



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LAS SAPONINAS DEL  
QUILLAY (*Quillaja saponaria*) COMO INHIBIDORAS DEL  
DESARROLLO DE COCCIDIAS INTESTINALES EN POLLOS DE  
ENGORDA**

**Raimundo Javier Espejo Marquinez**

Memoria para optar al título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Patología Animal

PROFESOR GUÍA: DR. HECTOR HIDALGO O.

SANTIAGO, CHILE  
2014



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LAS SAPONINAS DEL  
QUILLAY (*Quillaja saponaria*) COMO INHIBIDORAS DEL  
DESARROLLO DE COCCIDIAS INTESTINALES EN POLLOS DE  
ENGORDA**

**Raimundo Javier Espejo Marquinez**

Memoria para optar al título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Patología Animal

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA: HECTOR HIDALGO O.	.....	.....
PROFESOR CORRECTOR: FERNANDO FREDES M.	.....	.....
PROFESOR CORRECTOR: ULISES VERGARA C.	.....	.....

SANTIAGO, CHILE

2014

## **Agradecimientos**

*A mis padres, que me han apoyado durante todo el proceso y que, a pesar del largo tiempo que le dediqué a esta Memoria, nunca dejaron de estar presentes, sin mostrar impaciencias ni presiones.*

*A Camila Sepúlveda por entregarme la calma en los momentos de flaqueza y la alegría en los momentos de angustia.*

*Al Dr. Héctor Hidalgo, por aceptar ser mi profesor guía y por las experiencias y aprendizajes adquiridos durante estos dos años de Memoria.*

*A Ramón Zegpi, Paulina Torres y Daniela Marchant, por gastar un fin de semana completo de su tiempo ayudándome en la fase experimental de esta Memoria. Agradezco también a Valeria Alcayaga por su incondicional ayuda con la presentación final.*

*A Ramón Molina “Don Moncho” por introducirme en el laboratorio de patología aviar y despertar mi interés en el área.*

*A todos los integrantes del Laboratorio de Patología Aviar con los que alguna vez compartí. Gracias por los momentos vividos, las risas, las peleas, las celebraciones y todas las experiencias que compartimos.*

*A Francisco Castro, Felipe Guzmán, Carlos Contador, Patricia Hidalgo y Eduardo Achu. Mis amigos de siempre, que no ayudaron en nada en la realización de esta Memoria, pero aprovecho la oportunidad de agradecerles por formar parte de mi vida.*

## INDICE DE CONTENIDOS

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	3
4. Revisión Bibliográfica	
3.1 Coccidiosis	
a. Etiología y clasificación.....	6
b. Ciclo de vida.....	7
c. Epidemiología.....	8
d. Patogenia.....	10
e. Inmunidad.....	18
f. Diagnóstico e identificación.....	20
g. Prevención y control.....	22
3.2 Saponinas	
a. Saponinas del quillay.....	28
b. Composición química de las saponinas del quillay.....	29
c. Método de producción.....	29
d. Saponinas y su efecto antiprotozoario.....	31
5. Hipótesis.....	32
6. Objetivos.....	32
4.1 Objetivo General.....	32
4.2 Objetivos Específicos.....	32
7. Materiales y Métodos.....	33
8. Resultados.....	38
9. Discusión.....	44
10. Conclusiones.....	48
11. Bibliografía.....	49
12. Anexos.....	56

## RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la efectividad de un extracto de saponinas del árbol quillay (*Quillaja saponaria*) denominado “Nema-Q®” como una alternativa a las drogas convencionales actualmente usadas para el control de la coccidiosis aviar, se realizó una experiencia con 132 pollos de engorda. Estos fueron divididos en 5 grupos según si eran o no desafiados con coccidias y si eran o no tratados con saponinas: (a) Grupo Control C/S (con desafío coccidial y sin saponinas); (b) Grupo Control S/S (sin desafío coccidial y sin saponinas); (c) Grupo 1 (con desafío coccidial y 125 ppm de saponinas); (d) Grupo 2 (con desafío coccidial y 250 ppm de saponinas) y (e) Grupo 3 (con desafío coccidial y 500 ppm de saponinas). Las saponinas fueron administradas en el agua de bebida desde 3 días antes del desafío coccidial (11 días de edad) hasta el último día de vida de las aves (23 días de edad). El desafío coccidial fue realizado a los 14 días de edad inoculando oralmente, mediante una sonda conectada directamente al buche, 15 dosis de la vacuna Immucox®, vacuna viva contra coccidias que incluye las especies *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* y *E. tenella*.

La efectividad del producto Nema-Q® fue medida en base a su efecto sobre el recuento de ooquistes por gramo de deyecciones (OPG), las lesiones intestinales macroscópicas y microscópicas observadas y la comparación estadística entre los pesos y el índice de eficiencia de conversión alimentaria (IECA) que presentaron los diferentes grupos.

Los resultados obtenidos indicaron que las saponinas del quillay presentaron un efecto protector frente a la infección con coccidias, logrando reducir el número de ooquistes por gramo de deyecciones y disminuir la severidad de las lesiones intestinales.

Palabras claves: Coccidiosis, saponinas, quillay.

## ABSTRACT

In order to evaluate the effectiveness of a saponins extract from the Quillay tree (*Quillaja saponaria*) called "Nema-Q ®" as an alternative to conventional drugs currently used for the control of avian coccidiosis, an experience was carried out using 132 broiler chickens. These were divided into 5 groups according to whether they were challenged or not with coccidia and were treated or not with saponins: (a) Control Group C / S (with coccidial challenge, without saponins); (b) Control Group S / S (without coccidial challenge, without saponins); (c) Group 1 (with coccidial challenge and 125 ppm of saponins); (d) Group 2 (with coccidial challenge and 250 ppm of saponins) and (e) Group 3 (with coccidial challenge and 500 ppm of saponins). The saponins were administered by drinking water since 3 days before the coccidial challenge (11 days old) until the last day of birds life (23 days old). The coccidial challenge was performed at 14 days of age inoculating orally, through a tube connected directly to the crop, 15 dose of Immucox ® vaccine. Immucox® is a live vaccine against coccidiosis comprising the *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* and *E. tenella* species.

The effectiveness of the product was measured based on the counting of oocysts per gram of feces (OPG), the macroscopic and microscopic intestinal lesions presented and statistical comparison between weights and feed conversion efficiency ratio (FCR) presented by the different groups.

The results obtained indicated that the *Quillaja* saponins showed a protective effect against infection with coccidia, successfully reducing the number of oocysts per gram of droppings and reducing the severity of intestinal lesions.

Keywords: Coccidiosis, saponins, quillay.

## INTRODUCCIÓN

Tanto en Chile como a nivel mundial, el consumo, producción, importación y exportación de carne de ave ha manifestado un aumento paulatino en los últimos años. Según datos del Departamento de Agricultura de EEUU (USDA) (2012), el consumo de carne de pollo per cápita durante el año 2012, en este país, fue de 42,5kg manteniéndose en un crecimiento constante que hace estimar que para el año 2018, el consumo llegue a los 46kg. Esta situación se repite en el mercado chileno, ya que durante el año 2012 alcanzó un consumo de carne de pollo per cápita de 32kg, cuatro kilogramos más por persona de lo que se consumía el año 2007 (Asociación de Productores Avícolas de Chile, 2012).

La rentabilidad de esta actividad se ve amenazada año a año por factores relacionados al aumento de precio de materias primas e insumos, variaciones de precios internacionales y la presencia de enfermedades bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias, encontrándose dentro de esta última la coccidiosis, enfermedad reconocida como la parasitosis de mayor impacto económico en la producción avícola mundial.

La coccidiosis es provocada por diversas especies de coccidias del género *Eimeria*. El parásito se multiplica en el tracto gastrointestinal, causando daños tisulares con la consecuente interrupción de una correcta absorción de nutrientes, deshidratación, hemorragias, pérdida de pigmentación de la piel y aumento de la susceptibilidad hacia otros agentes patógenos (McDougald y Fitz-Coy, 2008).

La alta resistencia y prevalencia del parásito en condiciones naturales, constituyen un permanente riesgo de infección para los pollos broiler. Al no poderse evitar la infección, se previene la enfermedad aplicando drogas anticoccidiales en el alimento de los pollos. Actualmente existen diversas drogas anticoccidiales, encontrándose las sintéticas y las naturales. Estas drogas tienen la capacidad de intervenir en distintas etapas del ciclo reproductivo del parásito, sin embargo, su uso está siendo bastante cuestionado. Uno de sus inconvenientes es la resistencia que logra generar el protozoo frente a ellas, sumado a su acción antibacteriana, lo que podría generar resistencia por parte de bacterias patógenas, constituyendo un problema de Salud Pública. Todo esto, sumado a las políticas de inocuidad alimentaria que restringen la presencia de residuos de medicamentos en los alimentos, ha conllevado al desarrollo de vacunas y/o programas de rotación de vacunas

junto a la terapia tradicional de drogas. Las vacunas presentan el inconveniente de tener el potencial de generar una coccidiosis subclínica, en el caso de aplicarlas en forma inadecuada, además de no establecer una protección inmediata. Es por lo anteriormente mencionado, que la tendencia en la actualidad es reducir cada vez más el uso de drogas anticoccidiales e investigar otros productos naturales que permitan controlar la coccidiosis (Yuño y Gorgoza, 2008), como lo son las saponinas del quillay (*Quillaja saponaria*).

Las saponinas son detergentes naturales sintetizados por una gran variedad de plantas, siendo el quillay (árbol endémico de Chile) una de las principales fuentes industriales de saponinas del tipo triterpénico (Cheeke, 2001; Francis *et al.*, 2002).

Las saponinas presentan múltiples aplicaciones, destacándose su uso en el área de la nutrición humana y animal, en el control de olores, la minería y la cosmética. También son usadas en el área de la salud, siendo reconocidas como excelentes adyuvantes (Cheeke, 2001).

Recientemente se han realizado estudios que demuestran el efecto antiprotozoario de las saponinas, lo que podría ser de gran importancia en la búsqueda de tratamientos alternativos para la coccidiosis aviar (Lu y Jorgensen, 1987; Makkar *et al.*, 1998).

En este contexto, se evaluó a nivel experimental la efectividad de un extracto de saponinas del árbol quillay (*Quillaja saponaria*) denominado “Nema-Q®”, como una alternativa a las drogas convencionales actualmente usadas para el control de la coccidiosis aviar en Chile.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1. Coccidiosis

La coccidiosis es una enfermedad de distribución mundial causada por parásitos protozoarios unicelulares denominados coccidias (McDougald y Fitz-Coy, 2008). Entre las coccidias de importancia en medicina veterinaria se encuentran los géneros *Cryptosporidium*, *Isospora*, *Toxoplasma*, *Sarcosystis* y *Eimeria*, siendo estas últimas responsables de la coccidiosis aviar (Soulsby, 1987).

Este parásito se multiplica en el tracto gastrointestinal, causando daños tisulares con la consecuente interrupción de una correcta absorción de nutrientes, deshidratación, hemorragias, aumento del índice de conversión alimenticia, pérdida de la ganancia de peso y de la pigmentación de la piel y aumento de la susceptibilidad hacia otros agentes patógenos. Según la intensidad de la infección, se producirá una mortalidad variable que puede ir desde un 5% a un 40%, lo que dependerá del grado de parasitosis y la especie de *Eimeria* presente (McDougald y Fitz-Coy, 2008).

Las coccidias pueden infectar diversas especies animales entre las que se encuentran el hombre, los cerdos, bovinos, pavos, gansos y la gallina doméstica entre otros (Soto, 1984). Como grupo, las coccidias del género *Eimeria* son predominantemente especie específico, es decir, cada especie afecta a un hospedador en específico o a un grupo de hospedadores estrechamente relacionados entre sí (Conway y McKenzie, 2007).

Es una enfermedad presente en todos los lugares donde se crían pollos (*Gallus domesticus*) a lo largo del mundo, sobre todo en sitios donde exista producción avícola con características intensivas (Soto, 1984; Soulsby, 1987). Afecta principalmente a aves jóvenes entre la tercera y sexta semana de vida presentando rápidamente signos de enfermedad, mientras que las aves adultas parecen más resistentes a la infección debido a una inmunidad adquirida tras la exposición (Lillehoj, 2005; McDougald y Fitz-Coy, 2008).

Dado su estricta especificidad de hospedero, las aves silvestres no se consideran una fuente de infección, siendo la transmisión mecánica la forma más común de esparcimiento de la coccidiosis, mediante el personal que se mueve entre distintos galpones y granjas (McDougald *et al.*, 1987; McDougald *et al.*, 1997; Mattiello *et al.*, 2000).

Las coccidias aviarias generan variadas pérdidas en la producción pecuaria siendo sus repercusiones económicas difíciles de cuantificar, sin embargo, se estima que tan sólo los costos de la medicina usada de manera preventiva para su control en USA, exceden los 90 millones de dólares y más de 300 millones de dólares en todo el mundo (McDougald y Fitz-Coy, 2008).

#### **a. Etiología y Clasificación**

En aves, la coccidiosis es causada por protozoos del género *Eimeria*, del phylum Apicomplexa, clase Sporozoa, subclase Coccidia, familia Eimeriidae. Estos son parásitos intracelulares que se localizan en el enterocito. Tienen un solo hospedador, en el cual se realizan las fases de reproducción asexual (esquizogonia) y sexual (gametogonia). También poseen una fase asexual exógena, denominada esporogonia (Soulsby, 1987; Comotto, 2000; Conway y McKenzie, 2007) (Anexo 1).

Las *Eimerias* son parásitos protozoarios intracelulares pequeños, con ooquistes de gruesa y doble pared, esféricos u ovalados, que parasitan el citoplasma y se nutren por osmosis a partir de los líquidos de las células del hospedador a las cuales destruyen al multiplicarse (Borchet, 1981).

