *Eimeria* pueden ser confundidas (Chapman y col., 2013). Por otro lado, en condiciones de campo, la coccidiosis está relacionada con la presencia de varias especies de *Eimeria* (Hauck y col., 2019; Mesa-Pineda y col., 2021).

1.6.2. Diagnóstico molecular

Las herramientas moleculares son adecuadas para estimar con precisión la prevalencia de *Eimeria* spp. (Matsubayashi y col., 2020), ya que ofrecen una mejor sensibilidad y especificidad diagnóstica en muchos casos (Mesa-Pineda y col., 2021). Se han desarrollado técnicas, principalmente PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), para superar las limitaciones del examen morfológico (Chapman, 2014). La identificación molecular de las *Eimeria* que afectan animales de producción se ha utilizado durante más de 20 años (Tang y col., 2018).

El uso de PCR multiplex, que combina cebadores para cada especie en una sola reacción (Moraes y col., 2015), así como el uso de las secuencias ITS-1 y -2 (Internal transcribed spacer), han permitido el diagnóstico y

análisis de la variación genética de *Eimeria* spp. (Peek, 2010). La región ITS es ampliamente utilizada en filogenia molecular y taxonomía (You, 2014).

Otras técnicas moleculares que han sido utilizadas para la identificación de las especies de *Eimeria*, son fragmentos ADN polimórficos amplificados al azar, RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) (Tang y col., 2018); marcadores moleculares de región amplificada SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) (Shirley y Bumstead, 1994; Shu-San y col., 2019) y amplificación isotérmica mediada por LOOP, LAMP (Barkway y col., 2015).

La secuenciación de amplicones de próxima generación (NGS) puede ser una herramienta útil para determinar las especies de *Eimeria* circulantes y su abundancia relativa de manera precisa (Hauck y col., 2019). También se ha descrito el uso de un ortólogo de copia única (SCO 5995) para estimar la abundancia relativa de cada especie de *Eimeria* en infecciones naturales (Jenkins y col., 2022).

El diagnóstico molecular contribuirá al manejo de la enfermedad en granjas avícolas, monitoreo de pureza de las líneas vacunales y la toma de decisiones sobre el uso de anticoccidiales o vacunas (Chapman y col., 2013).

1.7. Prevención y control

La prevención o profilaxis en la coccidiosis aviar ha tenido un profundo impacto en la industria avícola moderna. Chapman (2009) considera que

sin las drogas anticoccidiales usadas profilácticamente, no hubiese sido posible el desarrollo actual de la industria avícola mundial. Sin embargo, la elevada prevalencia de coccidiosis, aun usando medidas profilácticas, muestra que los actuales programas de manejo han sido insuficientes para controlar esta enfermedad (Györke y col., 2013; Veen y col., 2016). Evidentemente, las actuales estrategias sanitarias de crianza presentan fisuras que permiten la propagación de estos patógenos entre las aves (Toledo y col., 2011; Györke y col., 2016).

Es importante evaluar los sistemas de prevención de la coccidiosis, conocer la dinámica de *Eimeria* spp. (Haug y col., 2008; Jenkins y col., 2017), la carga parasitaria y composición de especies en cada establecimiento, previo a la aplicación de programas anticoccidiales y vacunación (Jenkins y col., 2017).

1.7.1. Anticoccidiales

Desde la década de 1940, los medicamentos anticoccidiales se han utilizado en la industria avícola para controlar la coccidiosis (Chapman, 2014). En la década de 1960 el uso profiláctico de drogas para el control de la enfermedad clínica ha sido considerado un pilar fundamental en la industrialización de la crianza de aves (Chapman, 2009). En las últimas décadas, el uso de anticoccidiales en el alimento ha sido predominante, confiable y económico, en la prevención de la enfermedad en aves a nivel mundial (Chapman y col., 2013; Shivaramaiah y col., 2014).

En Ecuador se dispone de una amplia lista de posibilidades para el control

de la coccidiosis. Entre ellas, arsenicales (Roxarsona y nitarsona), quinolonas (bucoquinato, decoquinato y nequinato), piridinoles (clopidol – meticlorpindol, clopindol), derivados pirimídicos (amprolio y diaveridina), benzamidas (zoaleno, aklomida, nitromida), ionóforos monovalentes (monensina, maduramicina, narasina, salinomicina y senduramicina), ionóforos divalentes (lasalocida–lasalocid), derivados de la guanidina (robenidina), carbanilidas (nicarbazina e imidocarb), bencilpurinas (arprinocida), quinazolininas (halofuginona), triazinas (clazuril, diclazuril, toltrazuril, triazenetriona y etopabato) (Agrocalidad, 2020a). Los fármacos autorizados para la adición en alimentos balanceados de aves como tratamientos preventivos o terapéuticos son: amprolio, clopidol, decoquinato, diclazuril, etopabato, lasalocid, narasina, nequinato, nicarbazina, ormetoprim, robenidina, senduramicina, sulfadimetoxina y sulfaquinoxalina (Agrocalidad, 2020b).

Sin embargo, la resistencia a los medicamentos anticoccidiales es un problema en la industria de los pollos parrilleros (Witcombe y Smith, 2014; Mark Jenkins, 2019; Snyder y col., 2021b). El uso generalizado de fármacos ha exacerbado la resistencia de *Eimeria* a los anticoccidiales (Yu y col., 2021). Recientes investigaciones mostraron que EtGAPDH (expresión de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *E. tenella*) posee varias funciones, que pueden estar involucradas en el desarrollo de la resistencia de *E. tenella* a estas moléculas (Huang y col., 2022). Así también, la EtASNA1(ATPasa ASNA1 homóloga de *E. tenella*) fue relacionada con mecanismos de resistencia, proceso que requiere mayor investigación (Yu

y col., 2021).

Por otro lado, la demanda pública de productos libres de residuos (Witcombe y Smith, 2014; Jenkins, 2019), ha llevado a que los avicultores busquen otros métodos de control, como la vacunación, que está ganando importancia (Shivaramaiah y col., 2014). Aunque se ha observado que los conteos de ooquistes cuando las aves reciben anticoccidiales en el alimento, son menores comparados con lotes vacunados (Carrisosa y col., 2022). A campo, se siguen usando anticoccidiales ionóforos, debido a su eficacia y la posibilidad de adquirir inmunidad que representan (Chapman, 2009).

1.7.2. Vacunas

El uso comercial de vacunas anticoccidiales data de 1952 (Chapman, 2014). Las vacunas de ooquistes vivos o vivos atenuados se han incrementado (Shirley y col., 2007; Witcombe y Smith, 2014). Alrededor del 35% de las parvadas de pollos de engorde en EEUU reciben una vacuna anticoccidial (Carrisosa y col., 2022).

Las vacunas anticoccidiales vivas tradicionales están limitadas por su bajo índice reproductivo y su alto costo de producción (Pastor-Fernández y col., 2019). Se han reportado inconvenientes, como la tendencia de algunas *Eimeria* a evitar la inmunidad, alterando su capa superficial para impedir la destrucción por parte del hospedador (Jenkins, 2019). Además, algunos productores relacionan el uso de vacuna anticoccidial con la proliferación de *Clostridium* (Williams, 2002). Al no existir inmunidad cruzada, la vacuna

debe estar compuesta por todas las especies para ser efectiva (Cervantes, 2017).

Las vacunas anticoccidiales no mejoran los parámetros productivos, en algunos casos la conversión alimenticia ha mostrado ser peor comparada con el uso de anticoccidiales (Williams, 2002). Sin embargo, en algunos estudios se ha evidenciado una parcial restauración de sensibilidad a drogas posterior al uso de vacunas anticoccidiales (Chapman y col., 2013). Se están investigando estrategias de vacunación con subunidades, vectores vivos o ADN (Shirley y col., 2007), vacunas recombinantes y epítomos potenciales (Shivaramaiah y col., 2014), generación de líneas de parásitos transgénicos que funcionen como vectores de vacunas para administrar y expresar antígenos heterólogos (Pastor-Fernández y col., 2019). También se estudia el desarrollo de un inmunógeno que provea de anticuerpos maternos; esto sugiere una medida económica para prevenir la coccidiosis en pollitos recién nacidos (Witcombe y Smith, 2014). Todas estas propuestas han mostrado prometedores resultados.

1.7.3. Alternativas naturales

Varios componentes del alimento parecen afectar a *Eimeria* spp., ya sea directamente, disminuyendo el desarrollo y multiplicación del coccidio (ácidos grasos omega-3, β -glucanos, vitamina E, selenio y bicarbonato de sodio); o indirectamente, estimulando el sistema inmunológico, influyendo en la flora intestinal y la mucosa, o cambiando la fisiología del tracto digestivo (proteínas, vitamina A, C y K) (Peek, 2010). Además, se han

propuesto alternativas que incluyen prebióticos, probióticos, aceites esenciales, ácidos orgánicos, antioxidantes y nanobióticos (nanopartículas vegetales que se han utilizado como agentes antibacterianos) (Chapman y col., 2013). También se ha experimentado con extractos de hongos, hierbas y moduladores de la respuesta inmunitaria, ofertados como suplementos dietéticos (Quiroz-Castañeda y Dantán-González, 2015). Sin embargo, en algunos estudios los resultados obtenidos son discordantes, lo que delata la necesidad de seguir investigando el potencial de estas estrategias alternativas de control (Mesa-Pineda y col., 2021).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

- Los pollos parrilleros comerciales de las granjas avícolas de las provincias de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas de Ecuador, con o sin uso de drogas anticoccidiales en el alimento, se encuentran infectados por *Eimeria* spp., por lo tanto, presentan coccidiosis subclínica.
- Se pueden identificar al menos cinco especies de *Eimeria* spp., *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. tenella* y *E. brunetti* en las granjas avícolas comerciales de Ecuador.
- Las aves que recibieron vacunas vivas de *Eimeria* spp. presentan en sus heces especies diferentes a las vacunales.
- Las granjas avícolas que realizan un vacío sanitario más largo entre lote y lote presentan menor carga parasitaria.

2.2. Objetivo general

- Estudiar la presencia de *Eimeria* spp. en granjas avícolas comerciales de las provincias de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador, evaluando los factores de riesgo de infección.

2.3. Objetivos específicos

- Identificar las diferentes especies de *Eimeria* spp. que infectan a pollos parrilleros.
- Determinar la carga parasitaria de las diferentes especies de *Eimeria* spp. que infectan a las aves de cría.
- Registrar posibles factores de riesgo de infección y relacionarlos con la carga parasitaria y la prevalencia de especies de *Eimeria* spp.
- Determinar si las especies de *Eimeria* spp. halladas a campo y en las vacunas vivas son las mismas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

La coccidiosis se presenta con mayor frecuencia en aves jóvenes, por lo cual el estudio se realizó en pollos parrilleros. Según el censo antes mencionado, la provincia con mayor población de pollos parrilleros es Pichincha (territorio que actualmente ocupan las provincias de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas), con 7.694.050 pollos parrilleros (27.10% de capacidad avícola nacional), en 246 granjas, razón por la cual, la investigación se realizó en estas dos provincias (ver Figura 2).

Figura 2. Mapa de Ecuador. Área relevada: Provincias: Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas.



3.2. Tamaño muestral

El diseño del estudio fue transversal descriptivo. La unidad experimental, unidad epidemiológica (OIE, 2005), consistió en la muestra de heces frescas tomada de las granjas avícolas.

El cálculo del tamaño de muestra se realizó en base a la fórmula de población finita, con un IC del 95%, un error del 5% (0.05) y una población de 246 granjas comerciales de pollos parrilleros.

$$n = \frac{Z^2 * p * q}{e^2}$$

$$n = \frac{(1.96)^2 * 0.5 * 0.5}{(0.05)^2}$$

$$n = 151 \text{ granjas}$$

Donde

n = tamaño de la muestra

Z= nivel de confianza (correspondiente a la tabla de valores Z)

p = porcentaje de la población que tiene el atributo deseado

q = porcentaje de la población que no tiene el atributo deseado

e = error de estimación del máximo aceptado

Las 151 granjas calculadas como muestra fueron seleccionadas a través de un muestreo no probabilístico. Las granjas que formaron parte del estudio fueron aquellas que aceptaron participar, por lo tanto, el número ascendió a 155 granjas.

Agrocalidad (agencia encargada del control y regulación para la protección y el mejoramiento de la sanidad animal, sanidad vegetal e inocuidad

alimentaria de Ecuador), compartió parte de la base de datos de productores de pollos parrilleros de las provincias de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas, con lo cual pudimos establecer las zonas de mayor producción de pollos parrilleros. Además, participamos en capacitaciones avícolas en la zona, donde expusimos el proyecto de investigación a realizar. Por último, contactamos con las principales empresas productoras de pollos parrilleros de la región, presentando el proyecto en reuniones privadas y disipando dudas.

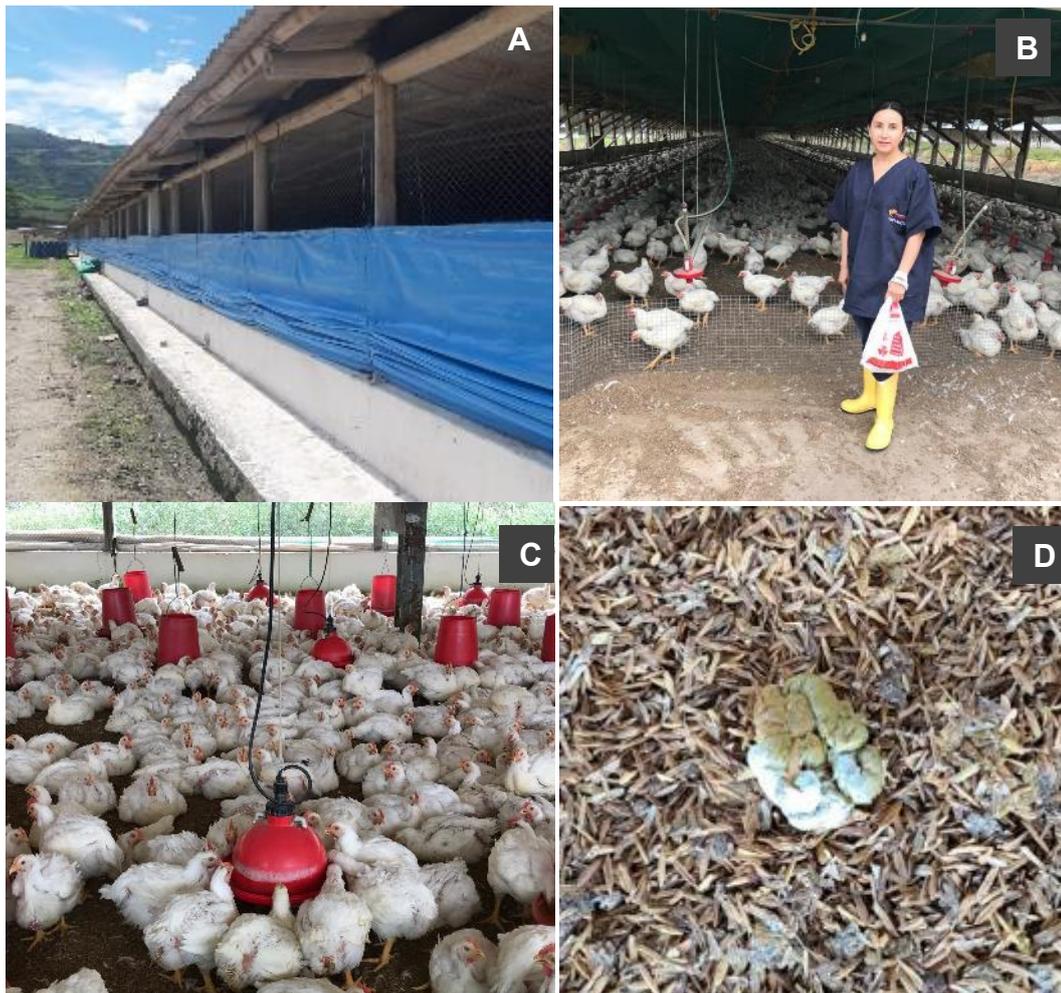
La fase de muestreo se realizó de junio 2019 a agosto del 2020, coincidiendo con la pandemia COVID 19. Pese a que las muestras se mantuvieron a -20°C , se presentaron dificultades con la extracción de ADN, por lo que se decidió realizar un segundo muestreo. Varias granjas no aceptaron participar de ese muestreo, obligándonos a buscar alternativas como: 1) Recuperar las muestras conservadas a -20°C a través de la concentración de ooquistes (centrifugación) y 2) Buscar otras granjas, que acepten participar del proyecto. De esta manera, la cantidad de granjas avícolas muestreadas ascendió a 155, pero en cuatro de ellas se realizó un segundo muestreo a los seis y siete meses del primero, y también se logró recuperar la muestra inicial. Por ese motivo, la cantidad total de muestras analizadas fue 159.

3.3. Obtención de la muestra

En cada granja se seleccionó un galpón que, de acuerdo al criterio del encargado, presentaba sospecha de infección, menores parámetros

productivos y/o camas más húmedas. Ante la falta de estos criterios, la selección fue al azar (ver Figura 3).

Figura 3. Galpón avícola (A). Toma de muestras (B). Pollos parrilleros (C). Heces frescas (D).



El día de la toma de muestras se realizó una encuesta epidemiológica al encargado del lugar (Anexo 1), para posteriormente determinar los factores de riesgo.

Para la recolección y transporte de las muestras, se utilizaron envases desechables estériles (60 ml de capacidad). Se usó el método descrito por

Kumar y colaboradores (2014). Para ello se trazó una W imaginaria a lo largo de cada galpón, se recorrió dicho trayecto recolectando muestras de heces frescas cada dos a cinco pasos (aproximadamente 1 gr por toma), hasta alcanzar las tres cuartas partes del envase. Se registró la hora de muestreo y el número de heces recolectadas.

Las muestras se rotularon y transportaron en refrigeración al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central de Ecuador (Figura 4).

Figura 4. Laboratorio de Parasitología del Instituto de Investigación en Salud Pública y Zoonosis de la Universidad Central del Ecuador.



En el laboratorio se asignó un código numérico a cada granja muestreada. El contenido de cada envase se homogenizó y a partir de este *pool* se aplicaron las técnicas de flotación de Willis, recuento de ooquistes con cámara de Mac. Máster, identificación de especies por esporulación y

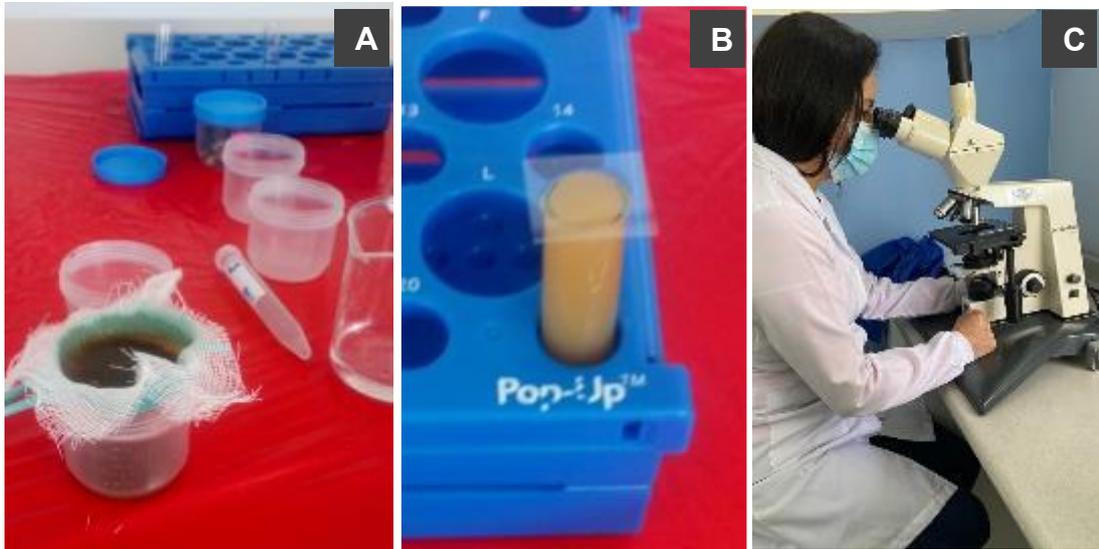
diagnóstico molecular por PCR. Previo a la pandemia COVID 19, para las tres primeras técnicas, las muestras se conservaron a 4°C hasta su procesamiento (entre 24 y 48 horas). Por las limitaciones acaecidas durante la pandemia, se pudieron realizar la técnica de flotación de Willis y el recuento de ooquistes por Mac. Máster, pero no se pudo concretar la esporulación. Para la PCR, un *pool* de cada muestra se conservó a -20 °C.

3.4. Análisis de laboratorio: Técnicas cuali-cuantitativas

3.4.1. Técnicas cualitativas: Flotación de Willis

Se trituraron en mortero 5 a 10 gr de materia fecal con 50 ml de solución salina de cloruro de sodio (δ : 1200). Se filtró por triple capa de gasa, se recogió el líquido en un tubo de ensayo y se completó hasta formar un menisco en el borde superior. Luego se colocó un cubreobjetos sobre el menisco y se dejó reposar 20 minutos. Se retiró con cuidado el cubreobjetos y se colocó sobre un portaobjetos, para observar al microscopio óptico (Marca Zeiss modelo Axiostar Plus) en 100 y 400 aumentos (ver Figura 5),

Figura 5. Filtrado en triple gasa (A). Flotación de Willis (B). Observación microscópica (C).



3.4.2. Identificación de ooquistes de *Eimeria* spp. por esporulación.

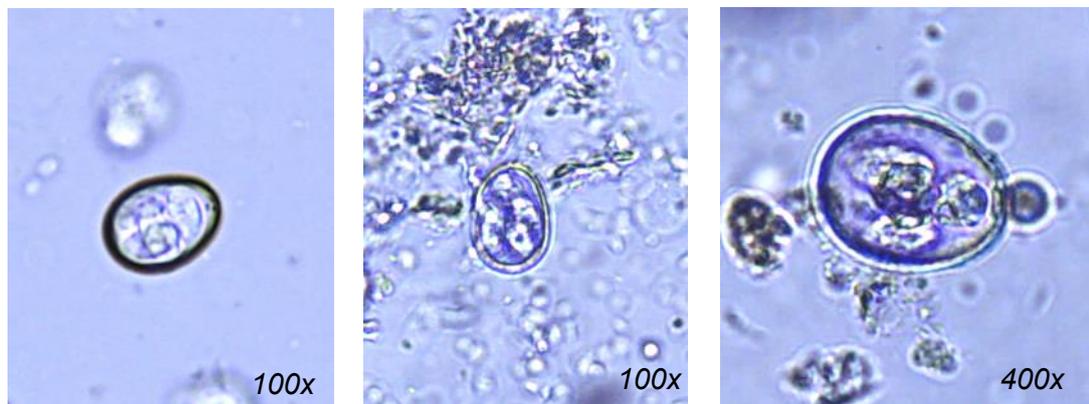
Antes de la pandemia COVID 19, las muestras obtenidas se sometieron a esporulación, para lo cual una parte de las heces fue suspendida en solución de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) 2.5% en placa de Petri y se mantuvo en estufa durante 72 horas a 29°C (ver Figura 6). A las 48 y 72 horas posteriores a la incubación se revisaron microscópicamente tres preparados por muestra, con el fin de verificar si los ooquistes habían esporulado; en caso necesario se añadió más solución. Pasado ese tiempo, las placas se retiraron de la estufa, se colectó todo el material de cada una, se suspendió en agua destilada y se centrifugo durante 5 minutos a 1500 rpm. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 2 ml de agua destilada. Se homogenizó, se colocó entre porta y cubreobjetos y se observó al microscopio, usando un microscopio óptico Leica DM 500 con

cámara y opción de visualización a través de PC, para realizar mediciones más precisas y capturar imágenes (ver Figura 7).

Figura 6. Incubación de heces con dicromato de potasio 2.5%



Figura 7. Ooquistes esporulados de *Eimeria* spp. (100x y 400x).



Durante el tiempo de incubación se determinaron dos inconvenientes: 1) Reducción importante en la cantidad de ooquistes: Se pudo notar, pero no cuantificar, una disminución en la concentración de ooquistes esporulados, en comparación con la cantidad inicial. Es probable que las condiciones del laboratorio no hayan sido óptimas para la esporulación de los ooquistes y 2) La fase de muestreo coincidió con la pandemia COVID 19 que obligó al

confinamiento, cierre de instituciones, entre ellas los laboratorios, por lo que sólo las muestras iniciales fueron utilizadas en esta técnica (11,3%). Una vez iniciada la pandemia, el tiempo de permanencia en el laboratorio fue limitado, y las muestras se conservaron a -20°C por varios meses, temperatura que inactivó los ooquistes.

Se observó la morfología y tamaño de los ooquistes esporulados para comparar con la tabla publicada por Conway (2008) y determinar las especies.

3.4.3. Técnicas cuantitativas: Mac Master modificada

Para el conteo de ooquistes por gramo de heces se utilizó la técnica de Mac. Master modificada (Conway y McKenzie, 2008). Por cada pool, se pesaron 3 gr de heces en balanza digital, luego se homogenizó en mortero, se añadió solución de NaCl (δ : 1200), hasta llegar a un volumen de 60 ml y se homogenizó. El macerado se filtró con triple capa de gasa. Con pipeta Pasteur se extrajo parte de la mezcla y se colocó en las celdas de la cámara de Mac Master. A los 3 minutos, se observó con objetivo de 10 x para el conteo de ooquistes (ver Figura 8).

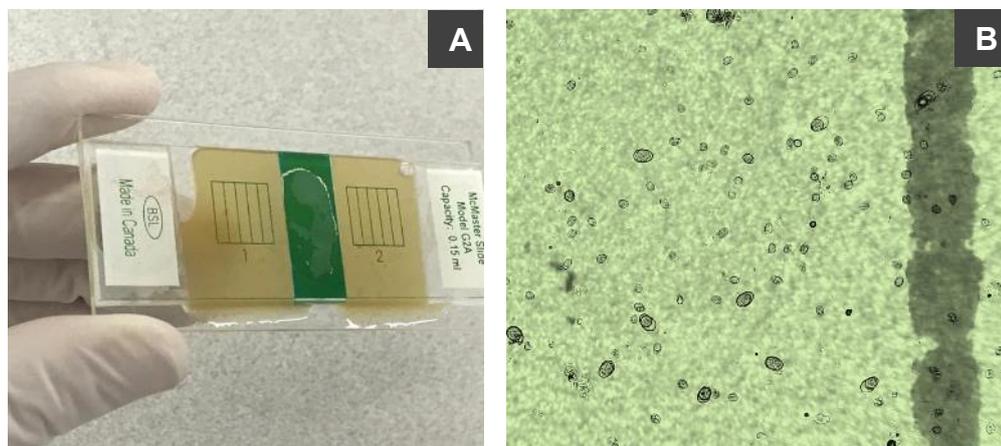
Para el cálculo del OPG, se usó el siguiente razonamiento:

60 ml de solución 3 gr heces

2 ml de solución $2 \times 3 / 60 = 0,1$ gr de heces

Luego, por regla de 3 simple, se calculó el OPG.

Figura 8. Llenado de la cámara de Mac Master (A). Observación microscópica (100x) (B).



3.4.4. Biología Molecular

3.4.4.1. Extracción de ADN de muestras fecales de pollos

Para la extracción de ADN se usaron heces conservadas a -20°C . La extracción del ADN de los ooquistes sin esporular se dificultó con el método inicialmente propuesto, hecho comprobado cuando al realizar la PCR por especie para el Gen 18S a muestras positivas por microscopía, dieron negativo.

Se probaron seis métodos de extracción de ADN, que más adelante se detallan, con el objeto de obtener ADN íntegro, en cantidad y altamente puro.

Inicialmente se buscaron cepas ATCC de *Eimeria* spp., sin resultados en el mercado nacional e internacional, por lo cual se optó por usar ADN extraído a partir de vacunas comerciales contra coccidiosis para la estandarización del control positivo.

3.4.4.2. Vacunas usadas como control positivo

Ante la falta de un control positivo, se utilizaron vacunas anticoccidiales de laboratorios confiables. Las vacunas usadas como control positivo en las diferentes fases de la investigación fueron:

- 1) Vacuna viva COCCI PLAT R, producida por La Plata Lab, Argentina, que de acuerdo con el fabricante contiene ooquistes esporulados de *E. maxima*, *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. necatrix* y *E. brunetti*. Esta vacuna fue donada por La Plata Lab., Argentina, laboratorio elaborador.
- 2) Vacuna viva FORTEGRA, producida por el laboratorio MSD Salud Animal en México. El folleto adjunto al producto indica que contiene ooquistes esporulados de *E. acervulina*, *E. máxima*, *E. máxima MFP*, *E. mivati* y *E. tenella*. Este insumo fue provisto por Integración ORO, Ecuador.
- 3) Vacuna viva COCCIVAC D2, producida por MSD Animal Health fabricada en EE. UU. Según el fabricante contiene ooquistes esporulados de *E. acervulina*, *E. máxima*, *E. mivati*, *E. brunetti*, *E. necatrix* y *E. tenella*. Fue donada por MSD Salud Animal Panamá, luego de gestionar los correspondientes permisos en Agrocalidad, debido a que el producto no posee registro en Ecuador.

