

Identification and speciation of oocysts in turkeys

Location of the lesions in the intestine helps in identification and speciation of *Eimeria* oocysts. Without any history of gross lesions, the speciation of oocysts cannot be determined solely based on the size of the oocysts, as there is an overlap in oocyst size and shape between different species. The availability of molecular diagnostic tools, such as PCR and sequencing, helps in discerning the *Eimeria* species.

BY VIJAY DURAIRAJ, EMILY BARBER, STEVEN CLARK AND RYAN VAN DER VEEN

Table 1 — Length, width and oocyst shape of common *Eimeria* species.

<i>Eimeria</i> species	Length	Width	Shape
<i>E. adenoeides</i>	18.9-31.3	12.6-20.9	Ellipsoidal
<i>E. gallopavonis</i>	22.7-32.7	15.2-19.4	Ellipsoidal
<i>E. meleagrititis</i>	15.8-26.9	13.1-21.9	Ovoid
<i>E. dispersa</i>	21.8-31.1	17.7-23.9	Broadly oval
<i>E. meleagridis</i>	20.3-30.8	15.4-20.6	Ellipsoidal
<i>E. innocua</i>	18.57-25.86	17.34-24.54	Subspherical
<i>E. subrotunda</i>	16.48-26.42	14.21-24.44	Subspherical

Reference: Cervantes HM, McDougald, LR, Jenkins MC. Coccidiosis. In: Diseases of poultry. 14th ed. Ames (IA): Wiley-Blackwell. p. 1193–1216; 2020.

Coccidiosis is one of the most economically detrimental diseases in the turkey industry. Coccidiosis is caused by *Eimeria* species, a common intracellular protozoon. In commercial production systems, turkeys may be screened by faecal flotation or mucosal intestinal scrapings at regular intervals to identify *Eimeria* oocysts. An increase in oocyst count during faecal flotation, especially if associated with clinical signs, raises concerns about turkey coccidiosis. In this diagnostic report faecal samples from a 7-weekold turkey flock were investigated following an increase in the number of *Eimeria* oocysts detected. Faecal flotation followed by DNA extraction, PCR and sequencing, confirmed the oocysts as *E. meleagrititis*, a highly pathogenic strain.

Ubiquitous

Intracellular protozoan parasites of the genus *Eimeria* are ubiquitous and prevalent in intensive turkey production facilities. They affect the production and performance of turkeys and significantly impact profitability. Economic losses are not just attributed to mortalities, but include poor feed conversion efficiency, lowered body weight, non-uniform sized birds, vaccinations, treatment and medications. Based on the 2022 turkey industry annual report, turkey coccidiosis ranks number nine among the top health issues of the US turkey industry. Seven *Eimeria* species, including *E. adenoeides*, *E. gallopavonis*, *E. meleagrititis*, *E. dispersa*, *E. meleagridis*, *E. innocua*, and *E. subrotunda* are found in turkeys. Turkey coccidiosis is controlled and managed with anticoccidial programmes that include ionophores, in-feed medication, vaccination or phytonutrient supplements. In commercial turkey production systems, samples collected from the flock may be screened at various points in time. An increase in the number of oocysts observed

raises concerns about coccidiosis. In such cases, it may be important to know which *Eimeria* species is involved. In general, gross lesions of turkey coccidiosis are not as pronounced as in chickens. In cases of clinical coccidiosis, the gross lesions serve as a guide to determine the *Eimeria* species based on pathological manifestations. However, subclinical coccidiosis does not induce classical lesions of specific *Eimeria* species in the targeted organs but still affects production parameters. Identification and speciation of turkey *Eimeria* species can be done based on the location of lesions in the intestine, along with size and shape of the oocysts. In instances where gross lesions are not evident and with mixed infections, identification of *Eimeria* species oocysts is primarily done based on the size and shape of the oocysts with advanced molecular tools like PCR and sequencing.

Case report

In December 2022, faecal samples were submitted from a 7-week-old-turkey flock with a history of enteritis and a slight increase in mortality. Coccidiosis was suspected based on the detection of an increased number of *Eimeria* oocysts at different points in time with an in-house flotation test. Faecal samples were collected and submitted to investigate and determine the species of the *Eimeria* oocysts.