Los pollos se ven afectados por 9 especies de *Eimeria*: *E. brunetti*; *E. acervulina*; *E. maxima*; *E. necatrix*; *E. tenella*; *E. mitis*; *E. mivati*; *E. hagani* y *E. praecox* (McDougald y Fitz-Coy, 2008), siendo las primeras 5 responsables de la coccidiosis clínica, encontrándose todas estas en nuestro país. *E. mitis* y *E. praecox* no desarrollan manifestaciones clínicas y la existencia de *E. hagani* y *E. mivati*, es incierta (Del Cacho *et al.*, 1999; Conway y McKenzie, 2007). En general, son diferenciadas en el hospedador sobre la base de los signos clínicos, las lesiones características en los sitios intestinales específicos, el periodo de prepatencia, el tamaño de los ooquistes, y la morfología en los estadios celulares (McDougald y Fitz-Coy, 2008).

#### **b. Ciclo de vida**

Las *Eimerias* presentan un ciclo de vida complejo que consiste en tres fases: esporogonia (etapa infectiva), esquizogonia (reproducción asexual) y gametogonia (reproducción sexual), comprendiendo etapas intracelulares y extracelulares (Lillehoj y Trout, 1993;

McDougald, 1997; Conway y McKenzie, 2007). Para describir el ciclo biológico se detallará lo que sucede con *E. tenella*, cuyo ciclo es similar al de todas las *Eimerias*: La infección ocurre cuando un pollo susceptible ingiere un ooquiste esporulado del ambiente. El ooquiste esporulado contiene cuatro esporoquistes. Cada esporoquiste contiene dos esporozoitos. Estos son liberados por la acción mecánica y bioquímica del tracto digestivo de los estómagos muscular y glandular del ave (mediante acción de bilis, tripsina y jugo pancreático) e invaden las células epiteliales de una zona específica del intestino o ciego dependiendo de la especie de *Eimeria* involucrada (Conway y McKenzie, 2007).

Una vez dentro de la célula hospedadora, el esporozoito se transforma luego de 12 a 48 hrs en trofozoito. Este comienza a crecer y el núcleo se divide por un proceso de división múltiple asexual, fase conocida como esquizogonia (merogonia). A este punto el parásito es llamado esquizonte o meronte. Las pequeñas formas parasitarias que se forman al interior del meronte son llamadas merozoitos. El esquizonte al madurar se rompe (al tercer día) liberando los merozoitos. La mayoría de estos invaden otras células epiteliales para repetir el proceso de desarrollo a través de las etapas de trofozoito y esquizogonias. Los merozoitos del segundo ciclo esquizogónico nuevamente penetran las células epiteliales del hospedador. Algunas o todas pueden pasar a través de un tercer ciclo esquizogónico, dependiendo de la especie, antes de la formación del gametocito masculino o femenino (microgametocito o macrogametocito respectivamente) (Conway y McKenzie, 2007). Se desconoce el mecanismo por el cual se diferencian sexualmente, aunque parece estar relacionado al número de gránulos de polisacáridos y mitocondrias (Del Cacho *et al.*, 1999). El gametocito masculino madura y se rompe liberando un gran número de pequeños microgametos biflagelados. Intracelularmente el macrogametocito crece para formar un macrogameto. Una gruesa pared se forma alrededor del macrogameto formando un cigoto cuando el macrogameto es fertilizado por el microgameto. Desde este momento se puede hablar de la existencia de un ooquiste inmaduro (Soulsby, 1987; Ruiz, 1990; Conway y McKenzie, 2007). Es en esta fase cuando ocurre la recombinación genética que permite la transferencia de propiedades como la resistencia a quimioterapéuticos y patogenicidad (Watkins, 1998).

El periodo de prepatencia de cada especie de *Eimeria* varía, dependiendo del tiempo requerido por cada una para realizar el ciclo de esquizogonia y del número de ciclos requeridos para generar el ooquiste inmaduro. La producción de ooquistes se mantiene por varios días alcanzando un máximo durante los 7-8 días post-infección, para empezar a descender y desaparecer a partir del día 12, siempre y cuando no ocurra reinfección (Soulsby, 1987; Ruiz, 1990; Conway y McKenzie, 2007) (Anexo 2).

### **c. Epidemiología**

La coccidiosis es una enfermedad omnipresente en avicultura sin importar el tipo de crianza. Pollos de todas las edades y razas son susceptibles a la infección. La alta resistencia del ooquiste a condiciones ambientales y desinfectantes es fundamental para la permanencia de la enfermedad (Shirley, 1994; McDougald y Fitz-Coy, 2008).

Los brotes son comunes a las tres a seis semanas de edad de los pollos y son raramente vistos en edades menores a las tres semanas, existiendo excepciones en las que se han visto infecciones en pollos menores de una semana de vida (McDougald y Fitz-Coy, 2008). Lo anterior se explica probablemente debido a la insuficiente cantidad de tripsina y sales biliares que tienen las aves a esta edad y que causan el desenquistamiento del ooquiste, además del aumento de la cantidad de deyecciones eliminadas por las aves a partir de la tercera semana, a causa del incremento del consumo de alimento (Bafundo, 1991).

Se ha observado que de acuerdo a la especie de *Eimeria*, varía la edad a la que se presenta la infección. Normalmente las infecciones de *E. mitis*, *E. praecox*, *E. maxima*, *E. acervulina*, *E. tenella* y *E. mivati* se presentan a las tres a seis semanas de edad, mientras que las infecciones con *E. necatrix* se observan a las 8 a 18 semanas de edad. Por su parte, *E. brunetti* se encuentra en ambos periodos (McDougald y Fitz-Coy, 2008).

La ingesta de ooquistes esporulados es el único método natural de transmisión. Pollos infectados pueden eliminar ooquistes en las deyecciones por varios días o semanas. Pollos del mismo lote pueden ingerir estos ooquistes a través del picaje de la cama o por contaminación del agua o el alimento (McDougald y Fitz-Coy, 2008).

El manejo general del lote de aves es de vital importancia en la manifestación de coccidiosis. Condiciones inadecuadas de temperatura, humedad, iluminación, equipos,

sanidad y stress, favorecen la presentación de la enfermedad (Bernal, 1993). La tasa de difusión es un factor de importancia que depende de la densidad, del tiempo que se mantienen las deyecciones contaminadas y del acceso del ave a estas deyecciones (Del Cacho *et al.*, 1999). Densidades por encima de 22 aves por metro cuadrado, como se usa en crianzas bajo ambientes controlados, predisponen de gran manera al desarrollo de coccidiosis (Vertomen y Kouwenhomen, 1994).

Aunque no existen hospederos intermediarios en el ciclo de las *Eimerias*, mecánicamente los ooquistes pueden ser esparcidos por diferentes animales, insectos, equipo contaminado, aves silvestres y polvo. La viabilidad del ooquiste es de pocos días en la cama de aves y de hasta semanas en el suelo, viéndose disminuida por la liberación de calor y amonio por compostaje y la acción de bacterias. El ooquiste muere al ser expuesto a temperaturas extremas o al secado. Temperaturas de 55°C o bajo cero eliminan al ooquiste rápidamente (McDougald y Fitz-Coy, 2008).

Las granjas nuevas pueden mantenerse libres de coccidias la mayor parte de la primera crianza, pero la introducción de coccidias a un lote completamente susceptible ocasiona brotes más severos que en granjas viejas. A esto se le conoce como “Síndrome de coccidiosis del galpón nuevo” (McDougald, 1997).

De acuerdo al estudio realizado por Alcaino *et al.*, (2002) donde se analizaron 51 muestras de deyecciones provenientes de ocho planteles avícolas de la II, V, VI y XIII región de Chile, se concluyó la existencia de siete especies de coccidias cuya frecuencia y porcentaje de presentación correspondió a: *E. mitis* 34 (68%); *E. praecox* 31 (62%); *E. maxima* 24 (48%); *E. acervulina* 24 (48%); *E. tenella* 7 (14%); *E. necatrix* 7 (14%) y *E. mivati* 4 (8%). No se encontraron *E. brunetti* ni *E. hagani*. Los ocho planteles avícolas presentaron infecciones por coccidias, siendo estas predominantemente mixtas, encontrándose casos con incluso seis especies de *Eimeria*. Lo anterior se debe a que no existe inmunidad cruzada entre las especies de *Eimerias* (Comotto, 2000; McDougald y Fitz-Coy, 2008). No es posible descartar la existencia de las *Eimerias* no encontradas en este estudio, ya que no se han realizado nuevas investigaciones desde entonces.

#### **d. Patogenia**

Se ha establecido una estrecha relación entre las coccidias y factores externos que contribuyen a crear las condiciones favorables para que ocurran brotes de coccidiosis, los cuales ocurren cuando aves susceptibles ingieren un gran número de ooquistes esporulados. Para que esto suceda tienen que existir las condiciones ambientales que posibiliten la esporulación de los ooquistes inmaduros, así como la presencia de una cama húmeda y temperaturas que varíen en un rango de 24-29°C, entre otras (Latala, 1981; Norton y Chard, 1983; Soto, 1984; Soulsby, 1987; Ruiz, 1990; Henken *et al.*, 1992). A mayor número de ooquistes esporulados ingeridos, mayor será el grado de infección, pero se debe considerar que existe un fenómeno llamado “efecto multitudinario” (crowding factor) por el cual, encima de cierto nivel de ooquistes ingeridos, no se producen mayores lesiones ni más cantidad de ooquistes eliminados (Del Cacho *et al.*, 1999).

Las infecciones por *Eimeria* tienen un curso de mayor o menor gravedad dependiendo básicamente de la especie de *Eimeria* implicada, edad, estado sanitario e inmunitario de las aves y número de ooquistes ingeridos (Del Cacho *et al.*, 1999). Tal como se mencionó, son predominantes las infecciones mixtas. No obstante suele ocurrir que el cuadro clínico manifestado corresponda a una especie de coccidia o, en ocasiones, a la combinación de dos o tres especies de coccidias (Soulsby, 1987).

Diferentes factores van a influir sobre el curso de la enfermedad, dentro de los cuales además de la cantidad de ooquistes ingeridos y de la patogenicidad propia de cada especie, van a influir las relaciones que se dan entre las *Eimerias* en infecciones mixtas. Así, contrariamente a lo que se podría pensar, las especies que parasitan la misma región del intestino (por ejemplo *E. praecox* y *E. acervulina*), compiten entre sí, produciendo un efecto patológico combinado menor que el que podrían producir especies que parasitan diferentes zonas del intestino (*E. brunetti*: intestino medio y *E. acervulina*: intestino anterior) (Del Cacho *et al.*, 1999).

La fase esquizogónica es la de mayor importancia patológicamente, ya que ésta produce la destrucción de las células epiteliales con la consecuente inflamación del intestino, llegando a destruir las vellosidades bajando el consumo de alimento y generando un síndrome de mala absorción, deshidratación, pérdida de sangre y muerte (McDougald, 1997; Del Cacho

*et al.*, 1999). Más específicamente, la segunda generación de esquizontes es la que produce el mayor daño, ya que al madurar rompe un gran número de células epiteliales (Bains, 1979), generando desprendimiento de mucosa, intensas hemorragias y la consecuente muerte del ave (Soulsby, 1987).

Producto de la invasión masiva de los esporozoitos, se producen cambios en el pH, la cinética celular y la morfología de las vellosidades, lo que produce una reducción en la absorción de vitamina A y caroteno (Soulsby, 1987).

La restitución celular, que normalmente se cumple cada 4 días, se retarda quedando áreas de las vellosidades desnudas y atrofiadas, disminuyendo la capacidad para absorber nutrientes, fluidos, glucosa y vitaminas, y aumentando la permeabilidad, con paso y pérdida de proteínas a través del intestino (Ruiz, 1990).

Producto del metabolismo de las coccidias se produce ácido láctico, provocando una baja del pH, la cual sumada a la disminución de la velocidad del tránsito intestinal genera un desequilibrio de la flora bacteriana, demostrándose la interacción entre las coccidias y otros agentes enteropatógenos, como *E. tenella* y *Clostridium perfringens* estudiado por Al Sheikly y Al Saieg (1980). Es normal que en las infecciones coccidiales con cualquier especie de *Eimeria* surjan cambios negativos en la flora bacteriana intestinal, produciéndose una proliferación exagerada de ciertas especies, como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens* y reducción de otras como los Lactobacilos (Pomiano, 2000).

Las enfermedades de Marek y Gumboro pueden interferir con el desarrollo de inmunidad, pudiendo exacerbar la coccidiosis (McDougald, 1997).

Según el grado de infección, se reconoce una coccidiosis clínica, caracterizada por presentar signos clínicos evidentes como diarrea sanguinolenta y mortalidad, y una coccidiosis subclínica, la que cursa con ausencia de signos clínicos y escasas o nulas lesiones intestinales macroscópicas, pero igualmente provoca efectos adversos en los parámetros productivos. Experimentalmente se calculó que la coccidiosis subclínica produce en los pollos broiler un aumento del 2-8% en el índice de conversión alimentaria, una baja de 50-100 gramos en la ganancia de peso y una disminución del 6-20% en el nivel

de carotenoides plasmáticos, lo que lleva a una menor pigmentación de la canal (Mattiello *et al.*, 1997).

La administración continua de anticoccidianos en el alimento ha logrado reducir la intensidad de las presentaciones clínicas de coccidiosis, sin embargo, ésta no ha podido ser absolutamente controlada, dando lugar a la aparición de cuadros de coccidiosis subclínica (Mattiello *et al.*, 1997).

Las diferentes especies de *Eimeria* presentan distintos grados de patogenicidad. Las especies más patógenas corresponden a *E. tenella* y *E. necatrix*, las cuales pueden generar altas mortalidades. *E. brunetti* y *E. maxima* generan enteritis mucoide, frecuentemente sanguinolenta, pero los brotes de campo suelen ser leves y de poca importancia patológica. *E. acervulina* se asocia a enteritis catarral con diarreas mucosas y reducción en la ganancia de peso (Del Cacho *et al.*, 1999).

Soto (1984) y Ruiz (1990) señalan que el orden de patogenicidad de las *Eimeria* que afectan a la gallina doméstica es: *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. acervulina*, *E. mivati*, *E. hagani*, *E. mitis* y por último *E. praecox*.

Las especies de *Eimeria* tienen gran especificidad por determinados segmentos intestinales, así como sus formas intracelulares por determinados tejidos, células o glándulas. *E. tenella* y *E. necatrix* penetran profundamente la pared intestinal, multiplicándose intensamente a nivel de lámina propia, mientras que las demás especies de *Eimeria*, se mantienen en las células epiteliales de las vellosidades durante su desarrollo (Soulsby, 1987; Ruiz, 1990; Lillehoj y Trout, 1994) (Anexo 3).

