

VALIDEZ Y EXTENSION DE LA ESPECIE
***Eimeria perforans* (LEUCKART, 1879) SLUITER Y**
SWELLENGREBEL, 1912 PARASITO INTESTINAL
DEL CONEJO

Por: Antonio Martínez Fernández
Jaime de Andrés Rodríguez
Miguel Cordero del Campillo
Benito Aller Gancedo

INTRODUCCION

Sobre la especie *Eimeria perforans* cayó siempre la idea de la pluralidad. En principio, porque a partir de la descripción por LEUCKART (1879) de *Coccidium perforans*, y hasta pasado el primer cuarto del siglo actual, todas las eimerias intestinales del conejo fueron llamadas *perforans* por los investigadores de turno. En segundo lugar, porque, pasado el primer cuarto del siglo actual, al estudiarse las especies intestinales de *Eimeria* que afectan al conejo, se ha descrito más de una con características englobadas en el «complejo perforans», cayéndose probablemente en el error contrario a la primera fase.

Las descripciones admitidas de esta especie se deben a KESSEL y JANKEWICZ (1931), KHEISSIN (cit. por PELLERDY, 1965) y PASTUSZKO (1963). El ciclo endógeno fue estudiado por RUTHERFORD (1943) y KHEISSIN (1946). La multiplicidad de especies con características próximas a *perforans* se produce como consecuencia de descripciones basadas solamente en la morfología de los ooquistes. Así denuncian MAROTEL

y GUILHON *E. nana*, en 1941, nombre sustituido, por ocupación previa, por el de *E. lugdunumensis* MAROTEL y GUILHON, 1942; y *E. nagpurensis* GILLI y RAY, 1960. Esta multiplicidad de especies próximas, se ve justificada por la dificultad de inclusión en *E. perforans*, de muchos de los ooquistes morfológicamente afines a ella y no encuadrables en otras especies, cuando se realizan exámenes sistemáticos de muestras de campo (ANDRÈS, 1969).

Por las razones anteriormente expuestas, parece justificable la realización de un estudio morfológico y estadístico de más de una generación de ooquistes, producidos a partir de una infección monoquistica. El trabajo presente consiste en el estudio de 1.000 ooquistes por período patente de cada una de las dos infecciones consecutivas, experimentalmente producidas en un mismo animal.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron conejos libres de coccidios obtenidos por el siguiente procedimiento. Se aislaron hembras recién cubiertas con una tasa de infección menor de 100 ooquistes por gramo de heces. Se colocaron en jaulas metálicas susceptibles de esterilización mediante flameado, y se sometieron a un tratamiento continuado de sulfametazina al 0,2 %, en el agua de bebida. Las jaulas se esterilizaron cada segundo día y se controló diariamente la eliminación de ooquistes que fue descendiendo hasta que, a los quince días, se hizo nula. La alimentación consistió en un granulado comercial con un coccidiostático incorporado. La aplicación de sulfametazina se suspendió dos días antes del tiempo previsto para el parto, continuándose una semana *post partum*.

El aislamiento de un sólo ooquiste se realizó por el método descrito por DAVIES, JOYNER y KENDALL (1963), a partir de las heces de un conejo con un parasitismo moderado por *E. perforans* y *E. media*. El ooquiste elegido fue un ejemplar de *E. perforans* de 18 × 12 micras, de paredes paralelas, polos achatados, sin micropilo visible y con el cuerpo residual ooquistico formado por unos pocos gránulos.

La administración al conejo se realizó en una cápsula de gelatina dentro de la cual iba el ooquiste en su soporte de agar. La infección tuvo éxito, pero proporcionó un número de ooquistes insuficientes para proseguir la experiencia. En consecuencia, se procedió a reinfectar el

mismo conejo, con el propio material coccidiano obtenido de él. Las heces eliminadas durante los tres primeros días de esta reinfección, proporcionaron suficiente material para el total del resto de la experiencia. Los ooquistes de las mismas se purificaron mediante flotación en solución salina saturada y centrifugación, esporulándose en placas con dicromato potásico al 2 %, durante 95 horas a 26° C.