Subclinical coccidiosis does not induce high mortalities or classical lesions in the target organs, but still affects production performance. PHOTO: MARCEL VAN HOORN

Screening of faecal samples with faecal flotation Fecal samples were diluted in saturated sucrose solution and strained using 100 pm cell strainer (Corning). The filtrate (500 ul) was placed on McMaster slides and allowed to sit for 30 minutes and then examined under the microscope. DNA was extracted by PCR from 200uL of post-faecal float material using QIAamp Fast DNA Stool Kit following the manufacturer's guidelines with the addition of using glass beads to rupture oocysts, along with 30 pl of proteinase K (Qiagen). Each 25 pL PCR reaction consisted of 1x GoTaq G2 Hot Start Master Mix, 0.4 pM of each primer, and 5 pL of template. PCR was performed against the

mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (mtCOI) gene of turkey *Eimeria* species based on the reference publications. On microscopic investigation of faecal flotation samples in the McMaster chamber, *Eimeria* oocysts were detected. In the PCR performed six *Eimeria* species (*E. adenoides*, *E. gallopavonis*, *E. meleagritidis*, *E. dispersa*, *E. meleagridis*, and *E. innocua*), amplicons were generated only with the primers targeted on *E. meleagritidis* and confirmed by sequencing.

Finding the culprit

Eimeria species are strictly host and site specific. Location of the lesions in the intestine helps with the identification and speciation of *Eimeria* oocysts. However, in this study, faecal samples were investigated without any history of gross lesions. Even though faecal flotation revealed *Eimeria* oocysts in the faeces, the species of oocysts cannot be determined solely based on the size of the oocysts as there is an overlap in oocyst size and shape between different species (Table 1). The availability of molecular diagnostic tools, such as PCR and sequencing, helped in determining the *Eimeria* species. Among *Eimeria* species, three are considered highly pathogenic, including *E. meleagritidis*, *E. adenoides* and *E. gallopavonis*. *E. meleagritidis* affects the duodenum and causes watery and mucoid content, fibrin strands, small blood clots, hemorrhage, diphtheritic membranes and necrosis. With severe infection, the above lesions extend to the jejunum. *E. meleagritidis* infections cause clinical signs such as listlessness, dehydration, diarrhea with mucus or blood-tinged faeces. It should be noted that the presence of few oocysts in the faecal sample does not confirm that the flock has clinical coccidiosis. Clinical coccidiosis is accompanied by increased mortalities, classical lesions in the target organs and decreased production performance. Subclinical coccidiosis does not induce high mortalities or classical lesions in the target organs, but still affects production performance. Although the location of the lesions in the intestinal tract was unknown, faecal flotation along with PCR and sequencing helped with the identification and speciation of *E. meleagritidis* oocysts in this turkey flock.

Identyfikacja i specjacja oocyst u indyków

Lokalizacja zmian w jelicie pomaga w identyfikacji i specjacji oocyst *Eimeria*. Bez historii poważnych zmian, specjacja oocyst nie może być określona wyłącznie na podstawie wielkości oocyst, ponieważ wielkość i kształt oocyst nakładają się na siebie u różnych gatunków. Dostępność molekularnych narzędzi diagnostycznych, takich jak PCR i sekwencjonowanie, pomaga w rozróżnianiu gatunków *Eimeria*.

VIJAY DURAIRAJ, EMILY BARBER, STEVEN CLARK I RYAN VAN DER VEEN

Tabela 1 - Długość, szerokość i kształt oocyst występujących powszechnie gatunków *Eimeria*.