Definir el mejor método de extracción de ADN, como la estandarización de la PCR por especie, fue un proceso que tomó tiempo, y que agotó la

vacuna inicial. Por otra parte, la ausencia de algunas de las especies de *Eimeria* en las diferentes vacunas anticoccidiales, nos obligó a usar distintas vacunas como control positivo.

3.4.4.3. Métodos de extracción de ADN utilizados

Por los problemas antes mencionados (heces conservadas a -20°C con ooquistes no esporulados), se probaron seis métodos de extracción de ADN, utilizando las muestras que presentaron mayor carga parasitaria, por lo tanto, la validación del método de extracción se realizó con las muestras 102 y 150. Los diferentes métodos de extracción de ADN usados fueron:

3.4.4.3.1. Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (pH-CIA) tomado y modificado de Surzycki, 2000

Se colocó 1 gr de heces frescas en 1 ml de buffer de hidratación (tris-HCl 110mM pH 8,6; EDTA 50 mM pH 8; NaCl 100 mM; SDS 0.5%; 200 mM de sacarosa). La suspensión se incubó toda la noche a temperatura ambiente.

Se centrifugó 10 minutos a 12000 g, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 50 µl de Buffer TE. Seguidamente se añadieron 30 µl de SDS 10% y 30 µl de proteinasa K (20mg/ml), se homogenizó en vórtex y se incubó toda la noche a 56° C con 1300 rpm de agitación.

Se añadieron 100 µl de NaCl 3M y se homogenizó. Luego se agregaron 80 µl de CTAB/NaCl precalentado y se homogenizó en vórtex. La solución se incubó por 10 minutos a 65° C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Inmediatamente, se realizaron 3 extracciones de proteínas con igual

volumen de fenol, fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), con sus respectivas centrifugaciones a 10000 g por 5 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante (fase acuosa) a un tubo de 1.5 ml sin tomar la interfase.

El ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,3; durante 30 minutos a -20°C. El precipitado de ADN genómico que se obtuvo por centrifugación a 10.000 g durante 20 minutos se lavó dos veces con etanol 70% y se secó a temperatura ambiente, realizando este lavado en 2 ocasiones. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a 37°C en el termomixer por 1 hora. Finalmente, el pellet se resuspendió en 50 ml de tampón tris-EDTA (TE) (tris-HCl 1 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. El ADN obtenido se conservó a -20 °C.

3.4.4.3.2. CTAB modificado de Oklander y col., 2004

Se mezclaron 500 mg de heces previamente hidratadas en 1 ml de PBS 1X. La suspensión se mezcló con 1 ml de buffer de lisis (CTAB 2%, TrisHCL 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M; pH 7.5) y 10µl de proteinasa K. Luego se incubó a 60°C por 2 horas y a 95°C por 15 minutos. En seguida se centrifugó a 7.825 g por 10 minutos y se colocó el sobrenadante en un nuevo tubo de 2 ml. Se modificó la primer extracción orgánica y purificación del ADN; se colocaron 700 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) a la solución y se homogenizó por 30 minutos. Se colocó el sobrenadante en un nuevo tubo de 2 ml, se adicionó 100 µl de buffer de lisis (CTAB 10%,

NaCl 0.5M, pH 5.5) y se incubó a 60°C por 30 minutos. Adicionalmente se colocaron 5 µl de RNasa y se incubó a 37°C por 1 hora.

Se modificó la segunda extracción orgánica y purificación del ADN, colocando 700 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) a la solución y se homogenizó por 30 minutos.

Finalmente se modificó la concentración de ADN de la siguiente manera: se precipitó con 1 ml de etanol absoluto frío por 12 horas, se realizó un lavado con 500 µl de etanol al 70% y se resuspendió el pellet de ADN en 50 µl de TE (pH 8) a 67°C por 30 minutos. El ADN obtenido se conservó a -20°C.

3.4.4.3.3. Extracción de ADN de ooquistes lisados

Para extracción de ADN de ooquistes, cada muestra se limpió con solución de hipoclorito de sodio (5-6% de cloro activo) durante 10 minutos, lavando 3 veces con agua desionizada y resuspendida en tampón de extracción (Tris – HCl 10 mM, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8). Los ooquistes y esporocistos fueron completamente lisados, el lisado fue centrifugado a 14000 g durante 10 minutos para eliminar los desechos y digerido con ARNasa sin ADNsa (20 mg/ml) a 37°C durante 1 hora. Una digestión adicional con proteinasa K (100 mg/ml) y SDS (0.5%) se realizó a 50°C por 2 horas. Luego se extrajo el ADN una vez con 1 volumen de fenol, fenol / cloroformo y cloroformo, y precipitado con etanol y acetato de amonio. El sedimento se lavó con etanol 70% y resuspendió en TE (10 mM Tris – HCl, pH 8.0; EDTA 1 mM, pH 8.0). El ADN obtenido se conservó a -20°C.

3.4.4.3.4. QIAamp DNA Stool Mini Kit

Protocolo de aislamiento de ADN de heces para detección de patógenos.

Se transfirieron entre 180-220 mg de heces a un tubo de microcentrífuga de 2 ml. Posteriormente se agregó 1ml del buffer InhibitEX, se homogenizó en vórtex por 1minuto, se llevó a incubación a 95°C por 10 minutos y se homogenizó en vórtex por 15 segundos. Luego se centrifugó a 15.337 g por 1 minuto.

Posteriormente, en tubo aparte se incorporaron 200 µl del sobrenadante, 15 µl de proteinasa K, y 200 µl del Buffer AL. La mezcla se homogenizó en vórtex por 15 segundos, y se incubó a 70°C por 10 minutos (sin homogenizar); se agregaron 200 µl de etanol 96% y se homogenizó la muestra. Se tomaron 600 µl del homogenizado, se colocaron en un "QIAamp spin column" y centrifugó a 15.337 g por 1 minuto.

La columna de "QIAamp spin column" se colocó en un tubo nuevo de 2 ml, dentro de la columna se agregaron 500 µl de Buffer AW1 y se centrifugó a 15.337 g por 1 minuto; luego dicha columna se colocó en un tubo nuevo de 2 ml y se agregó 500 µl de Buffer AW2 y se centrifugó a 15.337 g por 3 minutos. Por último, la columna "QIAamp spin column" se colocó en un tubo nuevo de 2 ml y se centrifugó a 15.337 g por 3 minutos.

Posteriormente, la columna de "QIAamp spin column" se colocó en un tubo nuevo de 1.5 ml, dentro de la columna se agregaron 80 µl de Buffer ATE, se dejó reposar por 1 minuto y se centrifugó a 15.337 g por 1 minuto. Se descartó la columna y el ADN obtenido se conservó a -20°C.

3.4.4.3.5. QIAamp DNA Stool Mini Kit modificado

Se colocó 1 gr de heces frescas en crisol con mortero, se agregó nitrógeno líquido. Una vez que la muestra fue homogeneizada de forma manual en nitrógeno líquido, se colocó el polvo en un tubo de microcentrifuga de 2 ml. Posteriormente se agregaron 0.5 ml del buffer InhibitEX, se homogenizó en vórtex por 1 minuto, se llevó a incubación a 75°C por 15 minutos, se homogenizó en vórtex por 15 segundos y centrifugó a 15.337 g por 1 minuto.

En un tubo nuevo de 1.5 ml se añadieron 15 µl de proteinasa K, 200 µl del sobrenadante del paso antes mencionado y 200 µl del Buffer AL, se homogenizó en vórtex por 15 segundos, se llevó a incubación a 70°C por 10 minutos (sin homogenizar); posteriormente se agregaron 200 µl de etanol 96% y se homogenizó la muestra.

Del paso antes mencionado se tomaron 600 µl, se colocaron en un "QIAamp spin column" y se centrifugó a 15.337 g por 1 minuto. Este paso se repitió 3 veces.

La columna de "QIAamp spin column" se colocó en un tubo nuevo de 2 ml y dentro de la columna se agregaron 500 µl de Buffer AW1. Se centrifugó a 15.337 g por 1 minuto, luego se colocó en un tubo nuevo de 1.5 ml y dentro de la columna se agregaron 80 µl de Buffer ATE. Se dejó reposar por 1 minuto y se centrifugó a 15.337 g por 1 minuto. Se descartó la columna y el ADN obtenido se conservó a -20°C.

3.4.4.3.6. FastDNA Spin Kit for Feces (MP)

En un tubo “Lysing Matrix E” de 2 ml se agregaron 400 mg de heces frescas, se añadieron 800 µl del Buffer de fosfato de sodio y 250 µl de la solución PLS. Se homogenizó en vórtex por 15 segundos; para posterior centrifugación a 15.337 g por 5 minutos (se descartó el sobrenadante). Se añadieron 970 µl del Buffer de fosfato de sodio y 122 µl del Buffer MT, y se homogenizó en vórtex hasta que la muestra estuvo completamente homogénea.

Posteriormente, se realizó lisis mecánica en el equipo “FastPrep® MP” por 15m/s 1 minuto; para posterior centrifugación a 15.337 g por 10 minutos.

Se transfirió el sobrenadante un tubo de 2 ml y se agregaron 250 µl de la solución PPS, se homogenizó la muestra, se incubó a 4°C por 10 minutos (sin homogenizar en vórtex) y se centrifugó a 15.337 g por 2 minutos.

El sobrenadante se transfirió a un tubo de 15 ml y se agregó 1 ml de la solución Binding Matrix. Se homogenizó en vórtex por 4 minutos, se centrifugó a 15.337 g por 2 minutos (descartando el sobrenadante) y se agregó 1 ml de Wash Buffer #1. Se homogenizó la muestra y se transfirieron 600 µl a la columna de “SPIN Filter”. Este paso se realizó 3 veces.

La columna de “SPIN Filter” se colocó en un tubo nuevo de 2 ml y dentro de la columna se agregaron 500 µl Wash Buffer #2, se centrifugó a 15.337 g por 2 minutos.

La columna de “SPIN Filter” se colocó en un tubo nuevo de 2 ml y se centrifugó a 15.337 g por 2 minutos.

Posteriormente, la columna de “SPIN Filter” se colocó en un tubo nuevo de

1.5 ml y dentro de la columna se agregaron 80 µl de TES, se dejó reposar por 1 minuto y se centrifugó a 15.337 g por 2 minutos. Se descartó la columna y el ADN obtenido se conservó a -20°C.

3.4.4.4. Extracción de ADN – Control Positivo

Para la extracción de ADN de las vacunas contra coccidiosis aviar que contienen ooquistes esporulados, se utilizó el kit QIAamp DNA Stool Mini que disponíamos en el laboratorio. Se colocaron 3 ml de la Vacuna en un crisol con mortero para posterior maceración de la muestra con nitrógeno líquido. Una vez homogeneizada de forma manual en nitrógeno líquido, se colocó el polvo en un tubo de microcentrífuga de 2 ml, posteriormente se agregó 1 ml del buffer InhibitEX, se homogenizó en vórtex por 1 minuto y se llevó a incubación a 90°C por 10 minutos. El resultado se homogenizó en vórtex por 15 segundos y centrifugó a 15.337 g por 1 minuto. En un tubo aparte se agregaron 15 µl de proteinasa K, 200 µl del sobrenadante del paso antes mencionado y 200 µl del Buffer AL. Se homogenizó en vórtex por 15 segundos, se llevó a incubación a 70°C por 10 minutos (sin homogenizar); posteriormente se agregaron 200 µl de etanol 96% y se homogenizó la muestra.

Del paso antes mencionado se tomaron 600 µl y se colocaron en un “QIAamp spin column”. Se centrifugó a 15.337 g por 1 minuto. Este paso se repitió por 3 veces.

La columna de “QIAamp spin column” se colocó en un tubo nuevo de 2 ml y dentro de la columna se agregaron 500 µl de Buffer AW1, y se centrifugó

a 15.337 g por 1 minuto.

La columna de "QIAamp spin column" se colocó en un tubo nuevo de 2 ml, se agregaron 500 µl de Buffer AW2 y se centrifugó a 15.337 g por 3 minutos.

La columna de "QIAamp spin column" se colocó en un tubo nuevo de 2 ml y se centrifugó a 15.337 g por 3 minutos.

Posteriormente La columna de "QIAamp spin column" se colocó en un tubo nuevo de 1.5 ml y se agregaron 80 µl de Buffer ATE, se dejó reposar por 1 minuto y se centrifugó a 15.337 g por 1 minuto. Se descartó la columna y el ADN obtenido se conservó a -20°C.

3.4.4.5. Validación de los métodos de extracción

Se extrajo el ADN de 2 muestras fecales con alta carga parasitaria (150 y 102) por duplicado y se analizó el mejor método de extracción de ADN. Se utilizó la electroforesis en geles de agarosa 2% para visualizar la presencia (1300 pb) e integridad del ADN extraído a través de un fotodocumentador.

3.4.4.6. Estandarización de PCR

Una vez extraído y cuantificado el ADN, se amplificó el gen 18S rRNA que codifica para una secuencia de 1300 pb, para lo cual se combinaron los siguientes elementos para un volumen total de 12.5 µl: 1X Buffer, 1.8 mM MgSO₄, 0.50 mM dNTP's, 1 U Taq, 0.8 µM primer forward 3F (5' GTT CGA TTC CGG AGA GGG A 3'), 0.8 µM primer reverse Api1R (5' TAA TCT ATC ATC CCC ACG ATG C 3'), 2.5 µl de ADN, 7.10 µl de agua libre de

nucleasas. Este protocolo se desarrolló usando un bloque frío LightCycler® Centrifuge Adapters - Roche en la cámara de flujo laminar Espectrocom con materiales previamente esterilizados. Una vez preparada la master mix se usó el termociclador Bio-Rad con el siguiente programa: 5 minutos a 94°C, 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C, 2 minutos a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Los productos se visualizaron en gel agarosa 2% teñido con bromuro de etidio (Invitrogen™). Los fragmentos fueron analizados a través de electroforesis horizontal, las bandas fueron visualizadas a través de un transiluminador de luz ultravioleta (BioPh-It™ System UVP – Transilluminators CV/White light).

3.4.4.7. Identificación de especies de *Eimeria* a partir de ADN de muestras de heces de pollo

La estandarización de las PCR por especies y multiespecies se realizó usando como referencia la técnica publicada por Fernández y col. (2003). Primero se amplificó la PCR en forma individual; una vez establecida la técnica por especie, se procedió con la amplificación multiplex. Las 159 muestras recolectadas fueron analizadas a través de las técnicas PCR multiplex para las seis especies de *Eimeria* que se detallan a continuación:

3.4.4.7.1. Estandarización PCR multiplex para *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*

La PCR multiplex se llevó a cabo en el termociclador BIOER utilizando los cebadores que se detallan en Anexo 2.

En la amplificación multiplex se combinaron los siguientes elementos, para llegar a un volumen total de 12.5 µl: 1X Buffer, 1.5 mM MgSO₄, 0.70 mM dNTP's, 1 U Taq, 0.85 µM primer forward Mx-01F, 0.85 µM primer reverse Mx-01R, 0.60 µM primer forward Tn-01F, 0.60 µM primer reverse Tn-01R, 0.60 µM primer forward Ac-01F, 0.60 µM primer reverse Ac-01R, 2.5 µl de ADN. Una vez preparada la master mix, se usó el termociclador Bio-Rad con el siguiente programa: 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos alineando de 57°C: 63°C, 1 minuto a 72°C y una extensión final de 7 minutos a 72°C.

Los productos de amplificación fueron analizados a través de Electroforesis, usando gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio (Invitrogen™).

3.4.4.7.2. Estandarización PCR multiplex para *E. necatrix* y *E. praecox*

La PCR multiplex se llevó a cabo en el termociclador BIOER utilizando los cebadores que se detallan en Anexo 2.

Para las especies *E. necatrix* y *E. praecox*, se combinaron los siguientes elementos con un volumen final de 12.5 µl: 1.25 X Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.60 mM dNTP's, 1 U Taq, 0.75 µM primer forward Nc-F, 0.75 µM primer

reverse Nc-R, 0.90 μ M primer forward Pr-F, 0.90 μ M primer reverse Pr-R, 2.5 μ l de ADN, 6.89 μ l de agua libre de nucleasas.

Una vez preparada la master mix se usó el termociclador BIOER con el siguiente programa: 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 64°C, 2 minutos a 72°C y una extensión final de 7 minutos a 72°C.

Al no encontrar un control positivo, el amplicón que coincidió con el peso molecular de *E. praecox* (354pb), se envió a Macrogen para secuenciar usando el método Sanger y así confirmar la validez del método.

3.4.4.7.3. Estandarización PCR convencional para *E. brunetti*.

La temperatura de hibridación para la especie *E. brunetti* fue 68°C, a diferencia de las especies estudiadas anteriormente. Por ello se realizaron varias pruebas.

Para la PCR convencional se trabajó con los siguientes reactivos con un volumen final de 12.5 μ l: 1 X Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.60 mM dNTP's, 1 U Taq, 0.75 μ M primer forward Br-F, 0.75 μ M primer reverse Br-R, 0.13 μ l de BSA, 2.5 μ l de ADN, 7.35 μ l de agua libre de nucleasas.

Una vez preparada la master mix, se usó el termociclador BIOER con el siguiente programa: 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 68°C, 2 minutos a 72°C y una extensión final de 7 minutos a 72°C.

Se cambiaron las concentraciones de los primers y dNTP's partiendo del protocolo antes mencionado. Se utilizaron gradientes de temperatura de

55° a 70°C, sin obtener resultados. Se procedió a la concentración de ADN, mediante centrifugación al vacío por 30 minutos a 37°C.

Una vez determinada la concentración y la calidad de ADN se procedió a realizar PCR convencional.

Se realizó un pool con las muestras más concentradas de ooquistes (98, 121, 150 y 154) y se procedió a la extracción de ADN mediante el kit de MP The FastDNA® SPIN Kit for Feces, para tomar como control positivo. Se trabajó con el siguiente protocolo para las 3 especies, *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. praecox*: Volumen final de 12.5 µl: 1.50 X Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.90 mM dNTP's, 1.25 U Taq, 0.8 µM primer forward Nc-F, 0.8 µM primer reverse Nc-R, 0.90 µM primer forward Pr-F, 0.90 µM primer reverse Pr-R, Br-R, 0.90 µM primer forward Pr-F, 0.90 µM primer reverse Br-R, 2.5 µl de ADN, 5.72 µl de agua libre de nucleasas.

Una vez preparada la master mix, se usó el termociclador BIOER con el siguiente programa: 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 65°C, 2 minutos a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Los productos de amplificación fueron analizados a través de Electroforesis, usando gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio (Invitrogen™), donde se evidenció un amplicón que coincidía con el peso molecular de *E. brunetti* (626pb), que se envió a secuenciar con el método Sanger a la empresa MacroGen.

3.5. Factores de riesgo

Para identificar los factores de riesgo asociados a la prevalencia e intensidad parasitaria, se elaboró un cuestionario epidemiológico denominado "Encuesta Epidemiológica" (Anexo 1), validada por expertos nacionales e internacionales.

La misma consistió en la observación de características físicas de los centros productivos y entrevistas realizadas a las personas responsables de cada granja avícola.

La información recolectada a través de los cuestionarios fue cargada en Microsoft Excel®, para ser organizada y depurada. Respecto de las variables que presentaron inconsistencias, se contactó nuevamente a los entrevistados, vía telefónica, a fin de revisar y aclarar la información. Aquellas variables que mantuvieron la discordancia hallada fueron anuladas. Así sucedió con el programa anticoccidial usado en el alimento balanceado (quimioprofilaxis, rotación, etc.), que fue anulado como variable. Algunos avicultores no dieron información, en otros casos la información era notoriamente errónea; y en otros, especialmente los que compraban indistintamente el alimento, desconocían del uso de anticoccidiales de manera profiláctica.

3.5.1. Información general de las granjas

La primera parte de la encuesta consistió en colocar la fecha de muestreo y un código a la granja visitada. Por un acuerdo previo de confidencialidad,

la mayoría de las granjas participantes solicitaron no publicar nombres ni detalles de sus sistemas de producción y manejo. Esta información fue proporcionada, para uso exclusivo de la investigación.

En cada centro productivo se registraron, el nombre de la persona a cargo de la granja, nombre de la granja y nombre comercial de la empresa. Cabe mencionar que de acuerdo con las autoridades competentes (Agrocalidad y CONAVE), todas las granjas muestreadas por sus características y capacidad son consideradas comerciales y/o industriales.

Se registró la ubicación geográfica (coordenadas geográficas) y la altitud para luego establecer dos rangos: A. Granjas ubicadas a menos de 1300 msnm y B. Granjas a altitudes mayores a 1301 msnm.

En Ecuador, está ganando popularidad, realizar acuerdos técnico-comerciales de integración, entre productores agropecuarios y empresas avícolas, para obtener mejores precios de compra (pollitos, alimentos, medicina e insumos), asegurar un mercado, la venta de sus productos avícolas, contar con respaldo técnico y asesoramiento por parte del integrador. Los productores dentro de esta categoría fueron denominados A. Integrados, que incluyó productores con granjas propias y los avicultores asociados, quienes a través de un contrato se comprometen a seguir las políticas de manejo establecidas por empresas avícolas (integradora). Por otro lado, fueron considerados los avicultores B. Independientes, que incluyó a productores autónomos, en su mayoría pequeños, sin políticas de compra de insumos (pollitos y alimento) que salen directamente al mercado.

Respecto de la capacidad instalada de cada granja, se establecieron 3 percentiles: A. Granjas pequeñas con capacidad de hasta 26.000 aves, B. Granjas medianas entre 28.000 y 84.000 aves y C. Granjas grandes, que alojan entre 87.000 y 376.442 aves.

La densidad de población expresada como el número de animales por metro cuadrado (aves/m²) y densidad expresada como kilogramos de ave por metro cuadrado (Kg/m²), se dividieron en tres percentiles (baja, mediana y alta).

Las variables humedad relativa, porcentaje de humedad en cama y temperatura ambiental, fueron descartadas, debido a las importantes variaciones que se visualizaron a lo largo del área del galpón y durante el transcurso del día.

3.5.2. Características de las granjas

De acuerdo con el nivel de tecnificación de las granjas, se clasificaron en A. Galpones abiertos, consistentes en casetas con paredes y ventanas, cuyo control de la ventilación se realiza a través del manejo de las cortinas.

En estos galpones es de vital importancia el criterio de la persona que está a cargo de las aves, ya que el control de la temperatura, humedad, concentración amoníaco, oxígeno, polvo, etc., se realiza de forma manual.

B. Galpones de ambiente controlado, completamente cerrados, con sistemas de calefacción para aumentar la temperatura interna, y ventilas o inlets (entradas controladas de aire en galpones cerrados); paneles de enfriamiento y extractores, sistemas usados en galpones cerrados para

controlar la temperatura y remover el aire viciado. Su control se realiza a través de computadoras y sensores; en estos galpones el personal a cargo tiene un nivel más alto de preparación en relación con el grupo anterior (ver Figura 9).

Figura 9. Galpón abierto (A). Galpón de ambiente controlado (B)



Por los diferentes niveles de termorregulación que presenta el techo de los galpones avícolas y la facilidad del control ambiental, se consideró el material del techo de los galpones como variable: A. Galvalume, acero base recubierto por una aleación de aluminio, zinc y silicio, con mayor nivel de termorregulación; B. Asbesto, también conocido como amianto o uralita; C. Láminas de zinc, comúnmente conocidas y usadas por su bajo costo y bajo nivel de termorregulación.

También se registró el material de la estructura que soporta el techo: A. Metal; B. Madera, esta última con la posible presencia de grietas que podrían guardar restos de cama (ver Figura 10).

El material del piso también fue registrado: A. Piso de tierra; B. Piso de

cemento (concreto) (ver Figura 11).

Además, se registró el uso de iluminación adicional, ya que se sabe que los oocistes sobreviven mejor en lugares sombríos y húmedos (Soulsby, 1987). También se establecieron categorías en cuanto al tipo de ventilación: uso de ventiladores, extractores, o ventilación natural.

Figura 10. Galpón con estructura de madera (A). Galpón con estructura de metal (B).



Figura 11. Galpón con piso de cemento (A). Galpón con piso de tierra (B).



3.5.3. Características del agua de bebida

Se registraron varios aspectos, entre ellos el origen del agua: A. Agua potable del sistema público de abastecimiento (agua de uso humano); B. Canales de riego o ríos (agua que está en constante movimiento). C. Pozos (aguas subterráneas).

Al respecto, se registró presencia o ausencia de tratamientos previos y tipos de productos agregados al agua (cloro y derivados, peróxidos, ozono, acidificantes, estabilizadores de pH, etc.).

Por último, se consideró el tipo de sistema de bebederos que disponen: A. Sistemas cerrados: nipples o tetinas, en los cuales queda suspendida una gota de agua, por lo que están relacionados con mayor sanidad y menor desperdicio de agua; B. Sistemas de bebederos abiertos: bebederos automáticos, campanas y canales, caracterizados por presentar canales abiertos, donde las aves beben agua de un canal común, con una aparente menor condición sanitaria, mayor desperdicio y evaporación (ver Figura 12).

Figura 12. Tipos de bebederos avícolas. Sistemas de bebederos abiertos (A).
Sistemas de bebederos cerrados (B).



3.5.4. Características del alimento balanceado y alimentación

Se registró el origen del alimento. Se consideraron dos categorías: A. Fabrican, los productores elaboran directamente su alimento balanceado, o tienen algún nivel de control o compromiso a través de la integración, y B. Compran, los productores compran indistintamente el alimento balanceado. En este caso, también se registró la marca del alimento utilizada en el lote evaluado.

Presentación física del alimento: se consideraron alimento en harina y peletizado. El primero es una mezcla de materias primas previamente molidas y el segundo es un alimento que luego de un proceso de aumento de temperatura, humedad y presión es compactado a gránulos de diferentes tamaños.

Tipo de comedero: se clasificó en dos categorías, A. Comederos manuales, los que son abastecidos de alimento a través del llenado manual de sus tolvas; B. Comederos mecánicos o automáticos, el llenado se realiza a través de cadenas o espirales propulsados por motores eléctricos (ver Figura 13).

Figura 13. Tipos de comederos avícolas. Comederos manuales (A). Comederos mecánicos (B).



Tipo de alimentación se dividió en: A. *Ad libitum* o libre, las aves tenían acceso permanente al alimento; B. Controlada, las aves tienen acceso a una cantidad específica de alimento o a un tiempo limitado del mismo. Además, se registró el tiempo que las aves no tienen acceso al alimento.

3.5.5. Control anticoccidial

Se solicitó información sobre los sistemas de control anticoccidial: vacunación para coccidiosis, uso de anticoccidiales en el alimento o ningún tratamiento de control.

Si la respuesta era vacunación, se solicitaban detalles, como la marca de la vacuna para conocer tipo de vacuna, su contenido, la edad de aplicación y método de vacunación.

En el caso de control mediante uso de anticoccidiales en el alimento, sólo se pudo establecer si el control se realizaba o no a través del alimento. Cuando se consultaron detalles sobre el programa, como productos actualmente usados, programas de rotación de principios activos y el tiempo de retiro de anticoccidiales previo al faenamiento; lamentablemente,

las encuestas mostraron respuestas con mucha variación, contradicciones, o simplemente los entrevistados desconocían del tema; por lo que estas variables fueron descartadas.

Respecto del uso de anticoccidiales en el agua de bebida como tratamiento curativo para coccidiosis clínica, en los casos afirmativos se solicitó el nombre del producto o principio activo, la edad de las aves al momento del suministro y duración del tratamiento.

Se solicitó información sobre vacunación para coccidiosis en lotes anteriores; así como también, vacunación de los progenitores, edad de vacunación y tipo de vacuna. Adicionalmente se solicitó la procedencia de las aves, para corroborar la información obtenida.

3.5.6. Características de la cama

Se registró el material que los productores usaban como cama, si usaban un solo material o si realizaban alguna combinación. Se consultó si la cama era nueva, de primer uso, o reciclada. En este último caso, se solicitó información sobre el método de compostaje o reducción de carga microbiana previo a su reutilización. Además, se registró el número de usos que tenía la cama y la profundidad en centímetros.