A lo largo de toda la experiencia se mantuvo al animal en el que se logró la infección monoquística, en condiciones que garantizaron la imposibilidad de penetración incontrolada de ooquistes (esterilización de jaulas cada segundo día, habitaciones separadas, manipulación con guantes y botas distintas para cada operación, alimentación esterilizada, etcétera). Similares precauciones se tomaron con el resto de los animales experimentales.

Antes de realizar la infección experimental, los ooquistes se lavaron mediante centrifugaciones sucesivas, para eliminar todo vestigio de dicromato potásico. El número de ooquistes necesarios se ajustó mediante recuento de alícuotas en cámara McMASTER, mientras se mantenía la suspensión de ooquistes agitada magnéticamente.

Del mismo modo que se utilizó un solo conejo como donante de ooquistes, se infectó un solo conejo también, en la idea de suprimir todo factor de variabilidad debido a peculiaridades reaccionales de diferentes hospedadores. El conejo experimental tenía dieciocho días de edad. Previamente se había comprobado la ausencia de toda infección coccidiana (análisis coprológico).

La dosis infectante se ajustó a 1.000 ooquistes, suspendidos en agua, administrándose mediante sonda buco-gástrica. A los sesenta días se aplicó una nueva dosis de 50.000, por el mismo procedimiento.

Tres días después de cada infección se comenzó la recogida de las heces totales producidas cada veinticuatro horas. El número de ooquistes por gramo de heces se determinó por el método de McMASTER, siguiendo la modificación usual en nuestro laboratorio (CORDERO, 1958). La recogida de ooquistes para estudio se llevó a cabo por el método de flotación-centrífuga; la esporulación, como se indicó más arriba. El tiempo de esporulación fue determinado por observaciones microscópicas con doce horas de intervalo.

El estudio morfológico se hizo a 100 X sobre extensiones de ooquistes centrifugados a partir de las placas de esporulación. Las mediciones se realizaron mediante ocular micrométrico con un valor por división de

1,42 micras, medida que se toma para la separación de las clases. Los ooquistes, hasta completar 100 por muestra y día se midieron y observaron según iban apareciendo en el campo microscópico. La única precaución que se tomó (CORDERO, loc. cit.) fue que estuvieran apoyados por su eje mayor; para lograr esto, a veces fue necesario tocar ligeramente el cubre con un pincel o aguja.

Las determinaciones estadísticas se realizaron por el método recomendado por QUENOUILLE (1959). Se ordenaron las observaciones diarias en clases y frecuencias. Se halló la media aritmética, la desviación estandar, el error estandar de la media y el error estandar de la desviación. Se estudió la presencia, forma y tamaño del micropilo y cuerpo residual, o la ausencia de uno u otro. No se sometieron a estudio estadístico estas observaciones.

RESULTADOS

En la primoinfección, el período de prepatencia fue de seis días, distribuyéndose la patencia de la siguiente manera: Una primera fase de eliminación alta, de siete días de duración, durante la cual se eliminaron el 94,8 % de los ooquistes totales, a una media de 52.400 ooquistes/g. A continuación hubo una fase de eliminación media, de seis días de duración, en la que se eliminaron un 4,5 % de los ooquistes totales, a una media de 2.400 ooquistes/g. Finalmente, la eliminación remanente continuó durante dieciséis días, con un 0,6 % de los ooquistes totales y una media diaria de 370 ooquistes/g.

La esporulación, en cifras medias, se produjo en un 90 % de los ooquistes a las cuarenta y ocho horas.

En la reinfección el período prepatente fue de cinco días, la eliminación alta de siete días, totalizando un 84,1 % de los ooquistes totales, con una media diaria de 411.247 ooquistes/g. La eliminación media duró 6-7 días, significando el 13,6 % de los ooquistes totales, a razón de 66.434 ooquistes/g. La eliminación remanente se prolongó por más de dieciséis días, fue un 2,3 % de la totalidad, con una media de 11.367 ooquistes/g.