Gatunki <i>eimeria</i>	Długość	Szerokość	Kształt
<i>E. adenoides</i>	18.9-31.3	12.6-20.9	Elipsoidalny
<i>E. gallopavonis</i>	22.7-32.7	15.2-19.4	Elipsoidalny
<i>E. meleagritidis</i>	15.8-26.9	13.1-21.9	Owalny
<i>E. dispersa</i>	21.8-31.1	17.7-23.9	Szeroko owalny
<i>E. meleagridis</i>	20.3-30.8	15.4-20.6	Elipsoidalny
<i>E. innocua</i>	18.57-25.86	17.34-24.54	Podkulisty
<i>E. subrotunda</i>	16.48-26.42	14.21-24.44	Podkulisty

Reference: Cervantes HM, McDougald, LR, Jenkins MC. *Coccidiosis. In. Diseases of poultry. 14th ed. Ames (IA): Wiley-Blackwell. p. 1193–1216; 2020.*

Kokcydioza jest jedną z najbardziej szkodliwych ekonomicznie chorób w przemyśle indyczym. Kokcydioza jest wywoływana przez gatunki *Eimeria*, powszechne wewnątrzkomórkowe pierwotniaki. W komercyjnych systemach produkcyjnych indyki mogą być badane za pomocą flotacji kału lub zeszkobin z błony śluzowej jelit w regularnych odstępach czasu w celu identyfikacji oocyst *Eimeria*. Wzrost liczby oocyst podczas flotacji kału, zwłaszcza w połączeniu z objawami klinicznymi, budzi obawy o kokcydiozę indyków. W niniejszym raporcie diagnostycznym zbadano próbki kału z 7-tygodniowego stada indyków po wykryciu wzrostu liczby oocyst *Eimeria*. Flotacja kału, a następnie ekstrakcja DNA, PCR i sekwencjonowanie potwierdziły, że oocysty to *E. meleagritidis*, wysoce patogenny szczep.

Wszechobecne

Wewnątrzkomórkowe pasożyty pierwotniakowe z rodzaju *Eimeria* są wszechobecne i powszechne w gospodarstwach prowadzących intensywną produkcję indyków. Wpływają one na produkcję i wydajność indyków oraz znacząco wpływają na rentowność. Straty ekonomiczne są przypisywane nie tylko śmiertelności, ale obejmują również niską wydajność konwersji paszy, obniżoną masę ciała, niejednolite rozmiary ptaków, szczepienia, leczenie i leki. Na podstawie rocznego raportu branży indyczej z 2022 r. kokcydioza indyków zajmuje dziewiąte miejsce wśród najważniejszych kwestii zdrowotnych w branży indyczej w USA. U indyków występuje siedem gatunków *Eimeria*, w tym *E. adenoides*, *E. gallopavonis*, *E. meleagritidis*, *E. dispersa*, *E. meleagridis*, *E. innocua* i *E. subrotunda*. Kokcydioza indyków jest kontrolowana i zarządzana za pomocą programów przeciw kokcydiozie, które obejmują jonofory, leki podawane w paszy, szczepienia lub suplementy

fitoskładnikowe. W komercyjnych systemach produkcji indyków próbki pobrane od stada mogą być badane w różnych punktach czasowych. Wzrost liczby obserwowanych oocyst budzi obawy o kokcydiozę. W takich przypadkach ważne może być ustalenie, który gatunek *Eimeria* jest zaangażowany. Ogólnie rzecz biorąc, poważne zmiany w kokcydiozie indyków nie są tak wyraźne jak u kurcząt. W przypadku kokcydiozy klinicznej, zmiany ogólne służą jako wskazówka do określenia gatunku *Eimeria* na podstawie objawów patologicznych. Jednakże, podkliniczna kokcydioza nie wywołuje klasycznych zmian określonych gatunków *Eimeria* w docelowych narządach, ale nadal wpływa na parametry produkcyjne. Identyfikacja i specjacja gatunków *Eimeria* indyków może być przeprowadzona w oparciu o lokalizację zmian w jelicie, wraz z rozmiarem i kształtem oocyst. W przypadkach, w których zmiany chorobowe nie są widoczne i w przypadku zakażeń mieszanych, identyfikacja oocyst gatunków *Eimeria* odbywa się głównie na podstawie wielkości i kształtu oocyst przy użyciu zaawansowanych narzędzi molekularnych, takich jak PCR i sekwencjonowanie.

Opis przypadku

W grudniu 2022 r. przesłano próbki kału od 7-tygodniowego stada indyków z zapaleniem jelit i niewielkim wzrostem śmiertelności. Podejrzewano kokcydiozę na podstawie wykrycia zwiększonej liczby oocyst *Eimeria* w różnych punktach w różnych okresach czasu za pomocą wewnętrznego testu flotacji. Pobrano i przesłano próbki kału w celu zbadania i określenia gatunku oocyst *Eimeria*.