Long *et al.*, (1980) señala que *E. tenella* y *E. necatrix* causan infecciones agudas en los pollos; mientras que *E. acervulina*, *E. mivati*, *E. maxima* y *E. brunetti* provocan coccidiosis crónica, pero con variaciones entre ellas.

La patogenicidad está determinada y condicionada por varios factores como el manejo (condiciones de la cama, temperatura ambiental, uniformidad del lote, etc.), estatus nutricional, enfermedades concomitantes, número de ooquistes ingeridos, viabilidad de los ooquistes, localización intestinal, edad del hospedador y enfermedades inmunodepresoras

previas, los cuales serán desarrollados a continuación (Hofstad *et al.*, 1978; Bafundo y Guerrero, 1989; Dale, 1990; Ruiz, 1990):

- a) Condiciones de la cama: principalmente la humedad, ya que ésta puede facilitar la presencia de organismos patógenos, incluyendo parásitos (coccidias), siendo una de las condiciones necesarias para la esporulación de los ooquistes. Factores que favorecen un alto nivel de humedad en la cama son la sobrepoblación, fallas en los bebederos, goteras dentro del galpón y diarreas, entre otros.
- b) Número de ooquistes ingeridos, viabilidad de los ooquistes y especie de coccidia actuante: Van a ir en directa relación con la magnitud del cuadro clínico. A mayor tiempo de conservación después de la esporulación, menor poder infectante del ooquiste.
- c) Temperatura ambiental: Es otra condición necesaria para la esporulación de los ooquistes. Una temperatura ambiental favorable (17-29°C) permitirá que los ooquistes permanezcan viables por un mayor tiempo, ya que las temperaturas extremas pueden destruirlos.
- d) Higiene del galpón: Una limpieza inadecuada y desinfección incompleta, permitirán que la enfermedad prevalezca en las aves próximas a ocupar ese galpón, producto de la alta carga de ooquistes que puede existir. Esto es común debido a las presiones económicas con miras a producir la mayor cantidad de carne o huevos en el menor tiempo posible, por lo que se acortan los periodos de descanso del galpón.
- e) Uniformidad del lote: Los pollitos más pequeños y débiles van a ingerir menor cantidad de droga anticoccidial, quedando más susceptibles a la enfermedad.
- f) Estatus nutricional: El potencial genético del pollito para obtener su máximo crecimiento y eficiencia está relacionado directamente a una nutrición adecuada, por lo que problemas en la nutrición, como por ejemplo contaminación con micotoxinas, pueden producir efectos inmunosupresores, haciendo que las aves sean más susceptibles a la coccidiosis.

- g) Enfermedades concomitantes: Existen enfermedades que permiten que el ave sea más susceptible (Gumboro, Anemia Infecciosa, Micotoxicosis) o que directamente agravan el cuadro clínico de la coccidiosis (*E. coli*, *C. perfringens*).
- h) Localización intestinal: especies que colonizan el intestino tienen mayores efectos sobre la digestión y absorción de nutrientes que las que parasitan el ciego y el recto.
- i) Edad de las aves: Las aves jóvenes son especialmente susceptibles a contraer esta enfermedad, sobre todo entre la tercera y sexta semana de edad.

Dale (1990) sugiere que la coccidiosis es una enfermedad de etiología multifactorial, ya que si se asume una situación en la que el nivel de droga en el alimento resulta ser un 25% inferior a lo propuesto y si además este alimento es consumido por un lote de pollos broiler mantenidos en una cama con baja humedad, con una edad de 42 días, con moderada densidad y sin ningún factor severo de tensión, probablemente no habrán lesiones de coccidiosis, sin embargo, si el mismo alimento va a una granja donde las aves tienen 29 días de edad y están a alta densidad, causando un aumento en la humedad de la cama, la probabilidad de que se produzca un brote de coccidiosis aumenta.

A continuación se presentan las características patológicas de cada especie:

**E. acervulina**: Es poco patógena, siendo responsable de coccidiosis intestinal subaguda en aves adultas y en pollitas a punto de comenzar la postura (Soulsby, 1987). Comúnmente afecta el asa duodenal pudiendo, en infecciones severas, llegar a yeyuno e incluso el íleon (Conway y McKenzie, 2007).

En cuanto a su patología, genera lesiones blanquecinas focales alargadas transversalmente, como peldaños de escalera; sin pérdida de sangre, las cuales son visibles en la superficie serosa del duodeno (Soto, 1984; Bafundo y Guerrero, 1989). Las fases de desarrollo tienen lugar en la porción anterior del intestino delgado. La pared intestinal y mucosas pueden presentarse engrosadas, pudiendo estar cubiertas de un exudado catarral (Soto, 1984). Solo se observa sangre en el lumen si se administran cantidades excesivas (millones) de ooquistes (Soulsby, 1987).

**E. praecox**: Su patogenicidad es baja, siendo incluso considerada como apatógena. Afecta principalmente la porción anterior del intestino delgado (Bafundo y Guerrero, 1989; Ruiz, 1990), sin producir alteraciones ni lesiones evidentes (Ruiz, 1990; Fraser, 1993).

**E. tenella**: La principal manifestación patológica de la infección por *E. tenella* es la hemorragia cecal, asociado a una destrucción de la mucosa (Allen, 1997). Se observa también marcada tiflitis, una mucosa engrosada y cicatrizada, tapones de sangre coagulada en ciegos y las deyecciones sanguinolentas. En casos crónicos se puede observar un exudado caseoso en ciegos (Soto, 1984; Bafundo y Guerrero, 1989; Ruiz, 1990; Fraser, 1993).

**E. maxima**: Es moderadamente patógena (Soulsby, 1987), debiéndose los efectos más serios a las fases sexuadas ya que son de tamaño mayor que las fases asexuadas, pudiendo llegar a afectar la capa muscular del intestino (Ruiz, 1990).

Produce exudado mucoso de color anaranjado cremoso en la porción media del intestino delgado. Enteritis en diferentes grados, dilatación de la pared intestinal y contenido hemorrágico en infecciones severas (Soto, 1984; Soulsby, 1987). El intestino puede verse flácido y dilatado por pérdida del tono muscular. También pueden verse petequias en serosa (Soto, 1984; Bafundo y Guerrero, 1989; Ruiz, 1990; Fraser, 1993).

**E. brunetti**: Los esquizontes generalmente se encuentran en el epitelio de las vellosidades, pero pueden entrar en los tejidos subepiteliales en las infecciones masivas (Soulsby, 1987).

La primera porción del intestino delgado es el lugar de mayor parasitación, llegando algunas fases a porciones más alejadas, incluso hasta ciegos y recto (Soulsby, 1987). Puede causar enfermedad grave en los pollos de 4 a 9 semanas de edad. Es característico que las lesiones se encuentren en la parte posterior del intestino delgado, generando la coccidiosis rectal típica (Soto, 1984; Ruiz, 1990). Produce un puntillado hemorrágico en distintos grados y pérdida del epitelio de la mucosa. Puede haber enteritis necrótica si se asocia con clostridios (Soto, 1984). Se puede presentar enrojecimiento de la mucosa, secreciones mucosas y caseosas. En infecciones graves se puede ver exudado catarral hemorrágico que aparece 4 a 5 días después de la infección experimental (Bafundo y Guerrero, 1989; Ruiz, 1990; Fraser, 1993).

**E. necatrix**: El desarrollo asexual tiene lugar en el intestino delgado, y el ciclo gametogónico, en los ciegos. Esta especie es uno de los agentes patógenos más importantes del intestino delgado de las gallinas (Soulsby, 1987).

Produce lesiones en el tercio medio del intestino delgado. La pared del intestino en esta zona puede verse engrosada, dilatada y hemorrágica, incluso con contenido de sangre en lumen. En infecciones ligeras, se pueden observar puntos blancos diseminados que indican presencia de colonias de esquizontes, rodeados por zonas de hemorragias petequiales (Soulsby, 1987).

**E. mivati**: Los esporozoitos se desarrollan en la base de las vellosidades de las células epiteliales, especialmente en duodeno, localizándose inmediatamente debajo de la superficie y muy por encima del núcleo de la célula del hospedador. Los merozoitos de segunda generación parasitan células del yeyuno y duodeno (Soulsby, 1987).

La zona afectada se presenta engrosada, edematosa y con petequias diseminadas. El contenido intestinal se ve de aspecto acuoso, seroso o cremoso y de color blanco. Las lesiones son redondeadas y no forman estrías o bandas como *E. acervulina* (Soto, 1984; Bafundo y Guerrero, 1989; Fraser, 1993).

**E. mitis**: En condiciones normales, es ligeramente patógena. Experimentalmente se ha demostrado que no produce signos clínicos en pollos inoculados con altas dosis de ooquistes esporulados (Soulsby, 1987). Joyner (1958) logró un 38% de mortalidad en pollitos de 6 días de edad, tras la administración de 2,5 millones de ooquistes esporulados.

**E. hagani**: Las fases de desarrollo tienen lugar en la porción anterior del intestino delgado. Generalmente se considera de escasa o nula patogenicidad (Ruiz, 1990). Las fases de desarrollo originan pequeñas hemorragias petequiales, visibles desde la superficie de la serosa (Soto, 1984; Bafundo y Guerrero, 1989; Ruiz, 1990; Fraser, 1993).

Aun cuando existen diferentes manifestaciones clínicas entre las especies de *Eimeria*, las manifestaciones generales incluyen la disminución en el consumo de alimento, diarrea y finalmente la muerte (Koning, 1994). Además los signos externos incluyen, deshidratación, aglomeración de aves, debilidad, plumas sucias y erizadas, palidez, ojos entreabiertos, baja de consumo, disminución del crecimiento y mala conversión alimenticia (Soto, 1984; Ruiz,

1990; North, 1990). La enfermedad se explica por las modificaciones en las funciones digestivas, lo que se traduce en la siguiente signología clínica (Ruiz, 1990):

- Deterioro de la digestión, con posterior anorexia.
- Aumento de la motilidad intestinal, con aumento de la velocidad de pasaje del contenido intestinal y reducción de la flora saprófita benéfica, lo que se traduce en diarrea.
- Variaciones marcadas del pH intestinal, afectando la degradación de proteínas, la acción enzimática y provocando desequilibrio de la flora intestinal, lo que se traduce en diarrea.
- Aumento de la permeabilidad de la pared intestinal, produciéndose debilidad y pérdida de peso.
- Alteración en la síntesis y absorción de vitamina A y K, afectándose la regeneración del epitelio y coagulación de la sangre respectivamente, llevando a cuadros de anemia y diarrea sanguinolenta.
- Alteración del balance entre agua y electrolitos, llevando a shock por deshidratación, y mortalidad de las aves.

Deyecciones diarreicas con gran cantidad de sangre son típicas de infecciones con *E. tenella*, causando anemia y palidez de cresta y barbilla. Además, se produce hipotermia que es la razón por la que las aves se agrupan con la cabeza bajo el ala. La mortalidad es muy variable (Del Cacho *et al.*, 1999).

*Eimeria acervulina* produce una diarrea mucosa de color blanco amarillento que humedece la cama y por eso las aves muestran las plumas manchadas (Del Cacho *et al.*, 1999). *E. maxima* produce diarrea sanguinolenta con coloración anaranjada o rosácea, y dentro del intestino, que está dilatado (“Balonamiento”), se encuentra contenido de la misma coloración. Esta especie es importante porque causa problemas en la pigmentación debido a que se afecta la absorción de xantofilas, carotenoides y otros pigmentos (McDougald, 1997).

### **e. Inmunidad**

En el desarrollo de estados de resistencia o inmunoprotección de las aves contra la coccidiosis, la inmunidad humoral y celular desempeñan una acción importante generando una inhibición de la proliferación de los parásitos (Lillehoj y Trout, 1994).

La destrucción de los parásitos es mediada por células natural killer (NK), linfocitos T helper y T citotóxicos (Lillehoj *et al.*, 1994), citokinas (Liew y Vickerman, 1997) y la producción de interferón, la cual es inducida por la presencia de los merozoitos y esporozoitos (Martin y Lillehoj, 1993). También participan macrófagos, los cuales fagocitan las células parasitarias (Liew y Vickerman, 1997).

Dependiendo de la genética del hospedador, puede existir una inmunidad natural total o parcial, lo que se relaciona a la marcada especificidad de los parásitos del género *Eimeria*. Es por lo anterior que diferentes razas y líneas de pollos varían en susceptibilidad a las infecciones por coccidias, no conociéndose bien los mecanismos de estas variaciones (Ruiz, 1990).

Las coccidias de las aves difieren en constitución genética, no produciendo inmunidad cruzada entre la mayoría de ellas ni afectando a diferentes especies de hospedadores (Ruiz, 1990). Es por lo anterior, que los pollos pueden sufrir tantos tipos de coccidiosis como número de especies los afecten (Pellerdy, 1965; Soulsby, 1987; Ruiz, 1990).

La inmunoprotección en las aves se crea en forma progresiva por infecciones y reinfecciones, no existiendo una relación de la edad con una resistencia a la enfermedad, ya que las aves domésticas son susceptibles de sufrir coccidiosis en cualquier etapa de su vida (Soulsby, 1987). La inmunidad protectora depende más del número de infecciones que de la cantidad de ooquistes inoculados (Soulsby, 1987; Ruiz, 1990; Tamasaukas, 1996).

Stiff y Bafundo (1993) encontraron que independientemente de la edad, todas las aves desafiadas con coccidias fueron capaces de establecer una inmunidad protectora completa contra *E. tenella*, *E. maxima* y *E. acervulina* bajo continuas exposiciones parasitarias.

Diversos estudios indican la posibilidad de que la inmunidad materna sea transferida a través de anticuerpos y células provenientes de gallinas previamente inmunizadas (Ruiz,

1990), pero todo parece indicar que la inmunidad materna no presentaría un rol protector relevante en los pollos recién nacidos, al no disminuir la susceptibilidad de presentar la infección. La inmunidad se desarrolla luego de infecciones previas, limitando futuros casos. Las gallinas ponedoras y reproductoras no se enferman durante el ciclo productivo debido a la inmunidad adquirida previamente por desafíos tempranos (McDougald y Fitz-Coy, 2008).