Se consideró la presencia de *Alphitobius diaperinus* (ver Figura 14), vector común de varias enfermedades, entre ellas la coccidiosis aviar (Goodwin y Waltman, 1996). Se indagó además sobre la presencia de algún método de control; en caso de respuesta afirmativa, se consultó la metodología usada.

Figura 14. *Alphitobius diaperinus* en cama (A). Fase adulta ("*Alphitobius diaperinus* (lesser mealworm)") (B)



En este segmento se consideraron los métodos de limpieza y desinfección que usaban los productores al final de cada lote; si realizaban o no control de plagas (ratas) e insectos; la frecuencia, el método y los productos utilizados.

3.5.7. Características de las aves

El muestreo se realizó en la fase final de crianza, en la mayoría de los casos días antes del sacrificio. Las encuestas incluyeron preguntas sobre particularidades del origen de las aves, entre ellas: la línea genética y su procedencia. Se registró la edad de las aves al momento del muestreo, tiempo máximo de permanencia en el galpón y su peso promedio en el día del muestreo. Para la variable edad se establecieron tres percentiles: A. Aves menores a 35 días, B. Aves de 36 a 45 días, C. Aves mayores a 46 días.

El peso promedio de las aves se clasificó en tres percentiles: bajo, mediano y alto. Luego, con la superficie y las dimensiones de los galpones (largo y ancho), se controlaron los cálculos de densidad poblacional.

3.5.8. Tiempo de repoblación y vacío sanitario

En la encuesta se registró el tiempo de vacío sanitario efectivo, periodo que permanece vacío el galpón (Morales y Moreno, 2017), se clasificó en tres percentiles: A. menor a 7 días, B. de 8 a 15 días, C. más de 16 días.

Además, se consultó el tiempo de repoblación; con este valor y la edad máxima de permanencia de las aves en el galpón, se comprobó si la información proporcionada era correcta.

3.6. Análisis estadístico

Para comparar la posible relación entre las características de las granjas avícolas, las medidas de control usadas para *Eimeria* spp. y el promedio de ooquistes por gramo de heces (OPG), se utilizó el análisis de varianza (ANOVA), considerando niveles de diferencias de significancia estadística: valor de $p \leq 0.01$ (diferencia altamente significativa) y valor de $p \leq 0.05$ (diferencia significativa). En las variables con tres o más niveles, se utilizó la prueba de Tukey para comparar si hubo significancia entre las medias de las poblaciones.

La prevalencia de cada especie de *Eimeria* (*P*) fue calculada dividiendo el número de muestras positivas sobre el número total de muestras tomadas.

Se estimó un intervalo de confianza de 95% para esta proporción.

Cuando se determinó la prevalencia de las especies: *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* no se consideraron las muestras de las aves que recibieron vacuna anticoccidial, ya que al ser vacunas que contienen ooquistes vivos de estas especies, es altamente probable que contengan ooquistes que provengan de las vacunas y no del ambiente.

La prevalencia de las especies de *Eimeria* spp. se calculó en base a la siguiente expresión:

$$\pi = 1 - (1 - P)^{1/k}$$

Donde:

P = es la proporción de muestras positivas

k = es el tamaño del pool (número de animales que aportaron a la muestra (45.72 aves en promedio))

El intervalo de confianza de 95% para π se calculó usando los límites bajo y alto de la estimación de P.

Para determinar el nivel de asociación entre la presencia de cada especie de *Eimeria* spp. y los diferentes factores analizados, se utilizó una medida de asociación de riesgo, la razón de probabilidad Odd Ratio (OR) y para su significación se usó la prueba exacta de Fisher. El nivel de significación estadística fue establecido en 5%. Para identificar las covariables a utilizar para el modelo final, se usó la regresión logística múltiple. El análisis estadístico se realizó con el software estadístico R (R Core Team, 2021). Para la elaboración de mapas y georreferenciación se usó el paquete estadístico Mapview (Appelhans y col., 2021).

4. RESULTADOS

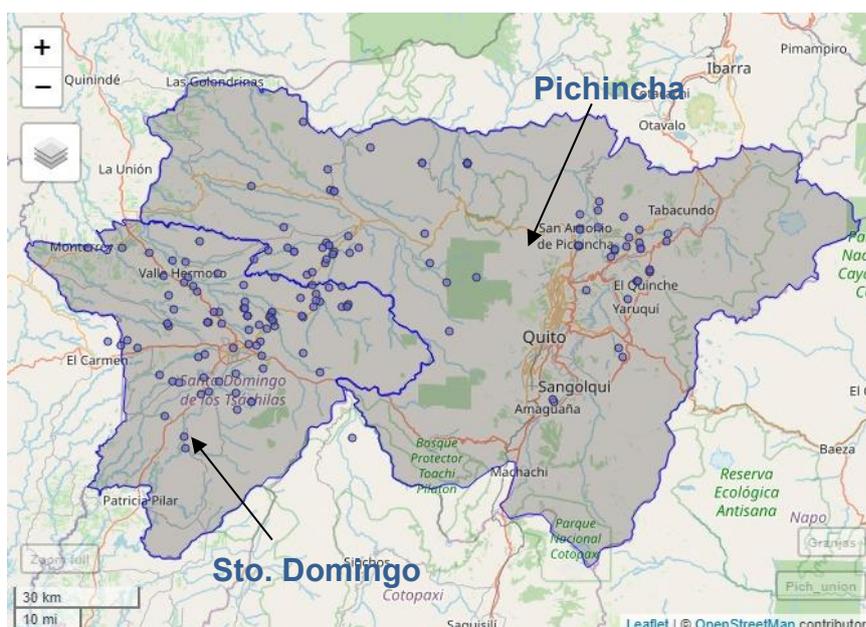
Se realizaron encuestas epidemiológicas y se tomaron muestras de heces de pollos parrilleros en 155 granjas avícolas de las provincias Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas.

4.1. Resultados parasitológicos

4.1.1. Técnica cualitativa de Willis

Todas las muestras analizadas (159) fueron positivas a la presencia de ooquistes de *Eimeria* spp. en heces frescas (ver Figura 15). El único género parasitario identificado en las muestras procesadas fue *Eimeria* spp. Según se desprende del análisis realizado a partir de las encuestas epidemiológicas, los resultados correspondieron a animales sin sintomatología de coccidiosis aviar.

Figura 15. Distribución de las granjas avícolas analizadas



4.1.2. Carga Parasitaria

Las muestras presentaron diferentes niveles de OPG (ooquistes por gramo de heces frescas), que fluctuaron entre 25 OPG y 69.900 OPG.

4.1.3. Identificación de ooquistes de *Eimeria* spp. por esporulación

La identificación de especies de *Eimeria* spp. a través de morfología post esporulación, sólo se pudo realizar en el 11.3% de las muestras, por los inconvenientes mencionados en la sección 3.4.2. de materiales y métodos.

4.2. Biología Molecular

4.2.1. Extracción de ADN de muestras fecales de pollos

Inicialmente se propuso trabajar con la técnica CETAB modificada para extraer el ADN de *Eimeria* spp. de heces frescas de pollo. Pero, pese a que esta técnica logró romper los ooquistes (se confirmó a través de observación microscópica) y se obtuvo ADN con concentración aceptable (medido a través de Nanodrop), no logró liberar el ADN de los ooquistes.

Esto se comprobó al salir negativas las PCR por especies, pese a encontrar microscópicamente ooquistes de *Eimeria* spp. en todas las muestras analizadas.

Ante la duda del origen del problema (si radicaba en la técnica de extracción de ADN o en los primers por especie), se decidió adquirir un primer 18S (primer genérico para *Eimeria* spp.), gen ampliamente usado para la amplificación de ADN de *Eimeria* spp. (Albanese y col., 2019). Al salir negativa la PCR para el gen 18S, se confirmó que el error estaba en la

extracción de ADN, por este motivo se optó por probar diferentes métodos para extracción.

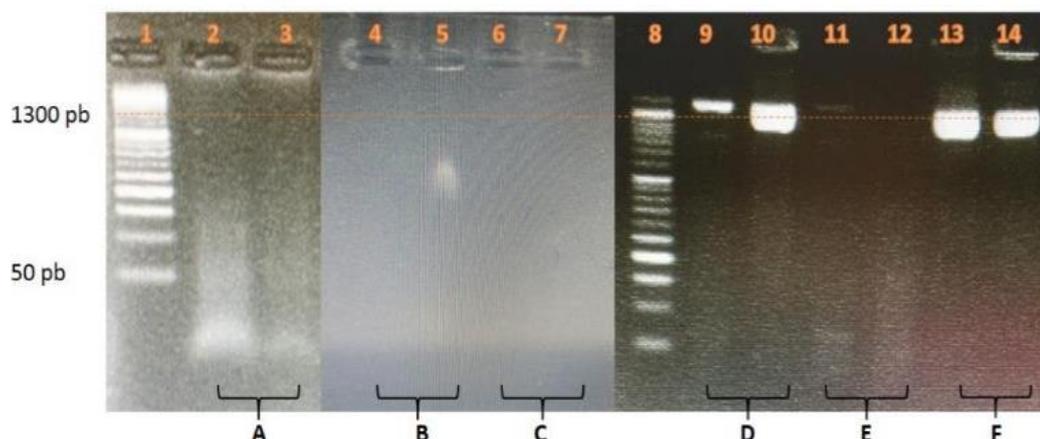
Para validar el procedimiento y estandarizar un control positivo, se buscaron cepas ATCC de *Eimeria* spp., sin resultados en el mercado nacional e internacional, por lo cual se optó por usar ADN extraído a partir de vacunas contra coccidiosis.

Durante los meses que tardamos en encontrar el error y buscar la técnica que presente mayor liberación de ADN de *Eimeria* spp., no sólo se gastaron los recursos disponibles, sino que también se agotó el control positivo existente (vacuna para coccidiosis). Por otro lado, no todas las vacunas contienen las especies de *Eimeria* inicialmente propuestas en este proyecto. Así, en el caso de *E. mitis*, no se encontró un control positivo, por tanto, se tuvo que omitir esta especie en la investigación.

Las vacunas usadas como controles positivos se enumeraron en la sección 3.4.4.2. de materiales y métodos.

El método de extracción que mejor resultado dio fue FastDNA Spin Kit for Feces (MP) (Figura 16), ya que por este método se obtuvieron amplicones más grandes y visibles. Este método de extracción de ADN se usó para las 159 muestras de heces obtenidas. Para la extracción de ADN de las vacunas con ooquistes esporulados se utilizó el kit QIAamp DNA Stool Mini (Qiagen); el kit FastDNA Spin Kit for Feces (MP) también resultó una buena opción, pero por disponibilidad del primero se usó ese para las vacunas.

Figura 16. Validación de seis métodos de extracción de ADN de heces.



Electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio (Invitrogen™), donde se observan los resultados de la extracción de ADN de dos muestras de heces (muestra 102 y 150). (A) Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico. (B) CTAB modificado. (C) Extracción de ADN de ooquistes. (D) QIAamp DNA Stool Mini Kit. (E) QIAamp DNA Stool Mini Kit modificado. (F) FastDNA Spin Kit for Feces (MP). (1 y 8) Marcador de peso molecular.

4.2.2. Especies de *Eimeria* spp. identificadas a través de PCR

Los resultados de microscopía, presencia de ooquistes de *Eimeria* spp., se validaron con biología molecular, al ser todas las muestras positivas al gen 18S.

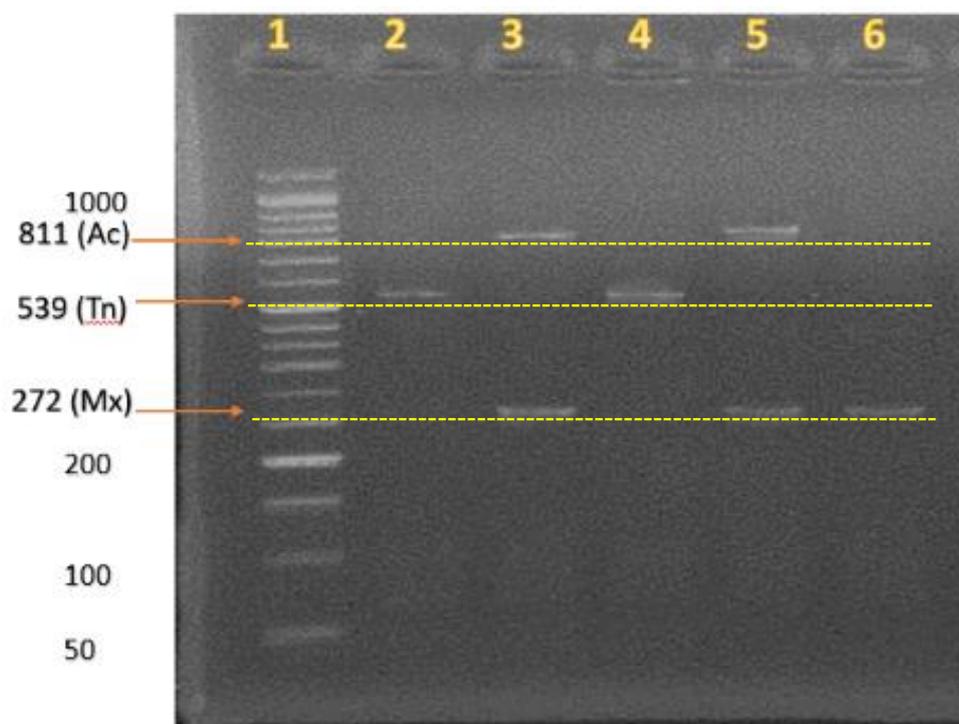
Una vez confirmada la presencia de *Eimeria* spp., se procedió a estandarizar y realizar la PCR por especies; primero se estandarizó la técnica individual y luego se procedió a multiplexar.

Las especies *E. máxima*, *E. tenella* y *E. acervulina* (Figura 17) fueron las primeras cuya PCR se pudo estandarizar y multiplexar, usando como control positivo una vacuna viva que contenía ooquistes esporulados de *E. acervulina*, *E. máxima*, *E. máxima* MFP, *E. mivati* y *E. tenella* (Fortegra,

MSD Salud Animal).

Para las especies restantes (*E. brunetti*, *E. necatrix* y *E. praecox*), la estandarización, tomó más tiempo, no sólo por su complejidad, sino también porque se hizo necesario importar una vacuna viva (COCIVAC D2, MSD Animal Health), que se usó como control positivo. Dicha vacuna indica contener ooquistes esporulados de *E. acervulina*, *E. máxima*, *E. mivati*, *E. brunetti*, *E. necatrix* y *E. tenella*. Sin embargo, mediante la PCR multiplex se detectó un amplicón que coincidió con el peso molecular de *E. praecox* (354pb); resultado que fue confirmado a través de secuenciación, con lo que se pudo comprobar la validez de la técnica.

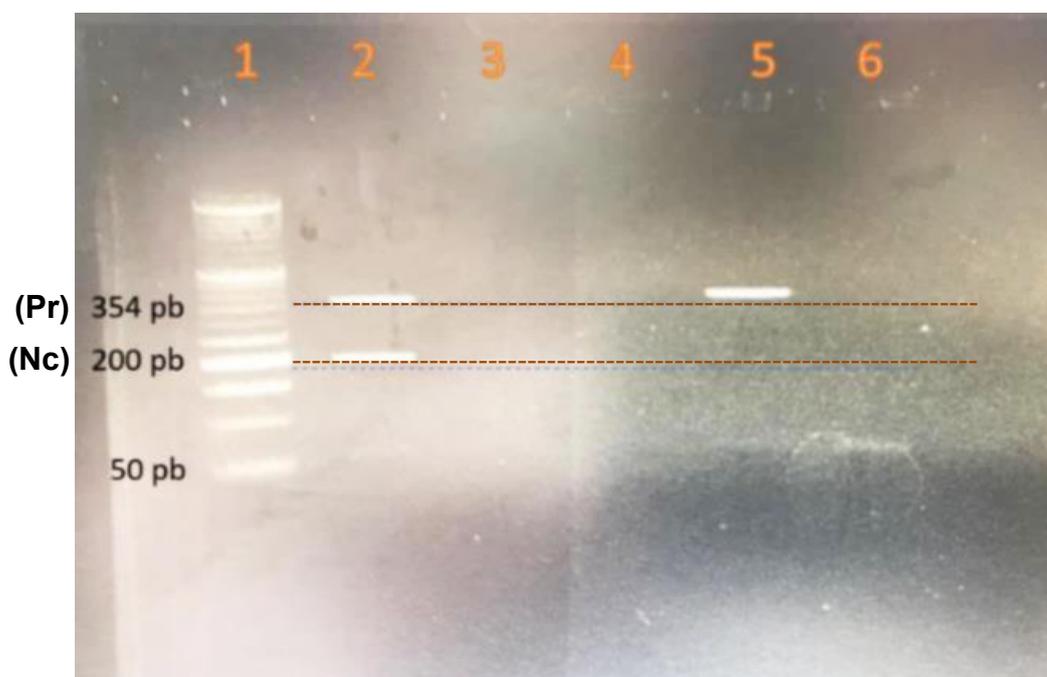
Figura 17. Identificación PCR de *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*.



Electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio (Invitrogen™), donde se observan los resultados. (1) Marcador de peso molecular (2) Muestra 26, (3) Muestra 27, (4) Muestra 28, (5) Muestra 29, (6) Muestra

Las especies *E. necatrix* y *E. praecox* (Figura 18) se pudieron multiplexar, mientras que con *E. brunetti* se realizó una PCR individual. La estandarización de este ensayo fue mucho más compleja, ya que se usan múltiples cebadores en la misma reacción y cada uno representa distintas eficiencias de unión, ocurriendo diferentes cinéticas de reacción simultáneamente, lo que conduce a un patrón de amplificación heterogéneo.

Figura 18. Identificación PCR de *E. necatrix* y *E. praecox*.



Electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio (Invitrogen™), donde se observan los resultados. (1) Marcador de peso molecular (2) Vacuna COCCIVAC® D2 – Control positivo, (3) Muestra 98, (4) Muestra 121, (5) Muestra 154, (6) Control negativo.

La vacuna usada como control positivo no amplificó para *E. brunetti*. Ante la falta de un control positivo para *E. brunetti*, se utilizó un *pool* de las muestras con mayor carga parasitaria, aumentando así la probabilidad de

detectar esta especie. Como se puede observar en la figura 19, en el pocillo 2 se encuentran presentes las especies *E. brunetti* (626 pb) y *E. praecox* (354 pb). Además, la banda de la especie *E. necatrix* (200 pb) no está muy definida. Sin embargo, a pesar de que el protocolo de PCR se encuentra establecido, no se puede considerar al pool de ADN como un control positivo. Por tal motivo se envió a secuenciar el amplicón que coincidía con el peso molecular de *E. brunetti* (626 pb). Los resultados de la secuenciación confirmaron la presencia de *E. brunetti* en el pool de heces, de este modo, se pudo comprobar la validez de la técnica utilizada.

Figura 19. Identificación PCR de *E. brunetti*, *E. necatrix* y *E. praecox*.



Electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio (Invitrogen™), donde se observan los resultados. (1) Marcador de peso molecular (2) ADN del pool de 4 muestras (3) Vacuna COCCIVAC® D2 – Control positivo, (4) Muestra 154, (5) (6) Control negativo.

Finalmente, a través de PCR se identificaron seis especies: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. máxima*, *E. necatrix*, *E. praecox* y *E. tenella* en las muestras de heces de las granjas avícolas de pollos parrilleros en Ecuador.

4.3. Características de las granjas evaluadas

Las granjas presentaron diferentes niveles de tecnificación que fueron desde galpones abiertos con piso de tierra hasta galpones cerrados de ambiente controlado. La capacidad instalada varió, desde 2.000 hasta 376.444 aves); del mismo modo, el asesoramiento técnico y prácticas de bioseguridad fueron muy variables. La capacidad total instalada de las 155 granjas muestreadas alcanza 10.951.000 pollos parrilleros en cada ciclo de producción (tabla 2).

Tabla 2. Capacidad de las granjas avícolas de pollos parrilleros de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas

Característica	Total granjas	Capacidad de alojamiento (aves)	Capacidad Total (aves)
Granjas pequeñas	53	2.000 a 26.000	932.000
Granjas medianas	54	28.000 a 84.000	2.834.000
Granjas grandes	48	87.000 a 376.000	7.185.000
TOTAL	155		10.951.000

La crianza de pollos parrilleros se realiza en diferentes pisos altitudinales. En la zona analizada varió entre 100 y 2800 msnm. Las granjas ubicadas a menor altitud estuvieron relacionadas con menor edad de faena y por lo tanto, menor edad al momento del muestreo.

Todos los productores tenían conocimiento de los daños que produce la

coccidiosis. El 97% de ellos empleaba anticoccidiales en el alimento y el 3% aplicaba vacunación anticoccidial como programas de prevención y control.

Por normativa local, los centros de producción avícola deben estar alejados de los centros poblados. Sólo el 8% de granjas tenía acceso al servicio de agua potable, el resto utilizaba agua de ríos o canales (25%), o realizaron excavaciones profundas para obtener aguas subterráneas, pozos (67%).

Todas las granjas realizaban algún tipo de tratamiento para mejorar la calidad del agua. Se encontró una amplia variación en cuanto a los productos que los avicultores utilizaban para potabilizar el agua de bebida, siendo la combinación cloro y peróxido la más ampliamente usada (69%). Además, solos o en combinación, se usaban diferentes fuentes de cloro, peróxidos puros o comerciales, ozono y acidificantes.

Tanto la adquisición de camas nuevas como la evacuación de camas usadas representan una situación cada día más difícil para los avicultores de Ecuador. Esto se debe por un lado al incremento progresivo en el costo de camas nuevas, y por otro, a que las camas avícolas se usan principalmente como abono, por lo que su comercialización fuera de la época de siembra es frecuente. Parte de los productores relevados optaron por usar camas nuevas (52%), mientras que otras empresas usaron las camas por un máximo de 8 crianzas (48%). El principal método de reutilización fue el compostaje a través de fermentación por amontonamiento, con lo cual aumenta la temperatura y disminuye el pH del material de la cama, dando como resultado la inactivación microbiana (Dai

Prá y Büttow Roll, 2019).

Respecto a la presencia de *Alphitobius diaperinus*, escarabajo de la cama o del estiércol, considerado un reservorio de enfermedades avícolas (Goodwin y Waltman, 1996), los entrevistados reportaron su presencia en 60% de las granjas analizadas. De ellos, 10.4% realizaban control con insecticidas al final de cada crianza. En cuanto a las formas de control, el piretroide cipermetrina fue el químico más comúnmente usado por 37.7% de los avicultores. La forma más común es el uso de productos agrícolas que, una vez diluidos según las recomendaciones de los fabricantes, se colocan en la cama avícola vía aspersión, en horas de la noche cuando las aves han salido. También usan una combinación comercial en polvo (Megacip®), que contiene cipermetrina, dimetiril ftalato, benzoato de bencilo, aceite de pino y citronela (5g/m²). Se aplica en la cama, previo a la llegada de las aves, o sobre la cama durante el vacío sanitario, en caso de reutilización de la misma. Otro método de control usado por 6.3% de productores avícolas es la aspersión de Diflubenzuron (Larvigen®), un benzoil-fenil-ureas, usado para el control de formas larvarias, que es aplicado en cama durante la crianza de las aves a una dosis de 0.48g/m². Todos los productores indicaron realizar una exhaustiva limpieza del piso al final de cada ciclo productivo, destacando el uso de desinfectantes, como formol, amonio cuaternario, glutaraldehídos, fenoles (creolina), cal viva y combinaciones de estos con flameado de piso (41%). El detalle de los resultados de las características de las granjas avícolas estudiadas se puede observar en el anexo 3.

4.4. Análisis de los datos

4.4.1. Prevalencia de *Eimeria* spp. en la población de granjas

Los resultados de prevalencia de las especies de *Eimeria* spp. en las granjas relevadas se muestran en la Tabla 3. *E. máxima* fue la especie con mayor prevalencia en las muestras analizadas 80% (IC 95%: 73.0 – 86.2%), mientras que *E. brunetti* fue la especie que menos veces se identificó en las muestras evaluadas 31% (IC 95%: 23.9-38.7%).

Tabla 3. Prevalencia de las especies de *Eimeria* spp. en la población de pollos parrilleros de las provincias de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas.

Especie	Muestras analizadas	Muestras positivas	Prevalencia
<i>E. acervulina</i>	153 *	108	70.59 (62.6 - 77.5)
<i>E. brunetti</i>	159	49	30.82 (23.9 - 38.7)
<i>E. maxima</i>	153*	123	80.39 (73.0 - 86.2)
<i>E. necatrix</i>	159	83	52.20 (44.2 - 60.1)
<i>E. praecox</i>	159	88	55.35 (47.3 - 63.2)
<i>E. tenella</i>	153*	82	53.59 (45.4 - 61.6)

* *E. acervulina*, *E. máxima* y *E. tenella* no se consideraron en las 6 granjas que recibieron vacuna, ya que se asume que esas especies están presentes.

Los niveles de OPG de las muestras analizadas no presentaron asociación con la presencia de las especies de *Eimeria* spp. identificadas por PCR. (Tabla 4).

Tabla 4. Especies de *Eimeria* spp. y carga parasitaria (OPG) identificadas en 159 muestras de pollos parrilleros de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas.

Especie	Presencia	Nº	%	IC 95%	OPG media	P
<i>E. acervulina</i>	SI	108	68	60.0-74.9	7953.8	0.663
	NO	51	32		4827.5	
<i>E. brunetti</i>	SI	49	31	23.9-38.7	6694.5	0.984
	NO	110	69		7065.2	
<i>E. maxima</i>	SI	123	77	69.9-83.5	5774.3	0.526
	NO	36	23		7295.4	
<i>E. necatrix</i>	SI	83	52	44.2-60.1	7734.4	0.661
	NO	76	48		6095.4	
<i>E. praecox</i>	SI	88	55	47.3-63.2	8898.9	0.162
	NO	71	45		4536.6	
<i>E. tenella</i>	SI	82	52	43.6-59.5	8069.3	0.097
	NO	77	48		5760.1	

4.4.2. Asociación entre factores de riesgo y carga parasitaria de *Eimeria* spp.

En el anexo 4 se pueden observar en detalle las características de las granjas y medidas de control en relación con el número de ooquistes por gramo de heces. En la tabla 5 se resumen las variables que fueron significativas.

Las características que mostraron asociación con mayores cargas parasitarias fueron: granjas ubicadas en altitudes menores a 1300 msnm; galpones con piso de tierra, aves más jóvenes (menos de 35 días) y alimento comprado. En menor nivel de significancia estuvo el agua de bebida proveniente de pozos, seguido de río o canal, pese a que ambos grupos informaron usar tratamientos de potabilización de agua (ver tabla 5).

Tabla 5. Asociación entre factores de riesgo y carga parasitaria de *Eimeria* spp. (OPG).

Parámetro	Muestras analizadas	Frecuencia %	OPG media	P
ALTITUD				
Menor a 1300msnm	122	77	8338.1	0.000**
Mayor a 1300msnm	37	23	2582.4	
MATERIAL DEL PISO				
Tierra	81	51	11127.2	0.000**
Cemento	78	49	2614.1	
ORIGEN DEL AGUA				
Pozo	107	67	8734.6 ^a	0.045*
Río o canal	39	25	3506.1 ^{ab}	
Agua Potable	13	8	2603.9 ^b	
ORIGEN DEL ALIMENTO				
Compran	38	24	13356.1	0.002**
Fabrican	121	76	4939.5	
EDAD DE LAS AVES				
Menos de 35 días	54	34	1239 ^a	0.006**
De 36 a 45 días	53	33	5266 ^b	
Más de 46 días	52	33	3021 ^b	

** Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.01$

*Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.05$
 IC: Intervalo de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas

El modelo final de regresión múltiple para las variables explicativas de riesgo y protección ante la carga parasitaria de *Eimeria* spp. (OPG), se presentan en la Tabla 6. Los resultados muestran que las granjas avícolas independientes presentaron mayor número de ooquistes respecto a las granjas integradas ($p < 0.01$), con valores de 9051 OPG y 5460 OPG respectivamente. La altitud menor a 1300 msnm también se asoció a mayor número de ooquistes (8338.1 OPG), comparado con las granjas que realizaban crianza en alturas superiores a 1300 msnm (2582.4).

Tabla 6. Asociación de factores de riesgo y carga parasitaria de *Eimeria* spp. (OPG) utilizando un modelo de regresión logística multivariable.

