

Evaluación de extractos de plantas en el control de infección experimental por coccidios

M. HAMDI^{1*}, E. G. MANZANILLA², S. LÓPEZ-VERGÉ¹ y J.F. PÉREZ¹

¹Departament de Ciència Animal i dels aliments, Facultat Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain; ²Animal & Grassland Research and Innovation Centre, Teagasc; Moorepark, Fermoy, Co. Cork, Ireland

*E-mail: Manel.Hamdi@uab.cat

El presente trabajo se realizó para estudiar el efecto de 6 extractos de plantas a diferentes dosis para controlar la coccidiosis clínica y subclínica en pollitos de carne ecológicos de 0 a 14 días. Este trabajo incluye tres experimentos. En el primer experimento se puso a punto el método de infección experimental utilizando vacunas comerciales para coccidiosis. Se compararon tres vacunas a 3 dosis (x1, x10, x100) usando 120 pollitos distribuidos en 40 jaulas repartidas en 10 tratamientos (4 réplicas/tratamiento). Hypracox® produjo los mejores resultados con una reducción en ganancia de peso (P<0001) y aumento de los ooquistes excretados (P<0001).

El segundo experimento incluyó 16 tratamientos (4 réplicas/tratamiento) para estudiar el efecto de tres extractos de plantas (cinamaldehído, extracto de *Artemisia annua* y timol) suministrados con el pienso a diferentes dosis a animales con infección experimental clínica (x100) y subclínica (x1). Se utilizaron 180 pollitas Hubbard Label Rouge distribuidas en 60 jaulas (3 animales/jaula). No se observó ningún efecto de los extractos de plantas sobre los parámetros productivos.

Como el segundo experimento, el tercer experimento incluyó 16 tratamientos (4 réplicas/tratamiento) pero con 3 nuevos extractos de plantas (cúrcuma, extracto de *Artemisia abshinthium* (ajenjo) y eugenol). Se utilizaron 180 pollitas Hubbard Red label distribuidas en 60 jaulas (3 animales/jaula). Los resultados mostraron que, en comparación a los animales del tratamiento control, la cúrcuma (1000ppm) redujo el número de ooquistes excretados (P < 0.05) en los animales infectados con la dosis x100 de la vacuna. Los pollitos con ajenjo en la dieta a dosis de 1000 ppm mostraron una disminución en la excreción de ooquistes (P < 0.05) los días 4 y 6 post-infección.

Palabras claves: coccidiosis; Eimeria; extractos de plantas; pollo de carne

This study was planned to assess the effect of 6 plant extracts at different doses on clinical and subclinical coccidiosis in organic broiler chickens from 0 to 14 days of age. The study included three experiments. In the first experiment, the experimental infection using an overdose of a commercial vaccine was optimized. Three different vaccines were compared at three different doses (x1, x10, x100) using 120 chicks housed in 40 cages and allocated to 10 treatments (4 replicates/treatment). Hypracox® showed the best results with a low weight gain (P<0001) and an increase in the number of oocysts excreted (P<0001).

In the second experiment the animals were allocated to 16 treatments (4 replicates/ treatment) to study the effects of three plant extracts (cinamaldehyde, *Artemisia annua* extract and thymol) administered in feed at different doses to animals infected with 2 doses of vaccine for clinic (x100) and sub-clinic (x1) effect. Hundred eighty female Hubbard Red label chicks were distributed to 60 cages (3 chicks/cage). None of the plant extracts used had any effect on the productive performance of the chickens.

As for experiment 2, the third experiment included 16 treatments (4 replicates/ treatment) using 3 different plant extracts (curcuma extract, *Artemisia abshinthium* extract and eugenol).

Hundred eighty female Hubbard Red label chicks were distributed to 60 cages (3 chicks/cage). Curcuma extract (1000ppm) reduced the excretion of oocysts in animals infected with the highest dose of vaccine (x100) compared to those uninfected ($P < 0.05$). On the other hand, the chicks fed *Artemisia abshinthium* extract at doses of 1000 ppm showed a decrease in oocysts excretion ($P < 0.05$) on days 4 and 6 after inoculation.