Las especies de coccidias varían en inmunogenicidad, e incluso, cepas de una misma especie pueden tener un comportamiento inmunológico diferente (Ruiz, 1990). Dentro de las especies de coccidias, *E. maxima* es considerada la más inmunogénica, seguida por *E. tenella* y *E. necatrix* (Soulsby, 1987; Ruiz, 1990).

Dentro del ciclo de las *Eimerias*, los esquizontes, esporozoitos y merozoitos de primera generación son los principales estadios responsables de generar una respuesta inmune, ya sea por acción directa o por productos de su metabolismo. Los ooquistes y formas sexuales del ciclo son considerados inductores de una inmunidad poco efectiva o poco protectora (Soulsby, 1987; Ruiz, 1990).

Long y Rose (1972) sugieren que la principal acción de los anticuerpos (Acs) es hacia las formas invasivas, especialmente durante sus fases extracelulares. IgM es la primera en aparecer, más tardíamente aparece IgG, siendo el descenso de sus niveles bastante lento. IgA se ha observado en secreciones biliares, lámina propia y mucus intestinal, donde parece tener una acción lítica sobre los estadios parasitarios señalados anteriormente.

La filtración de inmunoglobulinas presentes en el intestino se considera un posible mecanismo por medio del cual anticuerpos/antígenos específicos pueden prevenir, en forma efectiva, la penetración de los esporozoitos al epitelio intestinal (Mckenzie *et al.*, 1986).

La inmunidad celular interfiere en la penetración y multiplicación de las fases intracelulares de las coccidias en las células epiteliales de la pared del intestino (Ruiz, 1990).

Breed *et al.* (1999), realizando inmunización con fracciones de estadios parasitarios, lograron inducir en forma marcada la liberación de linfocitos T, lo que permitió que a nivel cecal, las lesiones fueran significativamente menores con respecto a aquellas aves no inmunizadas.

## **f. Diagnóstico e identificación**

Para hacer el diagnóstico de coccidiosis, la apariencia del ave y la visualización de lesiones intestinales puede ser suficiente información en algunos casos (North, 1990). En otras ocasiones, la confirmación de coccidiosis debe hacerse por laboratorio, cuando las lesiones no sean lo suficientemente específicas o se quiera identificar la especie de *Eimeria* actuante en infecciones mixtas (Whiteman y Bickford, 1983). En los últimos años se ha puesto más énfasis en la identificación bioquímica y fisiológica de las coccidias, usando nuevas herramientas para la identificación de especies, como la electroforesis de enzimas metabólicas (Shirley, 1979) y la técnica de PCR (Tsuji *et al.*, 1997).

Para poder realizar un diagnóstico de infección por coccidias e identificar el tipo de *Eimeria* actuante es necesario conocer diversas características, como son 1) la localización de las lesiones en el intestino, 2) la apariencia de la lesión, 3) el tamaño, forma y color de los ooquistes presentes, 4) el tamaño de los esquizontes y los merozoitos, 5) el tipo de célula parasitada, 6) el periodo de prepatencia y 7) la inmunogenicidad (McDougald y Fitz-Coy, 2008). También se deben conocer otras enfermedades que sean capaces de producir enteritis y diarrea, con el fin de realizar el diagnóstico diferencial, como son la enteritis ulcerativa, enteritis necrótica, salmonelosis, colibacilosis, micotoxicosis y diversas intoxicaciones (Del Cacho *et al.*, 1999).

Para lograr un correcto diagnóstico de coccidiosis es necesario recurrir a la necropsia, buscando lesiones intestinales características. El hallazgo de un gran número de ooquistes en las deyecciones del hospedero es indicativo de coccidiosis, pero no indica necesariamente un problema patológico grave (Soulsby, 1987). Este número dependerá de múltiples factores, entre los que se encuentran la cantidad de ooquistes ingeridos, el potencial reproductivo de la especie de *Eimeria*, la edad y estado inmunitario del hospedero, contactos previos, consistencia de la muestra de deyecciones, método de examen y etapa de la infección, entre otros. Es por esto que los resultados del examen coprológico deben relacionarse con los signos clínicos y lesiones intestinales (macro y microscópicamente) (Fraser, 1993).

Cada especie difiere en patogenicidad, localización y aspecto de las lesiones intestinales, lo cual debe ser usado para dirigir el diagnóstico, el cual debe realizarse con aves sacrificadas

e inmediatamente necropsiadas, debido a que los cambios postmortem en el intestino ocurren rápidamente (McDougald, 1997). Una vez muerta el ave, comienza un proceso de autólisis en el intestino, generando que luego de un tiempo, solamente se podrán ver las lesiones coccidiales que causaron masiva pérdida de sangre. Por otro lado, cuando se sacrifican aves enfermas para la necropsia y estas son inspeccionadas inmediatamente después de muertas, las lesiones serán más típicas y se podrá evaluar mejor la apariencia de la mucosa, presencia de hemorragias, moco o líquido en el intestino (McDougald, 1994).

El procedimiento de diagnóstico puede realizarse en varias etapas para poder llegar así a resultados definitivos y concluyentes, utilizando para ello pruebas únicas como también integrando más de un procedimiento diagnóstico. A continuación se señalan distintos procedimientos diagnósticos (Pellerdy, 1965; Hammond y Long, 1973; Soto, 1984; Soulsby, 1987; Ruiz, 1990; Mattiello *et al.*, 1997):

- a) Examen de campo: Mediante observación del cuadro clínico, historia del problema, manejo sanitario, calidad higiénica de los insumos, cantidad de aves afectadas, edad y performance de las aves, exámenes coprológicos de flotación en soluciones salinas saturadas, entre otros.
- b) Examen postmortem: El cual puede comprender una diversidad de métodos como la ubicación y descripción de lesiones en intestinos, exámenes coprológicos de flotación en soluciones salinas saturadas (pre y postmortem), observación directa de frotis de mucosa intestinal, uso de microscopía electrónica con micrómetro ocular y determinación histopatológica de los tejidos afectados.
- c) Determinación del periodo de esporulación y prepatencia de aves previamente infectadas.
- d) Infección experimental de aves con ooquistes infectivos.

En el caso de la coccidiosis subclínica, que es aquella que cursa en forma asintomática sin observarse lesiones anatomopatológicas evidentes, el diagnóstico deberá hacerse exclusivamente a través de técnicas de laboratorio, descartando el recuento de ooquistes en deyecciones o cama, ya que estas no permiten observar esquizontes, que son las formas parasitarias que mayor daño estructural producen a la mucosa y cuya detección es de suma

importancia para diagnosticar precozmente la coccidiosis subclínica y evaluar su curso. El método de elección para detectar la coccidiosis subclínica es la técnica de raspados seriados de la mucosa intestinal, evaluando por microscopia el número y ubicación en el epitelio de las formas parasitarias presentes. La coccidiosis subclínica tendrá significancia patológica siempre que se presente a una edad en la que el ave no logre completar su crecimiento compensatorio, que es fundamental en pollos broiler, siendo su periodo crítico entre la tercera y quinta semana de edad, donde los requerimientos del ave son máximos (Mattiello *et al.*, 1997).

#### **g. Prevención y Control**

Hasta antes de 1940 se intentaba controlar la coccidiosis con recetas alquimistas como leche desnatada, vinagre o azufre en flor (Robertson, 1986). Actualmente los programas de control de coccidiosis en pollos broiler se basan principalmente en la medicación preventiva, administrando una droga anticoccidial en la ración durante la mayor parte de la crianza (Melhorn, 1993). Las drogas se denominan en general anticoccidianos, entre los cuales pueden diferenciarse los coccidiostatos que sólo inhiben el crecimiento de los coccidios y los coccididas que interrumpen el ciclo de vida (Yuño y Gorgoza, 2008).

Las drogas coccidiostáticas han tenido gran éxito y realmente han permitido el control de la enfermedad, sin embargo han ido apareciendo cepas de coccidias resistentes o de sensibilidad reducida (Allen, 1997).

Dado que no es posible erradicar la enfermedad, los programas anticoccidiales tienen por objeto minimizar los efectos de la coccidiosis y a la vez maximizar la productividad (Watkins, 1998).

##### a) Prevención

En un principio la prevención de coccidiosis se hacía sólo mediante programas continuos con drogas aplicadas en el alimento durante toda la campaña, lo cual presentaba las desventajas de presentar riesgos de toxicidad y mayor costo (McDougald, 1983b). Posteriormente, debido a la generación de resistencia, se preconizó el uso rotativo de las drogas (Comotto, 2000), considerándose esencial cambiar la droga anticoccidial como máximo cada año o cada 5 crianzas (Bafundo, 1994; Chapman, 1998).

Considerando la naturaleza multifactorial de la enfermedad, es recomendable mantener un buen estado general del lote en cuanto a manejo, sanidad y alimentación en general (Pomiano, 2000). Fallas en estos factores conllevan a una reducción en el consumo de alimento y por lo tanto, de la droga anticoccidial (Bafundo, 1994).

Es importante considerar que los conceptos de desinfección para prevenir brotes, no son del todo válidos porque: 1) han habido muchas fallas en estos programas, 2) los ooquistes son extremadamente resistentes a la mayoría de los desinfectantes, 3) la esterilización completa de las instalaciones nunca es posible y 4) un ambiente libre de ooquistes no permite el establecimiento de inmunidad (McDougald, 1997).

Tiene mucha importancia el mantenimiento del buen estado de la cama, en especial cerca de los bebederos, evitando la humedad y proliferación de artrópodos (Borchet, 1981; Whiteman y Bickford 1983; Ruiz; 1990). Asimismo se debe eliminar permanentemente las aves enfermas o desuniformes, que pueden aumentar la contaminación de la cama (Ruiz, 1990).

Para evaluar la efectividad de un programa anticoccidial y prevenir la presentación de la enfermedad, es importante medir más de un parámetro, siendo recomendable hacer un monitoreo regular del lote, realizando necropsias de aves al azar para buscar lesiones intestinales coccidiales y recolectando cama, para someterla a recuento de ooquistes (McDougald, 1999). Siendo la cama la principal fuente de infección, su evaluación da información importante (Ruiz, 1990), sin embargo se menciona que la información conseguida con este método es útil a largo plazo (McDougald, 1997) y se debe establecer un patrón normal para cada localidad, a través de varias crianzas y programas que se hayan utilizado (McDougald, 1999). Se debe tener en cuenta que algunos factores pueden alterar la interpretación de esta prueba, como es el hecho que las especies más prolíficas de coccidias son menos patógenas, y se encontrarían recuentos altos sin un cuadro clínico severo (McDougald, 1994). Además, se ha encontrado una correlación moderada entre el recuento de ooquistes en cama y las lesiones intestinales macroscópicas y microscópicas causadas por coccidias, debido probablemente a que los otros factores que propician la presentación de coccidiosis, estuvieron bien controlados (Salinas, 2000). También es posible realizar el recuento de ooquistes directamente en deyecciones, método que ofrece

una visión más precisa, puntual e individual que el recuento de ooquistes en cama, en donde existe un factor de dilución mayor producto de los elementos propios que conforman la cama además de las deyecciones (Rubio *et al.* 2012).

Del Cacho *et al.* (2001) usaron el método de recuento de ooquistes en deyecciones para evaluar un ensayo de vacunación a gran escala de la vacuna Paracox 5® en pollitos de 1 día de edad. Mediante este estudio, lograron comparar la cinética de eliminación de ooquistes en diferentes explotaciones sometidas a distintas condiciones de manejo y características productivas. En este estudio, el 85% de los galpones vacunados alcanzaron la mayor cantidad de ooquistes eliminados a los 21 días postvacunación, el 11% a los 28 días postvacunación y el 4% a los 15 días postvacunación. Así mismo, Juárez *et al.* (2002) usaron el método de recuento de ooquistes en deyecciones para comparar los resultados, al usar dos instrumentos diferentes como son la Cámara de McMaster y el hemocitómetro de Neubauer. En este estudio, inocularon ooquistes esporulados de *E. tenella* a dos grupos de aves Leghorn de 5 semanas de edad. Siete días postinoculación se efectuó la evaluación con uno u otro instrumento, obteniéndose resultados similares para ambos.

También como método de prevención, la vacunación está siendo cada vez más usada. Para 1994 existían por lo menos 4 vacunas comerciales para la prevención de coccidiosis, todas destinadas mayormente a ponedoras y reproductoras (Del Cacho *et al.*, 1999), sin embargo durante los últimos años han demostrado ser útiles en pollos de engorda (McDougald, 1999).

b) Control:

Las drogas para el control de la coccidiosis producida por las diferentes especies de *Eimeria* en gallinas han sido comercializadas desde 1940. Por muchos años la quimioterapéutica fue la única forma de control de la coccidiosis, pero los crecientes problemas en su uso llevó a que nuevos métodos para el control, sean cada vez más estudiados (Williams y Andrews, 2001).

Las drogas se denominan anticoccidiales, entre las cuales pueden diferenciarse los coccidiostatos y los coccidicidas. Todos los anticoccidiales son susceptibles de inducir

resistencia por parte de los protozoarios. Para evitarla, existen programas de rotación de drogas o bien, la inmunización (Yuño y Gorgoza, 2008).

Distintos métodos se han investigado en la búsqueda de caminos alternativos para el control de la coccidiosis aviar. Los primeros medicamentos fueron las sulfamidas (sulfametazina, sulfaguanidina y sulfaquinoxalina); luego se introdujeron en el mercado otras moléculas como los nitrofuranos (actualmente prohibidos en animales para consumo humano). Hace tres décadas que no se generan nuevos medicamentos anticoccidianos en la industria avícola. Las drogas disponibles en la actualidad son más de 15, las cuales pueden clasificarse en compuestos de síntesis química (halofuginona, nicarbazina, dilclazuril) y antibióticos ionóforos producidos por fermentación (monensina, salinomicina, lasalocid, narasina), los cuales radican su eficacia en que no interfieren con el desarrollo de inmunidad. Se suelen utilizar combinaciones de drogas, especialmente las sintéticas con ionóforos (narasina + nicarbazina) (Yuño y Gorgoza, 2008).