Variable Explicativa		Modelo final	
		OPG	P
DEPENDENCIA	Independiente	9051.9 ^a	
	Integrado	5459.9 ^b	<0.01**
ALTITUD	Menor a 1300msnm	8338.1 ^a	
	Mayor a 1300msnm	2582.4 ^b	0.01**

** Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.01$.

En esta investigación ninguna medida de protección usada por los avicultores encuestados presentó algún nivel de protección en relación con la cantidad de ooquistes de *Eimeria* spp.

4.4.3. Asociación entre factores de riesgo y presencia de las diferentes especies de *Eimeria* spp.

En el anexo 4, se pueden observar los resultados de las variables incluidas en el análisis. Algunas se descartaron porque sus resultados se prestaban a confusión o discordancia. Entre ellas, el flameado del piso, que se incluía como un factor de riesgo, en comparación con las granjas que no lo hacían. Por otra parte, los programas de alimentación controlados (con periodos de restricción), que presentaban protección ante coccidiosis, comparado con los programas *ad libitum* (acceso permanente al alimento con anticoccidiales). Los comederos manuales y una profundidad de cama menor a 10 cm mostraron mayor riesgo para *E. tenella* y *E. necatrix* respectivamente, sin que en el resto de las especies se observen diferencias estadísticas. Es posible que estas variables estén solapadas

por otras características.

E. acervulina estuvo presente en 70.6% (108/153) de las muestras analizadas (IC 95%: 62.6-77.5%) (ver Figura 20). Las variables con significancia se muestran en la Tabla 7.

Figura 20. Distribución geográfica de *E. acervulina* en granjas de pollos parrilleros de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas.

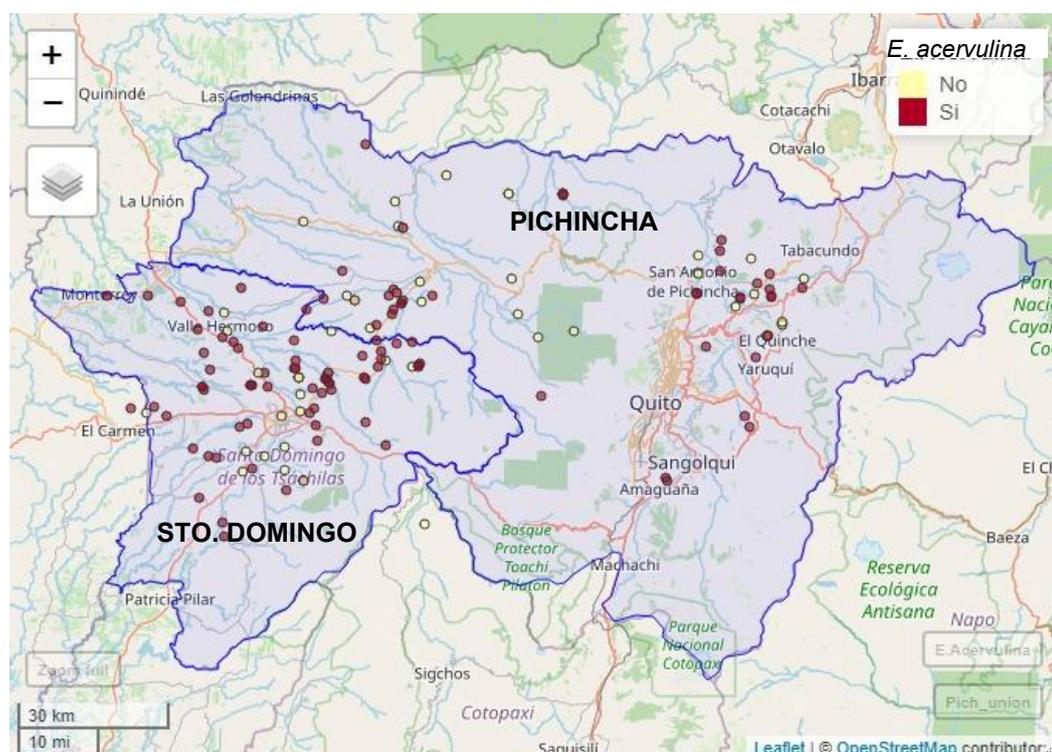


Tabla 7. Factores asociados a la presencia de *E. acervulina* en pollos parrilleros de la provincia de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas

Variable explicativa	Muestras analizadas	Muestras positivas	Frecuencia %	OR (95%IC)	P
DEPENDENCIA					
Integrado	87	57	65.5	Nivel de referencia	
Independiente	66	51	77.3	2.1 (1.0-4.7)	0.034*
MATERIAL DEL PISO					
Cemento	72	41	56.9	Nivel de referencia	
Tierra	81	67	82.7	4.3 (1.9-9.7)	0.00**
MATERIAL SOPORTE DEL TECHO					
Metal	59	34	57.6	Nivel de referencia	

Madera	94	74	78.7	2.6 (1.3-5.6)	0.01**
ORIGEN DEL AGUA					
Río o canal	39	20	51.3	Nivel de referencia	
Pozo	101	80	79.2	2.8 (1.2-6.5)	0.01**
Agua Potable	13	8	61.5	1.5 (0.4-6.9)	0.75
ORIGEN DEL ALIMENTO					
Fabrican	115	72	62.6	Nivel de referencia	
Compran	38	36	94.7	12.1 (2.9-108.6)	0.00**
EDAD DE LAS AVES					
Más de 46 días	50	28	56.0	Nivel de referencia	
De 36 a 45 días	51	32	62.8	1.3 (0.6-3.0)	0.56
Menos de 35 días	52	48	92.3	6.7 (2.3-22.6)	0.00**
CAL VIVA					
No	43	21	48.8	Nivel de referencia	
Si	110	87	79.1	3.1 (1.4-6.9)	0.00**

** Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.01$

*Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.05$

E. brunetti fue identificada en 30.8% (49/159) de las muestras analizadas (IC 95%: 23.9 – 38.7%) (ver Figura 21). Las variables asociadas a la presencia de *E. brunetti* se muestran en la Tabla 8.

Figura 21. Distribución geográfica de *E. brunetti* en granjas de pollos parrilleros de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas.

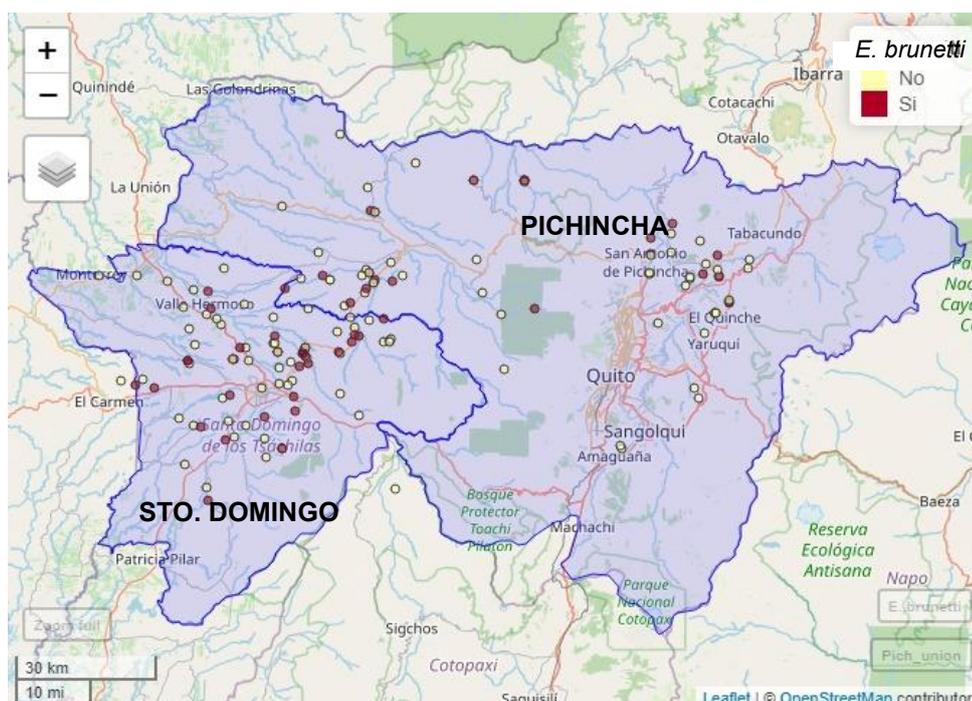


Tabla 8. Factores asociados a la presencia de *E. brunetti* en pollos parrilleros de la provincia de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas

Variable Explicativa	Muestras analizadas	Muestras positivas	Frecuencia %	OR (95%IC)	P
DEPENDENCIA					
Integrado	93	20	21.5	Nivel de referencia	
Independiente	66	29	43.9	2.8 (1.4-6.1)	0.00**
ORIGEN DEL ALIMENTO					
Fabrican	121	27	22.3	Nivel de referencia	
Compran	38	22	57.9	4.7 (2.1-11.2)	0.00**
ANTICOCCIDIALES EN AGUA					
No	141	38	26.9	Nivel de referencia	
Si	18	11	61.1	4.2 (1.4-13.8)	0.01**

** Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.01$

*Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.05$

E. maxima fue la especie que mayor frecuencia presentó en las granjas, con 80.4% (123/153) de las muestras analizadas (IC 95%: 73.0 – 86.2%) (ver Figura 22). Variables asociadas a la presencia de *E. maxima* se muestran en la Tabla 9.

Figura 22. Distribución geográfica de *E. maxima* en granjas de pollos parrilleros de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas.

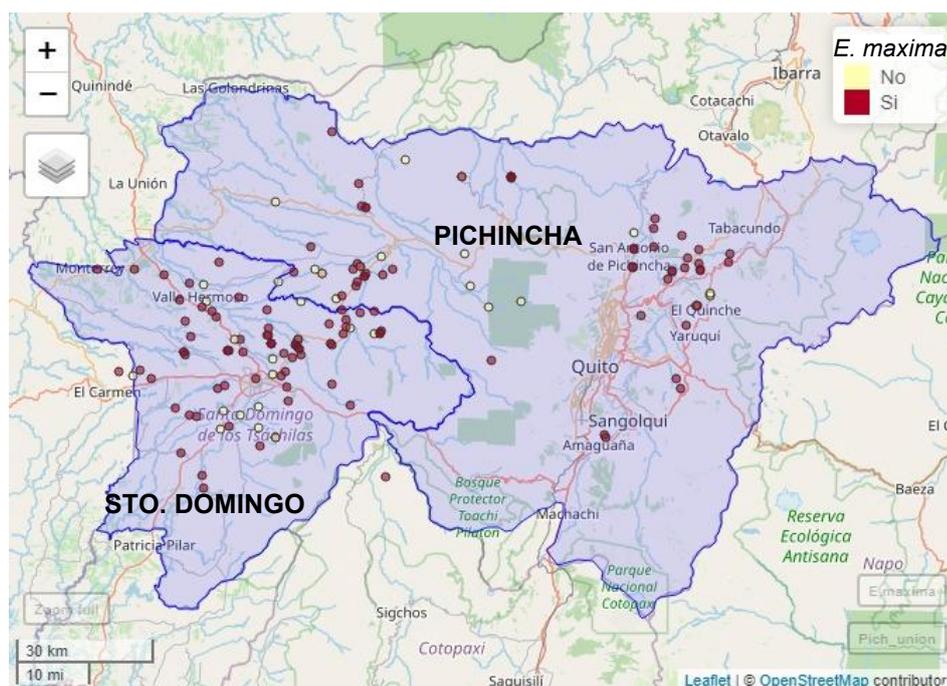


Tabla 9. Factores asociados a la presencia de *E. máxima* en pollos parrilleros de la provincia de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas.

Variable explicativa	Muestras analizadas	Muestras positivas	Frecuencia %	OR (95%IC)	P
ORIGEN DEL AGUA					
Río o canal	39	25	64.1	Nivel de referencia	
Pozo	101	88	87.1	2.6 (1.0-6.3)	0.03 *
Agua Potable	13	10	76.9	1.9 (0.4-12.2)	0.51
ORIGEN DEL ALIMENTO					
Fabrican	115	87	75.7	Nivel de referencia	
Compran	38	36	94.7	6.9 (1.6-63.1)	0.00 **
ALPHITOBIUS DIAPERINUS					
No	63	43	68.3	Nivel de referencia	
Si	90	80	88.9	2.3 (1.0-5.3)	0.03 *
EDAD DE LAS AVES					
Más de 46 días	50	35	70.0	Nivel de referencia	
Menos de 35 días	52	49	94.2	4.7 (1.5-17.8)	0.00 **
De 36 a 45 días	51	39	76.5	1.4 (0.5-3.4)	0.53
CAL VIVA					
No	43	28	65.1	Nivel de referencia	
Si	110	95	86.4	2.4 (1.0-5.7)	0.03 *

** Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.01$

*Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.05$

E. necatrix fue identificada en 52.2% (83/153) de las muestras analizadas (IC 95%: 44.2 – 60.1%) (ver Figura 23). Las variables incluidas en el análisis para determinar los factores asociados a la presencia de *E. necatrix* se muestran en la Tabla 10.

Figura 23. Distribución geográfica de *E. necatrix* en granjas de pollos parrilleros de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas.

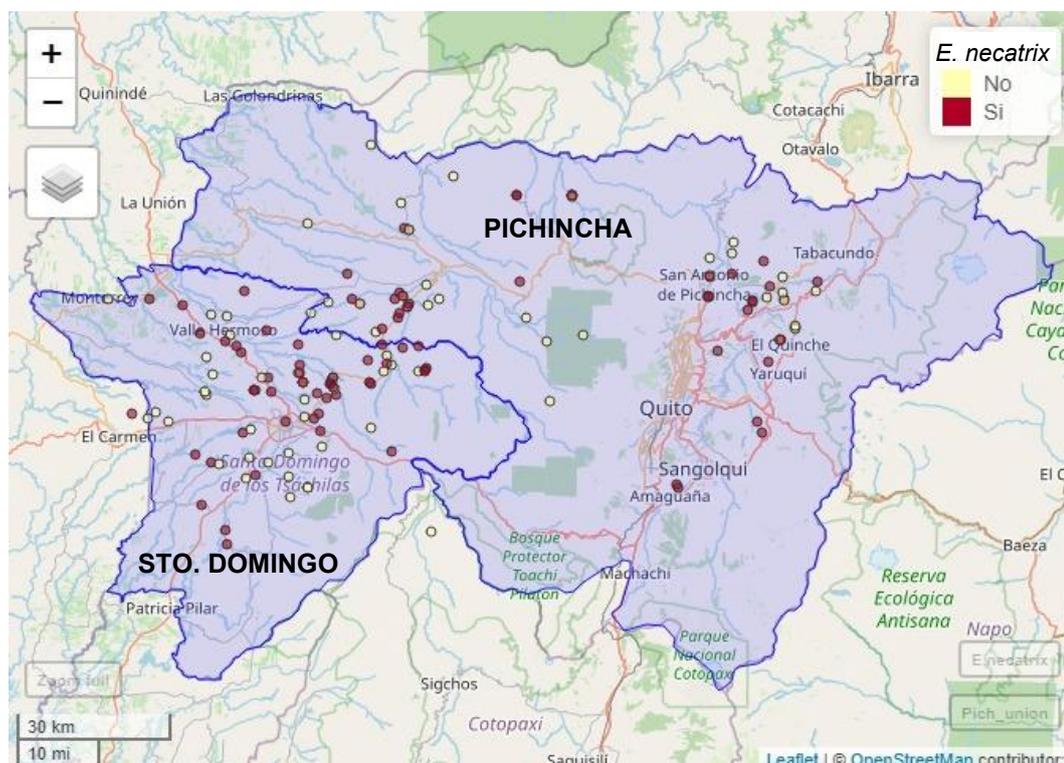


Tabla 10. Factores asociados a la presencia de *E. necatrix* en pollos parrilleros de la provincia de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas

Variable Explicativa	Muestras analizadas	Muestras positivas	Frecuencia %	OR (95%IC)	P
DEPENDENCIA					
Integrado	93	42	45.2	Nivel de referencia	
Independiente	66	42	63.6	2.2 (1.1-4.5)	0.02*
EDAD DE LAS AVES					
Más de 46 días	52	19	36.5	Nivel de referencia	
Menos de 35 días	54	31	57.4	2.3 (1.0-5.5)	0.01**
De 36 a 45 días	53	33	62.7	2.8 (1.2-6.8)	0.04*

** Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.01$

*Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.05$

La presencia de *E. praecox* se identificó en 55.4% (88/159) de las muestras (IC 95%: 47.3 – 63.2%) (ver Figura 24). Las variables incluidas en el análisis se muestran en la Tabla 11.

Figura 24. Distribución geográfica de *E. praecox* en granjas de pollos parrilleros de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas.

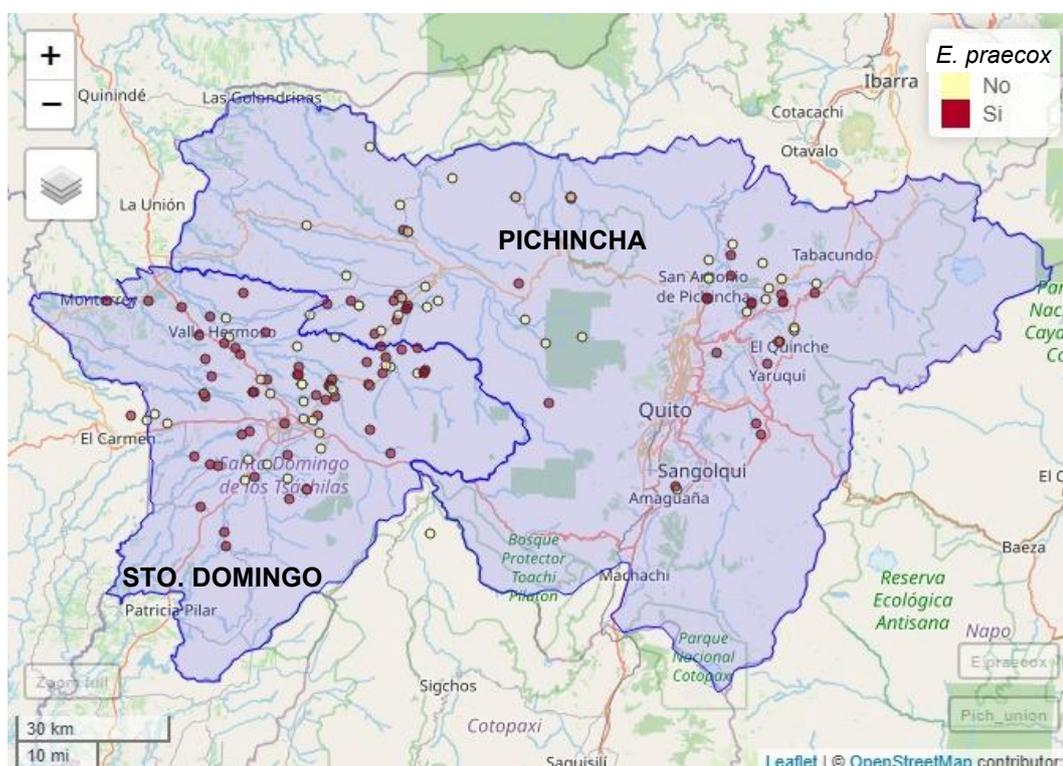


Tabla 11. Factores asociados a la presencia de *E. praecox* en pollos parrilleros de la provincia de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas

Variable Explicativa	Muestras analizadas	Muestras positivas	Frecuencia %	OR (95%IC)	P
DEPENDENCIA					
Integrado	93	43	46.2	Nivel de referencia	
Independiente	66	45	68.2	2.5 (1.2-5.1)	0.01 **
MATERIAL DEL PISO					
Cemento	78	35	44.9	Nivel de referencia	
Tierra	81	53	65.4	2.3 (1.2-4.6)	0.01 **
MATERIAL SOPORTE DEL TECHO					
Metal	62	26	41.9	Nivel de referencia	
Madera	97	62	63.9	2.4 (1.2-4.9)	0.01 **
ORIGEN DEL AGUA					
Río o canal	39	15	38.5	Nivel de referencia	
Pozo	107	68	63.6	2.8 (1.2-6.4)	0.01 **
Agua Potable	13	5	38.5	1 (0.2-4.3)	1.00
ORIGEN DEL ALIMENTO					
Fabrican	121	60	49.6	Nivel de referencia	

Compran	38	28	73.7	2.8 (1.2-7.1)	0.01 **
EDAD DE LAS AVES					
Más de 46 días	52	21	40.4	Nivel de referencia	
Menos de 35 días	54	39	72.2	3.8 (1.6-9.4)	0.00 **
De 36 a 45 días	53	28	52.8	1.7 (0.7-3.9)	0.24

** Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.01$

*Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.05$

Se halló *E. tenella* en 53.6% (82/153) de las muestras analizadas (IC 95%: 45.4 – 61.6%) (ver Figura 25). Los factores analizados para determinar su nivel de asociación a la presencia de *E. tenella* se muestran en la Tabla 12.

Figura 25. Distribución geográfica de *E. tenella* en granjas de pollos parrilleros de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas.

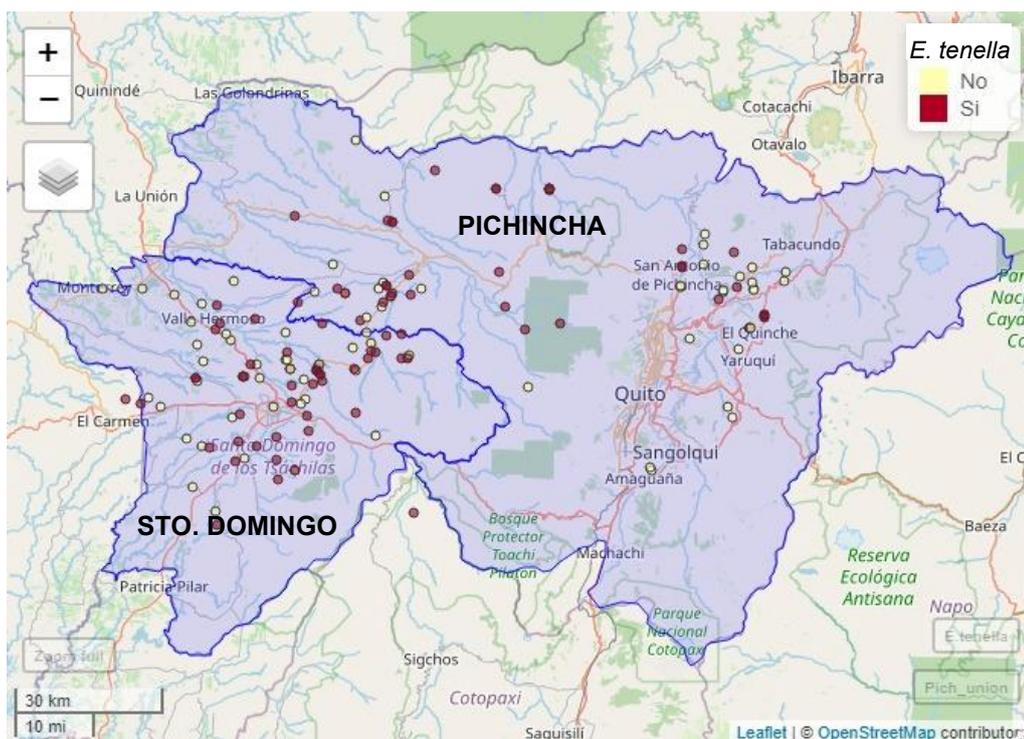


Tabla 12. Factores asociados a la presencia de *E. tenella* en pollos parrilleros de la provincia de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas.

Variable Explicativa	Muestras analizadas	Muestras positivas	Frecuencia %	OR (95%IC)	P
DEPENDENCIA					
Integrado	87	37	42.5	Nivel de referencia	
Independiente	66	45	68.2	3.2 (1.6-6.7)	0.00 **
ORIGEN DEL ALIMENTO					
Fabrican	115	50	43.5	Nivel de referencia	
Compran	38	32	84.2	7.5 (2.8-23.6)	0.00**
ALPHITOBIUS DIAPERINUS					
No	63	26	41.3	Nivel de referencia	
Si	90	56	62.2	1.9 (1.0-4.0)	0.05*
ANTICOCCIDIALES EN AGUA					
No	137	68	49.6	Nivel de referencia	
Si	16	14	87.5	3.7 (1.1-16.3)	0.02*

** Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.01$

*Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.05$

Algunas variables se descartaron por presentar discordancia. Las variables que estuvieron asociadas a la presencia de las especies de *Eimeria* fueron: Los productores independientes presentaron mayor riesgo ante la presencia de varias especies. De este modo, el valor de OR=2.1 veces más riesgo para *E. acervulina* (IC 95%: 1.0 – 4.7; $P < 0.05$); 2.8 para *E. bruneti* (IC 95%: 1.4 – 6.1; $P < 0.01$); 2.3 para *E. necatrix* (IC 95%: 1.1 – 4.5; $P < 0.05$); 2.5 para *E. praecox* (IC 95%: 1.2 – 5.1 $P < 0.01$); y 3.2 para *E. tenella* (IC 95%: 1.6 – 6.7; $P < 0.01$); comparado con los productores que trabajan integrados.

En cuanto al material del piso, el de tierra presentó 4.28 veces mayor riesgo para *E. acervulina* (IC 95%: 2.0 – 9.7; $P < 0.01$); y 2.3 para *E. praecox* (IC 95%: 1.2 – 4.6; $P < 0.01$), en relación a granjas con piso de cemento.

La estructura que soporta el techo también mostró diferencias significativas, así el uso de madera se asoció con 2.6 veces mayor riesgo de presentar *E. acervulina* (IC 95%: 1.3 – 5.6; P <0.01) y 2.4 para *E. praecox* (IC 95%: 1.2 – 4.9; P <0.01), comparado con la estructura de metal.

El origen del agua de bebida también marcó diferencia, así cuando provenía de un pozo presentó 2.8 mayor riesgo para *E. acervulina* (IC 95%: 1.2 – 6.5; P <0.01); 2.6 para *E. maxima* (IC 95%: 1.0 – 6.3; P <0.05); y 2.8 para *E. praecox* (IC 95%: 1.2 – 6.4; P <0.01), en relación al agua proveniente de río o canal.

Comprar alimento balanceado presentó 12.1 mayor riesgo para *E. acervulina* (IC 95%: 2.9 – 108.6; P <0.01); 4.7 para *E. bruneti* (IC 95%: 2.1 – 11.2; P <0.01); 6.9 para *E. maxima* (IC 95%: 1.6 – 63.1; P <0.01); 2.8 para *E. praecox* (IC 95%: 1.2 – 7.1; P <0.01); y 7.5 para *E. tenella* (IC 95%: 2.8 – 23.6; P <0.01), más probabilidad que si fabricaba o tenía relación a largo plazo con el proveedor de alimento.

Las granjas en las que se detectó *Alphitobius diaperinus*, tuvieron 2.3 veces mayor riesgo de presentar *E. maxima* (IC 95%: 1.2 – 7.1; P <0.05); y 2.0 *E. tenella* (IC 95%: 1.0 – 4.0; P <0.05), en relación a los que no observaron este escarabajo.

La edad de las aves también evidenció diferencias, así las de menor rango etario (menores a 35 días) presentaron 6.7 veces mayor riesgo de infección por *E. acervulina* (IC 95%: 2.3 – 22.6; P <0.01); 4.7 para *E. maxima* (IC 95%: 1.5 – 17.8; P <0.01); 2.3 para *E. necatrix* (IC 95%: 1.00 – 5.5; P <0.01); y 3.8 para *E. praecox* (IC 95%: 1.6 – 9.4; P <0.01), más probabilidad que

las aves mayores a 46 días. Las aves de edad intermedia (35 a 45 días) tuvieron 2.8 mayor riesgo de presentar *E. necatrix* (IC 95%: 1.2 – 6.8; P <0.05), comparado con aves de mayor edad.

Las granjas que habían utilizado tratamientos anticoccidiales en el agua de bebida por tener casos de coccidiosis clínica durante la crianza, mostraron 4.2 veces mayor riesgo de presentar *E. brunetti* (IC 95%: 1.4 – 13.8; P <0.01) y 3.7 para *E. tenella* (IC 95%: 1.1 – 16.3; P <0.05).

El uso de cal viva en la desinfección del piso exhibió 3.1 mayor riesgo de tener *E. acervulina* (IC 95%: 1.4 – 6.9; P <0.01) y 2.4 de *E. maxima* (IC 95%: 1.0 – 5.7; P <0.05), comparado con los productores que la utilizaban.

El resto de las variables analizadas no presentaron asociación; tampoco se halló ninguna variable de protección para las especies de *Eimeria* spp.

El modelo final de regresión logística binaria multivariable arrojó como variables explicativas de riesgo ante la presencia de *E. acervulina*, *E. brunetti* (Tabla 13), *E. maxima*, *E. necatrix* (Tabla 14), *E. praecox* y *E. tenella* (Tabla 15), los siguientes factores: dependencia, altitud, origen del agua, edad de las aves, tipo de galpón y material que soporta el techo.