Keywords: broiler chicken; coccidiosis; Eimeria; plants extracts

Introducción

La coccidiosis es una de las principales enfermedades en la producción avícola ante la que resulta imprescindible establecer tratamientos preventivos en los sistemas de producción convencional. Por otro lado, el control de esta enfermedad puede resultar más difícil si los animales tienen acceso al exterior y especialmente en el caso de producciones ecológicas donde las sustancias disponibles para la prevención y el tratamiento de los animales están muy restringidas (Reglamentos (CE) 834/2007, 889/2008 y 505/2012). En consecuencia, la coccidiosis puede provocar importantes pérdidas en todo tipo de sistemas productivos y en especial en los sistemas ecológicos. Algunos extractos de plantas han mostrado efectos beneficiosos en el tratamiento y prevención de la coccidiosis (Brenes y Roura, 2010), sin embargo su uso en avicultura convencional está muy adaptado a las condiciones concretas de esta producción con dosis de inclusión bajas durante todo el periodo de engorde. En este proyecto hipotetizamos que la utilización de extractos de plantas, o sustancias derivadas de ellos, a dosis altas y por periodos reducidos de tiempo puede constituir una opción para el control de la coccidiosis en pollitos. Esta práctica podría ser de especial interés en los casos donde el uso de coccidiostáticos esté limitado. Para ello se plantearon 3 experimentos con una estirpe normalmente utilizada en producciones extensivas como el pollo campero o las producciones ecológicas. Los extractos de plantas y las dosis utilizadas fueron seleccionados en base a sus efectos *in vitro* e *in vivo* encontrados en la bibliografía disponible (Brenes y Roura, 2010; del Cacho et al., 2010; Remmal et al., 2011; de Almeida et al., 2012; Orengo et al., 2012). Para poder estudiar los efectos de los extractos de plantas de manera controlada se desarrolló previamente un modelo experimental de coccidiosis por sobredosis de vacuna. A continuación se testaron los diferentes extractos seleccionados utilizando el modelo de infección desarrollado.

Material y métodos

Todos los experimentos presentados se realizaron en el Servei de Granges i Camps Experimentals de la Universitat Autònoma de Barcelona y recibieron aprobación previa de la comisión de ética de la misma institución. Asimismo, en todos ellos se utilizaron pollitas de 1 día de edad de tipo Label Rouge (Hubbard, Granja Pagès, Reus).

Desarrollo del modelo experimental (experimento 1): Para el desarrollo del modelo se utilizaron 3 vacunas comerciales: Paracox-8® líquida, Paracox-5® (Schering-Plough Animal Health, Madrid, España) e Hipracox® (HIPRA, Girona, España). Las 3 vacunas se suministraron a los animales a la dosis recomendada por el fabricante, y a dosis 10 y 100 veces mayores. Incluyendo el control negativo, se utilizaron por lo tanto 10 tratamientos. Un total de 120 pollitas se mantuvieron en corrales en suelo hasta el día 10 de vida alimentadas con un pienso a base de maíz y soja sin antibióticos o tratamientos contra la coccidiosis. El día 10 los animales fueron distribuidos en 40 jaulas (3 pollitas/jaula) y éstas se asignaron al azar a los 10 tratamientos (4 réplicas/tratamiento). A los 12 días de edad los animales se inocularon con el tipo y la dosis de vacuna correspondiente. Los animales y el pienso se pesaron cada día, se registraron las bajas y se recogieron heces para el recuento de ooquistes cada 2 días. El control de peso, ingestión y excreción de coccidios se mantuvo hasta recuperar los ritmos de crecimiento normales alrededor del día 20 de vida.