Morfológicamente, los ooquistes observados pertenecían a todos los tipos habituales en el «complejo perforans». La distribución de frecuencias de longitud y anchura de los 2.000 ooquistes observados se resumen en

las tablas I y II. En la primoinfección, se obtuvo una longitud media de $13,83 \pm 0,22$ con una desviación típica de $6,75 \pm 0,17$, equivalente a 19,6 micras. La anchura media fue de $9,16 \pm 0,15$, con una desviación típica de $4,6 \pm 0,12$, que en micras es 13,0. El índice longitud/anchura hallado fue de 1,50 sobre las medias. Las oscilaciones fueron de 12,7 a 28,4 micras para las longitudes y de 9,9 a 19,8 micras para las anchuras.

En la reinfección se obtuvo una longitud media de $13,3 \pm 0,19$ con una desviación típica de $5,9 \pm 0,15$ igual a 18,8 micras. La anchura media fue de $9 \pm 0,13$ con una desviación típica de $4 \pm 0,10$, igual a 12,7 micras. El índice longitud/anchura fue de 1,47. Las oscilaciones encontradas fueron de 8,5 a 29,4 micras para las longitudes y de 8,5 a 21,3 micras para las anchuras.

A la variabilidad notable en el tamaño correspondió también una marcada diversidad en la forma del cuerpo residual ooquistico. En la primera infección se encontró que un 61,5 % de los ooquistes tenía cuerpo residual esférico, de un tamaño medio de 2,9 micras; un 11,5 % tenía el cuerpo residual ovalado, con unas dimensiones de 3,6 por 2,2 micras; un 2 % tenía el cuerpo residual formado por gránulos dispuestos en forma triangular; un 22 % poseía el cuerpo residual también formado por varios gránulos, cinco frecuentemente, dispuestos en forma de paréntesis; finalmente, un 3 % de los ooquistes carecían de cuerpo residual ooquistico.

La evidencia de micropilo dependió en gran manera del tratamiento de los ooquistes. Cuando en algunas muestras se deformaron los ooquistes, hecho que atribuimos al tratamiento salino y a la centrifugación, apareció micropilo en un 32-34 % de los ooquistes, con un tamaño medio de 3,5 micras. En las muestras normales, el número de ooquistes con micropilo evidente fue de un 2 %.

En la reinfección, el cuadro de variaciones morfológicas fue similar; un 70,2 % tenía cuerpo residual esférico de 2,4 micras de media; un 14 % de forma oval, de 3,5 por 1,8 micras; un 2 % de forma triangular; un 10,8 % tenía cuerpo residual puntiforme; y, un 3 %, carecía de todo cuerpo residual ooquistico.

Finalmente, si se traza una curva con los valores de frecuencias en las abscisas y los de las clases en las ordenadas, de las cifras de longitud de los 1.000 ooquistes medidos en cada infección, cuadros I y II, se aprecia que la curva es bimodal, con dos máximos en las clases 15 y 13 (21,3 y 18,4 micras).

DISCUSION

Es sorprendente que una estirpe de *E. perforans*, obtenida a partir de un solo ooquiste de tamaño medio y sin casi cuerpo residual ooquístico, produzca una tan significativa multiplicidad de formas del cuerpo residual y una variación tan notable en cuanto a tamaños. Prácticamente, con nuestros resultados coinciden las cifras tipo dadas por otros autores para la especie. Nuestro estudio confirma lo ya deducible de la bibliografía sobre este coccidio (cuadro III), que se trata de una especie pleomórfica —en la extensión que en coccidios puede tener esta palabra— y, por esta razón, se han descrito formas como pertenecientes a más de una especie. La bimodalidad de la curva de frecuencias de las clases es un argumento más en apoyo, tanto de lo anteriormente dicho, como de la dificultad en la interpretación como *E. perforans* de muchos de los ooquistes que se encuentran en las infestaciones naturales.

La clase de mayor frecuencia, 20,3 micras de longitud, es muy próxima a la media normal atribuida en la bibliografía a *E. perforans*. La segunda clase de mayor frecuencia (18 micras) está muy cerca de la media atribuida por MAROTEL y GUILHON (loc. cit.) para *E. lugdunumensis*. Si, además de esto, consideramos que las demás características morfológicas de *E. lugdunumensis* las hallamos entre los ooquistes de nuestras infecciones puras, de acuerdo con lo ya apuntado por PELLERDY (loc. cit.), esta especie bien podía pasar a la sinonimia de *E. perforans*.