Los ionóforos han sido ampliamente utilizados a nivel mundial y han tenido menor generación de resistencias, debido a que los coccidios deben desarrollar varios cambios genéticos para resistir a su efecto (McDougald, 1983a). Sin embargo se han reportado cepas de sensibilidad reducida con el uso de ionóforos, la cual no varía con cada droga, si no que se presenta con los ionóforos en general (McDougald, 1994). La principal desventaja de estas drogas es la depresión que producen en el consumo de alimento, esto sumado a otras causas que reducen el consumo de alimento, perjudican el programa de control de coccidiosis (Pomiano, 2000; McDougald, 1983b).

Un problema creciente que existe en cuanto al control de la coccidiosis, es la generación de resistencia por parte de las coccidias a ciertas drogas anticoccidiales. La resistencia se va produciendo por una selección continua de parásitos que sobreviven a las concentraciones de medicación preventiva, así como sub dosificaciones en la formulación (Chapman, 1998).

Para intentar retardar el desarrollo de resistencia, hoy en día es usado el sistema dual de drogas, es decir, el uso de un anticoccidial en el iniciador y de otro en el crecimiento acabado (McDougald, 1997). En el uso de un programa dual, la resistencia aparece durante el uso de la primera droga, luego los parásitos pueden sobrevivir en la cama durante el uso de la segunda droga. Cuando la primera droga se usa nuevamente en el siguiente lote,

resultará en la generación de resistencia (Chapman, 1998). Aunque no hay evidencia científica que apoye este sistema, actualmente es de amplio uso. Su uso también tiene justificación económica, dado que puede usarse una droga costosa sólo durante la mitad de la campaña, en vez de durante toda la campaña (McDougald, 1983b).

El uso de vacunas anticoccidiales en aves de crianza es, probablemente, el curso óptimo en la mayoría de las situaciones, sobre todo con la opción actual de vacunar a los pollitos en la incubadora mediante aspersión o inoculación ocular. Las aves vacunadas deben ser cuidadosamente controladas para asegurarse de que han desarrollado la inmunidad. El tratamiento con un fármaco anticoccidial a través del agua (por ejemplo, el amprolio, sulfaquinoxoline y toltrazuril) puede ser necesario en los grupos vacunados, si un reto grave de coccidias se diagnostica antes de que la inmunidad se haya desarrollado completamente (Conway y McKenzie, 2007).

También existen riesgos asociados a la vacunación, como por ejemplo una reacción exagerada a *E. acervulina* y *E. maxima* presentes en la vacuna puede afectar negativamente a las aves en cuanto a su capacidad de absorción de vitaminas, especialmente vitaminas A, D, E y K. En vista de este problema potencial, se recomienda la adición de vitaminas en el agua de bebida de pollos durante este período (Conway y McKenzie, 2007).

#### c) Productos Naturales para el tratamiento de la Coccidiosis

Debido al problema de la resistencia de las coccidias a los anticoccidianos y su prohibición progresiva por problemas de inocuidad alimentaria, es que se hace necesario reemplazar estos productos en el alimento de los pollos y buscar nuevas estrategias que logren cumplir esta función (Nawaz *et al.*, 2000; Bertolatti *et al.*, 2003; Wallace, 2004). Lo anterior ha incentivado la búsqueda de sistemas naturales que inhiban el desarrollo de las coccidias. Es así como diversos autores han publicado sobre la efectividad de diferentes productos naturales para el control de la coccidiosis aviar, dentro de los que se pueden mencionar el aloe vera y componentes bioactivos de un extracto acuoso del hongo *Ganoderma lucidum* entre varios otros (Hassan *et al.*, 2008; Akhtar *et al.*, 2012).

Existen plantas que son usadas para tratar enfermedades en los animales, así como también existen reportes del uso de extractos de plantas para el tratamiento de la coccidiosis (Arab

*et al.*, 2006). Un ejemplo de producto natural para el tratamiento de la coccidiosis aviar lo constituye la harina de guar (*Gyamopsis tetragonoloba*), el cual tiene altos niveles de saponinas y demostró ser efectivo en reducir el número de ooquistes por gramo de deyecciones y prevenir la diarrea sanguinolenta producida por *E. tenella* en pollos infectados experimentalmente (Hassan *et al.*, 2008).

## 2. Saponinas

Las saponinas son glucósidos esteroidales o triterpénicos que son generados principalmente por plantas, aunque también por bacterias y animales marinos menores (Riguera 1997; Yoshiki *et al.*, 1998; Nasri *et al.*, 2011). Al menos existen 20 diferentes saponinas identificadas de la corteza de diferentes plantas y se describe que cumplirían una función en el sistema de defensa de las plantas al presentar propiedades antibacterianas, antifúngicas y contra los ataques de insectos (Morrissey y Osbourn, 1999).

Las saponinas están compuestas de un azúcar, usualmente glucosa, galactosa, ácido glucurónico, xilosa, ramnosa o metilpentosa, la cual está unida por un enlace glucosídico a una aglicona hidrofóbica (sapogenina) la que, en la naturaleza, puede ser esteroide o triterpenoide (Francis *et al.*, 2002).

La extracción de saponinas a partir de diversos materiales biológicos ha sido reportada bajo múltiples procedimientos, sin embargo, dada la naturaleza en gran manera polar de estos compuestos, todos los métodos coinciden en la extracción en caliente o frío, con agua o alcoholes de bajo peso molecular. Entre estos sobresalen el uso de metanol, etanol, butanol y mezclas de diferentes proporciones de estos alcoholes y agua (Hernández *et al.*, 2005).

En la actualidad, las saponinas están siendo investigadas por su actividad antibacteriana (especialmente bacterias Gram-positivas como *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*) (Avato *et al.*, 2006; Hassan *et al.*, 2007), antiprotozoaria (especialmente sobre protozoos ruminales) (Mshvildadze *et al.*, 2000) y antifúngica (como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*) (Yang *et al.*, 2006).

Se ha reportado que al mezclar saponinas con el alimento o el agua de bebida de los animales de granja, se previenen enfermedades respiratorias, favorece la absorción de

nutrientes y disminuye la emisión de amoníaco y otros gases tóxicos producto de los excrementos y la orina (Aguirre, 2008).

#### **a. Saponinas del Quillay**

La corteza del quillay (*Quillaja saponaria*), árbol endémico de la zona central de Chile, es una de las principales fuentes industriales de saponinas triterpénicas en el mundo (Cheeke, 2001; Francis *et al.*, 2002). Durante décadas los extractos de quillay han sido usados como espumantes en bebidas, emulsificante en alimentos, agente humectante en fotografías, etc. (Cheeke, 2001).

Este árbol crece naturalmente en la zona central del país e históricamente, la corteza ha sido exportada a Estados Unidos, Europa y Japón, no siendo procesada en Chile (San Martín y Briones, 1999).

La sobre explotación de su corteza ha causado un importante daño ecológico y escasez de este recurso. Hasta hace algún tiempo atrás, para obtener corteza en cantidades rentables, árboles de alrededor de 30 a 50 años, con un diámetro de 20 a 50 cm eran talados. Para satisfacer la demanda mundial, sobre 50.000 árboles eran talados cada año, los cuales eran descortezados dejando la biomasa sobrante en el campo, la que se usaba para carbón, o simplemente se descomponía. Aproximadamente el 95% del peso del árbol, es decir, 20.000 toneladas por año se perdían por el hecho de explotar el recurso de esa manera. Afortunadamente, en el último tiempo, esto ha podido ser remediado usando en forma integral toda la biomasa del árbol y no solo la corteza. Esta materia prima es abundante, y se obtiene del raleo de los bosques existentes, sin necesidad de cortar árboles (Nifuri, 2005).

Estudios recientes han demostrado, con satisfacción, la calidad de los productos derivados de toda la madera, comparados con los productos comerciales derivados de la corteza. Usando este nuevo proceso de producción, menos de 10.000 árboles por año pueden satisfacer la presente demanda mundial de saponinas de quillay. Es más, la madera puede ser obtenida totalmente desde las podas de arbustos existentes que regeneran después de la explotación de la corteza. Basado en este nuevo proceso, una empresa opera en Chile

(Natural Response S.A., Quilpué), la cual usa todo el recurso y lo procesa produciendo extractos purificados de saponinas de quillay (Desert King, 2001).

#### **b. Composición química de las saponinas de quillay**

Variadas técnicas pueden ser usadas para analizar las saponinas, siendo necesario primero la extracción y purificación de la planta. El proceso comienza con la extracción del material de la planta con metanol o etanol. Luego viene un proceso de evaporación mediante la aplicación de bajas presiones, un proceso de disolución en agua y finalmente separación en n-butanol. Luego se sigue purificando mediante un proceso que involucra cromatografía líquida o más comúnmente cromatografía de exclusión por tamaño molecular (HPLC). Una vez que la saponina ha sido purificada, puede ser sometida a métodos de análisis los que incluyen espectrometría de masas (MS), resonancia magnética nuclear (NMR) y espectroscopia infrarroja (Francis *et al.*, 2002).

Así, por ejemplo, las saponinas monoméricas tienen una masa molecular, determinado por HPLC en el rango de 1.800 - 2.000 u (Kensil *et al.*, 1991). Un ácido graso dominante y su grupo aldehído triterpénico, en posición 4, son importantes rasgos estructurales que distinguen a las saponinas de *Q. saponaria* de otras especies de plantas (Recchia *et al.*, 1995).

Las saponinas del quillay son clasificadas como bisdesmosidos, es decir, contienen dos mitades de azúcares unidas a un núcleo triterpénico en posición 3 y 28 (Francis *et al.*, 2002). Poseen un núcleo triterpénico, el cual ha sido identificado como ácido quillaico y presenta dos cadenas de azúcares unidas a él, las que le confieren a un carácter hidrofóbico, mientras que las cadenas de azúcar le confieren un carácter hidrofílico, lo cual las convierte en una molécula anfótera (Higuchi *et al.*, 1998; Cheeke, 2001) (Anexo 4).

#### **c. Método de producción**

Los extractos de quillay son comercializados con diferente grado de purificación. El producto líquido tipo, es preparado mediante una extracción acuosa, posterior al molido del material crudo. El paso siguiente, es la concentración del líquido mediante evaporación para obtener la concentración deseada de sólidos. En algunos casos es necesario, para purificar el extracto, el contacto con carbón activado o filtración, para remover compuestos

y así evitar precipitados durante el almacenamiento. El producto final contiene saponinas, proteínas, taninos, polifenoles, oxalato de calcio y azúcares (Rocher, 1969).

Los productos líquidos no refinados contienen, en sólidos totales, aproximadamente 550 g/L y cuando son diluidos con agua, ellos adquieren un color rojo anaranjado. Sus preservantes comunes son benzoato de sodio (0,5-1 g/L) y etanol, sin embargo algunas empresas no utilizan ningún tipo de preservante. Los productos más refinados involucran la remoción de compuestos no relacionados a las saponinas como son polifenoles, oxalato de calcio, azúcar y taninos, que pueden interferir en términos de color, interacción química, sabor y olor. Para este propósito la purificación con resinas poliméricas como Diaion HP-20 y solventes orgánicos han sido usados (Ogawa y Yokota, 1985; Ogawa y Murakami, 1987). Una alternativa de aproximación a lo mencionado anteriormente emplea la remoción de compuestos de bajo peso molecular mediante diafiltración con membranas de ultrafiltración con límites de 10-30 kDa que retienen micelas de saponinas (Kensil *et al.*, 1991).

La calidad del extracto final es evaluada en términos de claridad y color en solución, como también por sus propiedades espumantes. Recientemente para la aplicación de las saponinas ha sido necesario estandarizar y precisar los procedimientos analíticos, considerando particularmente el contenido neto de saponinas (Nifuri, 2005).

#### **d. Saponinas y su efecto antiprotozoario**

Según estudios realizados en rumiantes, las saponinas tendrían un pronunciado efecto antiprotozoario. En estos estudios, se evidenció una disminución de la población protozoaria ruminal posterior a la administración oral de saponinas a través de la dieta (Lu y Jorgensen, 1987). A la vez, existen ensayos hechos en sistemas de fermentación ruminal *in vitro*, que abalan esta afirmación (Makkar *et al.*, 1998).

Son compuestos altamente lipofílicos y liposolubles, lo que les da la capacidad de desplazarse a la membrana del parásito y unirse a un fosfolípido de membrana que le permite al parásito ingresar a la célula intestinal del hospedador, formando un complejo y precipitándolo. Es por esta razón que las saponinas serían menos activas contra *E. acervulina*, dado que esta coccidia ingresa con más rapidez en la mucosa intestinal,

quedando fuera de la acción del compuesto natural, el cual actúa en la luz intestinal, no siendo absorbido. Esta misma razón hace que las saponinas sean más efectivas contra *E. tenella* (Sims *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos en rumiantes, sugieren que podría existir un eventual efecto de las saponinas contra enfermedades protozoarias que afectan a los humanos y animales de abasto, actuando en la parte del ciclo de vida del parásito que ocurre en el tracto gastrointestinal. Un ejemplo de esto es la enfermedad giardiosis, causada por el protozoo *Giardia lamblia*, también conocida como *G. duodenalis*, considerada como uno de los patógenos intestinales más comunes en humanos y animales. Se ha demostrado que las saponinas de extractos de *Yucca sp.*, son efectivas en destruir sus trofozoítos en el intestino (McAllister *et al.*, 1998). Así mismo, se ha descrito que extractos de plantas que contienen saponinas tienen actividad protectora contra los protozoos que generan la leishmaniosis humana (McClure y Nolan, 1996).

Además existen reportes donde se especifica el uso de las saponinas como adyuvantes en vacunas antiprotozoarias (Bomford, 1989).

Lo anteriormente mencionado sobre las saponinas, sumado a que son compuestos orgánicos prácticamente atóxicos, que no requieren de un periodo de restricción ni tienen efecto depresor del consumo de alimento y que se pueden usar en múltiples combinaciones para programas duales, las hacen generar buenas expectativas para el tratamiento de la coccidiosis en aves (Sims *et al.*, 2001).