Evaluación del efecto de los extractos de plantas (experimentos 2 y 3): Un total de 192 pollitas se mantuvieron en corrales en suelo hasta el día 6 de vida alimentadas con un pienso a base de maíz y soja sin antibióticos o tratamientos contra la coccidiosis. El día 6 los animales fueron distribuidos en 64 jaulas (3 pollitas/jaula) y éstas se asignaron al azar a los 16 tratamientos descritos más abajo (4 réplicas/tratamiento). A los 8 días de edad los animales se inocularon con el tipo y la dosis de vacuna correspondiente y se les suministró el tratamiento asignado en la dieta. Los animales y el pienso se pesaron cada día, se registraron las bajas y se recogieron heces para el recuento de ooquistes cada 2 días. El control de peso, ingestión y excreción de coccidios se mantuvo hasta recuperar los ritmos de crecimiento normales alrededor del día 16 de vida. Los 16 tratamientos utilizados fueron:

- control negativo no infectado.
- control negativo infectado con dosis x1 (subclínica) o x100 (clínica) de vacuna Hipracox®.
- control positivo infectado con dosis x100 de vacuna Hipracox® y tratado con un coccidiostático comercial (KOKCISAN 120g, Andrés Pinaluba, S.A, Reus, España).
- Cinamaldehído, *Artemisia annua* o timol subministrados a dosis de 100 y 1000ppm simultáneamente a la infección experimental clínica y subclínica (sólo experimento 2).
- Curcuma, ajeno o eugenol subministrados a dosis de 100 y 1000ppm simultáneamente a la infección experimental clínica y subclínica (sólo experimento 3).

Recuento de ooquistes: Se realizó un conteo del número de ooquistes de *Eimeria* excretados por gramo de heces mediante observación directa con un microscopio a 10 aumentos en una cámara de de Mc Master, para determinar de este modo el grado de parasitosis medio de las aves. El número final de ooquistes, es la media de los dos compartimentos de la cámara, multiplicado por 100.

Análisis estadístico: Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SAS 9.2. Los datos se analizaron mediante modelos lineales generalizados y las comparaciones múltiples de medias se hicieron utilizando la corrección de Tukey. El nivel alfa utilizado para la determinación de significación fue 0.05.

Resultados y discusión

De los 3 modelos experimentales estudiados, la sobredosis de vacuna Paracox-5® (P5) no provocó ningún efecto sobre el crecimiento de los animales (figura 1) y por lo tanto fue descartada como posible modelo de coccidiosis.

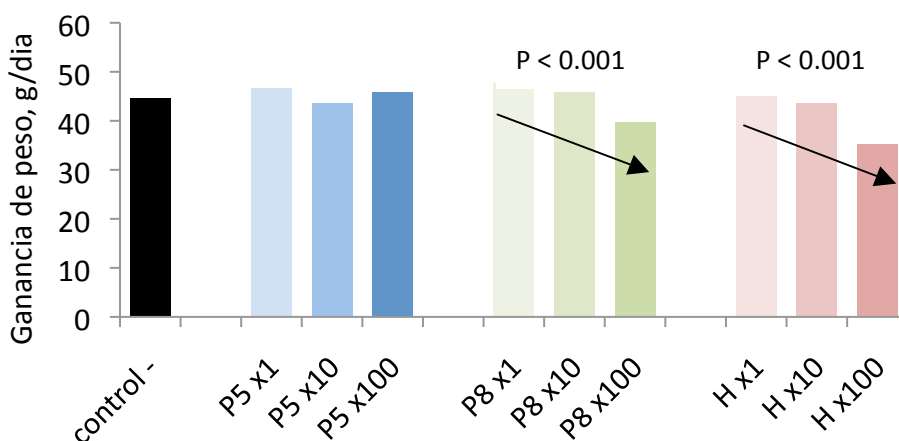


Figura 1. Efecto de las diferentes vacunas (P5 = Paracox-5®, P8 = Paracox-8® y H = Hipracox®) a diferentes dosis (x1, x10 y x100) en la ganancia media diaria de pollos durante los 8 días posteriores a la inoculación realizada a la edad de 12 días.