Ante nuestros resultados, sometemos también a crítica la validez de *E. nagpurensis* GILL y RAY (1960). Las longitudes atribuidas para esta especie (entre 20 y 26 micras) caen (véase el cuadro I de nuestros resultados) entre las clases 15 y 19, totalizando 418 observaciones sobre 1.000. La anchura de esta especie, de 10 a 15 micras cae dentro de más de 900 observaciones del cuadro I de nuestros resultados. En cuanto a la ausencia de cuerpo residual ooquístico, como dato taxonómico diferencial, no lo encontramos como característica unívoca. En nuestros resultados se encuentran un 3 % de los ooquistes carentes de cuerpo residual, y un gran número (de 10 a 22 %) tiene el cuerpo residual reducido a unos pocos gránulos insignificantes y sin agrupar.

Por razones que se alcanzarán a cualquier experto en el problema, no consideramos en el mismo caso a *E. exigua* YAKIMOFF, 1934 (véase PELLERDY loc. cit.), aunque para su entera identidad, faltan datos similares a los obtenidos en este trabajo para *E. perforans*.

Concluimos que, la admisión de las especies sometidas a crítica en esta discusión, debe ser provisional mientras no se realice el estudio de las fases endógenas y no se puedan establecer otro tipo de diferencias. Una vez más se corrobora que los ooquistes sólo pueden servir para diferenciar especies en presencia de características morfológicas inequívocas. No, en cambio, cuando hay similitudes grandes o considerables variaciones morfológicas.

De acuerdo con la magnífica obra de PELLERDY (loc. cit.) y como consecuencia del presente trabajo y uno anterior ANDRES (loc. cit.), aconsejamos la siguiente clave para la identificación, a groso modo, de los ooquistes de coccidios del conejo doméstico en el Noroeste de nuestro país.

- | | | |
|---|---|-------------------------|
| 1. Ooquistes ovoideos | 2 | |
| Ooquistes elipsoideos o subcilíndricos | 4 | |
| Ooquistes piriformes u oblicuos | 6 | |
| Ooquistes esféricos o esferoideos, esporonte llenando todo el ooquiste; sin cuerpo residual ooquistico cuando esporulados; 14×12 micras de media | | <i>E. exigua</i> |
| 2. Con micropilo y cuerpo residual ooquistico; micropilo provisto de formaciones labiformes | | <i>E. magna</i> |
| Con micropilo normal y cuerpo residual ooquistico. | | <i>E. matsubayashii</i> |
| Con micropilo y sin cuerpo residual ooquistico | 3 | |
| 3. Con micropilo prominente | | <i>E. irresidua</i> |
| Con micropilo liso, inaparente a veces | | <i>E. stiedae</i> |
| 4. Sin micropilo evidente; con cuerpo residual ooquistico variable, esférico, triangular o compuesto por una cadena de gránulos | | <i>E. perforans</i> |
| Con micropilo y cuerpo residual ooquistico bien manifiesto | 5 | |
| 5. Con tamaño que no sobrepasa las 36 micras; índice longitud/anchura inferior a dos | | <i>E. media</i> |
| Con tamaño superior a 32 micras; índice longitud/anchura superior a dos | | <i>E. neoleporis</i> |
| 6. Con cuerpo residual ooquistico | | <i>E. intestinalis</i> |
| Sin cuerpo residual ooquistico | | <i>E. piriformis</i> |

RESUMEN

Ante el número de especies de *Eimeria* parásitas del conejo, próximas a *E. perforans*, y dado que los oocistos de esta especie son bastante pleomórficos, se realizó un estudio biométrico y estadístico de 1.000 oocistos por infección, en el tercero y cuarto pase, y de una estirpe de esta especie. La estirpe se obtuvo por infección a partir de un solo oociste. Se estudiaron los oocistos eliminados en una primoinfección por dosis moderada y de la reinfección con masas. De los resultados del trabajo se concluye que *E. lugdunumensis*, *E. nagpurensis* y *E. perforans*, no pueden ser diferenciadas entre sí, sobre la base de la morfología de sus oocistos. La validez como especie de *E. lugdunumensis* y *E. nagpurensis* debe ser demostrada mediante estudios histológicos e inmunológicos.