Los resultados del modelo de regresión logística binario multivariable muestran que las granjas avícolas que trabajaban independiente presentaron 2.8 (IC 95%: 1.2 – 6.4; P <0.05) mayor riesgo de tener *E. brunetti*; 2.2 (IC 95%: 1.1 – 4.4; P <0.05) de presentar *E. necatrix*, 3.3 (IC 95%: 1.5 – 7.4; P <0.01) *E. praecox* y 3.7 (IC 95%: 1.8 – 7.7; P <0.01) *E. tenella*, comparado con los productores que trabajaban integrados a empresas avícolas.

Tabla 13. Variables explicativas de riesgo para la presencia de *E. acervulina* y *E. brunetti* utilizando un modelo de regresión logística binaria multivariable.

Variable explicativa	<i>E. acervulina</i>		<i>E. brunetti</i>	
	OR (95% IC)	P	OR (95% IC)	P
DEPENDENCIA				
Integrado	-		Nivel de referencia	
Independiente	-		2.8 (1.2-6.4)	0.013*
ALTITUD				
Mayor a 1300msn	-		Nivel de referencia	
Menor a 1300msnm	-		5.9 (1.7-21.1)	0.005**
MATERIAL SOPORTE DEL TECHO				
Metal	Nivel de referencia		-	
Madera	3.0 (1.2-7.4)	0.016*	-	

** Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.01$

*Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.05$

Tabla 14. Variables explicativas de riesgo para la presencia de *E. maxima* y *E. necatrix* utilizando un modelo de regresión logística binaria multivariable.

Variable explicativa	<i>E. maxima</i>		<i>E. necatrix</i>	
	OR (95% IC)	P	OR (95% IC)	P
DEPENDENCIA				
Integrado	-		Nivel de referencia	
Independiente	-		2.21 (1.1-5.0)	0.021*
TIPO DE GALPON				
Cerrado	Nivel de referencia		-	
Abierto	4.0 (1.1-13.8)	0.028*	-	
EDAD DE LAS AVES				
Más de 46 días	Nivel de referencia		-	
De 36 a 45 días	1.6 (0.6-4.3)	0.309	-	
Menos de 35 días	6.9 (1.6-30.0)	0.008**	-	

** Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.01$

*Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.05$

Las aves criadas en alturas menores a 1300 msnm mostraron 5.9 (IC 95%: 1.7 – 21.1; $P < 0.01$) veces probabilidad de presentar *E. brunetti* y 3.4 (IC 95%: 1.7 – 8.2; $P < 0.01$) de *E. tenella*, comparado con altitudes mayores. Los galpones abiertos presentaron una asociación positiva de 4.0 (IC 95%: 1.1 – 13.8; $P < 0.05$) ante la presencia de *E. maxima* en relación a los galpones cerrados, de ambiente controlado.

Tabla 15. Variables explicativas de riesgo para la presencia de *E. praecox* y *E. tenella* utilizando un modelo de regresión logística binaria multivariable.

Variable explicativa	<i>E. praecox</i>		<i>E. tenella</i>	
	OR (95% IC)	P	OR (95% IC)	P
DEPENDENCIA				
Integrado	Nivel de referencia		Nivel de referencia	
Independiente	3.3 (1.5-7.4)	0.003**	3.7 (1.8-7.7)	0.000**
ALTITUD				
Mayor a 1300msnm	-		Nivel de referencia	
Menor a 1300msnm	-		3.4 (1.7-8.2)	0.005**
MATERIAL SOPORTE DEL TECHO				
Metal	Nivel de referencia		-	
Madera	3.5 (1.4-8.5)	0.005**	-	
ORIGEN DEL AGUA				
Río o canal	Nivel de referencia			
Potable	0.8 (0.2-3.2)	0.688	-	
Pozo	2.6 (1.0-6.6)	0.041*	-	

** Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.01$

*Diferencias en las características de la granja y/o medidas de control con valor- $p \leq 0.05$

Los galpones con estructura de madera (soporte del techo) mostraron 3.0 (IC 95%: 1.2 – 7.4; $P < 0.05$) veces mayor riesgo de presentar *E. acervulina* y 3.5 (IC 95%: 1.4 – 8.5; $P < 0.01$) *E. praecox*, comparado con los galpones que tienen estructura de metal.

El agua de bebida que proviene de pozos presentó asociación positiva de 2.6 (IC 95%: 1.0 – 6.6; $P < 0.05$) ante la presencia de *E. praecox*, comparada con el agua que proviene de ríos o canales.

En aves de menor edad (menor a 35 días) el riesgo se incrementó 6.9 veces (IC 95%: 1.6 – 30.0; $P < 0.01$) para la presencia de *E. maxima*.

El resto de las variables analizadas no evidenciaron asociación en este modelo estadístico, así como ninguna variable evaluada mostró protección para la presencia de *Eimeria* spp.

5. DISCUSIÓN

La coccidiosis aviar es una infección parasitaria con alto impacto económico en la industria avícola (Dalloul y Lillehoj, 2006; Kant y col., 2013; Kumar y col., 2015; Moraes y col., 2015; Cervantes, 2017; Gottardo Balestrin y col., 2021). Se ha reportado mundialmente en aves comerciales (Kant y col., 2013; Chengat Prakashbabu y col., 2017) y continúa siendo una de las enfermedades más costosas para la industria mencionada (Mesa y col., 2021).

En la presente investigación se evidenció la presencia de *Eimeria* spp. en el 100% de las muestras analizadas mediante la técnica de concentración por flotación de Willis, pese a que los establecimientos avícolas muestreados presentaban condiciones aceptables de bioseguridad. *Eimeria* spp. fue el único género parasitario hallado, lo que demuestra que las medidas de bioseguridad no son suficientes para controlar la presencia de este protozoo en granjas avícolas comerciales. Estos resultados coinciden con los reportados por Haug y colaboradores (2008), quienes hallaron entre cientos y millones de ooquistes por gramo de heces en pollos parrilleros sin enfermedad clínica en Noruega. Cabe recordar que cada especie presenta diferente grado de patogenicidad, y por lo tanto, diferente carga parasitaria requerida para producir lesiones intestinales, descamación de la mucosa y expulsión de moco y/o sangre (Reid, 1990).

En Ecuador, la presencia de *Eimeria* spp. en pollos parrilleros comerciales ha sido escasamente estudiada. En este sentido, Villarreal (2010)

monitoreó la integridad intestinal de pollos parrilleros en la planta de sacrificio, hallando que el 5% presentaba lesiones gastrointestinales sugestivas de *E. tenella*, y el 13% lesiones macroscópicas (enteritis). Garcés-Gudiño y col. (2018) al evaluar el proceso de reciclaje de camas en una granja de Pedro Vicente Maldonado, Pichincha, encontraron que, al finalizar el ciclo productivo, todas las camas tenían ooquistes de *Eimeria* spp. en diferentes etapas de desarrollo. La coccidiosis aviar también fue reportada en el archipiélago de Galápagos, Ecuador por Whitehead y col. (2018), quienes evaluaron sanitariamente aves comerciales introducidas por el posible riesgo de contaminación de aves silvestres, detectando ooquistes de *Eimeria* spp. en heces en ocho de las trece granjas analizadas.

Se ha reportado una alta prevalencia de *Eimeria* spp. en granjas avícolas comerciales de Holanda (Veen y col., 2016), Reino Unido, Irlanda, África y Asia (Pegg y col., 2018). En Rumania se reportó 91% de prevalencia (Györke y col., 2013), en China 97.2% (Geng y col., 2021), en la región norte de India 81.3% (Kumar y col., 2015); mientras que en Etiopía se observó 42.2% (Wondimu y col., 2019). En aves de traspatio del norte de India se reportó 28.5% de prevalencia (Khursheed y col., 2022).

En países como México, pese al uso y rotación de drogas anticoccidiales en el alimento, se ha reportado la presencia de *Eimeria* spp. en 100% de las granjas muestreadas (Moreno y Ibarra, 2002), al igual que en los estados de Tocantins (Toledo y col., 2011) y Bahía (Carvalho y col., 2011),

Brasil. En el estado de Santa Catarina, la frecuencia fue 96% (Moraes y col., 2015). En Argentina se informó 88.37% (McDougald, 1998), y en Colombia 92.8% (Mesa y col., 2021). En galpones con ambiente controlado de Brasil se ha reportado 87.5% de prevalencia de *Eimeria* spp. (Gottardo y col., 2021). Gazoni y colaboradores (2021) informaron la presencia de coccidiosis subclínica en la industria avícola brasileña, durante los ocho años que duró su investigación.

A pesar de la escasa información publicada sobre esta infección en Ecuador, todos los productores tienen conocimiento de su existencia y las pérdidas económicas que conlleva. Posiblemente este sea el motivo por el cual mantienen medidas profilácticas permanentes. Así, 97% de los consultados usan programas anticoccidiales en el alimento, mientras que 3% de ellos maneja vacuna anticoccidial para prevenir pérdidas económicas. Esta información coincide con Mesa y colaboradores (2021), quienes reportaron que en Colombia el uso de anticoccidiales en el alimento es el principal método profiláctico, mientras que el uso de vacuna es poco frecuente.

En los años 50 la coccidiosis era probablemente la enfermedad más temida (Reid, 1990). Los primeros anticoccidiales usados como alternativa de prevención y profilaxis fueron presentados a la industria avícola en 1948 (Chapman, 2009, 2014). Este descubrimiento y la generalización de la quimioterapia preventiva contribuyeron al control de estos protozoarios y el desarrollo de la industria avícola en EEUU (Reid, 1990). De ahí en más, se

han convertido en un aspecto relevante en la industrialización y desarrollo de los sistemas de crianza de pollos mundial a nivel intensivo (Chapman, 2009, 2014). De esta manera, son una alternativa ampliamente utilizada en la industria avícola, por su bajo costo y eficacia comprobada en la producción comercial de pollos parrilleros (Dalloul y Lillehoj, 2005). En las últimas décadas, su uso se transformó en la estrategia más popular para la prevención de coccidiosis aviar (Dalloul y Lillehoj, 2006, Chapman y col., 2013). Así, según Agri Stats Inc. en EEUU, la adición de anticoccidiales en el alimento varía entre 70 y 98%, dependiendo de la estación del año, información comparable a lo que ocurre alrededor del mundo (Chapman y col., 2013). Sin embargo, también se ha evidenciado la resistencia a productos anticoccidiales (Snyder y col., 2021), dado que la mayoría de los medicamentos ya no son tan efectivos como al momento de su introducción al mercado (Chapman y col., 2013); hecho demostrado en diversas investigaciones (McDougald y col., 1987; Arabkhazaeli y col., 2013; Tan y col., 2017; Ramey y Ahlstrom, 2020; Mesa y col., 2021; Snyder y col., 2021).

El uso comercial de las vacunas anticoccidiales tiene más de 50 años, sin embargo, en Ecuador su uso no está generalizado por el elevado costo y la complejidad en el manejo post-vacunal. La distribución de los ooquistes durante la vacunación puede no ser uniforme, y algunas aves no recibir suficiente cantidad de ooquistes vacunales (Jenkins, 2019). En el primer contacto con los ooquistes, no necesariamente producen inmunidad, sino que requieren más pases en las aves (Bruzual y Marton, 2022). De esta manera, las aves que no recibieron la cantidad suficiente de ooquistes en

la vacunación, se inmunizan con los ooquistes eliminados por las aves que sí fueron vacunadas. Pero para ello, los ooquistes deben estar esporulados. En condiciones de camas muy secas, la esporulación de los ooquistes es menor (Price y col., 2014), con lo que, la inmunización de todas las aves en un segundo o tercer ciclo no sería efectiva. Por otro lado, si la humedad es muy alta, la esporulación es exagerada, llegando a complicar la reacción vacunal por producir coccidiosis clínica (Bruzual y Marton, 2022). Ambos panoramas fueron expuestos por la única empresa participante de la presente investigación que ha utilizado vacunas por más de 10 años consecutivos (Báez, Juan Carlos – resultados no publicados).

Por otra parte, en Bolivia se ha reportado que el uso de vacunación en comparación con el uso de anticoccidiales es más costoso (Ayala y Gonzales, 2008).

Según Del Cacho (2013), la resistencia a los anticoccidiales no es genéticamente estable, por lo que al usar vacunas anticoccidiales por varios ciclos consecutivos, las poblaciones resistentes de las granjas avícolas desaparecen o son desplazadas por poblaciones sensibles provenientes de las vacunas anticoccidiales. Chapman y colaboradores (2010) propusieron que la mejor estrategia es alternar el uso de anticoccidiales y vacuna anticoccidial. En algunos estudios se ha evidenciado una parcial restauración de sensibilidad a drogas posterior al uso de vacunas anticoccidiales (Chapman y col., 2013).

A través de la técnica de Mac Master modificada, se cuantificó la carga parasitaria de *Eimeria* spp., obteniendo valores que oscilaron entre 25 y 69.900 OPG. Esos valores fueron medidos en la última semana de permanencia de las aves en las granjas, demostrando que la carga parasitaria varió considerablemente. Del mismo modo, en un estudio realizado en Pedro Vicente Maldonado, Pichincha, se reportaron valores entre 1.083 y 6.717 OPG, pese a que el muestreo se realizó en la misma granja, con similares condiciones de manejo, bioseguridad, medidas profilácticas y rango etéreo de las aves (Garcés-Gudiño, 2018). En Argentina también se reportaron valores entre 138 y 415.800 OPG (McDougald y col., 1987). Se ha descrito la asociación entre la carga parasitaria de *Eimeria* spp. y los parámetros productivos. En Noruega, cargas mayores a 50.000 OPG en el momento del sacrificio de las aves, presentaron menores parámetros productivos (9% menor índice de producción europeo) (Haug y col., 2008). Snyder y colaboradores (2021) reportaron que la carga parasitaria puede estar afectada por variados factores, entre ellos, diferentes niveles de sensibilidad a los anticoccidiales. Después de usar vacunas anticoccidiales, hallaron niveles inferiores de OPG y mejoría en la sensibilidad a los anticoccidiales. Por lo tanto, el rango amplio en la carga parasitaria de *Eimeria* spp. también podría estar influenciado por el uso de anticoccidiales, tanto por el tipo de fármaco específico, como por el programa utilizado.

En la presente investigación no se pudo establecer qué programas anticoccidiales se utilizaban, el tiempo de retiro, ni la rotación de los

principios activos, porque los entrevistados lo desconocían o tenían información errónea. Este hecho coincide con lo reportado por Mesa y colaboradores (2021), quienes al realizar su investigación en Colombia no pudieron determinar los fármacos anticoccidiales usados, por similares razones. Sin embargo, reportaron que el plan básico fue la administración de ionóforo en la etapa de crecimiento (1 a 21 días de edad) y una combinación de ionóforo con químico para la siguiente etapa (21 a 42 días de edad).

Para Hodgson (1970) no es posible indicar la cantidad de ooquistes necesarios para producir coccidiosis clínica. Sin embargo, conocer la carga parasitaria sería de utilidad para evaluar los programas de control, si se realizan con intervalos en el mismo lote. Por otro lado, es importante recordar que la presencia de *Eimeria* spp. es considerada un factor predisponente para la clostridiosis (Gazoni y col., 2021).

Haug y colaboradores (2008) realizaron dos investigaciones (2000 y 2003) en granjas comerciales. En la primera, observaron que el índice de eficiencia europeo disminuyó 9% cuando el OPG era mayor a 50.000 OPG; pero en el segundo estudio, el valor de OPG no presentó reducción. Ellos concluyeron que la diferencia se debió a los cambios observados en la composición de especies de *Eimeria* spp. En el primero predominaban ooquistes medianos y grandes, mientras que, en el segundo, ooquistes pequeños. También Gazoni y colaboradores (2021) reportaron fluctuaciones anuales entre especies de *Eimeria* spp. en granjas

comerciales. Por lo dicho, es importante conocer tanto la carga parasitaria como la composición de especies de *Eimeria* spp. (Jenkins y col., 2017).

En esta experiencia, no se observó asociación entre la carga parasitaria y la presencia de ninguna de las especies de *Eimeria* estudiadas. Es importante recordar que cada especie tiene diferentes niveles de patogenicidad y ciclo merogónico (De Franceschi, 2011; Reid, 1990).

Salinas y colaboradores (2001) hallaron una correlación moderada entre la carga parasitaria de *Eimeria* spp. y las lesiones intestinales macro y microscópicas. Por otra parte, Lee y colaboradores (2012) concluyeron que los programas anticoccidiales de campo influyen en la carga de *Eimeria* spp. y modulan la respuesta inmune del hospedador.

Sin embargo, Chapman y Johnson, (1992) reportaron que la cantidad de ooquistes no estuvo relacionada con el peso corporal ni la conversión alimenticia de las aves. Por lo tanto, el conocimiento de la carga parasitaria no sería suficiente; es necesario conocer las especies presentes y su abundancia relativa, por la diferencia en el grado de patogenicidad que presentan las distintas especies.

Tradicionalmente los programas anticoccidiales se suelen comparar a través de la evaluación de los parámetros zootécnicos obtenidos. Sin embargo, los valores de OPG podrían ser usados como referencia en los cambios de programas anticoccidiales. Jenkins y colaboradores (2017) concluyeron que se puede calcular la efectividad de las medidas de control (programas anticoccidiales o vacunación), a través del conocimiento de la

dinámica de *Eimeria* spp., teniendo en cuenta los hallazgos de ooquistes y la composición de especies.

También es importante recalcar que en la presente investigación se cuantificó el total de ooquistes no esporulados de *Eimeria* spp. en heces frescas, por lo que no se pudo diferenciar su morfología, tamaño, o algún aspecto que pueda contribuir con la identificación de especies. Cuando se procedió a cultivarlas en dicromato de potasio al 2%, se pudo evidenciar una reducción importante en la cantidad de ooquistes, pocos lograron esporular. Como se mencionó anteriormente, las muestras fueron congeladas por coincidir con la pandemia COVID 19, razón por la cual se usaron ooquistes no esporulados de heces frescas.

Los resultados obtenidos a través microscopía fueron confirmados mediante PCR, ya que al usar el gen 18S para *Eimeria* spp., todas las muestras resultaron positivas. Los amplicones de parte de estas muestras fueron secuenciados, detectando *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. praecox* y *E. tenella*. Además, los resultados arrojaron especies de hongos, vegetales, como arroz y maíz; esto debido a la falta de especificidad del gen 18S y por no separar los ooquistes de las heces. Por otro lado, en la vacuna Coccivac D2®, usada como control positivo, inesperadamente se halló *E. praecox*, no mencionada como componente de dicha vacuna, mientras que *E. brunetti* (componente de la vacuna), estuvo ausente.

Todas las muestras fueron analizadas a través de PCR específica para las especies *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. praecox* y *E.*

tenella, se identificaron entre una y seis especies por muestra. Las combinaciones más comunes fueron: *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* y *E. praecox* presente en el 23.9% de las muestras, seguida de *E. tenella*, como única especie, identificada en el 10.7 de las muestras. La combinación *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. praecox* se encontró en el 8.8%; *E. tenella* y *E. brunetti* en el 6.9%; mientras que *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. necatrix* en el 5.6%.

La prevalencia de *E. acervulina* fue 70.6% (IC: 62.6 - 77.5), en otras investigaciones se reportaron prevalencias mayores. Así, en Brasil 89% (Gottardo y col., 2021), en Argentina 93% (McDougald y col., 1987), en Romania 91% (Györke y col., 2013), en Grecia 79.3% (Andreopoulou y col., 2022). En Nigeria se reportó una prevalencia similar a nuestros resultados, 68.4% (Djemai y col., 2022). Estos resultados coinciden con otras investigaciones que señalan que *E. acervulina* y *E. maxima* son las especies más detectadas a nivel mundial (Conway y Mckenzie, 2007; Gazoni y col., 2020, 2021). Sin embargo, en Colombia hallaron 35% de prevalencia (Mesa y col., 2021), mientras que en aves de traspatio del norte de India se encontró 24% de prevalencia (Khursheed y col., 2022).

Eimeria brunetti presentó la menor prevalencia, 30.8% (IC: 23.9 – 38.7). Sin embargo, este valor fue mayor que el reportado en Brasil, 4.7% (Gottardo y col., 2021), 5% en Argentina (McDougald y col., 1987), 2.1% en Nigeria (Djemai y col., 2022) y el 4% reportado en aves de traspatio en el norte de India (Khursheed y col., 2022). En contraparte, consideran que la presencia

de *E. brunetti* está generalizada en Japón, con una prevalencia de 51.5% (Matsubayashi y col., 2020).

La prevalencia calculada para *E. maxima* es 80.4% (IC: 73.0 - 86.2), valor superior al reportado en Brasil, 70.3% (Gottardo y col., 2021), Nigeria 69% (Djemai y col., 2022), Argentina 42% (McDougald y col., 1987), Romania 22% (Györke y col., 2013); en aves comerciales de Colombia 20.4% (Mesa y col., 2021), y en aves de traspatio en el norte de India, 16% (Khursheed y col., 2022). Esta especie tiene gran importancia, se relaciona con coccidiosis y grandes pérdidas económicas en granjas avícolas comerciales (Cervantes, 2017).

Eimeria necatrix presentó una prevalencia de 52.2% (IC: 44.2 - 60.1), valor superior comparado con otras investigaciones. En Nigeria se reportó una prevalencia de 11.2% (Djemai y col., 2022); en Colombia fue la especie con menor prevalencia (Mesa y col., 2021) y en Argentina no fue reportada en pollos parrilleros (McDougald y col., 1987). La presencia de *E. necatrix* es menos probable que el resto de las especies, normalmente se asocia con aves adultas, gallinas (Conway y Mckenzie, 2007). Posiblemente sea menos frecuente en pollos parrilleros por el corto tiempo de vida. Por otra parte, esta especie es más común en regiones tropicales (Conway y Mckenzie, 2007). Es posible que esto justifique nuestros resultados, ya que 77% de las granjas evaluadas estuvieron ubicadas en altitudes inferiores a 1300 msnm. En Brasil no reportaron la presencia de *E. necatrix* en pollos parrilleros (Gottardo y col., 2021). En Henan y Hubei, China, las granjas

con aves autóctonas tuvieron mayor riesgo de presentar esta especie (Geng, y col., 2021). También se reportó 36% de infecciones por *E. necatrix* en aves de traspatio en India (Khursheed y col., 2022). Cabe señalar que *E. necatrix* es una de las especies más patógenas (Geng, y col., 2021), afecta el crecimiento de las aves (Conway y Mckenzie, 2007), y está relacionada con pérdidas económicas (Cervantes, 2017), por lo que se deberían tomar precauciones para evitar su presencia en pollos parrilleros.

La prevalencia de *E. praecox* fue 55.4% (IC: 47.3 – 63.2). En Argentina se reportó 56% (McDougald y col., 1987), 13% en Rumania (Györke y col., 2013), 4.3% en Nigeria (Djemai y col., 2022), mientras que en Brasil no fue reportada (Gottardo y col., 2021). En aves de traspatio de India se detectó 16% (Khursheed y col., 2022). Debido a que actualmente se la relaciona con mayor patogenicidad que la anteriormente reportada, esta especie ha adquirido mayor interés (Répérant y col., 2011).

Eimeria tenella mostró 53.6% (IC: 45.38 - 61.63) de prevalencia. En Grecia reportaron una frecuencia mayor, 65.5% (Andreopoulou y col., 2022), sin embargo, en Brasil obtuvieron una prevalencia menor, 46.9% en pollos parrilleros comerciales (Gottardo y col., 2021). En Colombia 30.9% (Mesa y col., 2021), en Argentina 14% (McDougald y col., 1987), en Nigeria 8% (Djemai y col., 2022), mientras que en aves de traspatio de India 16% (Khursheed y col., 2022). No obstante, fue la especie más prevalente en Kwara Central, Nigeria (Ola-Fadunsin y col., 2019). *Eimeria tenella* es una de las especies que causa mayores pérdidas económicas (Cervantes,

2017), llegando a reducir entre 15 y 25% el peso de las aves (Conway y Mckenzie, 2007).

El 3% de las granjas analizadas (6 granjas) usaban como medida profiláctica vacunación anticoccidial (Fortegra, MSD), que contiene ooquistes vivos de *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*; la aplicación se realizaba al primer día de edad, en la incubadora. Las especies halladas a campo fueron: *E. acervulina* 50% (3/6), *E. brunetti* 50% (3/6), *E. maxima* 83% (5/6), *E. necatrix* 50% (3/6), *E. praecox* 50% (3/6) y *E. tenella* 83% (5/6). Esto demuestra que el manejo de la vacuna no fue el adecuado, ya que sólo en el 50% de las muestras (3/6) se encontraron las tres especies vacunales en la fase final de crianza.

Se ha informado que las vacunas veterinarias pueden tener una eficacia limitada por varios factores. En algunos casos (Ej.: *Streptococcus suis*, virus de la influenza porcina, *Eimeria* spp.), las cepas vacunales pueden no ser una buena decisión frente a las cepas de campo (Hoelzer y col., 2018). Jenkins y col. (2017), al analizar una granja durante 4 ciclos de vacunas, observaron un incremento del OPG, por lo que infieren una pobre cobertura vacunal. Además, en esta investigación no encontraron diferencias en la composición de especies al usar vacunas o quimioprofilaxis. Por otro lado es importante recordar que las aves requieren de 3 a 4 ciclos consecutivos para el desarrollo de inmunidad; para ello es necesario que las condiciones ambientales del galpón permitan la esporulación (Bruzual y Marton, 2022). De esta manera, los proveedores de vacunas en su hoja técnica indican

que las vacunaciones en campo rara vez producen una protección completa en todas las aves de un mismo grupo y por eso, sugieren usar un programa de vacunación periódica (Salud Animal MSD, 2021). Por lo tanto, el uso de vacunas debe recibir un monitoreo constante, ya que una deficiencia en el almacenamiento, aplicación, o manejo postvacunal puede resultar en una respuesta inmune insuficiente o coccidiosis clínica (Mora, 2022).

Por otra parte, estos resultados muestran que la vacuna no protege contra las otras especies de *Eimeria*, información que coincide con otras investigaciones que mencionan que no hay protección cruzada entre especies (McDonald y Shirley, 2009; Cervantes, 2017).

Por su parte, Peek (2010), informó que al usar vacuna anticoccidial se obtuvo protección completa contra el desafío de *E. acervulina*, protección cruzada parcial para *E. tenella* y sin protección para *E. maxima*.

En cuanto a los diferentes métodos de diagnóstico usados, se podría afirmar que no son comparables, ya que cada uno tiene un objetivo diferente. La técnica de flotación de Willis, sólo contribuye a conocer la presencia o ausencia de *Eimeria* spp. La técnica de Mac Master modificada evalúa la carga parasitaria sin distinguir las especies de *Eimeria* presentes. Este método es usado típicamente para evaluar la eficiencia de los diferentes anticoccidiales y los programas anticoccidiales profilácticos, en conjunto con la exploración de lesiones intestinales y la evaluación de los parámetros productivos (Conway y McKenzie, 2007).

Para las granjas avícolas, las necropsias y la búsqueda e identificación de lesiones intestinales en sitios específicos, continúan siendo la principal y más práctica forma de diagnosticar coccidiosis (Chapman y col., 2013). En este sentido, la especificidad del sitio de invasión puede contribuir a la presunción de la especie infectante, diagnóstico que debe ser corroborado microscópicamente con el tamaño y forma de los ooquistes (Conway y Mckenzie, 2007; Chapman y col., 2013). Generalmente, la identificación de especies de *Eimeria* se realiza a través de varios criterios que incluyen: el periodo de prepatencia, el tiempo mínimo de esporulación (Mattiello y col., 2000; Chapman y col., 2013), la localización tisular de formas parasitarias (Gazoni y col., 2020) y la especificidad inmunológica (Chapman y col., 2013). Conocer con precisión qué especie de *Eimeria* está presente, contribuiría en el manejo y prevención de la enfermedad, como por ejemplo la decisión de mantener o cambiar el anticoccidial (Chapman y col., 2013). El diagnóstico y caracterización genética de las diferentes especies de *Eimeria* son fundamentales para la prevención, la vigilancia y el control de la coccidiosis (Morris y Gasser, 2006).