La sobredosis de Paracox-8® (P8) e Hipracox® provocó una disminución en el crecimiento de los animales (Figura 1), sobre todo con las sobredosis de x100. La vacuna P8 se descartó como posible modelo ya que su forma diluida implica suministrar al animal un elevado volumen en la sobredosis de x100. Por ello se seleccionó la vacuna Hipracox® a dosis x100 para el modelo de coccidiosis experimental.

Las reducciones en la ganancia de peso observadas tras la inoculación con la sobredosis de vacuna se deben sobre todo a la caída de la ingestión que se observa 2-3 días tras la inoculación. Este modelo de coccidiosis provocó también heces sanguinolentas en las dosis de x100 y lesiones a nivel intestinal, sobre todo en el ciego, pero no provocó ninguna baja. El modelo simula la problemática clínica real sin procar mortalidad, permitiendo además una mejor evaluación de los efectos sobre los parámetros productivos.

La excreción de coccidios también fue diferente entre vacunas. En el caso de las vacunas P5 y P8, la excreción de coccidios fue dosis dependiente (Figura 2). En el caso de Hipracox®, la excreción total de coccidios fue similar en todas las dosis.

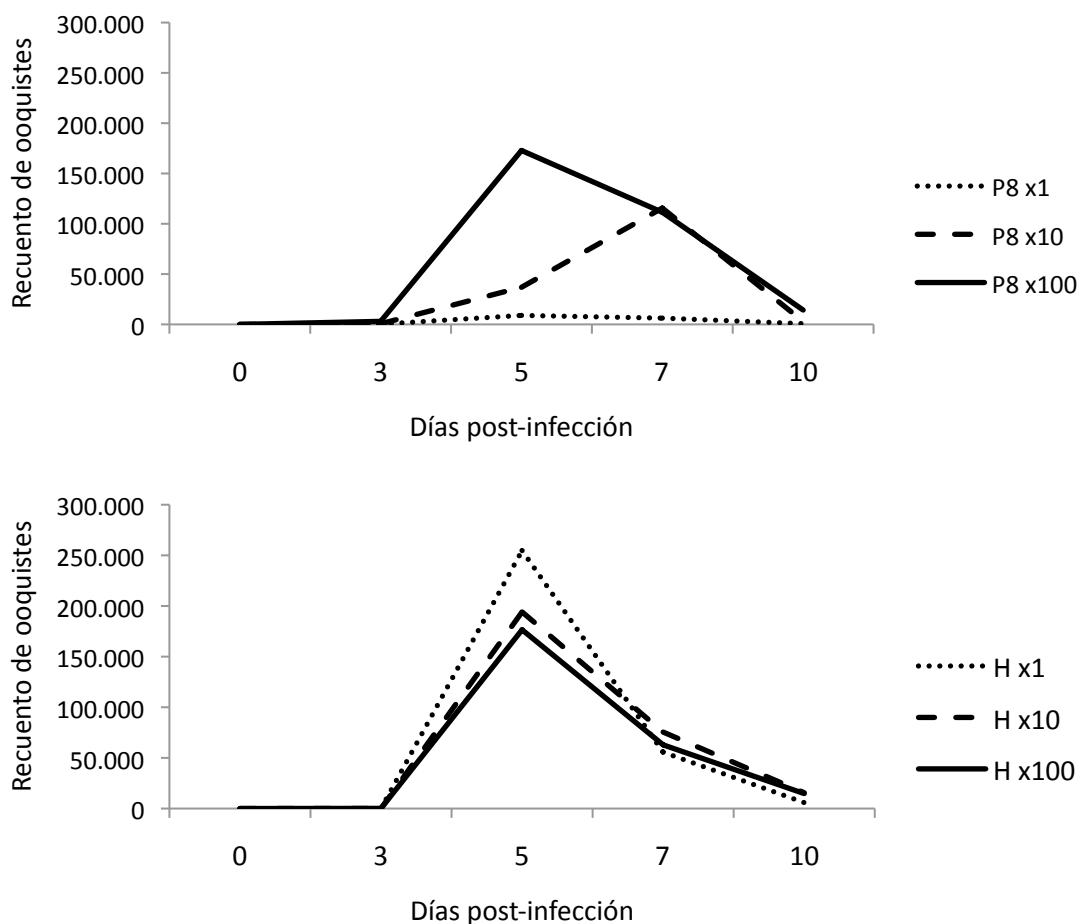


Figura 2. Efecto de las vacunas Paracox-8® (arriba) y Hipracox® (abajo) a diferentes dosis (x1, x10 i x100) en el recuento de ooquistes durante los 10 días posteriores a la inoculación a la edad de 12 días.