RESUME

Vu le nombre d'espèces d'*Eimeria* parasitaires dans le lapin et proches de *E. perforans* et étant donné que les oocystes de cette espèce sont assez pléomorphiques, on effectua une étude biométrique et statistique de 1.000 oocystes par infection, dans la troisième et la quatrième passage d'une souche de cette espèce. La souche fut obtenue par infection à partir d'un seul oocyste. On étudia les oocystes éliminés dans une première infection avec de petites doses, et la réinfection avec de grandes doses.

D'après les résultats du travail, on tire la conclusion que les *E. lugdunumensis*, les *E. nagpurensis* et les *E. perforans* ne peuvent être différenciées entre elles si l'on considère la morphologie de leurs oocystes.

La validité comme espèces d'*E. lugdunumensis* et d'*E. nagpurensis* doit être démontrée au moyen d'études histologiques et immunologiques.

SUMMARY

As the number of *Eimeria* spp. from rabbit which are morphologically near to *E. perforans* is comparatively large, and presuming that the oocysts of the mentioned specie are rather pleomorphic, the authors have performed a biometric and statistic study of 1,000 oöcysts from each of the 3rd and 4th passages of a pure strain. The strain was made up by

isolating a single oöcyst, and the study was carried through a moderate primary infection and a massive challenge. The pleomorphism of this specie, specially in the oöcystic residual body was observed. From the results the authors concluded that *E. lugdunumensis*, *E. nagpurensis* and *E. perforans* can not be differenciated on the sole bases of their oöcyst morphology. The validity of *E. lugdunumensis* and *E. nagpurensis* as species should be adchieved through histological and immunological research.

TABLA I - PRIMOINFECCION

Frecuencia de longitudes

Días p. i.	9	11	12	13	15	17	18	19	25	26	Total frecuencias
Longitudes (clases)											
20	2	1		2				2			7
19	2	2	1					2			7
18	5	1	6		1		1	2	1	2	19
17	6	4	4	4	3	6	7	8	5	4	51
16	17	15	8	11	14	9	6	6	10	9	105
15	28	30	23	26	34	19	18	18	21	19	236
14	8	15	13	23	16	16	19	10	18	15	153
13	5	12	23	17	17	24	30	24	12	34	198
12	17	16	16	14	13	13	8	8	22	10	137
11	8	2	4	3	2	8	9	4	4	4	48
10	2	1	1			5	2	14	7	2	34
9		1	1					2		1	5
TOTAL 1.000 ooquistes											

Frecuencia de anchuras

Días p. i.	9	11	12	13	15	17	18	19	25	26	Total frecuencias
Anchuras (clases)											
14	2										2
13	1					1					2
12	10	3			1	1		2		2	19
11	9	6		4	13	6	8	14	4	5	69
10	42	63	30	39	46	47	28	10	35	26	366
9	27	19	34	33	33	28	28	36	25	45	318
8	9	8	33	21	7	17	25	30	35	19	204
7		1	3	3			1	8	1	3	20
TOTAL 1.000											

Valor de las clases en micras = $n \times 1,42$.

TABLA II - REINFECCION
Frecuencia de longitudes

Días p. i.	6	7	8	9	12	13	14	16	18	21	Total frecuencias
Longitudes (clases)											
21	1										1
20	2									1	3
19										1	1
18			4	1					2	1	8
17	6	1	1	3	5	4	2	5	7	5	39
16	6	5	8	8	6	5	9	10	9	16	62
15	10	14	18	24	27	28	28	24	32	31	236
14	26	19	19	19	15	17	12	10	11	5	153
13	25	23	23	18	19	23	21	21	19	14	206
12	10	10	11	17	19	16	18	21	17	11	150
11	9	13	7	7	8	6	7	9	1		67
10	4	11	7	2			3		2	1	30
9	1	3	1	1	1	1					8
8		1									1
6			1								1
1.000 ooquistes											

Frecuencia de anchuras											
Días p. i.	6	7	8	9	12	13	14	16	18	21	Total frecuencias
Anchuras (clases)											
15	1										1
14	1								1		2
13	1										1
12	9		6		1					3	19
11	14		7		1	3	4		7	8	44
10	15	7	20	13	28	33	20	61	72	61	330
9	32	41	33	42	49	32	31	23	14	6	303
8	22	47	27	42	17	27	40	16	4	7	253
7	5	5	7	3	3	4	4		2	1	34
6					1	1	1				3
TOTAL 1.000 ooquistes											

Valor de las clases en micras = $n \times 1,42$.