La identificación de especies se puede realizar a través del diagnóstico morfológico de ooquistes esporulados, en este caso se consideran la forma y el tamaño de los ooquistes. Sin embargo, por la subjetividad inherente al método, es importante contar con personal calificado (Chapman y col., 2013). Castañón y colaboradores (2007), reportaron el desarrollo de COCCIMORPH, un sistema de reconocimiento de imágenes digitales de ooquistes de *Eimeria*, que caracteriza la curvatura, tamaño, simetría y

cuantificación de la estructura interna. Kumar y colaboradores (2014), consideran que este método es una valiosa herramienta de diagnóstico. No obstante, no pudieron identificar correctamente algunas especies. Sin embargo, esta puede ser una herramienta valiosa para la evaluación preliminar en la detección e identificación, la misma que deberá ser confirmada a través de microscopía o validación molecular. En la presente investigación no fue posible realizar estas pruebas diagnósticas por los factores ya mencionados.

Las técnicas de biología molecular son herramientas robustas, directas y de fácil interpretación (Kumar y col., 2014). El método de PCR es ampliamente usado en la identificación de las siete especies de *Eimeria* en pollos parrilleros (Haug y col., 2007). A pesar de que estas técnicas son consideradas el “estándar de oro” en la detección de varios patógenos, el costo de equipos, reactivos requeridos, y la necesidad de contar con personal capacitado, limitan su uso rutinario en países como Ecuador. Se espera que, con la reducción de sus costos a través del tiempo, estas técnicas de diagnóstico puedan ser integradas como parte rutinaria en el control de la coccidiosis (Kumar y col., 2014). A su vez, la caracterización genética podría contribuir a solucionar los problemas de resistencia a los anticoccidiales (Morris y col., 2007).

Con los datos obtenidos en las encuestas epidemiológicas se establecieron factores de riesgo. Aunque la totalidad de empresas relevadas se encuentran categorizadas como granjas comerciales, de acuerdo con la

clasificación dada por Agrocalidad, Agencia de Regulación y Control Zoo y Fitosanitaria de Ecuador; tienen establecidos rigurosos programas de bioseguridad en general. A pesar de contar con programas de prevención de coccidiosis (97% a través del uso de anticoccidiales y 3% a través de vacunación), las aves fueron positivas a la presencia de *Eimeria*.

Los productores que trabajan independientemente, no integrados, estuvieron relacionados con mayor OPG, y mayor riesgo de infecciones por *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. praecox* y *E. tenella*. Este grupo de productores avícolas tiende a comprar sus insumos dando prioridad al costo ofrecido y a las formas de pago; dejando de lado el asesoramiento técnico y otros beneficios que ofrecen las empresas integradoras. Esto estaría en concordancia con lo expuesto por Fatoba y Adeleke (2018), quienes señalan que la coccidiosis está asociada a sistemas de gestión deficientes en la crianza de aves. Estos resultados también concuerdan con Wondimu y colaboradores (2019), quienes afirmaron que el manejo adecuado está relacionado con menor carga parasitaria y mejores parámetros productivos.

El tamaño o capacidad de la granja no presentó asociación estadística con la carga parasitaria ni con la prevalencia de las especies de *Eimeria*. Sin embargo, en sistemas extensivos, Andreopoulou y colaboradores (2022), hallaron diferencias significativas entre los sistemas de producción y la capacidad de las granjas en Grecia. Del mismo modo, Ola-Fadunsin y

colaboradores (2019), reportaron que el tamaño de las granjas se asoció con la prevalencia de *Eimeria* spp. en Nigeria.

Las granjas ubicadas a menos de 1300 msnm presentaron mayor nivel de OPG. Estos resultados coinciden con Biswas y colaboradores (2010), quienes señalaron que la altitud es un factor ambiental natural que afecta la abundancia de los parásitos. A mayor altitud se prevé menor cantidad de parásitos, debido a factores ambientales estresantes que reducen su transmisión. Es posible que las características de los pisos altitudinales de las zonas estudiadas de Ecuador interfieran en la esporulación de los ooquistes de *Eimeria*. Así, los pisos altitudinales inferiores (zonas subtropicales), se caracterizan por presentar mayor humedad relativa y mayor temperatura ambiental (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, 2017), condiciones que podrían favorecer la esporulación de los ooquistes de *Eimeria* en granjas ubicadas a menor altitud, comparado con los pisos altitudinales superiores (mayor a 1300 msnm). Chapman y Johnson (1992) reportaron que la cantidad de ooquistes de *Eimeria* está relacionada positivamente con la humedad de cama. Esto lo confirmaron Khursheed y colaboradores (2022) y Moreno e Ibarra (2002), quienes informaron que aves criadas con mayor humedad relativa ambiental tuvieron mayor excreción de ooquistes, comparado con las condiciones de verano.

Por el contrario, Venkateswara y colaboradores (2015) señalaron que las condiciones climáticas húmedas retrasaron el tiempo de esporulación;

mientras que los climas secos con camas húmedas constituyeron la condición ideal para una rápida esporulación.

En Ecuador, las aves criadas en mayor altitud son sometidas a una restricción o control alimenticio, con el propósito de reducir los efectos negativos de tal crianza, como la presentación de síndrome ascítico, muerte súbita y enfermedades metabólicas (Baghbanzadeh y Decuypere, 2008). Esta práctica hace que el ave alcance su peso de mercado a mayor edad.

Según Blake y Tomley (2014), la coccidiosis tiene alto impacto en la industria avícola, ya que la transmisión de parásitos se ve favorecida por alta densidad de aves susceptibles. En la presente investigación, la densidad de población, expresada tanto en kilogramos de aves por metro cuadrado, como en cantidad de aves por metro cuadrado, no mostró diferencias estadísticas. Estas densidades fueron cercanas a las 12 a 14 aves por metro cuadrado, observadas usualmente en Colombia (Mesa y col., 2021. López-López y Sarmiento-Franco (2022), expresaron que, a mayor densidad de población, se incrementa la humedad de la cama. Sin embargo, ellos tampoco encontraron diferencias con los valores de OPG.

Al analizar la estructura de las granjas: tipo de galpón, ventilación, material del techo, e iluminación, no se determinó asociación con el OPG ni con las especies analizadas. Sin embargo, Gottardo y colaboradores (2021), observaron que los galpones de ambiente controlado y ventilación negativa tenían menor prevalencia de *Eimeria* spp., comparado con los galpones de ventilación natural. Del mismo modo, Chengat y colaboradores (2017),

encontraron diferencias entre las granjas evaluadas en el sur, pero no en el norte de la India. Reportes que coinciden con Wondimu y colaboradores (2019), quienes señalaron que las condiciones de alojamiento influyen en la carga parasitaria de *Eimeria* spp.

La presencia de *E. acervulina* y *E. praecox* fue más probable en granjas con galpones de madera y pisos de tierra; esta última característica también estuvo relacionada con mayor OPG. Los ooquistes esporulados son altamente resistentes a las condiciones ambientales (Barragán, 2006). En este sentido, se demostró una supervivencia de 602 días en el suelo en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en Beltsville, Maryland (Reid, 1990).

Tanto la madera como el piso de tierra son características estructurales que están relacionadas con menor higiene, es posible que los ooquistes sobrevivan en grietas durante mucho tiempo. Reportes experimentales indican que luego de 54 días los ooquistes esporulados se encuentran intactos en el ambiente (Williams, 1995) y logran sobrevivir por semanas en condiciones óptimas (Ayala y Gonzales, 2008).

En esta investigación no se halló asociación entre los diferentes sanitizantes usados en el agua (derivados de cloro y peróxido) y coccidiosis aviar. Estudios *in vitro* sobre inactivación y destrucción de ooquistes no esporulados usando diferentes productos: Glutaraldehído 42.5g, cloruro de benzalconio 7.5g, sal de amonio cuaternario, formol 37%, sulfonato de sodio 12%, hipoclorito de sodio 2%, ortodichlorobenceno 60%, xileno 30%,

cloruro de sodio, cloramina, yodo libre 2.3%, ácido fosfórico 15g, entre otros; lograron reducir hasta 79.5% de ooquistes con la mejor combinación (Guimarães y col., 2007). Por otra parte, Neretti y colaboradores (2018), reportaron la inactivación de ooquistes esporulados mediante el uso de plasmas de descarga de barrera dieléctrica de aire a presión. Por lo expuesto, difícilmente se esperaría un efecto en la inactivación de los ooquistes en el agua de bebida mediante el uso de sanitizantes comunes.

El uso de agua potable del sistema público no presentó niveles de protección. Sin embargo, cuando el agua de bebida provenía de pozos (aguas subterráneas), se asoció con mayor OPG y presencia de *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. praecox*. Las aves infectadas eliminan ooquistes de *Eimeria* spp. a través de sus heces, que contaminan el agua, el alimento y el suelo (Peek, 2010; Gharekhani y col., 2014; Shivaramaiah y col., 2014). Por lo que es probable que las aguas subterráneas estén contaminadas y los métodos de potabilización usados no eliminan los ooquistes de *Eimeria*. En cuanto al tipo de bebederos usados, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los sistemas abiertos y cerrados.

Respecto al alimento, no se evidenciaron diferencias en la presentación, oferta de alimento, ni en el tipo de comedero utilizado. Cuando se analizó la procedencia del alimento, se observó que la compra del alimento indistintamente, sin relación alguna con el proveedor, se asoció con mayor OPG y con la presencia de *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. praecox* y *E. tenella*. La ausencia de una relación a largo plazo con los proveedores,

implica el desconocimiento y principalmente la falta de control de los programas anticoccidiales. Esta podría ser la principal razón por la que este grupo de productores presentó mayor riesgo de coccidiosis.

Stephan y colaboradores (1997), encontraron un alto porcentaje de resistencia a los anticoccidiales en aislamientos de campo, principalmente multiresistencias, concluyendo que es un fenómeno generalizado. Por otra parte, Györke y colaboradores (2013), reportaron que la alta prevalencia de *E. acervulina* y *E. tenella* hallada en su investigación podría asociarse a una susceptibilidad reducida a los fármacos anticoccidiales. Según el análisis genético realizado por Tan y colaboradores (2017) en Hubei, China, se detectaron polimorfismos genéticos estrechamente relacionados con la distribución regional y la sensibilidad a los anticoccidiales. Es posible que estos resultados estén relacionados a multiresistencias en las granjas avícolas que compran indistintamente el alimento balanceado. También se pudo evidenciar que la mayoría de los trabajadores de las granjas desconocían el programa anticoccidial que estaban usando. Seguramente esta información no estaba a su alcance. Por lo tanto, difícilmente tendrían establecido un programa de uso y rotación de anticoccidiales, que evitaría la presentación de resistencia por sobreexposición.

En la industria avícola el principal método profiláctico es la quimioterapia, pero la resistencia a los medicamentos es un problema grave (McDonald y Shirley, 2009). Según Del Cacho (2013), para evitar la aparición de resistencias se han propuesto dos sistemas. El primero es el uso rotacional

de principios activos cada 4 a 6 meses, y el segundo, un sistema dual, que consiste en cambiar el coccidiostático a la mitad del ciclo de cría. Otra alternativa es alternar el uso de anticoccidiales con la vacuna anticoccidial (Chapman et al., 2010). Las vacunas pueden inducir inmunidad altamente protectora, pero específica para cada especie (McDonald y Shirley, 2009; Cervantes, 2017). Con el uso de vacunas anticoccidiales se ha evidenciado una restauración parcial de la sensibilidad a drogas posterior a su uso (Peek y Landman, 2006; Chapman y col., 2013; Snyder y col., 2021). Una alternativa viable para estos avicultores sería el uso de vacuna anticoccidial, o la realización de pruebas de sensibilidad a los anticoccidiales. En esta investigación, no se pudo conocer el tiempo de retiro de estos fármacos; posiblemente esta práctica no se esté realizando en todas las granjas.

Durante el estudio no se evidenciaron signos ni síntomas de coccidiosis, sin embargo, 11.3% de los avicultores entrevistados indicó haber usado tratamientos anticoccidiales por observación de coccidiosis clínica durante la fase de crecimiento (3ra y 5ta semana de edad). Este grupo también mostró mayor riesgo de presentar *E. brunetti* y *E. tenella*. La coccidiosis es una infección en la que comúnmente están involucradas varias especies (Conway y McKenzie, 2007; Ojmelukwe y col., 2018; Andreopoulou y col., 2022; Djemai y col., 2022). Se han reportado infecciones mixtas, siendo *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* la combinación más frecuente (Gazoni y col., 2021; Mesa y col., 2021; Flores y col., 2022), por lo que seguramente la coccidiosis indicada por los productores haya sido multiespecie.

De acuerdo con los datos recabados mediante la encuesta epidemiológica, el 61% de los entrevistados que usaron tratamiento anticoccidial (11/18) indicó el fármaco usado. El anticoccidial oral más usado fue toltrazuril (25g/L) (8/18), seguido de la combinación de sulfonamida y diaminopirimidina (sulfamonometoxina 800g trimetoprim 200g/kg) (3/18). El resto de entrevistados (7/18) no proporcionó información sobre las drogas usadas. Ojimekwe y colaboradores (2018), reportaron que luego de la administración de toltrazuril *E. tenella* predominaba en las granjas avícolas, manteniendo las lesiones cecales típicas de esta especie; lo que reveló la resistencia a este fármaco. Estos resultados fueron corroborados con las pruebas AST (prueba de sensibilidad anticoccidial), ACI (índice anticoccidial) y POAA (porcentaje óptimo de actividad anticoccidial), ya que el aislado de *Eimeria* también presentó sensibilidad reducida a este fármaco. Por otra parte, Odden y colaboradores (2018), también encontraron resistencia a este fármaco en *Eimeria* de ovinos. Alnassan y colaboradores (2013), reportaron que el toltrazuril actúa como profiláctico, pero su efecto fue mínimo durante la infección. Estas investigaciones concuerdan con la nuestra. Flores y colaboradores (2022), encontraron una fuerte resistencia a toltrazuril, clopidol, diclazuril, maduromicina, monensina y salinomina en aislados de campo de Korea. Por otro lado, Lan y colaboradores (2017), al revisar la resistencia de varios anticoccidiales, entre ellos sulfamonometoxina/trimetoprim, encontraron multiresistencias a la mayoría de los fármacos probados. Ellos concluyeron que este hallazgo es una amenaza potencial para la avicultura. Posiblemente los resultados

obtenidos en esta investigación se deban a multiresistencias generadas por el uso indiscriminado de medicamentos anticoccidiales.

Según Soulsby (1987), los pollos jóvenes son más vulnerables a padecer coccidiosis. Sin embargo, cuando las gallinas adultas tienen contacto con ooquistes de *Eimeria* pueden desarrollar resistencia y protegerse de exposiciones siguientes, esta inmunidad es especie-específica.

En la presente investigación, las aves menores de 35 días al momento del muestreo presentaron asociación con mayor OPG y mayor riesgo de *E. acevulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* y *E. praecox*. Estos resultados coinciden con varios autores, quienes señalan que la menor edad de las aves está relacionada con mayor carga parasitaria y coccidiosis (Soulsby, 1987; Ola-Fadunsin y col., 2019; Wondimu y col., 2019; Khursheed y col., 2022).

En el siguiente rango de edad (36 a 45 días) sólo *E. necatrix* mantuvo su tendencia de mayor presentación. Habitualmente la presencia de *E. necatrix* ha sido asociada a regiones tropicales (Conway y Mckenzie, 2007), es posible que la ubicación altitudinal de las granjas evaluadas (77% en altitudes menores a 1300 msnm) haya contribuido a su presencia.

En Ecuador se ha reportado que la reutilización de cama ha contribuido con la reducción de la carga parasitaria de *Eimeria*, obteniendo mejores resultados productivos, comparado con el uso de cama nueva (Garcés-Gudiño, 2018). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación no mostraron diferencias respecto a la reutilización de la cama, el método de reciclaje usado, ni la profundidad de cama. En cuanto al material de

cama, nuestros resultados coinciden con Chapman y Johnson (1992), quienes tampoco hallaron diferencias entre el uso de virutas de pino, roble o cascarilla de arroz con la presencia de ooquistes de *Eimeria*.

Alphitobius diaperinus es un coleóptero, conocido como vector y reservorio de enfermedades comunes en la industria avícola (Goodwin y Waltman, 1996). Entre ellas, las producidas por bacterias patógenas (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*), hongos (*Aspergillus* spp., *Candida* spp.), protozoos (*Eimeria* spp.), parásitos avícolas y virus (causantes de enfermedad de Marek, enfermedad de Gumboro, enfermedad de Newcastle, influenza aviar y leucemia en aves de corral) (Dzik y Mituniewicz, 2020). En esta investigación, las granjas avícolas con presencia de *Alphitobius diaperinus* mostraron mayor riesgo de presentar *E. maxima* y *E. tenella*. Estos resultados coinciden con Reyna y col. (1983), quienes señalaron que la coccidiosis podría transferirse de una parvada a otra a través de la supervivencia de ooquistes en vectores como *Alphitobius diaperinus* y moscas. Según Dzik y colaboradores (2022), este escarabajo puede alimentarse de aves muertas o enfermas, estiércol de pollo y materia orgánica y de esta manera convertirse en vector mecánico de la parasitosis.

Para Peek (2010), la limpieza y desinfección entre parvadas y la maximización del período de vacío sanitario son importantes para reducir significativamente la cantidad de ooquistes en galpones contaminados. En la avicultura, la limpieza y desinfección de los galpones son aspectos

cruciales para la prevención y el control de enfermedades zoonóticas y animales (Dzik y col., 2022). Cuando se evaluó la limpieza y desinfección del piso de los galpones avícolas, ninguno de los desinfectantes comúnmente usados en la industria avícola ecuatoriana (formol, amonio cuaternario, glutaraldehídos, fenoles), solo o en combinación, presentó algún nivel de protección con relación al OPG. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Chapman y colaboradores (2013), quienes indicaron que la pared del ooquiste es marcadamente resistente a los agentes químicos, por lo que, en el laboratorio la extracción del ADN se realiza a través de la disrupción mecánica con perlas de vidrio. De igual manera, Chapman y colaboradores (2016) y Jenkins y colaboradores (2019), reportaron la presencia de ooquistes de *Eimeria* luego de un exhaustivo proceso de limpieza. En el momento de la recepción de pollitos recién nacidos, entre 30 y 50% de los ooquistes pueden ser viables (Jenkins y col., 2019). Es posible que los ooquistes sobrevivan al proceso de limpieza, evadan la bioseguridad de la granja e ingresen físicamente a través del calzado, o a través de insectos (Chapman y col., 2016). Las especies de *Eimeria* son omnipresentes donde haya crianza de aves de corral (Shivaramaiah y col., 2014). Peek (2010) señaló que en condiciones de campo, la limpieza e higienización de las instalaciones usando suficiente agua y luego desinfección con una solución de amoníaco al 5-10% reducen la diseminación del parásito. Al evaluar los procesos específicos de limpieza y posterior desinfección del piso, sólo el uso de cal viva mostró mayor riesgo de presentar *E. acevulina* y *E. maxima*. El uso de cal es una

práctica ampliamente usada en la industria avícola ecuatoriana y en el área muestreada (94.9% - 148/156 granjas muestreadas). Sin embargo, Lopes y colaboradores (2015), recomiendan el uso de cal viva sola para la reducción de la carga bacteriana de la cama avícola. En granjas comerciales de Brasil el uso de cal viva redujo el riesgo de presentar *E. maxima* y *E. tenella* (Gottardo y col., 2021). Sin embargo, Vriesman y colaboradores (2021), hallaron que el uso de la cal viva en conjunto con la fermentación de cama (proceso de reciclaje), presentó menor efecto que por separado, porque la cal afecta el proceso fermentativo al no permitir su acidificación y por lo tanto, su efecto desinfectante de microorganismos patógenos. Así, el tratamiento conjunto presentó mayor conteo de ooquistes de *Eimeria*. Además, mencionan que el uso de la cal viva sola es tan efectivo como el proceso de fermentación en la reducción de patógenos, lo que podría justificar los resultados obtenidos en esta investigación, ya que los productores encuestados solían usar los dos procesos a la vez (uso de cal viva y fermentación).

Por último, se utilizó un modelo de regresión logística multivariable para identificar las covariables. Los modelos de regresión logística tienen doble función: explicativa y predictiva; estiman la fuerza de asociación de cada factor de riesgo de una manera independiente y estiman el valor predictivo de cada uno de ellos, o bien del modelo en su conjunto (Fiuza y Rodriguez, 2000). En este modelo, las variables que mostraron asociación con la presencia de *Eimeria* spp. fueron: productores que trabajan de manera independiente, aves criadas en altitudes menores a 1300 msnm, menores

a 35 días de edad, galpones con estructura de madera, abiertos y agua de bebida proveniente de pozos subterráneos. Los resultados de este modelo coinciden con las variables explicativas del modelo anterior, razón de probabilidad (Odd Ratio OR), excepto galpones abiertos, variable que aparece en este modelo.

La variable “productores independientes” mostró alta asociación con mayor OPG de *Eimeria* spp. y probabilidad de presentar *E. praecox*, seguida por *E. brunetti*, *E. necatrix* y *E. tenella*. Estas tres últimas especies de *Eimeria* han sido relacionadas con alta patogenicidad en pollos parrilleros (Mohamed, 2008). Cabe recordar que estos avicultores independientes tienen establecidos estrictos sistemas de bioseguridad; y por su capacidad y manejo, son considerados avicultores comerciales (Morales y Moreno, 2017). Pero, su principal sistema profiláctico para coccidiosis aviar consiste en usar alimentos con anticoccidiales. Posiblemente en esas granjas avícolas el manejo y rotación de estos fármacos no se haya realizado bajo un criterio profesional, lo que podría haber generado resistencia a los anticoccidiales usados. Witcombe y Smith (2014) señalan que la presencia de resistencia cruzada y multiresistencia a los anticoccidiales es bastante común, lo que complica el control de la coccidiosis a través de la rotación de fármacos. Por otro lado, se han reportado variantes genéticas entre los hemisferios norte y sur (Clark y col., 2016) y se cree que esta variación es atribuible al uso de medicamentos y vacunas anticoccidiales (Prakashbabu y col., 2017).

La coccidiosis es conocida como una terrible enfermedad que causa pérdidas económicas (Fatoba y Adeleke, 2018). Si bien estos productores no indicaron tener morbilidad ni mortalidad durante el muestreo, con el control de *Eimeria* spp. podrían tener importantes beneficios económicos en términos de mejora de productividad (Chapman, 2009). La presencia de *Eimeria* spp. probablemente esté causando reducción en el desempeño productivo de las aves, y sin un control efectivo, el número de parásitos podría aumentar hasta producir coccidiosis clínica (Gazoni y col., 2021).

Las aves que se criaban en altitudes menores a 1300 msnm presentaron mayor riesgo de exhibir valores más altos de OPG de *Eimeria* spp., *E. brunetti* y *E. tenella*. Es posible que estos resultados estén relacionados a las condiciones ambientales (tropicales y subtropicales) típicas de estos pisos altitudinales en Ecuador, como son la mayor temperatura y humedad relativa ambiental (Instituto de Meteorología 2017). Coincidentemente, Ahmad y col. (2012), reportaron mayor prevalencia de coccidiosis en alturas menores a 4000 pies (1291 msnm).

Los galpones avícolas con estructura de madera (material que soporta el techo) también mostraron mayor riesgo de presentar *E. acervulina* y *E. praecox*. En las instalaciones de crianza intensiva, la transmisión de ooquistes esporulados vía fecal/oral es de difícil control (Witcombe y Smith, 2014; Blake y col. 2020). Considerando la naturaleza ubicua de *Eimeria* spp., este hecho podría ser aún más notorio en materiales como la madera, que difícilmente se puede limpiar con profundidad (Chapman y col., 2016).

Para Peek (2010) en condiciones normales es casi imposible criar pollos libres de coccidiosis, a menos que se utilicen condiciones de alojamiento similares a SPF. Los galpones de estructura de madera, podrían ser un reservorio importante de ooquistes, por las grietas que normalmente presenta este material.

La menor edad de las aves (inferior a 35 días) resultó un factor de riesgo para la presencia de *E. maxima*. Varias investigaciones concuerdan con estos resultados, señalan que la coccidiosis es más frecuente en aves jóvenes (Soulsby, 1987; Ola-Fadunsin y col., 2019; Wondimu y col., 2019; Khursheed y col., 2022).

Los galpones abiertos presentaron mayor riesgo de exhibir *E. máxima* en relación con los galpones cerrados de ambiente controlado. De acuerdo con estos resultados, el mayor grado de tecnificación y control ambiental, ayudaría a controlar la coccidiosis por *E maxima* en esta zona, en concordancia con otros autores (Chengat Prakashbabu y col., 2017; Wondimu y col., 2019; Gottardo Balestrin y col., 2021), quienes observaron que el mejor control ambiental de los galpones avícolas favorece el control de la coccidiosis. Por el contrario, se ha reportado que un inadecuado manejo ambiental en galpones avícolas brinda condiciones ideales para la esporulación (El-shall y col., 2022).

Por último, el factor “agua que proviene de pozo” (aguas subterráneas), mostró mayor riesgo de *E brunetti* y *E. praecox*. Los ooquistes de *Eimeria* son ubicuos y tienen una alta capacidad de reproducción que conduce a

elevados niveles de contaminación (Peek, 2010). La coccidiosis se transmite entre hospedadores por la ingestión de alimentos o agua contaminados con ooquistes esporulados (Fatoba y Adeleke, 2018). En el ambiente externo, los esporozoítos están protegidos de la desecación y desinfección química por la pared del ooquiste que confiere resistencia (Belli y col., 2006). Por lo que, los procesos de potabilización utilizados por las granjas que usan este tipo de agua no son suficientes para eliminar los ooquistes. En Francia, Van Immerseel y colaboradores (2004) hallaron que todas las muestras de agua recogidas en explotaciones intensivas contenían ooquistes (*Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp.). Es importante dar seguimiento a la calidad de agua de bebida y al proceso de potabilización que debería eliminar o separar efectivamente los ooquistes de *Eimeria*. Soliman y colaboradores (2021), proponen el uso de filtros de arcilla para controlar el ingreso vía agua de bebida de varias enfermedades, entre ellas la coccidiosis. Es posible que los productores que usan agua de pozo no hayan realizado un adecuado filtrado.

La presente investigación, constituye el primer estudio de prevalencia de las especies de *Eimeria* spp. en granjas de pollos parrilleros de Ecuador y sus factores de riesgo. La forma subclínica siempre es silenciosa y ocasiona pérdidas económicas. Serían necesarias más investigaciones tendientes al diseño de estrategias de control para mejorar la gestión en las granjas avícolas.

6. CONCLUSIONES

- Las granjas avícolas de crianza de pollos parrilleros comerciales de la zona centro norte de Ecuador, provincias de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas, se encontraron infectadas por *Eimeria* spp. (100%).
- La carga parasitaria de *Eimeria* spp. en heces frescas de pollos parrilleros en su última etapa de vida, varió entre 25 y 169.700 OPG.
- Al momento del muestreo no se evidenciaron signos ni síntomas de coccidiosis, por lo que se puede indicar que las aves presentaron la forma subclínica de la enfermedad.
- Los avicultores de la zona utilizan anticoccidiales en el alimento como medida profiláctica (97%), mientras que, el 3% emplea vacunas anticoccidiales vivas. Sin embargo, se detectaron elevadas prevalencias de *E. acervulina* (70.6%), *E. brunetti* (30.8%), *E. maxima* (80.4%), *E. necatrix* (52,2%), *E. praecox* (55.4%) y *E. tenella* (53.6%) por PCR.
- La vacuna anticoccidial usada contiene ooquistes vivos de *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella* y *E. mivati*. Sin embargo, en las granjas que usaban dicha vacuna se identificaron *E. acervulina* (50% - 3/6), *E. brunetti* (50% - 3/6), *E. maxima* (83% - 5/6), *E. necatrix* (50% - 3/6), *E. praecox* (50% - 3/6) y *E. tenella* (83% - 5/6) por PCR.
- La PCR es un método factible y confiable para la identificación de especies de *Eimeria* spp.