A pesar de no disponer de contajes específicos para las diferentes especies de Eimeria, deberíamos presuponer que la composición de especies de Eimeria que forman el pico de excreción no es la misma en las diferentes dosis utilizadas de Hipracox®, ya que los signos clínicos fueron totalmente diferentes para cada dosis, siendo estos inexistentes en el caso de la dosis comercial. La comparación de las concentraciones de las diferentes especies de Eimeria en los picos de las dosis de vacunación x1 y x100 sería de interés para un mejor conocimiento de la ecología del parásito, pero este objetivo está fuera del alcance actual de este trabajo. Sin embargo, la dosis x1 se incluyó en los experimentos 2 y 3

como dosis de infección subclínica (en realidad asintomática) para estudiar el efecto de los extractos en los contajes de ooquistes en las condiciones de vacunación.

En los experimentos 2 y 3 el modelo de coccidiosis clínica se repitió de manera similar. Así, la infección con dosis de x100 produjo un aumento de la excreción de ooquistes que indujo una caída en la ingestión seguida de una caída en la ganancia de peso. El tratamiento con el coccidiostático evitó la caída de los rendimientos y redujo la excreción de ooquistes (Figura 3) como se esperaba. Esta observación confirma que el modelo es válido para el estudio de productos contra la coccidiosis. Sin embargo, ninguno de los tratamientos de extractos de plantas estudiados tuvo efecto en los rendimientos productivos.