## **HIPÓTESIS**

Existe un efecto protector de las saponinas del quillay (*Quillaja saponaria*) frente a la infección coccidial experimental en pollos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la efectividad de un producto comercial (Nema-Q®), basado en saponinas del quillay (*Quillaja saponaria*), como agente inhibidor del desarrollo de coccidias intestinales en pollos de engorda, infectados experimentalmente.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Cuantificar el efecto inhibidor de saponinas (Nema-Q®) sobre la multiplicación intestinal de las coccidias.
2. Cuantificar el efecto protector de las saponinas (Nema-Q®) sobre el daño macroscópico y microscópico en el epitelio intestinal de pollos, desafiados con una dosis infectante de coccidias vacunales.
3. Cuantificar el efecto de las saponinas sobre la ganancia de peso y la eficiencia de conversión alimentaria en pollos infectados de coccidiosis experimentalmente.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### Saponinas del Quillay:

Se emplearon saponinas del árbol quillay (*Quillaja saponaria*) facilitadas por la empresa Desert King. El producto utilizado corresponde a una presentación comercial líquida denominada Nema-Q®, cuyo contenido en saponinas es de un 6% y está diseñado para ser aplicado en el agua de bebida.

### Desafío coccidial:

Para evaluar el efecto anticoccidiano de las saponinas en el producto Nema-Q®, se debió establecer un modelo de reproducción de la coccidiosis. Para este efecto se utilizó un modelo de desafío con altas dosis de la vacuna viva Immucox®, la cual contiene ooquistes vivos atenuados suspendidas en un vehículo estéril acuoso de las siguientes especies de *Eimeria*:

- *E. acervulina* (150 - 300 ooquistes por cada dosis)
- *E. brunetti* (20 - 30 ooquistes por cada dosis)
- *E. maxima* (10 - 20 ooquistes por cada dosis)
- *E. necatrix* (10 - 20 ooquistes por cada dosis)
- *E. tenella* (50 - 75 ooquistes por cada dosis)

El ensayo consistió en inocular oralmente a los 14 días de edad, mediante una sonda conectada directamente al buche, 15 dosis de la vacuna Immucox® (tomando como referencia los estudios de Jerzslé *et al.*, 2011 y Gholamiandehkordi *et al.*, 2007), con el objetivo de reproducir signos y lesiones de coccidiosis en forma consistente para posteriormente evaluar la actividad anticoccidial del producto comercial Nema-Q®, administrándolo en el agua de bebida.

### Aves:

Se emplearon 132 pollos de engorda machos de la línea genética Ross, criados desde el día de edad hasta los 23 días de edad, en un galpón aislado ubicado en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Estos pollos fueron traídos de la Empresa Agrícola Chorombo y fueron mantenidos en una batería calefaccionada con

comederos y bebederos individuales, a una densidad de 0,06 m<sup>2</sup> por ave (6 pollos en jaulas de 100x40cm).

#### Alimento y agua de bebida:

El alimento usado correspondió a alimento de crianza de origen comercial carente de drogas anticoccidiales.

El agua de bebida utilizada fue agua potable común y corriente, la misma que fue utilizada para administrar el Nema-Q® en los tratamientos experimentales.

#### Metodología:

Las 132 aves fueron divididas en 5 grupos, cada uno con 5 subgrupos de 6 pollos cada uno, exceptuando un grupo “Control S/S”, el cual estuvo conformado por 2 subgrupos de 6 pollos cada uno:

1. Control C/S: grupo **con** desafío coccidial y agua **sin** aditivo de saponinas (30 pollos).
  2. Grupo 1: grupo **con** desafío coccidial y agua **con** saponinas en una concentración de **125 ppm** (30 pollos).
  3. Grupo 2: grupo **con** desafío coccidial y agua **con** saponinas en una concentración de **250 ppm** (30 pollos).
  4. Grupo 3: grupo **con** desafío coccidial y agua **con** saponinas en una concentración de **500 ppm** (30 pollos).
  5. Control S/S: grupo **sin** desafío coccidial y agua **sin** aditivo de saponinas (12 pollos).
- Las diferentes concentraciones del producto fueron establecidas por el fabricante.

El producto Nema-Q® fue entregado desde 3 días antes del desafío (a partir de los 11 días de edad, como premedicación), hasta el último día de vida de las aves (23 días de edad).

El efecto anticoccidiano de las saponinas del Nema-Q® fue evaluado mediante:

**(a) Recuento de ooquistes en deposiciones:**

A partir del cuarto día post desafío coccidial (18 días de edad) y hasta el último día de vida de las aves (23 días de edad), se realizó la recolección diaria de deyecciones, las cuales fueron sometidas a examen de recuento de ooquistes en Cámara de McMaster para obtener el número de ooquistes por gramo de deyecciones (OPG) diario correspondiente, realizándose un total de 6 mediciones.

Los hallazgos encontrados en cuanto al OPG fueron sometidos a descripción de tipo cualitativo.

**(b) La observación de lesiones intestinales macroscópicas y microscópicas:**

Las 132 aves en estudio fueron sacrificadas al noveno día post inoculación (23 días de edad), para evaluar y comparar macroscópicamente y microscópicamente la existencia de lesiones intestinales coccidiales entre los distintos grupos, evidenciando si la saponina fue efectiva en su prevención.

Se realizó la necropsia, extrayendo y examinando macroscópicamente el intestino completo de cada ave con el fin de encontrar hallazgos de anatomía patológica. Se verificaron las lesiones de la pared intestinal y luego se examinó la mucosa con la finalidad de describir el tipo de lesión y su localización. Ante cualquier lesión macroscópica encontrada se calificó el grado de la lesión en una escala de 0 a 4, de acuerdo con el método de Johnson y Reid (1970).

El examen microscópico del intestino se realizó mediante histopatología, tomando muestras de aproximadamente 1 centímetro de largo de intestino anterior (en el “loop” duodenal), intestino medio (yeyuno a 1 cm de distancia del divertículo de Meckel) y ciego (en la zona media cecal) de los grupos 1, 3, Control C/S y Control S/S. El Grupo 2 no fue considerado por razones económicas, considerándose en la medición los dos grupos extremos en cuanto a concentración de saponinas en el agua de bebida (el Grupo 1 con la menor concentración de saponinas y el Grupo 3 con la mayor concentración de saponinas).

Se tomaron 36 muestras del Grupo 1 (12 muestras de duodeno, 12 muestras de yeyuno y 12 muestras de ciego), 36 muestras del Grupo 3, 36 muestras del grupo Control C/S y 18

muestras (6 muestras de duodeno. 6 muestras de yeyuno y 6 muestras de ciego) del Grupo Control S/S. Las muestras para histopatología fueron sometidas a un estudio descriptivo, con el fin de caracterizar las principales alteraciones encontradas en los distintos segmentos del intestino. Para esto las muestras fueron conservadas en frascos con formalina al 10% hasta el momento de ser procesadas. El menor número de muestras para el grupo Control S/S se explica por el menor número de aves que presentaba este grupo.

Los hallazgos de anatomía patológica e histopatología fueron sometidos a descripción de tipo cualitativo.

**(c) Efectos sobre los parámetros productivos (ganancia de peso y eficiencia de conversión alimentaria):**

Para la evaluación de los parámetros productivos, las aves fueron pesadas individualmente a los 4, 8, 14 y 21 días de edad así como también se realizaron mediciones del consumo de alimento a los 8, 14 y 21 días de edad. Lo anterior se realizó con el objetivo de hacer comparaciones estadísticas entre los distintos grupos en cuanto a sus ganancias de peso promedio y eficiencia de conversión alimentaria promedio, en 3 etapas productivas experimentales: 4 a 8 días (primera fase); 8 a 14 días (segunda fase); 14 a 21 días (tercera fase):

- Primera fase: corresponde a un periodo en que ningún grupo estaba desafiado con coccidias ni estaba siendo tratado con saponinas en el agua de bebida.
- Segunda fase: corresponde a un periodo en que ningún grupo estaba desafiado con coccidias, pero si presentaban saponinas en el agua de bebida los Grupos 1, 2 y 3 a partir de los 11 días de edad.
- Tercera fase: corresponde a un periodo en que existe desafío coccidial en los grupos Control C/S, 1, 2 y 3, y además saponinas en el agua de bebida en los Grupos 1,2 y 3.

El modelo estadístico utilizado fue el de Análisis de Varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de un 95%; también se usó la prueba de Tukey (comparaciones múltiples) para determinar e individualizar diferencias entre grupos.

Manejo de aves experimentales:

El sacrificio humanitario de las aves fue realizado mediante dislocación cervical (2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia, 2001).

Las aves muertas y examinadas, fueron eliminadas por incineración, en el horno incinerador de desechos biológicos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Este protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Anexo 5).

## RESULTADOS

Tal como se describió en los objetivos específicos de esta memoria de título, la efectividad de las saponinas del quillay sobre pollos infectados con coccidiosis fue evaluada mediante los siguientes parámetros:

1. Recuento de ooquistes por gramo de deyecciones (OPG):

A continuación se presenta un cuadro resumen con los OPG promedio para cada grupo:

**Cuadro N°1: Recuento promedio de ooquistes en OPG (ooquistes por gramo de deyecciones), a partir del cuarto día posterior al desafío con 15 dosis de la vacuna coccidial Immucox®.**

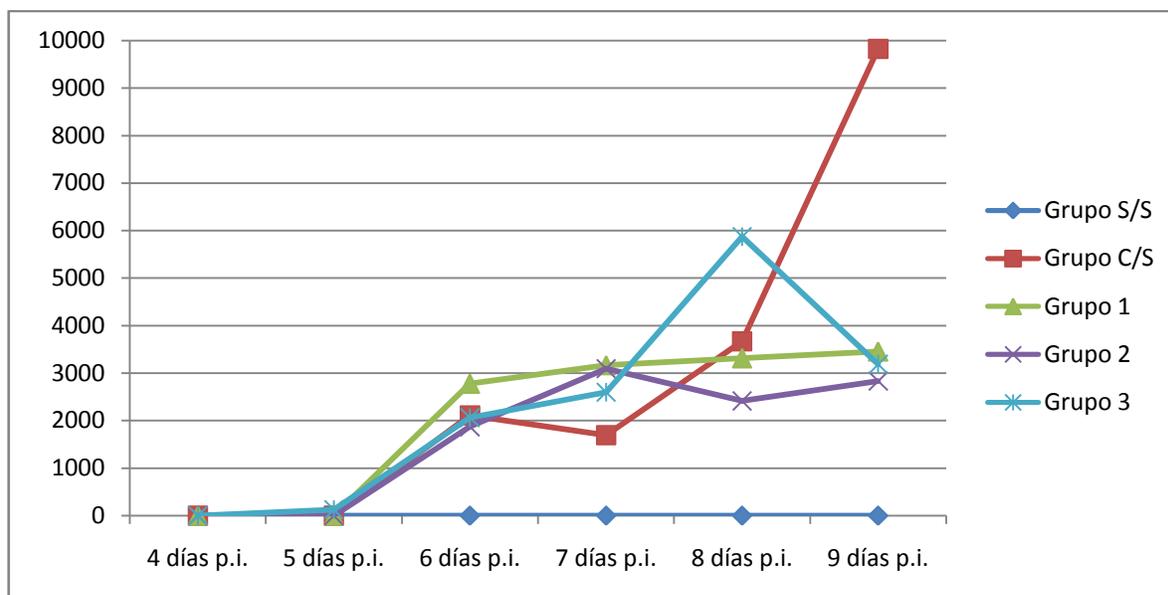
	Control S/S	Control C/S	Grupo 1 125 ppm	Grupo 2 250 ppm	Grupo 3 500 ppm
Saponinas	-	-			
Desafío coccidial	-	15x	15x	15x	15x
4 días post desafío	0	0	0	0	0
5 días post desafío	0	0	0	0	128
6 días post desafío	0	2.112	2.776	1.872	2.064
7 días post desafío	0	1.696	3.168	3.096	2.600
8 días post desafío	0	3.672	3.312	2.416	5.872
9 días post desafío	0	9.824	3.456	2.832	3.184

- Las saponinas fueron medicadas desde 3 días antes del desafío (a partir de los 11 días de edad), hasta el último día de vida de las aves (23 días de edad).

El grupo Control S/S, al no presentar un desafío coccidial, se mantuvo en un recuento de cero durante todo el periodo. También se puede observar que mientras los grupos con saponinas en el agua de bebida presentaron un recuento de ooquistes en sus deyecciones similar entre ellos a lo largo del tiempo, a los 9 días post desafío coccidial el grupo Control C/S presentó un alza muy superior al recuento mostrado por los otros grupos, llegando a un recuento promedio de 9.824 OPG en comparación a los valores de 3.456 OPG que mostró el Grupo 1, 2.832 OPG del Grupo 2 y 3.184 OPG del Grupo 3.

A continuación se presenta un gráfico que representa las cantidades de ooquistes para cada día post desafío coccidial:

**Gráfico N°1: Recuento promedio de ooquistes en OPG (ooquistes por gramo de deyecciones), a partir del cuarto día posterior al desafío con 15 dosis de la vacuna coccidial Immucox®.**



- Control S/S: grupo **sin** desafío coccidial y agua **sin** aditivo de saponinas (12 pollos).
- Control C/S: grupo **con** desafío coccidial y agua **sin** aditivo de saponinas (30 pollos).
- Grupo 1: grupo **con** desafío coccidial y agua **con** saponinas en una concentración de **125 ppm** (30 pollos).
- Grupo 2: grupo **con** desafío coccidial y agua **con** saponinas en una concentración de **250 ppm** (30 pollos).
- Grupo 3: grupo **con** desafío coccidial y agua **con** saponinas en una concentración de **500 ppm** (30 pollos).