- Se identificaron varios factores de riesgo (Odd Ratio), pero al usar el modelo final (regresión logística multivariable), se determinaron los siguientes factores de riesgo: productores independientes presentaron alta probabilidad de presentar mayor OPG de *Eimeria* spp., *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. praecox* y *E. tenella*. Los galpones avícolas a menos de 1300 msnm se relacionaron con mayor OPG y presencia de *E. brunetti*. Los galpones de madera presentaron mayor riesgo de tener *E. praecox* y *E. acervulina*. Las aves menores a 35 días de edad tuvieron mayor probabilidad de presentar *E. maxima*. Los galpones avícolas abiertos (con rudimentario control ambiental), mostraron mayor probabilidad de presentar *E. maxima*. Si el agua de bebida provenía de pozos, el riesgo de *E. praecox* era mayor. El tiempo de vacío sanitario en las granjas avícolas, no presentó diferencias con relación a la carga parasitaria (OPG).
- Estudios posteriores deberían llevarse a cabo en granjas, incluyendo más edades/categorías, planes de uso y rotación de anticoccidiales, con la finalidad de comprender mejor la epidemiología de esta coccidiosis.
- Sería recomendable realizar pruebas de sensibilidad a los anticoccidiales, principalmente en las granjas avícolas de productores independientes.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrocalidad. Lista de aditivos farmacológicos autorizados para la formulación de alimentos medicados, suplementos medicados, fórmulas maestras,premezclas y núcleos. Quito, Agrocalidad, 2020a.
2. Agrocalidad. Clasificación de ingredientes o principios activos y denominación de venta para productos veterinarios. Ecuador, 2020b, p. 8.
3. Albanese A, Grace A, Adrea E, Brian J. Identification of a Short Dna Bar Code in the 18S rdna for Improved Differentiation of Common *Eimeria* Species Infecting Chickens. J. Parasitol. 2019; 105: 816-820.
4. Alnassan AA, Shehata AA, Kotsch M, Schrödl W, Krüger M, Dauschies A, Bangoura B. Efficacy of early treatment with toltrazuril in prevention of coccidiosis and necrotic enteritis in chickens. Avian Pathol. 2013; 42: 482-490.
5. Andreopoulou M, Sotiraki ICS, Bangoura ADB. Prevalence and molecular detection of *Eimeria* species in different types of poultry in Greece and associated risk factors. Parasitol. Res. 2022; 121: 2051-2063.
6. Appelhans T, Destsh F, Reeudenbach C, Woellauer S. Mapview: Interactive viewing of spatial Data in R. 2021.
7. Arabkhazaeli F, Modrisanei M, Nabian S, Mansoori B, Madani A. Evaluating the resistance of *Eimeria* spp. field isolates to

- anticoccidial drugs using three different indices. Iran. J. Parasitol. 2013; 8: 234-241.
8. Aviagen. Manual de manejo 2018. ROSS An Aviagen Brand. 2018; .
 9. Ayala RM, Gonzales G. Evaluar la replicación de oocistos en forma objetiva utilizando la vacuna de coccidiosis aviar en tipo parrillero de Araní Quillacollo y Punata. Universidad Mayor de San Simón. 2008.
 10. Baghbanzadeh A, Decuypere E. Ascites syndrome in broilers: Physiological and nutritional perspectives. Avian Pathol. 2008; 37: 117-126.
 11. Barkway CP, Pocock RL, Vrba V, Blake DP. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the species-specific detection of *Eimeria* that infect chickens. J. Vis. Exp. 2015; 1-6.
 12. Barragán JI. El uso de sistemas de control de coccidiosis en España. Jornada teórico práctica sobre coccidiosis aviar. 2006. Madrid.
 13. Beck HP, Blake D, Dardé ML, Felger I, Pedraza-Díaz S, Regidor-Cerrillo J, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora LM, Putignani L, Shiels B, Tait A, Weir W. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. Int. J. Parasitol. 2009; 39: 175-189.
 14. Biswas A, Roy BG, Gogoi D, Ahmed M, Singh SB. Poultry farming in the cold, arid Himalayan region of India. Worlds. Poult. Sci. J. 2010; 66: 297-307.
 15. Blake D, Clark E, Macdonald SE, Thenmozhi V, Kundu K, Garg R, Jatau ID, Ayoade S, Kawahara F, Moftah A, Reid AJ, Adebambo AO, Zapata RÁ, Rao ASRS, Thangaraj K, Banerjee PS, Dhinakar-Raj G,

- Raman M, Tomley FM. Population, genetic, and antigenic diversity of the apicomplexan *Eimeria tenella* and their relevance to vaccine development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2015; 112: E5343-E5350.
16. Blake DP, Knox J, Dehaeck B, Huntington B, Rathinam T, Ravipati V, Ayoade S, Gilbert W, Adebambo AO, Jatau ID, Raman M, Parker D, Rushton J, Tomley FM. Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. Vet. Res. 2020; 51: 1-14.
17. Blake DP, Vrba V, Xia D, Jatau ID, Spiro S, Nolan MJ, Underwood G, Tomley FM. Genetic and biological characterisation of three cryptic *Eimeria* operational taxonomic units that infect chickens (*Gallus gallus domesticus*). Int. J. Parasitol. 2021; 51: 621-634.
18. Bruzual JJ, Marton Z. Control de la coccidiosis con vacunas en pollos de engorde. Aviagen Br. 2022; 1-8.
19. *Alphitobius diaperinus* (lesser mealworm). 2019. [Online] Disponible en:
<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.4385>
20. Campos P, Miska K, Kahl S, Jenkins M, Shao J, Proszkowiec-Weglarz M. The intestinal disease coccidiosis, caused by parasitic *Eimeria* species, severely impacts poultry production, leading to an estimated \$14 billion in annual losses worldwide. As the poultry industry moves away from antibiotics as a treatment for diseases, . Avian Dis. 2022; 66: 39-52.

21. Cantacessi C, Riddell S, Morris GM, Doran T, Woods WG, Otranto D, Gasser RB. Genetic characterization of three unique operational taxonomic units of *Eimeria* from chickens in Australia based on nuclear spacer ribosomal DNA. Vet. Parasitol. 2008; 152: 226-234.
22. Carrisosa M, Terra-Long M, Cline J, Macklin K, Dormitorio T, Wang C, Hauck R. Multilocus Sequence Typing of *Eimeria* maxima in Commercial Broiler Flocks. Avian Dis. 2022; 66: 389-395.
23. Carvalho FS, Wenceslau AA, Teixeira M, Alexandre J, Carneiro M, Diego A, Melo B, Albuquerque GR. Diagnosis of *Eimeria* species using traditional and molecular methods in field studies. Vet. Parasitol. 2011; 176: 95-100.
24. Castañón CAB, Fraga JS, Fernandez S, Gruber A, da F. Costa L. Biological shape characterization for automatic image recognition and diagnosis of protozoan parasites of the genus *Eimeria*. Pattern Recognit. 2007; 40: 1899-1910.
25. Cervantes H. XVII Congreso Amevea Georgia 2017. Control de la coccidiosis comercial. 2017. Atens.
26. Cervantes H. Coccidiosis o Coccidiasis? 2013, p. 1-5.
27. Chapman D. Milestones in avian coccidiosis research: A review Citing articles via. Poult. Sci. 2014; 93: 501-511.
28. Chapman D, Barta JR, Blake D, Gruber A, Jenkins M, Smith NC, Suo X, Tomley FM. A Selective Review of Advances in Coccidiosis Research. 1ra. Edición. Elsevier Ltd., 2013.
29. Chapman D, Jeffers TK, Williams RB. Forty years of monensin for

- the control of coccidiosis in poultry. Poult. Sci. 2010; 89: 1788-1801.
30. Chapman HD. A landmark contribution to poultry science- Prophylactic control of coccidiosis in poultry. Poult. Sci. 2009; 88: 813-815.
31. Chapman HD, Johnson ZB. Oocysts of *Eimeria* in the litter of broilers reared to eight weeks of age before and after withdrawal of lasalocid or salinomycin. Poult. Sci. 1992; 71: 1342-1347.
32. Clark EL, Macdonald SE, Thenmozhi V, Kundu K, Garg R, Kumar S, Ayoade S, Fornace KM, Danladi I, Moftah A, Nolan MJ, Sudhakar NR, Adebambo AO, Lawal IA, Álvarez R, Awuni JA, Chapman HD, Karimuribo E, Mugasa CM, Namangala B, Rushton J, Suo X, Thangaraj K, Srinivasa ASR, Tewari AK, Banerjee PS, Raj GD, Raman M, Tomley FM, Blake DP. Cryptic *Eimeria* genotypes are common across the southern but not northern hemisphere q. Int. J. Parasitol. 2016; 46: 537-44.
33. Conway DP, McKenzie ME. Poultry Coccidiosis. Diagnostic and Testin procedures. Carlton Australia, Blackwell publishing, 2007.
34. Conway DP, McKenzie ME. Poultry Coccidiosis: Diagnostic and Testing Procedures. Iowa-USA, Blackwell Publishing, 2008.
35. Cunningham J, Klein B. Fisiología Veterinaria. 2009.
36. Dai Prá MA, Büttow Roll VF. Cama avícola: Utilización reutilización y destino. 1ra Edición. Lima, Editora Evangraf, 2019.
37. Dalloul R, Lillehoj H. Poultry coccidiosis : recent advancements in control measures and vaccine development. Expert. Rev. Vaccines.

- 2006; 5: 143-163.
38. Dalloul RA, Lillehoj HS. Recent advances in immunomodulation and vaccination strategies against coccidiosis. Avian Dis. 2005; 49: 1-8.
39. De Franceschi ME. Principales retos en Avicultura. Coccidiosis. Zaragoza, SERVET Grupo Asis, 2011.
40. Del Cacho E. Congreso Científico de Avicultura Simposio WPSA-AECA 2013. Coccidiosis: La enfermedad, consecuencias y tratamiento. 2013.
41. Djemai S, Ayadi O, Khelifi D, Bellil I, Hide G. Prevalence of *Eimeria* species, detected by ITS1-PCR, in broiler poultry farms located in seven provinces of northeastern Algeria. Trop. Anim. Health Prod. 2022; 54: 250.
42. Duszynski D, Lee C, Upton S. The coccidia of Galliformes. 2000.
43. Duszynski D, Lee C, Upton S. Coccidia of the World. 1995.
44. Dzik S, Mituniewicz T. Effectiveness of biocidal paint containing permethrin, ultramarine and violet 23 against *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) in laboratories and poultry houses. Animals. 2020; 10: 1-11.
45. Dzik S, Mituniewicz T, Beisenov A. Efficacy of a Biocidal Paint in Controlling *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) and Improving the Quality of Air and Litter in Poultry Houses. Animals. 2022; 12: 1-18.
46. El-shall NA, El-hack MEA, Albaqami NM, Khafaga AF, Taha AE, Swelum AA, El-saadony MT, Salem HM, El-tahan AM, Abuqamar

- SF, El-tarabily KA, Elbestawy AR. Phytochemical control of poultry coccidiosis : a review. Poult. s. 2022; 101: 101542.
47. Fatoba AJ, Adeleke MA. Diagnosis and control of chicken coccidiosis: a recent update. J. Parasit. Dis. 2018; 42: 483-493.
48. Fernandez, S; Pagotto, A.H.; Furtado, M.M.; Katsuyama, A.M; Madeira, A.M.B.N; Gruber A. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven *Eimeria* species that infect domestic fowl #. Parasitology. 2003; 127: 317-325.
49. Fiuza Perez MD, Rodriguez Perez J. La regresión logística : una herramienta versátil. Nefrología. 2000; 20: 477-565.
50. Flores RA, Nguyen BT, Cammayo PLT, Võ TC, Naw H, Kim S, Kim WH, Na BK, Min W. Epidemiological investigation and drug resistance of *Eimeria* species in Korean chicken farms. BMC Vet. Res. 2022; 18: 1-13.
51. Garcés-Gudiño J, Merino-Guzman R, Cevallos-Gordón AL. Litter reuse reduces *Eimeria* spp oocyst counts and improves the performance in broiler chickens reared in a tropical zone in Ecuador. Eur. Poult. Sci. 2018; 82: 1-9.
52. Gazoni F, Matte F, Chiarelli-adorno F, Jaguezeski A, Tellez-isaia G, Schafer-da-silva A. Coccidiosis en pollos de engorda comerciales en Brazil entre 2012 y 2019 : especies principales y grados de daño
Coccidiosis in commercial broilers in Brazil between 2012 and 2019 : main species and degrees of injury INTRODUCCIÓN En la cría de

- aves de cor. Abanico Vet. 2021; 1-10.
53. Gazoni FL, Adorno FC, Matte F, Alves AJ, Campagnoni IDP, Urbano T, Zampar A, Boiago MM, da Silva AS. Correlation between intestinal health and coccidiosis prevalence in broilers in Brazilian agroindustries. Parasitol. Int. 2020; 76: 102027.
54. Geng T, Ye C, Lei Z, Shen B, Fang R, Hu M, Zhao J, Zhou Y. Prevalence of *Eimeria* parasites in the Hubei and Henan provinces of China. Parasitol. Res. 2021; 655-663.
55. Gerhold RWJ. Coccidiosis in Poultry. MSD Man. Vet. Man. 2023; .
56. Gharekhani J, Sadeghi-dehkordi Z, Bahrami M. Prevalence of Coccidiosis in Broiler Chicken Farms in Western Iran. J. Vet. Med. 2014; 2014: 4.
57. Goodwin MA, Waltman WD. Transmission and Bacteria To Chicks : Darkling Beetles As Vectors of Pathogens. J. Appl. Poult. Res. 1996a; 5: 51-55.
58. Goodwin MA, Waltman WD. Transmission of *Eimeria*, viruses, and bacteria to chicks: Darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) as vectors of pathogens. J. Appl. Poult. Res. 1996b; 5: 51-55.
59. Gottardo P, Warzensaky E, Santiani F, Biezu G, Moraes JC, Da Silva Casa M, Vicente Medeiros AL, Casagrande RA. Prevalence of *Eimeria* sp. In broiler poultry houses with positive and negative pressure ventilation systems in southern Brazil. Avian Dis. 2021; 65: 469-473.
60. Guimarães JS, Bogado ALG, da Cunha TCB, Garcia JL. In vitro

- evaluation of the disinfection efficacy on *Eimeria tenella* unsporulated oocysts isolated from broilers. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2007; 16: 67-71.
61. Györke A, Kalmár Z, Pop LM, Şuteu OL. The economic impact of infection with *Eimeria* spp. in broiler farms. Rev. Bras. Zootec. 2016; 45: 273-280.
62. Györke A, Pop L, Cozma V. Prevalence and distribution of *Eimeria* species in broiler chicken farms of different capacities. Parasite. 2013; 20.
63. Hauck R, Carrisosa M, McCrea B, Dormitorio T, Macklin K. Evaluation of Next-Generation Amplicon Sequencing to Identify *Eimeria* spp. of Chickens. Avian Dis. 2019; 63: 577-583.
64. Haug A, Gjevre AG, Thebo P, Mattsson JG, Kaldhusdal M. Coccidial infections in commercial broilers: Epidemiological aspects and comparison of *Eimeria* species identification by morphometric and polymerase chain reaction techniques. Avian Pathol. 2008; 37: 161-170.
65. Hoelzer K, Bielke L, Blake DP, Cox E, Cutting SM, Devriendt B, Erlacher-Vindel E, Goossens E, Karaca K, Lemiere S, Metzner M, Raicek M, Collell Suriñach M, Wong NM, Gay C, Van Immerseel F. Vaccines as alternatives to antibiotics for food producing animals. Part 1: Challenges and needs. Vet. Res. 2018; 49: 1-10.
66. Huang W, Zhu S, Chen T, Zhao Q, Dong H, Huang B, Yao Y, Liu Z, Yu Y, Han H. Molecular characterization of glyceraldehyde-3-

- phosphate dehydrogenase from *Eimeria tenella*. Parasitol. Res. 2022; 121: 1749-1760.
67. Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. Anuario meteorológico № 53-2013. Quito, 2017.
68. Jenkins M. Vaccination. En: In Dubey JP. Coccidiosis in Livestock, Poultry, Companion Animals, and Humans. LA, 2019, p. 51-58.
69. Jenkins MC, Parker C, Ritter D. *Eimeria* Oocyst Concentrations and Species Composition in Litter from Commercial Broiler Farms during Anticoccidial Drug or Live *Eimeria* Oocyst Vaccine Control Programs. Avian Dis. 2017; 61: 214-220.
70. Johnson J, Reid WM. Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. Exp. Parasitol. 1970; 28: 30-36.
71. 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.
72. Kant V, Singh P, Verma PK, Bais I, Parmar MS, Gopal A, Gupta V. Anticoccidial Drugs Used in the Poultry: An Overview. 2013, p. 261-265.
73. Khursheed A, Yadav A, Sofi OMUD, Kushwaha A, Yadav V, Rafiqi SI, Godara R, Katoch R. Prevalence and molecular characterization of *Eimeria* species affecting backyard poultry of Jammu region, North India. Trop. Anim. Health Prod. 2022; 54: 1-7.
74. Kim E, Letourneau-Montminy M-P, Lambert W, Chalvon-Demersay

- T, Kiarie EG. Centennial Review: A meta-analysis of the significance of *Eimeria* infection on apparent ileal amino acid digestibility in. Poult. Sci. 2022; 101: 101625.
75. Kumar S, Garg R, Banerjee PS, Ram H, Kundu K, Kumar S, Mandal M. Genetic diversity within ITS-1 region of *Eimeria* species infecting chickens of north India. Infect. Genet. Evol. 2015; 36: 262-267.
76. Kumar S, Garg R, Moftah A, Clark EL, Macdonald SE, Chaudhry AS, Sparagano O, Banerjee PS, Kundu K, Tomley FM, Blake DP. An optimised protocol for molecular identification of *Eimeria* from chickens. Vet. Parasitol. 2014; 199: 24-31p.
77. Lan LH, Sun BB, Zuo BXZ, Chen XQ, Du AF. Prevalence and drug resistance of avian *Eimeria* species in broiler chicken farms of Zhejiang province, China. Poult. Sci. 2017; 96: 2104-2109.
78. Lee KW, Lillehoj HS, Jang SI, Pagès M, Bautista DA, Pope CR, Ritter GD, Lillehoj EP, Neumann AP, Siragusa GR. Effects of in ovo vaccination and anticoccidials on the distribution of *Eimeria* spp. in poultry litter and serum antibody titers against coccidia in broiler chickens raised on the used litters. Res. Vet. Sci. 2012; 93: 177-182.
79. Lillehoj HS, Trout JM. Coccidia: A review of recent advances on immunity and vaccine development Coccidia: a review of recent advances on immunity and vaccine development. Avian Dis. 2007; 22: 3-31.
80. Lillehoj HS, Trout JM. Coccidia: a review of recent advances on immunity and vaccine development. Avian Pathol. 1993; 22: 3-31.

81. Lopes M, Leite FL, Valente BS, Heres T, Dai Prá MA, Xavier EG, Roll VFB. An assessment of the effectiveness of four in-house treatments to reduce the bacterial levels in poultry litter. Poult. Sci. 2015; 94: 2094-2098.
82. López-López P, Sarmiento-Franco L, Santos-Ricalde R. No Title Effect of stocking density on performance, infection by *Eimeria* spp., intestinal lesions and foot pad injuries in broilers with outdoor access under tropical conditions. Br. Poult. Sci. 2022; 63: 108-114.
83. Matsubayashi M, Shibahara T, Matsuo T, Hatabu T, Yamagishi J, Sasai K, Isobe T. Morphological and molecular identification of *Eimeria* spp. In breeding chicken farms of Japan. J. Vet. Med. Sci. 2020; 82: 516-519.
84. Mattiello R, Boviez JD, McDougald LR. *Eimeria brunetti* and *Eimeria necatrix* in chickens of Argentina and confirmation of seven species of *Eimeria*. Avian Dis. 2000; 44: 711-714.
85. McDonald V, Shirley MW. Past and future: Vaccination against *Eimeria*. Parasitology. 2009; 136: 1477-1489.
86. McDougald LR. Intestinal Protozoa Important to Poultry Coccidia and Related Organisms Monitoring of Litter Oocysts. Infect. Poult. Dis. 1998; 77: 1156-1158.
87. McDougald LR, Da Silva JM, Solis J, Braga M. A survey of sensitivity to anticoccidial drugs in 60 isolates of coccidia from broiler chickens in Brazil and Argentina. Avian Dis. 1987; 31: 287-292.
88. Mesa-Pineda C, Navarro-Ruíz JL, López-Osorio S. Chicken

Coccidiosis : From the Parasite Lifecycle to Control of the Disease.

Front. Vet. science. 2021; 8: 1-15.

89. Mesa C, Gómez-Osorio LM, López-Osorio S, Williams SM, Chaparro-Gutiérrez JJ. Survey of coccidia on commercial broiler farms in Colombia: frequency of *Eimeria* species, anticoccidial sensitivity, and histopathology. Poult. Sci. 2021; 100.
90. Mora B. Vacunas contra coccidias en aves: tipos de vacunas y procedimientos de vacunación. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2022.
91. Moraes JC, França M, Sartor AA, Bellato V, de Moura AB, Magalhães M de LB, de Souza AP, Miletti LC. Prevalence of *Eimeria* spp. in Broilers by Multiplex PCR in the Southern Region of Brazil on Two Hundred and Fifty Farms. Avian Dis. 2015; 59: 277-281.
92. Morales W, Moreno L. Guia de Buenas Practicas Avicolas. Agrocalidad. 2017; 1-45.
93. Moreno RD, Ibarra FV. Algunos aspectos de la coccidiosis aviar en la zona de Coatzacoalcos , Veracruz , México. Fac. Med. Vet. y Zootec. Univ. Nac. Auton. Mex. 2002; 33: 63-71.
94. Morris GM, Gasser RB. Biotechnological advances in the diagnosis of avian coccidiosis and the analysis of genetic variation in *Eimeria*. Biotechnol. Adv. Adv. 2006; 24: 590-603.
95. Neretti G, Morandi B, Taglioli M, Poglayen G, Galuppi R, Tosi G, Borghi CA. Inactivation of *Eimeria* Oocysts in aqueous solution by a dielectric barrier discharge plasma in contact with liquid. Plasma

- Med. 2018; 8: 155-162.
96. Odden A, Enemark HL, Ruiz A, Robertson LJ, Ersdal C, Nes SK, Tømmerberg V, Stuen S. Controlled efficacy trial confirming toltrazuril resistance in a field isolate of ovine *Eimeria* spp. Parasites and Vectors. 2018; 11: 1-11.
97. OIE. Métodos de muestreo. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004 - capítulo actualizado (mayo 2005). 2005, p. 3-15.
98. Ojimekwe AE, Emedhem DE, Agu GO, Nduka FO, Abah AE. Populations of *Eimeria tenella* express resistance to commonly used anticoccidial drugs in southern Nigeria. Int. J. Vet. Sci. Med. 2018; 6: 192-200.
99. Oklander LI, Marino M, Zunino GE, Corach D. Preservation and extraction of DNA from feces in howler monkeys (*Alouatta caraya*). Neotrop. Primates. 2004; 12: 59-64.
100. Ola-Fadunsin SD, Uwabujo PI, Sanda IM, Hussain K, Ganiyu IA, Rabiun M, Balogun RB. Cross-sectional study of *Eimeria* species of poultry in Kwara State, North-Central Nigeria. J. Parasit. Dis. 2019; 43: 87-95.
101. Pastor-Fernández I, Pegg E, Macdonald SE, Tomley FM, Blake DP, Marugan-Hernandez V. Manipulation of *Eimeria tenella*. Curr. Protoc. Microbiol. 2019; 81: 1-25.
102. Peek H. Resistance to anticoccidial drugs: alternative strategies to control coccidiosis in broilers coccidiosis in broilers. Utrecht. 2010.

103. Peek HW, Landman WJM. Higher Incidence of *Eimeria* spp . Field Isolates Sensitive for Diclazuril and Monensin Associated with the Use of Live Coccidiosis Vaccination with Paracox™ -5 in Broiler Farms Research Note — Higher Incidence of *Eimeria* spp . Field Isolates Sensitive fo. Avian Dis. 2006; 50: 434-439.
104. Pegg E, Doyle K, Clark EL, Jatau ID, Tomley FM, Blake DP, Biology P, Lane H, Mymms N, Campus SK. Application of a new PCR-RFLP panel suggests a restricted population structure for. Vet. Parasitol. 2018; 229: 1-19.
105. Pomboza-Tamaquiza, Pablo; Guerrero-López, Ricardo; Guevara-Freire, Deysi; Rivera V. Granjas avícolas y autosuficiencia de maíz y soya: caso Tungurahua Ecuador. Rev. Aliment. Contemp. y Desarro. Reg. 2018; 28.
106. Prakashbabu CB, Thenmozhi V, Limon G, Kundu K, Kumar S, Garg R, Clark EL, Rao ASRS, Raj DG, Raman M, Banerjee PS, Tomley FM, Guitian J, Blake DP. Veterinary Parasitology *Eimeria* species occurrence varies between geographic regions and poultry production systems and may influence parasite genetic diversity. Vet. Parasitol. 2017a; 233: 62-72.
107. Prakashbabu CB, Thenmozhi V, Limon G, Kundu K, Kumar S, Garg R, Clark EL, Srinivasa Rao ASR, Raj DG, Raman M, Banerjee PS, Tomley FM, Guitian J, Blake DP. *Eimeria* species occurrence varies between geographic regions and poultry production systems and may influence parasite genetic diversity. Vet. Parasitol. 2017b;

- 233: 62-72.
108. Price KR, Guerin MT, Barta JR. Success and failure: The role of relative humidity levels and environmental management in live *Eimeria* vaccination of cage-reared replacement layer pullets. J. Appl. Poult. Res. 2014; 23: 523-535.
109. Quiroz-Castañeda RE, Dantán-González E. Control of avian coccidiosis: Future and present natural alternatives. Biomed Res. Int. 2015; 2015.
110. R Core Team R. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria, R. Foundation for Statistical Computing, 2021.
111. Ramey AM, Ahlstrom CA. Antibiotic resistant bacteria in wildlife: Perspectives on trends, acquisition and dissemination, data gaps, and future directions. J. Wildl. Dis. 2020; 56: 1-15.
112. Répérant J, Dardi M, PAGÈS M, Martine T. Estudio sobre patogenicidad de *Eimeria praecox* en pollos sola o asociada a *Eimeria acervulina*. Xlviii Simp. Científico Avic. 2011; 1-5.
113. Reyna PS, McDougald LR, Mathis GF. Survival of coccidia in poultry litter and reservoirs of infection. Avian Dis. 1982; 27: 464-73.
114. Salinas M, Icochea E, Salas E, Falcón F, Reyna P. Niveles de ooquistes de *Eimeria* en cama y su relación con las lesiones intestinales en pollos broiler. Rev. Investig. Vet. Perú. 2001; 12: 1.
115. Salud Animal MSD. Fortegra ® FICHA TÉCNICA. 2021.
116. Shirley MW, Bumstead N. Intra-specific variation within

- Eimeria tenella* detected by the random amplification of polymorphic DNA. Parasitol. Res. 1994; 80: 346-351.
117. Shirley MW, Smith AL, Blake DP. Challenges in the successful control of the avian coccidia. Vaccine. 2007; 25: 5540-5547.
118. Shivaramaiah C, Barta JR, Hernandez-Velasco X, Téllez G, Hargis BM. Coccidiosis : recent advancements in the immunobiology of *Eimeria* species , preventive measures , and the importance of vaccination as a control tool against these Apicomplexan parasites. Vet. Med. Res. reports. 2014; 5: 23-34.
119. Shu-San L, Lik-Sin L, Nurul Ain E, Damer P. B, Shin Ichiro K, Kiew Lian W. Comparison of molecular methods for the detection of *Eimeria* in domestic chickens in Malaysia. Sains Malaysiana. 2019; 48: 1425-1432.
120. Censo avícola 2015. 2015. [Online] Disponible en: <http://simce.ambiente.gob.ec/sites/default/files/documentos/anny/Tabela de Salida de Censos Avícolas Ecuatorianos.pdf>
121. Snyder RP, Guerin MT, Hargis BM, Kruth PS, Page G, Rejman E, Rotolo JL, Sears W, Zeldenrust EG, Whale J, Barta JR. Restoration of anticoccidial sensitivity to a commercial broiler chicken facility in Canada. Poult. Sci. 2021a; 100: 663-674.
122. Snyder RP, Guerin MT, Hargis BM, Page G, Barta JR. Monitoring coccidia in commercial broiler chicken flocks in Ontario: comparing oocyst cycling patterns in flocks using anticoccidial medications or live vaccination. Poult. Sci. 2021b; 100: 110-118.

123. Soliman ES, Hassan RA, Farid DS. The efficiency of natural-ecofriendly clay filters on water purification for improving performance and immunity in broiler chickens. Open Vet. J. 2021; 11: 483-499.
124. Soulsby EJ. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7ma Edición. Mexico, Interamericana, 1987.
125. Stephan B, Rommel M, Dauschies A, Haberkorn A. Studies of resistance to anticoccidials in *Eimeria* field isolates and pure *Eimeria* strains. Vet. Parasitol. 1997; 69: 19-29.
126. Surzycki S. General Aspects of DNA Isolation and Purification. In: Basic Techniques in Molecular Biology. Springer Lab Manuals. Berlin, Springer Berlin Heidelberg, 2000, p. 1-32.
127. Tan L, Li Y, Yang X, Ke Q, Lei W, Mughal MN, Fang R, Zhou Y, Shen B, Zhao J. Genetic diversity and drug sensitivity studies on *Eimeria tenella* field isolates from Hubei Province of China. Parasites and Vectors. 2017; 10: 1-10.
128. Toledo GA, Almeida JDDM, Almeida KDS, Freitas FLDC. Coccidiosis in broiler chickens raised in the Araguaína region, State of Tocantins, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Veterinária. 2011; 20: 249-52.
129. Van Immerseel F, De Buck J, Pasmans F, Huyghebaert G, Haesebrouck F, Ducatelle R. Clostridium perfringens in poultry: An emerging threat for animal and public health. Avian Pathol. 2004; 33: 537-549.