Podkliniczna kokcydioza nie powoduje wysokiej śmiertelności ani klasycznych zmian w narządach docelowych, ale nadal wpływa na wydajność produkcji. FOTO: MARCEL VAN HOORN

Badanie próbek kału za pomocą flotacji kału. Próbkę kału rozcieńczono w nasyconym roztworze sacharozy i odcedzono za pomocą sitka komórkowego 100 pm (Corning). Przesącz (500 ul) umieszczono na szkiełkach McMaster i pozostawiono na 30 minut, a następnie zbadano pod

FINANSOWANE Z FUNDUSZU PROMOCJI MIĘSA DROBIOWEGO

mikroskopem. DNA wyekstrahowano metodą PCR z 200 μ l materiału po kale przy użyciu zestawu QIAamp Fast DNA Stool Kit zgodnie z wytycznymi producenta, z dodatkiem szklanych kulek do rozerwania oocyst, wraz z 30 μ l proteiny K (Qiagen). Każda reakcja PCR o objętości 25 μ l składała się z 1x GoTaq G2 Hot Start Master Mix, 0,4 pM każdego startera i 5 μ l matrycy. PCR przeprowadzono przeciwko mitochondrialnemu genowi podjednostki oksydazy cytochromu c (mtCOI) indyków z gatunku *Eimeria* w oparciu o publikacje referencyjne. W badaniu mikroskopowym próbek kału w komorze McMastera wykryto oocysty *Eimeria*. W przeprowadzonym badaniu PCR sześciu gatunków *Eimeria* (*E. adenoeides*, *E. gallopavonis*, *E. meleagrimitis*, *E. dispersa*, *E. meleagridis* i *E. innocua*), amplikony zostały wygenerowane tylko ze starterami ukierunkowanymi na *E. meleagrimitis* i potwierdzone przez sekwencjonowanie.

Znalezienie winowajcy

Gatunki *Eimeria* są ściśle związane z żywicielem i miejscem. Lokalizacja zmian w jelicie pomaga w identyfikacji i specjacji oocyst *Eimeria*. Jednak w tym badaniu badano próbki kału bez żadnej historii poważnych zmian. Mimo że flotacja kału ujawniła oocysty *Eimeria* w kale, gatunku oocyst nie można określić wyłącznie na podstawie wielkości oocyst, ponieważ wielkość i kształt oocyst nakładają się na różne gatunki (Tabela 1). Dostępność molekularnych narzędzi diagnostycznych, takich jak PCR i sekwencjonowanie, pomogła w określeniu gatunków *Eimeria*. Wśród gatunków *Eimeria* trzy są uważane za wysoce patogenne, w tym *E. meleagrimitis*, *E. adenoeides* i *E. gallopavonis*. *E. meleagrimitis* atakuje dwunastnicę i powoduje wodnistą i śluzowatą treść, nitki fibryny, małe skrzepy krwi, krwotok, błony błoniaste i martwicę. W przypadku ciężkiego zakażenia powyższe zmiany rozciągają się na jelito czcze. Infekcje *E. meleagrimitis* powodują objawy kliniczne, takie jak apatia, odwodnienie, biegunka ze śluzem lub kałem zabarwionym krwią. Należy zauważyć, że obecność kilku oocyst w próbce kału nie potwierdza, że stado ma kliniczną kokcydiozę. Klinicznej kokcydiozie towarzyszy zwiększona śmiertelność, klasyczne zmiany w narządach docelowych i obniżona wydajność produkcyjna. Podkliniczna kokcydioza nie wywołuje wysokiej śmiertelności ani klasycznych zmian w narządach docelowych, ale nadal wpływa na wyniki produkcyjne. Chociaż lokalizacja zmian w przewodzie pokarmowym była nieznana, flotacja kału wraz z PCR i sekwencjonowaniem pomogła w identyfikacji i specjacji oocyst *E. meleagrimitis* w tym stadzie indyków.