## 2. Lesiones macroscópicas intestinales:

En cuanto a las lesiones macroscópicas encontradas, estas fueron escasas en todos los grupos. A continuación se presenta un cuadro resumen con el número de pollos con lesiones visualizadas en cada grupo:

**Cuadro N°2: Número de pollos con lesiones intestinales macroscópicas encontradas en los diferentes grupos experimentales a los 23 días de edad (9 días post desafío coccidial con 15 dosis de la vacuna Immucox®).**

		Control S/S	Control C/S	Grupo 1 125ppm	Grupo 2 250ppm	Grupo 3 500ppm
<b>Saponinas</b>		-	-			
<b>Desafío coccidial</b>		-	15x	15x	15x	15x
<b>Número de aves</b>		<b>12</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>
<b>Intestino Anterior</b>	Lesiones blanquecinas	0	3	1	1	0
	Congestión de la mucosa	0	4	6	2	6
<b>Intestino Medio</b>	Contenido anaranjado	0	5	6	2	3
	Congestión de la mucosa	0	1	1	1	0
<b>Intestino Posterior</b>	Congestión de la mucosa	0	0	0	0	1

En esta experiencia la mayor cantidad de lesiones fueron inespecíficas. Las únicas lesiones atribuibles directamente a coccidiosis corresponden a las lesiones con aspecto de bandas blanquecinas escalonadas visualizadas en duodeno del grupo Control C/S, Grupo 1 y 2. Las lesiones del grupo Control C/S fueron levemente más severas que las de los Grupos 1 y 2, correspondiendo al grado 1,5 de la escala de Johnson y Reid, a diferencia de las de los grupos con saponinas que fueron muy leves, clasificándose como grado 1 según la misma escala.

Los ciegos no fueron incluidos en la tabla ya que no se observaron lesiones macroscópicas en ninguno de ellos.

Imágenes de las lesiones visualizadas pueden ser encontradas en el Anexo 6.

### 3. Lesiones histopatológicas:

No se observaron diferencias claras entre los distintos grupos, tampoco se encontraron estados evolutivos de *Eimeria*. Las lesiones histopatológicas por lo general fueron escasas, restringiéndose en su mayoría a infiltrado inflamatorio de linfocitos, plasmocitos, histiocitos, macrófagos y heterófilos en la mucosa y lámina propia, engrosamiento y acortamiento de las vellosidades intestinales y criptas dilatadas.

El detalle del examen histopatológico puede ser observado en el Anexo 7.

### 4. Parámetros productivos:

El detalle de los pesajes, consumo de alimento, IECA y ganancia de peso para los diferentes periodos puede ser observado en los Anexos 8, 9, 10 y 11 respectivamente.

La ganancia de peso y el IECA fueron sometidos a análisis estadístico, obteniéndose los siguientes resultados:

**Cuadro N°3: Peso corporal, índice de eficiencia de conversión alimentaria (IECA) y ganancia de peso total para aves tratadas con y sin saponinas y con y sin desafío coccidial.**

<b>Tratamientos</b>	<b>Grupo S/S</b>	<b>Grupo C/S</b>	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3</b>
<b>Saponinas</b>	-	-	<b>125ppm</b>	<b>250ppm</b>	<b>500ppm</b>
<b>Desafío coccidial</b>	-	<b>15x</b>	<b>15x</b>	<b>15x</b>	<b>15x</b>
<b>Primera Fase (4-8 días)</b>					
<b>Peso Final (g)</b>	111,50 <sup>b</sup>	99,73 <sup>a</sup>	93,97 <sup>a</sup>	110,67 <sup>b</sup>	99,10 <sup>a</sup>
<b>IECA</b>	1,43	1,56	1,57	1,47	1,52
<b>Ganancia de Peso total (g)</b>	57,50 <sup>b</sup>	45,84 <sup>a</sup>	39,95 <sup>a</sup>	56,65 <sup>b</sup>	44,95 <sup>a</sup>

<b>Segunda Fase (8-14 días)</b>					
<b>Peso Final (g)</b>	297,00 <sup>c</sup>	240,50 <sup>ab</sup>	228,13 <sup>a</sup>	251,43 <sup>b</sup>	228,03 <sup>a</sup>
<b>IECA</b>	1,52 <sup>a</sup>	1,65 <sup>ab</sup>	1,65 <sup>ab</sup>	1,75 <sup>bc</sup>	1,77 <sup>c</sup>
<b>Ganancia de Peso total (g)</b>	185,50 <sup>b</sup>	140,67 <sup>a</sup>	134,17 <sup>a</sup>	140,77 <sup>a</sup>	128,93 <sup>a</sup>
<b>Tercera Fase (14-21 días)</b>					
<b>Peso Final (g)</b>	471,75	466,60	441,15	464,43	455,93
<b>IECA</b>	2,10	2,11	2,26	2,27	2,13
<b>Ganancia de Peso total (g)</b>	224,50	226,09	213,80	213,00	228,03

\*Letras diferentes indican diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre grupos (Tukey).

En la primera fase, de los 4 a los 8 días de edad, no existía desafío coccidial ni saponinas en el agua de bebida. En esta fase, en cuanto a los pesos a los 8 días de edad, los grupos Control C/S (99,73 g), 1 (110,67 g) y 3 (99,10 g) fueron estadísticamente similares entre ellos y presentaron diferencias estadísticas significativas con los Grupos 2 (110,67 g) y Control S/S (111,50 g), los cuales mostraron pesos mayores. En cuanto al IECA, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. En cuanto a la ganancia de peso total, los grupos Control C/S (45,84 g), 1 (39,95 g) y 3 (44,95 g) fueron estadísticamente similares entre ellos y presentaron diferencias estadísticas con los Grupos 2 (56,65 g) y Control S/S (57,5 g), los cuales presentaron la mayor ganancia de peso.

En la segunda fase, de los 8 a los 14 días de edad, tampoco existía desafío coccidial pero sí saponinas en el agua de bebida a partir de los 11 días de edad en los Grupos 1, 2 y 3. En esta fase, en cuanto a los pesos a los 8 días de edad, los grupos Control C/S (240,50 g), 1 (228,13 g) y 3 (228,03 g) fueron estadísticamente similares entre ellos y presentaron diferencias estadísticas significativas con el grupo Control C/S (240,50 g) y el Grupo 2 (251,43 g). El grupo Control S/S (297 g) presentó diferencias estadísticas significativas con relación a los demás grupos, alcanzando el mayor peso en el periodo. En cuanto a el IECA, los grupos Control C/S (1,65), 1 (1,65) y 2 (1,75) fueron estadísticamente similares entre ellos y presentaron diferencias estadísticas significativas con el Grupo 3 (1,77) que a su vez

fue estadísticamente similar al Grupo 2 (1,75) pero con diferencias estadísticas significativas con los grupos Control C/S (1,65), Grupo 1 (1,65) y Control S/S (1,52), el cual presentó el IECA más baja en el periodo. En cuanto a la ganancia de peso total, no existieron diferencias estadísticas significativas entre los grupos, exceptuando el grupo Control S/S (185,5 g), el cual presentó diferencias significativas con respecto a los demás grupos, con la ganancia de peso más alta para el periodo.

En la tercera fase, de los 14 a los 21 días de edad, en la cual hubo desafío coccidial y tratamiento con saponinas en el agua de bebida en los correspondientes grupos, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los grupos en ninguno de los parámetros medidos.

## DISCUSIÓN

En esta investigación, se evaluó la efectividad de un producto comercial basado en saponinas del quillay (Nema-Q®) sobre el control de la coccidiosis aviar. Esto se realizó midiendo el efecto del producto sobre el recuento de ooquistes por gramo de deyecciones, lesiones intestinales macroscópicas e histológicas y efecto sobre los parámetros productivos (ganancia de peso e IECA) en aves infectadas experimentalmente con una sobredosis de coccidias vivas vacunales.

En este estudio primero fue necesario encontrar una forma de inducir coccidiosis en las aves experimentales de manera consistente. El método de desafío seleccionado fue la inoculación de varias dosis (15x) de una vacuna coccidial (Immucox®), que contenía cepas vivas atenuadas de *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* y *E. tenella*, método que ya había sido utilizado por otros autores. Con esta prueba de desafío se logró la infección intestinal con coccidias, la presencia de ooquistes en deyecciones y lesiones intestinales en los grupos desafiados, así como la ausencia de ooquistes y lesiones en el grupo no desafiado. La utilización de éste método otorga un mayor control sobre el ensayo, permitiendo conocer exactamente las especies de *Eimeria* con las que se está desafiando a las aves además de la cantidad de ooquistes inoculados en las mismas, inoculándose en total entre 2.250 y 4.500 ooquistes de *E. acervulina*, entre 300 y 450 ooquistes de *E. brunetti*, entre 150 y 300 ooquistes de *E. maxima* y *E. necatrix*, y entre 750 y 1.125 ooquistes de *E. tenella*.

El recuento de ooquistes es una variable de valor en el monitoreo y control de la coccidiosis en los planteles productivos, siendo recomendable tener registros de estos recuentos para la evaluación de los diferentes programas y drogas anticoccidiales usadas (Bafundo, 1994). Un factor a tomar en cuenta es que este método no diagnostica especie y que las especies más prolíficas son menos patógenas (McDougald, 1994). El recuento de ooquistes puede ser realizado tanto en cama como en deyecciones. Se ha encontrado que existe una asociación leve entre el recuento de ooquistes en cama y las lesiones intestinales (Salinas, 2000), pero si existiría una fuerte asociación entre el recuento de ooquistes en cama y la enfermedad subclínica (Center for Veterinary Medicine, 1992). En el caso del recuento de ooquistes en deyecciones, ofrece una visión más precisa, puntual e individual que el

recuento de ooquistes en cama, en donde existe un factor de dilución mayor producto de los elementos propios que conforman la cama además de las deyecciones (Rubio *et al.*, 2012). Del Cacho *et al.* (2001) usaron el método de recuento de ooquistes en deyecciones para evaluar un ensayo de vacunación a gran escala de la vacuna Paracox 5®. Así mismo, Juárez *et al.* (2002) usaron este método para comparar los resultados en el recuento de ooquistes usando dos instrumentos diferentes como son la Cámara de McMaster y el hemocitómetro de Neubauer.

En este estudio, el recuento de ooquistes fue realizado de las deyecciones y no de la cama buscando obtener una medición más precisa, evitando el factor de dilución que genera el recuento en cama. Considerando que el ciclo completo de las coccidias en el intestino demora alrededor de 7 días (McDougald y Fitz-Coy, 2008), es posible explicar que los mayores recuentos de ooquistes se hayan obtenido los últimos dos días de medición, especialmente al noveno día post desafío coccidial, en el cual se alcanzaron los mayores valores medidos. Se observa que las saponinas lograron reducir el número de ooquistes por gramo de deyecciones, existiendo un menor recuento en el final del periodo (9 días post desafío) en aquellos grupos que recibieron saponinas en el agua de bebida, en comparación con el grupo control que fue desafiado con coccidias y que no recibió saponinas en el agua de bebida: el Grupo 1 (desafío coccidial y 125ppm de saponinas) tuvo un recuento promedio de 3.456 OPG (rango de resultados entre 1.880 y 5.120 OPG), el Grupo 2 (desafío coccidial y 250ppm de saponinas) un recuento promedio de 2.832 OPG (rango de resultados entre 1.600 y 4.360 OPG), el Grupo 3 (desafío coccidial y 500ppm de saponinas) un recuento promedio de 3.184 OPG (rango de resultados entre 1.240 y 5.280 OPG), valores menores que los presentados por el grupo Control C/S (desafío coccidial y sin saponinas) el que alcanzó un promedio de 9.824 OPG (rango de resultados entre 4.600 y 17.800 OPG).

Se encontraron lesiones intestinales macroscópicas compatibles con coccidiosis en el duodeno del grupo Control C/S (desafío coccidial y sin saponinas), Grupo 1 (desafío coccidial y 125ppm de saponinas) y Grupo 2 (desafío coccidial y 250ppm de saponinas). Las lesiones blanquecinas escalonadas visualizadas en los duodenos de estos grupos son características de *E. acervulina* (Anexo 6). Según la escala de Johnson y Reid (1970), las

lesiones del grupo Control C/S (desafío coccidial y sin saponinas) fueron levemente más severas que las presentadas por los grupos con saponinas como tratamiento. La ausencia de lesiones en el resto del intestino podría relacionarse a la atenuación patogénica de las cepas inoculadas incluidas en la vacuna.

Microscópicamente, a la histopatología, las lesiones encontradas en el intestino fueron inespecíficas, visualizándose pocas o ningún estadio de las coccidias inoculadas. Esto podría deberse a que todas las muestras fueron tomadas en un pequeño segmento (de aproximadamente 1cm de largo) del duodeno, yeyuno y ciego de ubicación predeterminada en el protocolo experimental. Al mismo tiempo, esta aparente dificultad en la detección microscópica de coccidias puede estar asociada con la atenuación patogénica presentada por las cepas vacunales usadas como desafío, las cuales generarían lesiones de menor severidad que las provocadas por cepas de campo.

En cuanto a las variables productivas, durante las dos primeras fases (de los 4 a los 8 y de los 8 a los 14 días de edad), aún no existía desafío coccidial y solo en la segunda fase a partir del día 11 de edad existieron saponinas en el agua de bebida. El desafío coccidial se realizó a los 14 días de edad, al comienzo de la tercera fase de medición. En la tercera fase (de los 14 a los 21 días de edad), fase en la cual los grupos 1, 2, 3 y Control C/S estaban con desafío coccidial y los grupos 1, 2 y 3 con saponinas como tratamiento (y el grupo Control S/S sin desafío coccidial y sin saponinas), se puede apreciar que no hay diferencias significativas entre ninguno de los grupos. Sin embargo, al observar los números absolutos en esta fase, el grupo Control S/S (sin desafío coccidial y sin saponinas) fue el que mostró el mayor peso promedio (471,75 g) que representan entre 5,15 y 30,6 gramos más de peso corporal que los demás grupos, resultado que era de esperar ya que este grupo no fue sometido a desafío coccidial. Paradójicamente los pesos finales de los grupos tratados con 125, 250 y 500ppm de saponinas fueron menores que el grupo Control C/S (con desafío coccidial y sin saponinas), a pesar de que los pollos tratados con saponinas demostraron una inhibición en el desarrollo de las coccidias a nivel intestinal de acuerdo a los recuentos de ooquistes en deyecciones obtenidos y una atenuación en el grado de las lesiones macroscópicas mostradas en comparación a este grupo.