TABLA III

AUTORES	FORMA	Variaciones de tamaño	Media	L/A	Cuerpo residual ooquistico
<i>E. perforans</i> KESSEL y JANKIEWICZ, 1931	más elipsoide que ovoide	15 a 29 × 11 a 17	22,7 × 14,2	1,57	oval o esférico de 2,2 micras
<i>E. perforans</i> KHEISSIN (PELLERDY, 1966)	más elipsoide que ovoide	13,3 a 30 × 10,7 a 17,3	21,5 × 14,5		puede estar presente de 2,3 micras
<i>E. perforans</i> MAROTEL y GUILHON, 1941	elipsoide, polos estrechos	25 a 30 × 14 a 17		1,6-1,8	de espesor casi igual al de los esporocistos
<i>E. lugdunumensis</i> MAROTEL y GUILHON, 1942 (sinónimo, <i>E. nana</i> MAROTEL y GUILHON, 1941)	elipsoide, polos anchos	14 a 20 × 12 a 14		1,3-1,4	globoso y minúsculo, 1/3 del esporocisto
<i>E. nagpurensis</i> GILL y RAY, 1960	en forma de barril	20 a 26 × 10 a 15	23 × 13		sin cuerpo residual
<i>E. perforans</i> ANDRES, 1969	elipsoide	15,6 a 31 × 9,9 a 18,4	21,7 × 13,3		presente, de forma variada
<i>E. perforans</i> Nosotros	elipsoide	8,5 a 29,4 × 8,5 a 21,3	19,05 × 12,8	1,4-1,5	variado, véase texto.

BIBLIOGRAFIA

ANDRES RODRIGUEZ, J. de (1969).—Sobre epizootiología de las coccidiosis del conejo doméstico en la provincia de León. *Tesis Doctoral*. Universidad de Santiago.

CORDERO DEL CAMPILLO, M. (1958).—Estudios sobre *Eimeria falciiformis* (Eimer, 1870) parásito del ratón. *Ann. Fac. Vet. León*, 4: 55-73.

DAVIES, S. F. M., JOYNER, L. P. y KENDALL, S. B. (1963).—*Coccidiosis* p. 226. Oliver and Boyd. London.

GILL, B. S. y RAY, H. N. (1960).—The coccidia of the domestic rabbit and the common field hare of India. *Proc. Zool. Soc. Calcuta*, 13: 128-143.

KESSEL, J. F. y JANKIEWICZ, H. A. (1931).—Species differentiation of the coccidia of the domestic rabbit based on a study of the cöcysts. *Amer. J. Hyg.*, 14: 304-324.

KHEISSIN, E. M. (1946).—Duration of the life-cycle in rabbit *Coccidia*. *C. R. Acad. Sci.* 52: 557-560.

LEUCKART, R. (1879).—*Die Parasiten des Menschen und die von ihnen herrührenden Krankheiten*. Tomo I, p. 225. C. F. Winter. Viena.

MAROTEL, G. y GUILHON, J. (1941).—Recherches sur la coccidiose du Lapin. *Rec. Med. Vet.*, 117: 321-328.

_____ y _____. (1942).—Note au sujet des coccidies du Lapin. *Rec. Med. Vet.*, 118: 270.

PASTUSKO, J. (1963).—Kokcydiozy królików w Polsce (Coccidiosis del conejo en Polonia). *Pol. Arch. Weteryn.*, 8: 129-140.

PELLERDY, L. P. (1965).—*Coccidiu and Coccidiosis* p. 252 Akadémiai Kiadó. Budapest.

QUENOUILLE, M. H. (1959).—*Rapid statistical calculations*. Method 7. Charles Griffin and Co. Ltd. London.

RUTHERFORD, R. L. (1943).—The life-cycle of four intestinal coccidia of the domestic rabbit. *J. Parasit.* 29: 10-32.