130. Veen C, Bruijn ND De, Dijkman R, Wit JJ De. Prevalence of histopathological intestinal lesions and enteric pathogens in Dutch commercial broilers with time. Avian Pathol. 2016; 46: 95-105.
131. Venkatas J, Adeleke MA. Emerging threat of *Eimeria* operational taxonomic units (OTUs) on poultry production. Parasitology. 2019; 146: 1615-1619.
132. Venkateswara-Rao P, Raman M, Gomathinayagam S. Sporulation dynamics of poultry *Eimeria* oocysts in Chennai. J. Parasit. Dis. 2015; 39: 689-692.
133. Villareal MA. Diagnóstico de enfermedades gastrointestinales en pollos a nivel de planta procesadora en la ciudad de Atuntaqui. Universidad de las Américas. 2010.
134. Vriesman AL, Molinari AP, Fernandes SR, Mello NL. Efficiency of sanitary management of litter in *Eimeria* spp. control in poultry housing of Western Paraná, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 2021; 30: e026920.
135. Whitehead ABR, Butcher GD, Walden HS, Duque V, Cruz M, Hernandez JA. Burden of exposure to infectious bursal disease virus, infectious bronchitis virus, Newcastle disease virus, *Mycoplasma gallisepticum*, and intestinal parasites in introduced broiler chickens on the Galapagos. PLoS One. 2018; 13: 1-11.
136. Williams R. Epidemiological studies of coccidiosis in the domesticated fowl (*Gallus gallus*): II. Physical condition and survival of *Eimeria acervulina* oocysts in poultry-house litter. Appl. Parasitol.

- 1995a; 36: 90-96.
137. Williams RB. Epidemiological studies of coccidiosis in the domesticated fowl (*Gallus gallus*): I. The fate of ingested oocysts of *Eimeria tenella* during the prepatent period in susceptible chicks. Appl. Parasitol. 1995b; 36: 83-89.
138. Williams RB. Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to success. Avian Pathol. 2002; 31: 317-353.
139. Witcombe DM, Smith NC. Strategies for anti-coccidial prophylaxis. Parasitology. 2014; 141: 1379-1389.
140. Wondimu A, Mesfin E, Bayu Y. Prevalence of Poultry Coccidiosis and Associated Risk Factors in Intensive Farming System of Gondar Town, Ethiopia. Vet. Med. Int. 2019; 2019.
141. You M. Parasitology International Detection of four important *Eimeria* species by multiplex PCR in a single assay. Parasitol. Int. 2014; 63: 527-532.
142. Yu Y, Dong H, Zhao Q, Zhu S, Liang S, Wang Q, Wang H, Yu S, Huang B, Han H. Molecular characterization and analysis of the ATPase ASNA1 homolog gene of *Eimeria tenella* in a drug sensitive strain and drug resistant strains. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 2021; 15: 115-125.

8. ANEXOS

ANEXO 1. Encuesta epidemiológica

ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA PRESENCIA DE *Eimeria* spp. EN PICHINCHA Y Sto. DOMINGO

CODIGO:

Entrevistado _____ Registro Agrocalidad _____
 Nombre de la granja _____ Fecha _____
 Nombre del responsable o representante legal _____
 Independiente _____ Integrado a _____

DENSIDAD

total de aves en la granja _____ # de aves en galpón muestreado _____
 # de personas que trabajan en la granja _____ # de galponeros (total) _____
 Galponeros realizan otra actividad: NO _____ SI _____ Cuál? _____
 Superficie del galpón (m2) _____ Largo (m2) _____ Ancho (m2) _____

CONDICIONES MEDIO AMBIENTALES

Coordenadas _____ Altitud _____
 Humedad Relativa actual _____ Temperatura actual _____
 Hora del día de la toma _____ Amoníaco _____ CO2 en ambiente _____

INSTALACIONES

Material del techo _____ Material del piso _____
 Tipo de ventilación _____
 Iluminación (aves adultas) _____ Tipo _____ # Horas _____

EQUIPOS

Tipo de bebederos _____ Procedencia del agua _____
 Potabilizan el agua _____ Productos que usan _____
 Tipo de comederos _____ Procedencia del alimento _____
 Tipo o presentación del alimento (harina, pelet) _____

CAMA

Material que usan _____ Profundidad (cm) _____
 Material usado _____ Humedad en cama _____
 Número de uso _____
 Método de compostaje _____

Presencia de: *Alphitobius diapedinus* _____ Ratas _____ Otros _____

AVES

Edad _____ Línea genética _____ Procedencia _____
 Progenitores vacunados para *Eimeria* spp NO _____ SI _____
 Vacuna anticoccidial (lote actual) NO _____ SI _____ Tipo _____ Edad _____
 Lotes anteriores han recibido vacunación NO _____ SI _____ Cuál _____
 Uso de quimioprofilaxis NO _____ SI _____ Tipo de programa _____
 Drogas usadas _____ Rotación (tiempo) _____
 Alimento: Planta propia _____ Compra _____ Marca _____
 Alimentación: Ad libitum _____ Controlada _____ Restricción (h) _____
 Tiempo de retiro de anticoccidial previo a faena _____
 Tiempo de ayuno previo a faena _____ Desórdenes en locomoción (%) _____

VACIO SANITARIO

Tiempo de repoblación (entre ciclo y ciclo) _____
 Tiempo de vacio sanitario efectivo _____
 Control de insectos NO SI Frecuencia _____ Método: _____
 Control de ratas NO SI Frecuencia _____ Método: _____

MUESTRA

Persona que recolecta _____ # de animales que aportaron _____
 Hora de recolección _____

LABORATORIO

Fecha de recepción _____
 Peso neto de la muestra _____
 Observaciones: _____

RESULTADOS:

Fecha _____ Hora _____
 Flotación Positivo Negativo

RECuento DE OOQUISTES

Fecha _____ Hora _____
 Cuantificación en cámara de McMaster _____
 Número de ooquistes por gramo de heces _____
 Observaciones _____

ESPORULACIÓN

Fecha _____ Hora _____

	SI	NO	OPG	%
<i>E. acervulina</i>				
<i>E. brunetti</i>				
<i>E. maxima</i>				
<i>E. mitis</i>				
<i>E. necatrix</i>				
<i>E. praecox</i>				
<i>E. tenella</i>				
Otros				

PCR

Fecha _____ Hora _____

	SI	NO
<i>E. acervulina</i>		
<i>E. brunetti</i>		
<i>E. maxima</i>		
<i>E. mitis</i>		
<i>E. necatrix</i>		
<i>E. praecox</i>		
<i>E. tenella</i>		

ANEXO 2. Secuencia de primers, de *Eimeria* spp. de aves domésticas
para el ensayo PCR multiplex.

Espece	SCA R	Primer Identific ación	Secuencias de primer	Aplicon tamaño (bp)
<i>E. acervulina</i>	Ac- A03- 811	Ac-01-F	AGTCAGCCACACAATAATGGCAAACATG	811
		Ac-01-R	AGTCAGCCACAGCGAAAGACGTATGTG	
<i>E. brunetti</i>	Br- J18- 626	Br-01-F	TGGTCGCAGAACCTACAGGGCTGT	626
		Br-01-R	TGGTCGCAGACGTATATTAGGGGTCTG	
<i>E. tenella</i>	Tn- K04- 539	Tn-01-F	CCGCCCAAACCAGGTGTCACG	539
		Tn-01-R	CCGCCCAAACATGCAAGATGGC	
<i>E. mitis</i>	Mt- A03- 460	Mt-01-F	AGTCAGCCACCAGTAGAGCCAATATTT	460
		Mt-01-R	AGTCAGCCACAAACAAATTCAAACTCTAC	
<i>E. praecox</i>	Pr- A03- 718	Pr-01-F	AGTCAGCCACCACCAAATAGAACCTTGG	354
		Pr-01-R	GCCTGCTTACTACAAACTTGCAAGCCCT	
<i>E. maxima</i>	Mx- A09- 1008	Mx-01-F	GGGTAACGCCAACTGCCGGGTATG	272
		Mx-01-R	AGCAAACCGTAAAGGCCGAAGTCCTAGA	
<i>E. necatrix</i>	Nc- M02- 1081	Nc-01-F	TTCATTTTCGCTTAACAATATTTGGCCTCA	200
		Nc-01-R	ACAACGCCTCATAACCCCAAGAAATTTTG	

Fernandez y col., 2003

ANEXO 3. Características de las granjas evaluadas

Parámetro	Número de muestras	Proporción %
TIPO DE PRODUCCION		
Intensivo	54	34%
Industrial	67	42%
Artesanal	38	24%
DEPENDENCIA		
Integrado	93	58%
Independiente	66	42%
EMPRESA		
Empresa 3	18	11%
Empresa 1	36	23%
Empresa 2	43	27%
Empresa 4	15	9%
Empresa 5	6	4%
Independiente	41	26%
TAMAÑO DE GRANJA		
Grande	49	31%
Mediano	56	35%
Pequeño	54	34%
ALTITUD		
Menor a 1300msnm	122	77%
Mayor a 1300msnm	37	23%
DENSIDAD (KG/M2)		
Intermedia	46	29%
Baja	52	33%
Alta	61	38%
DENSIDAD (AVES/M2)		
Entre 9.6 y 11	54	34%
Menor a 9.5	51	32%
Más de 11.1	54	34%
TIPO DE GALPÓN		
Ambiente controlado	27	17%
Abierto	132	83%
MATERIAL DEL TECHO		
Galvallume	134	84%
Asbesto	14	9%
Zinc	11	7%
MATERIAL DEL PISO		
Cemento	78	49%
Tierra	81	51%
MATERIAL SOPORTE DEL TECHO		
Metal	62	39%
Madera	97	61%
ILUMINACION ADICIONAL		
NO	46	29%
SI	113	71%
TIPO DE VENTILACIÓN		
Mecánica	30	19%
Natural	129	81%
TIPO DE BEBEDEROS		
Sistemas cerrados	76	48%
Sistemas abiertos	83	52%
ORIGEN DEL AGUA		
Río o canal	39	25%
Pozo	107	67%
Agua Potable	13	8%
SANITIZANTES USADOS EN EL AGUA		
Cloro	17	11%
Cloro y peróxido	110	69%
Peróxido	3	2%
Más de 3 productos	29	18%
PEROXIDO		
SI	113	71%
NO	46	29%

Parámetro	Número de muestras	Proporción %
COLOR		
SI	127	80%
NO	32	20%
TIPO DE COMEDEROS		
Mecánicos	87	55%
Manuales	72	45%
PRESENTACIÓN DEL ALIMENTO		
Harina	40	25%
Peletizado	119	75%
ORIGEN DEL ALIMENTO		
Fabrican	121	76%
Compran	38	24%
NUMERO DE USO DE CAMA		
Dos o tres usos	53	33%
Un uso	82	52%
Más de 4 usos	24	15%
PROFUNDIDAD DE CAMA		
De 10 a 15cm	15	9%
Menos de 10cm	64	40%
Más de 15cm	80	50%
METODO DE COMPOSTAJE DE CAMA		
Fermentación	84	53%
Ninguno	75	47%
PRESENCIA DE ALPHITOBIOUS DIAPERINUS		
No	63	40%
Si	96	60%
ANTICOCCIDIALES AL AGUA		
No	141	89%
Si	18	11%
EDAD DE LAS AVES		
Más de 46 días	52	33%
Menos de 35 días	54	34%
De 36 a 45 días	53	33%
TIPO DE ALIMENTACIÓN		
Libre (Ad libitum)	58	36%
Controlada	101	64%
TIEMPO DE REPOBLACION		
Mayor a 68 días	36	23%
Menor a 60 días	63	40%
De 61 a 67 días	60	38%
VACÍO SANITARIO		
Más de 18 días	27	17%
8 a 15 días	79	50%
3 a 7 días	53	33%
CAL VIVA		
No	43	27%
Si	116	73%
FENÓLICOS		
No	95	60%
Si	32	20%
FORMOL		
No	87	55%
Si	40	25%
FLAMEADO		
No	94	59%
Si	65	41%
AMONIO CUATERNARIO		
No	141	89%
Si	18	11%
OTROS DESINFECTANTES		
No	150	94%
Si	9	6%

ANEXO 4. Relación oocistas por gramo de heces (OPG) y especies de *Eimeria* spp. halladas con las características y medidas de control aplicadas en las granjas estudiadas.

Anexo 4. Características de las granjas avícolas y medidas de control usadas por avicultores de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas en relación con el número de oocistas por gramo de heces (OPG) y a la presencia de las especies de *Eimerias*

Parámetro	% OPG	% E. acervulina	% E. brunetti	% E. maxima	% E. necatrix	% E. praecox	% E. tenella
DEPENDENCIA							
Integrado	58% 5459.95	65.52	215.1	77.01	45.16	46.24	42.53
Independiente	42% 9511.97	77.27	2.13 (1.00-4.72)	84.85	63.64	68.18	68.19
			0.03**	0.003**	0.016*	0.009**	0.001**
TAMANO DE GRANJA							
Grande	31% 4888.27	65.12	26.53	81.4	55.1	53.06	53.49
Mediano	35% 8904.55	71.43	7.86 (0.77-4.57)	78.57	50.82	57.14	42.86
Pequeño	34% 8803.8	74.07	2.13 (0.86-5.37)	81.48	51.85	55.56	64.81
			0.956	0.149	0.874	0.845	0.077
ALTITUD							
Menor a 1300nm	77% 8338.06	64.68	18.92	75.69	54.05	51.35	37.84
Mayor a 1300nm	22% 2582.43	72.41	34.43	81.9	51.64	56.56	58.62
			0.551	0.07	0.461	0.461	0.062
DENSIDAD (AVES/M2)							
Intermedia	29% 12113.61*	72.92	37.04	91.67	53.7	62.75	60.42
Baja	33% 14289.6*	84.31	2.44 (0.94-6.65)	88.27	56.86	62.75	60.78
Alta	38% 9579.94*	55.56	22.22	64.81	46.3	48.15	40.74
			0.681	0.698	0.846	0.846	0.587
DENSIDAD (AVES/M3)							
Entre 9 y 11	34% 6126.24*	65.12	32.65	81.67	48.98	44.9	60.47
Menor a 9.5	32% 10049.12*	80	2.97 (1.18-7.72)	88.37	53.33	65	56.67
Más de 11.5	34% 4887.69*	64	1.33 (0.550-3.228)	72	54	54	44
			0.541	0.513	0.689	0.424	0.424
TIPO DE GALPON							
Ambiente controlado	17% 7812.04	66.67	22.22	66.67	51.85	59.26	40.74
Abierto	82% 6714.85	71.43	1.07 (0.39-2.77)	83.33	52.27	54.55	56.35
			1	0.21	1	1	0.391
MATERIAL DEL TECHO							
Galvalume	84% 7225.6	71.88	30.6	82.81	53.73	54.48	55.47
Asbesto	9% 4494.64	57.14	0.61 (0.17-2.28)	64.29	50	57.14	42.86
Zinc	7% 6731.82	72.73	1.22 (0.27-7.47)	72.73	36.36	63.64	45.45
			1	0.739	0.351	0.755	0.757
MATERIAL DEL PISO							
Cemento	49% 2614.1	56.94	26.92	77.78	46.15	44.67	51.38
Tierra	51% 11127.22	82.71	4.28 (1.98-9.67)	82.72	58.02	65.43	55.56
			0.000**	0.309	0.154	0.011**	0.343
MATERIAL SOPORTE DEL TECHO							
Metal	39% 5701.61	57.63	25.81	74.58	50	41.94	54.24
Madera	61% 7749.54	78.72	34.02	84.04	53.61	63.92	53.19
			0.26	0.296	0.745	0.009**	1
ILUMINACION ADICIONAL							
NO	29% 5860.04	72.5	32.61	87.5	52.17	56.52	67.5
SI	71% 7383.67	69.91	30.09	77.88	52.21	54.87	48.67
			0.46	0.805	1	0.863	0.863
TIPO DE VENTILACION							
Mecánica	18% 7250.83	71.43	26.67	75	53.33	56.67	46.43
Natural	81% 8881.24	70.4	31.78	81.6	51.94	55.04	55.2
			1	0.665	1	1	0.418
TIPO DE BEBEDEROS							
Sistemas cerrados	48% 7250	68.06	27.63	76.39	51.32	53.95	47.22
ORIGEN DEL AGUA	52% 6877.17	72.84	1.35 (0.66-2.79)	83.95	53.01	56.63	59.26
			0.4	0.492	0.675	0.752	0.114
RIO O CANAL							
Pozo	25% 3506.05*	51.28	38.46	64.1	46.15	38.46	53.85
Agua Potable	67% 8743.63*	79.21	2.19 (1.215-4.46)	87.13	55.14	63.55	53.47
			0.045*	0.224	0.355	0.008**	0.852
SANITIZANTES USADOS EN EL AGUA							
Cloro	11% 3126.47	64.71	17.65	70.59	52.94	52.94	35.29
Cloro y peróxido	69% 7679.36	67.27	35.45	80	50.91	54.55	56.36
Peróxido	2% 4050	66.67	1.09 (0.05-74.91)	66.67	100	66.67	33.33
Más de 3 productos	18% 6910.19	91.3	1.42 (0.32-6.15)	91.3	51.72	58.62	56.52
			0.74	0.19	0.765	0.555	0.555
PEROXIDO							
SI	71% 7679.36	65.49	34.51	76.11	49.58	53.1	54.87
NO	29% 5515	85	0.91 (0.41-1.97)	92.5	58.7	60.97	50
			0.86	0.065	0.731	0.863	0.086
COLORO							
SI	80% 7069.92	66.93	33.07	77.17	51.18	54.33	53.54
NO	20% 6478.91	88.46	21.88	96.15	56.25	59.38	53.85
			0.68	0.296	0.694	0.693	0.332
TIPO DE COMEDEROS							
Mecánicos	55% 6942.53	69.14	24.14	80.25	54.02	57.47	46.91
Manuales	45% 6961.15	72.22	1.44 (0.70-3.01)	80.56	50	52.78	61.11
			0.31	0.058	0.635	0.631	0.038*

Continuación

Continuación
Anexo 4. Características de las granjas avícolas y medidas de control usadas por avicultores de Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas en relación con el número de oocistos por gramo de heces (OPG) y a la presencia de las especies de Eimerias

Parámetro	OPG		E. acroculina		E. brunetti		E. maxima		E. necatrix		E. praecox		E. tenella	
	%	P	%	OR (95%CI)	%	OR (95%CI)	%	OR (95%CI)	%	OR (95%CI)	%	OR (95%CI)	%	OR (95%CI)
PRESENTACION DEL ALIMENTO														
Harina	25%	2908.75	64.71	Nivel de referencia	32.5	Nivel de referencia	85.29	Nivel de referencia	55	Nivel de referencia	50	Nivel de referencia	64.71	Nivel de referencia
Pellets	75%	8309.71	72.27	2.12 (0.94-4.76)	0.051	0.843	78.99	1.42 (0.56-3.45)	0.39	51.26	0.86 (0.39-1.88)	0.718	57.14	1.01 (0.61-1.61)
ORIGEN DEL ALIMENTO														
Fabrican	76%	4939.46	62.61	Nivel de referencia	22.31	Nivel de referencia	75.65	Nivel de referencia	47.93	Nivel de referencia	49.59	Nivel de referencia	43.48	Nivel de referencia
Compran	24%	13356.05	94.74	12.11 (2.89-108.61)	0.000**	0.000**	94.74	8.94 (1.64-63.08)	0.003**	65.79	2.08 (0.92-4.87)	0.064	73.68	2.83 (1.21-7.12)
NUMERO DE USO DE CAMA														
Dos o tres usos	33%	7842.55	66.04	Nivel de referencia	41.51	Nivel de referencia	77.36	Nivel de referencia	47.17	Nivel de referencia	56.6	Nivel de referencia	62.26	Nivel de referencia
Un uso	52%	6231.1	76.32	1.24 (0.55-2.77)	0.57	0.061	25.61	0.49 (0.22-1.09)	0.061	53.66	1.29 (0.62-2.75)	0.485	54.88	0.93 (0.44-1.98)
Más de 4 usos	15%	7883.33	62.5	0.86 (0.28-2.69)	0.8	0.206	66.67	1.70 (0.59-5.56)	0.4	58.33	1.56 (0.53-4.70)	0.462	54.17	0.91 (0.31-2.69)
PROFUNDIDAD DE CAMA														
De 10 a 15cm	9%	1465.33	60	Nivel de referencia	33.33	Nivel de referencia	73.33	Nivel de referencia	26.67	Nivel de referencia	66.67	Nivel de referencia	46.67	Nivel de referencia
Menos de 10cm	40%	7230.86	68.75	1.46 (0.37-5.35)	0.55	0.49	32.81	0.98 (0.26-4.12)	1	62.5	4.93 (1.17-21.56)	0.019*	60.94	0.78 (0.19-2.88)
Más de 15cm	50%	7755.62	74.32	1.46 (0.38-5.19)	0.56	0.762	28.75	0.81 (0.22-3.36)	0.762	48.75	2.59 (0.65-12.11)	0.159	48.75	0.48 (0.12-1.71)
METODO DE COMPOSTAJE DE CAMA														
Fermentación	53%	8010.18	70.51	Nivel de referencia	32.14	Nivel de referencia	79.49	Nivel de referencia	48.81	Nivel de referencia	55.95	Nivel de referencia	56.41	Nivel de referencia
Ninguno	47%	5764.67	70.67	1.27 (0.62-2.63)	0.5	0.733	81.33	1.54 (0.68-3.88)	0.34	56	1.33 (0.68-2.62)	0.427	54.67	0.95 (0.46-1.98)
PRESENCIA DE ALPHITOBUS DIAPERINUS														
No	40%	8734.17	58.73	Nivel de referencia	26.98	Nivel de referencia	68.25	Nivel de referencia	47.62	Nivel de referencia	46.03	Nivel de referencia	41.27	Nivel de referencia
Si	60%	4233.73	78.89	1.99 (0.96-4.15)	0.056	0.463	33.33	1.35 (0.64-2.92)	0.463	55.21	1.35 (0.65-2.69)	0.418	61.46	1.96 (0.95-3.74)
ANTICOCCIDIALES AL														
No	89%	6248	67.88	Nivel de referencia	26.95	Nivel de referencia	78.1	Nivel de referencia	50.35	Nivel de referencia	54.61	Nivel de referencia	49.84	Nivel de referencia
Si	11%	12450	93.75	2.57 (0.68-14.51)	0.18	0.006**	100	2.53 (0.95-23.80)	0.37	66.67	1.96 (0.64-6.75)	0.219	61.11	1.30 (0.43-4.21)
EDAD DE LAS AVES														
Más de 46 días	33%	3001*	58	Nivel de referencia	26.92	Nivel de referencia	70	Nivel de referencia	36.54	Nivel de referencia	40.38	Nivel de referencia	44	Nivel de referencia
Menos de 35 días	34%	12388*	92.31	6.73 (2.32-22.64)	0.001**	0.672	94.23	4.68 (1.48-17.84)	0.004**	57.41	2.32 (1.00-5.51)	0.011**	72.22	3.79 (1.58-9.41)
De 36 a 45 días	33%	5288*	62.75	1.30 (0.56-3.04)	0.56	0.526	33.96	1.39 (0.56-3.52)	0.526	62.26	2.94 (1.21-6.63)	0.035*	52.83	1.65 (0.71-3.65)
TIPO DE ALIMENTACION														
Libre (Ad libitum)	36%	9226.29	106.9	Nivel de referencia	25.66	Nivel de referencia	80.03	Nivel de referencia	55.17	Nivel de referencia	65.52	Nivel de referencia	43.1	Nivel de referencia
Controlada	64%	5944.36	48.42	0.42 (0.18-0.93)	0.022*	0.373	33.66	1.45 (0.67-3.23)	0.373	50.5	0.83 (0.41-1.66)	0.623	49.5	0.52 (0.25-1.06)
TIEMPO DE														
Mayor a 68 días	23%	7170.14	86.67	Nivel de referencia	30.56	Nivel de referencia	96.67	Nivel de referencia	58.33	Nivel de referencia	61.11	Nivel de referencia	63.33	Nivel de referencia
Menor a 60 días	40%	10175	58.33	0.54 (0.20-1.42)	0.2	0.817	71.67	0.61 (0.18-1.80)	0.47	43.33	0.55 (0.23-1.36)	0.201	41.67	0.46 (0.18-1.14)
De 61 a 67 días	38%	3454.25	74.6	1.13 (0.40-3.11)	0.61	0.823	28.98	0.84 (0.31-2.32)	0.823	57.14	0.95 (0.35-2.36)	1	65.08	1.18 (0.46-2.99)
VACIO SANITARIO														
Más de 18 días	17%	9256.67	88.89	Nivel de referencia	48.15	Nivel de referencia	88.89	Nivel de referencia	62.96	Nivel de referencia	66.67	Nivel de referencia	66.67	Nivel de referencia
8 a 15 días	50%	6864.56	59.49	0.19 (0.03-0.69)	0.005**	0.172	72.15	0.36 (0.06-1.25)	0.11	46.84	0.52 (0.18-1.38)	0.183	51.9	0.54 (0.19-1.46)
3 a 7 días	33%	7097.64	78.72	0.29 (0.05-1.19)	0.09	0.009**	89.36	0.48 (0.08-2.07)	0.36	54.72	0.71 (0.24-2.02)	0.633	54.72	0.61 (0.20-1.74)
CAL VIVA														
No	27%	5306.98	48.84	Nivel de referencia	37.21	Nivel de referencia	65.12	Nivel de referencia	46.51	Nivel de referencia	51.16	Nivel de referencia	58.14	Nivel de referencia
Si	73%	7960.39	79.09	3.12 (1.41-6.94)	0.002**	0.335	28.45	0.67 (0.30-1.52)	0.335	54.31	1.36 (0.64-2.94)	0.475	58.9	1.26 (0.55-2.70)
FENOLICOS														
No	60%	5024.26	65.17	Nivel de referencia	36.64	Nivel de referencia	78.78	Nivel de referencia	48.42	Nivel de referencia	46.42	Nivel de referencia	65.17	Nivel de referencia
Si	20%	9881.25	78.13	2.26 (0.84-6.84)	0.09	0.835	34.38	1.82 (0.60-6.72)	0.33	53.13	1.21 (0.50-2.92)	0.687	65.63	2.02 (0.82-5.19)
FORMOL														
No	55%	6751.44	70.37	Nivel de referencia	36.78	Nivel de referencia	83.95	Nivel de referencia	48.28	Nivel de referencia	52.87	Nivel de referencia	61.73	Nivel de referencia
Si	25%	4913.25	65	0.98 (0.42-2.34)	1	0.82	75	0.84 (0.32-2.28)	0.705	52.5	0.89 (0.44-2.24)	1	60	1.11 (0.49-2.57)
FLAMEADO														
No	59%	4035.03	61.36	Nivel de referencia	31.91	Nivel de referencia	78.41	Nivel de referencia	44.68	Nivel de referencia	45.74	Nivel de referencia	54.55	Nivel de referencia
Si	41%	11163.54	83.08	3.61 (1.61-8.65)	0.001**	0.862	29.23	0.88 (0.41-1.85)	0.862	63.08	2.11 (0.64-7.26)	0.025*	69.23	2.85 (1.31-5.51)
AMONIO CUATERNARIO														
No	89%	6861.74	71.85	Nivel de referencia	34.75	Nivel de referencia	82.22	Nivel de referencia	53.19	Nivel de referencia	55.32	Nivel de referencia	51.85	Nivel de referencia
Si	11%	6866	61.11	0.71 (0.23-2.33)	0.59	0.101	66.67	0.54 (0.17-1.91)	0.25	44.44	0.71 (0.23-2.12)	0.618	55.56	1.01 (0.34-3.13)
OTROS DESINFECTANTES														
No	94%	4008.33	70.83	Nivel de referencia	32	Nivel de referencia	79.86	Nivel de referencia	52.67	Nivel de referencia	52.67	Nivel de referencia	54.86	Nivel de referencia
Si	6%	7127.33	66.67	0.94 (0.19-6.06)	1	0.277	88.89	2.42 (0.31-111.03)	0.69	44.44	0.72 (0.14-3.49)	0.738	44.44	0.72 (0.14-3.49)