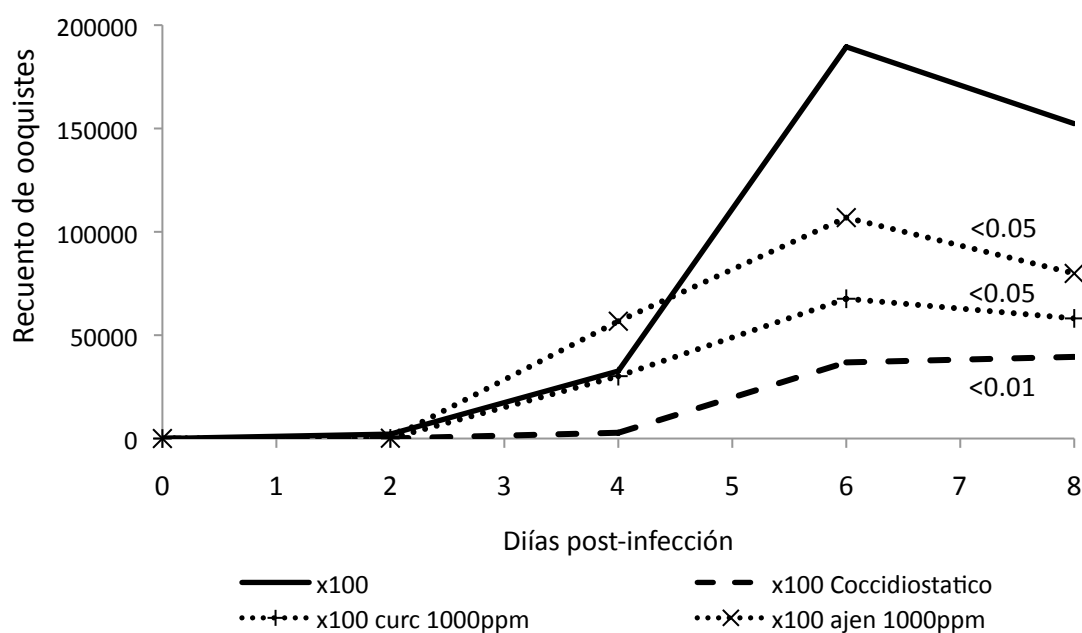


Figura 3. Efecto del coccidiostático, y curcuma y ajeno a 1000ppm sobre el recuento de ooquistes durante los 8 días posteriores a la inoculación con la sobredosis x100 de la vacuna Hipracox®.

El único efecto positivo mostrado por los extractos de plantas fue en el caso de la cúrcuma y el ajeno a dosis de 1000ppm que redujeron el número de ooquistes excretados ($P < 0.05$ en ambos casos) en los animales infectados con la dosis x100 de la vacuna (Figura 3). Sin embargo esta reducción fue de menor magnitud que la producida por el coccidiostático. Esta observación ha sido publicada previamente por otros autores que han mostrado en la mayoría de los casos efectos de los extractos de plantas sobre la excreción de ooquistes, pero no siempre acompañados por efectos a nivel productivo (del Cacho et al., 2010; Remmal et al., 2011; de Almeida et al., 2012; Orengo et al., 2012; Kim et al., 2013). En comparación con otros estudios, la dosis de extractos utilizada en el presente estudio ha sido mucho más alta con la intención de incrementar el efecto de los extractos de plantas sobre los coccidios. Sin embargo, esta estrategia no ha funcionado como se esperaba.

Agradecimientos:

Agradecemos a LUCTA (Montornès del Vallès, Barcelona) el suministro de los extractos de plantas y las recomendaciones realizadas para su incorporación adecuada en los piensos. Igualmente, agradecemos también a HIPRA (Girona) el suministro de las vacunas. Finalmente, extendemos también el agradecimiento a la Generalitat de Catalunya por financiar el presente trabajo dentro del programa AGECE 2012.

Referencias

- BRENES, A. y ROURA, E.** (2010) Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology* **158**:1–14.
- DE ALMEIDA, G.F., HORSTEDA, K., THAMSBORGB, S.M., KYVSGAARD, N.C., FERREIRAD, J.F.S., Y HERMANSEN, J.E.** (2012) Use of *Artemisia annua* as a natural coccidiostat in free-range broilers and its effects on infection dynamics and performance. *Veterinary Parasitology* **186**:178–187.
- DEL CACHO, E., GALLEGO, M., FRANCESCH, M., QUÍLEZ, J., Y SÁNCHEZ-ACEDO, C.** (2010) Effect of artemisinin on oocyst wall formation and sporulation during *Eimeria tenella* infection. *Parasitology International* **59**:506–511.
- DK KIM, HS LILLEHOJ, SH LEE, SI JANG, EP LILLEHOJ Y D BRAVO.** (2013) Dietary *Curcuma longa* enhances resistance against *Eimeria maxima* and *Eimeria tenella* infections in chickens. *Poultry Science* **92**:2635–2643.
- ORENGO, J., BUENDÍA, A.J., RUIZ-IBÁÑEZ, M.R., MADRID, J., DEL RÍO, L., CATALÁ-GREGORI, P., GARCÍA, V., Y HERNÁNDEZ, F.** (2012) Evaluating the efficacy of cinnamaldehyde and *Echinacea purpurea* plant extract in broilers against *Eimeria acervulina*. *Veterinary Parasitology* **185**:158-163.
- REMMAL, A., ACHAHBAR, S., BOUDDINE, L., CHAMI, N., CHAMI, F.** (2011) In vitro destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. *Veterinary Parasitology* **182**:121-126.