Para estudios posteriores se recomienda realizar una experiencia similar pero utilizando cepas de *Eimeria* de campo las cuales generarían lesiones más severas, permitiendo evidenciar con mayor facilidad la efectividad de las saponinas en el tratamiento de la coccidiosis clínica. También se recomienda realizar estudios sobre la efectividad de las saponinas del quillay sobre las coccidias del género *Eimeria* de manera *in vitro*, en donde se evalúe si existe alguna diferencia en cuanto a la efectividad de las saponinas del quillay en el control de diferentes especies de *Eimeria*, aislando a cada especie y sometiénolas a las saponinas por separado.

La alta resistencia y prevalencia de las coccidias hace imposible evitar la infección de los pollos broiler. Por esta razón, la enfermedad se intenta prevenir aplicando drogas anticoccidiales en el alimento, sin embargo, estas presentan inconvenientes como la resistencia que logra generar el protozoo frente a ellas, lo que sumado a su acción antibacteriana y el riesgo de generar resistencia por parte de bacterias patógenas, constituye un problema de salud pública. Todo esto, sumado a las crecientes políticas de inocuidad alimentaria a lo largo del mundo, las que restringen la presencia de residuos de medicamentos en los alimentos, hace que la tendencia actual sea reducir cada vez más el uso de drogas anticoccidiales e investigar sobre productos naturales que permitan controlar la coccidiosis. De ahí entonces la importancia de esta experiencia, en la cual se probó la efectividad de las saponinas del árbol endémico quillay (*Quillaja saponaria*), como una alternativa a las drogas convencionales actualmente usadas para el control de la coccidiosis aviar en Chile. Este estudio demuestra que, al menos en estas condiciones experimentales, las saponinas reducen el desarrollo de las coccidias en el intestino de los pollos, justificando la realización de evaluaciones futuras en la búsqueda del control de la coccidiosis con productos naturales en reemplazo de productos químicos.

## CONCLUSIONES

- Las saponinas del quillay fueron efectivas en el control de la coccidiosis a nivel intestinal ya que, en las aves infectadas, disminuyeron el número de ooquistes en las deyecciones y aminoraron el grado de severidad de las lesiones intestinales encontradas en los grupos tratados con ellas, en comparación a los no tratados.
- Se recomienda en ensayos posteriores evaluar el efecto antiprotozoario de las saponinas del quillay sobre los protozoos del género *Eimeria* usando cepas de campo como desafío.

## BIBLIOGRAFÍA

- **AGUIRRE, A.** 2008. La útil Yucca. **In:** Ideas para el cambio. pp. 46-49.
- **AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION (AVMA).** 2001. Report of the AVMA panel on euthanasia. JAVMA. 218 (5): 669–696.
- **AKHTAR, M.; ANWAR, M.I.; IQBAL, Z.; MUHAMMAD, F.; AWAIS, M.M.; HAQ, A.U.; SAWICKA, E.H.** 2012. Immunological evaluation of two local isolates of *Eimeria tenella* gametocytes against coccidiosis in poultry. PakVet J. 32: 77-80.
- **ALCAINO, H.; GONZÁLES, J.P.; FREDES F.; GORMAN, T.** 2002. Coccidias aviarias de gallineros industriales de Chile. Parasitol Latinoam. 57: 34-39.
- **ARAB, H. A.; RAHBARI, S.; RASSOULI A.; MOSLEMI M.H.; KHOSRAVIRAD, F.** 2006. Determination of artemisinin in *Artemisia sieberi* and anticoccidial effects of the plant extract in broiler chickens. Trop. Anim. Heal. Prod. 38: 497–503.
- **ASOCIACIÓN DE PRODUCTORES AVICOLAS DE CHILE A.G. (APA).** 2012. Sector Avícola/ Análisis Sectorial 2012. [en línea] <[http://www.apa.cl/index/plantilla1.asp?id\\_seccion=2&id\\_subsecciones=8](http://www.apa.cl/index/plantilla1.asp?id_seccion=2&id_subsecciones=8)> [consulta: 02-02-2014].
- **ALLEN, P.C.** 1997. Nitric oxide productions in chickens. Poult Sci. 76 (6): 810-813.
- **AL SHEIKLY, F.; AL SAIEG, A.** 1980. Role of coccidia in the occurrence of necrotic enteritis in the chicken. Avian Dis. 24: 324-333.
- **AVATO, P.; BUCCI, R.; TAVA, A.; VITALI, C.; ROSATO, A.; BIALY, Z.; JURZYSTA, M.** 2006. Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* spp. Structure activity relationship. Phytother. Res. 20: 454-457.
- **BAFUNDO, K.W.; GUERRERO, R.** 1989. Revisión de las técnicas para el diagnóstico de la coccidiosis en pollos de engorda. Avicultura Profesional. 6 (4): 136-138.
- **BAFUNDO, K.W.** 1991. Managing coccidiosis specially in broiler breeder pullets. Misset world poultry. Atlanta, Georgia, USA. 7 (9): 39-40.
- **BAFUNDO, K.W.** 1994. Trends in coccidiosis control: present considerations and future corners. **In:** Proceedings of the thirty third west PDC. Sacramento, California, USA. pp: 45-52.
- **BAINS, B.** 1979. A manual of poultry diseases. Basilea, Suiza. Roche. pp: 162-166.
- **BERNAL, J.** 1993. El conteo de ooquistes en heces como recurso en la evaluación de programas anticoccidiales. **In:** IV jornada médico-avícola. Universidad Autónoma de México. pp: 26-30.
- **BERTOLATTI, D.; O'BRIEN, F.G.; GRUBB, W.B.** 2003. Characterization of drug-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from poultry processing plants in Western Australia. Int. J. Environ. Health. Res. 13: 43-54.

- **BOMFORD, R.** 1989. Adjuvants for anti-protozoal vaccine. *Parasitol. Today.* 5: 41-46.
- **BORCHET, A.** 1981. *Parasitología veterinaria.* 3°ed. Zaragoza, España. pp: 608-617.
- **BREED, D.G.; SCHETTERS, T.P.; VERHOEVEN, N.A.; BOOTGROENINK, A.; DORRESTEIN, J.; VERMEULEN, A.N.** 1999. Vaccination against *Eimeria tenella* infection using a fraction of *E. tenella* sporozoites selected by the capacity to active T cells. *Int J Parasitol.* 29 (8): 1231-1240.
- **CENTER FOR VETERINARY MEDICINE. FDA.** 1992 Draft guideline for the evaluation of the efficacy of anticoccidial drugs and anticoccidial drugs combinations in poultry. Maryland, USA, pp: 42.
- **CHAPMAN H.** 1998. Coccidiosis: Drogas anticoccidiales, resistencia y programas de inmunización en pollos de engorde. In: IX Seminario Internacional en patología aviar, Memorias. Atlanta, Georgia, USA. pp. 257-263.
- **CHEEKE, P.R.** 2001. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. *Rec Adv An.* 13: 115-126.
- **COMOTTO, G.** 2000. Enfermedades de las aves. Coccidiosis aviar. 1°ed. Ed. Sagazeta Lima, Perú. pp. 157-163.
- **CONWAY, D.P.; MCKENZIE, E.** 2007. Introduction to Coccidiosis. In: Poultry Coccidiosis. 3<sup>th</sup> ed. Blackwell Publishing. Iowa, USA. pp. 7 - 10.
- **DALE, N.** 1990. Concepto de control de calidad en coccidiosis. *Avicultura Profesional* 8 (1): 15-16.
- **DEL CACHO, E.; SIERRA, M.A.; SANCHEZ-ACEDO, C.** 1999. Coccidiosis aviar. In: Cordero del Campillo. *Parasitología veterinaria.* Ed. Mc-Grow Hill Interamericana. México. pp. 757-768.
- **DEL CACHO, E.; CEPERO, R.; LOPEZ-BERNAD, F.; LOPEZ-CABAÑEZ, J.A.** 2001. Respuestas a la vacunación de broilers contra la coccidiosis. XXXVIII Symposium Científico de Avicultura. Córdoba, Argentina.
- **DESERT KING CHILE LIMITADA.** 2001. QP Extracto de Quillay en polvo (*Quillaja saponaria* Mol.) Boletín Técnico: Alimentación de pollos, Aditivo Natural. Inmunoprotección y Reducción de Amoniaco. 14 pp.
- **FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.; BECKER, K.** 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br J Nutr.* 88: 587-605.
- **FRASER, C.M.** 1993. El Manual Merck de Medicina Veterinaria. 4°Ed. en español, Merck & Co., Inc. Rahway, N.J., U.S.A. pp: 1783-1784.
- **GHOLAMIANDEHKORDI, A.R.; TIMBERMONT, L.; LANCKRIET, A.; VAN DEN BROECK, W.; PEDERSEN, K.; DEWULF, J.; PASMANS, F.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F.** 2007. Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathol.* 36: 375-382.

- **HAMMOND, D. M.; LONG, P. L.** 1973. The Coccidia, University Park Press, Baltimore, Buterworths, London.
- **HASSAN, S. M.; GUTIERREZ O.; HAQ, A.U.; BYRD, J.A.; BAILEY, C.A.; CARTWRIGHT A.L.** 2007. Saponin-rich extracts from quillaja, yucca, soybean, and guar differ in antimicrobial and hemolytic activities. *Poult Sci.* 86: 121.
- **HASSAN, S.; EL-GAYAR, A.; CADWELL, D.; BAILEY, C.; CARTWRIGHT, A.** 2008. Guar Meal ameliorates *Eimeria Tenella* infection in broiler chicks.
- **HENKEN, A.M.; GOELEMA, J.O.; NIEJENHUIS, F.** 1992. Multivariate epidemiological approach to coccidiosis in broilers. *Poultry Science Association* 71 (11): 1849-1856.
- **HERNÁNDEZ, R.; LUGO, E.; DÍAZ, L.; VILLANUEVA, S.** 2005. Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave lechuguilla* Torrey. *Revista Digital Científica e-Gnosis.* 3: 1-9.
- **HIGUCHI, R.; TOKIMITSU, Y.; KOMORI, T.** 1998. An acylated triterpenoid saponin from *Quillaja saponaria*. *Phytochemistry.* 27: 1165-1168.
- **HOFSTAD, M.S.; CALNEK, B.W.; HELMBOLDT, C.F.; REID, W.M.; YODER, H.W.** 1978. Coccidiosis. **In:** *Diseases of Poultry*, 7° Ed. Iowa State University Press, Iowa, USA. pp. 784-805.
- **JERZSLE; SZEKER, K.; GALFI, P.; PUYALTO, M.; HONRUBIA, P.; MALLO, J.** 2011. Effect of protected sodium-N-butyrate (Gustor BP70) and its combination with essential oils (Natesse) in a necrotic enteritis artificial infection model in broilers. *NOREL Animal Nutr.* 5: 1-5.
- **JOHNSON, J.; REID, W.M.** 1970. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp Parasitol.* 28: 30-36.
- **JOYNER, L.P.** 1958. Experimental *Eimeria mitis* infections in chickens. *Parasitology.* 48: 101-112.
- **JUÁREZ, M.; CABRIALES, J.; PETRONE, V.; TÉLLEZ, G.** 2002. Evaluación del conteo total de ooquistes de *Eimeria tenella* a partir del ciego o heces, efectuado con la cámara de McMaster y el hemocitómetro de Neubauer. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México. pp: 73-79.
- **KONING, V.** 1994. ¿*Eimeria*, quo vadimus? *World Poultry.* 4: 4-6
- **KENSIL, C.; PATEL, R.U.; LENNICK, M.; MARCIANI, D.** 1991. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J. Immunol.* 146: 431-437.
- **LATALA, A.** 1981. Effect of hygienic conditions on the occurrence of coccidiosis in broilers. Instituto Chorob Zakaznych, Polonia. *Weterynaria* 37: 85-101.

- **LIEW, F.Y.; VICKERMAN, K.** 1997. Immune effector mechanisms in parasitic infections. *Parasitology today*. 13 (10): 365-366.
- **LILLEHOJ, H.S.; TROUT, J.M.** 1993. Coccidia: a review of recent advances on immunity and vaccine development. *Avian Pathol.* 22: 3-31.
- **LILLEHOJ, H. S.; SASAI, K.S.; MATSUDA, H.** 1994. Development and characterization of chicken-chicken B-cell hybridomas secreting monoclonal antibodies that detect sporozoite and merozoite antigens of *Eimeria*. *Poultry Sci.* 73: 1685-1693.
- **LILLEHOJ, H.S.; TROUT, J.M.** 1994. CD8 T cell-coccidia interactions. *Parasitology Today*. 10 (1): 10-13.
- **LILLEHOJ, H.S.** 2005. Immune response to coccidia. The IXth international coccidiosis conference. Foz do Iguassu, Parana, Brasil. Resumen en CD.
- **LONG, P.L.; ROSE, M.E.** 1972. Immunity to coccidiosis: Effect of serum antibodies on cell invasion by sporozoites of *Eimeria tenella* in vitro. *Parasitology*. 65: 437-445.
- **LONG, P.L.; JOHNSON, J.; WYATT, R.D.** 1980. *Eimeria tenella*: clinical effects in partially immune and susceptible chickens. *Poultry Sci.* 59: 2221-2224.
- **LU, C.D.; JORGENSEN, N.A.** 1987. Alfalfa saponins affects site and extent of nutrient digestion in ruminants. *J Nutr.* 117: 919-927.
- **MAKKAR, H.P.S.; SEN, S.; BLUMMEL, M.; BECKER, K.** 1998. Effect of fractions containing saponins from *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria* and *Acacia auriculiformis* on rumen fermentation. *J Agric Food Chem.* 46: 4324-4328.
- **MARTIN, A.; LILLEHOJ, H.S.** 1993. Lymphocyte proliferation and interferon production induced by coccidia infection. *Poultry Sci.* 72 (1): 50
- **MATTIELLO, R.; DE FRANCESCHI, M.; GONZÁLEZ, H.** 1997. Coccidiosis subclínica: la importancia de su diagnóstico. *Industria Avícola.* 44 (10): 18-19.
- **MATTIELLO, R.; BOVIEZ, J.D.; MCDUGALD, L.R.** 2000. *Eimeria brunetti* and *E. necatrix* in chickens of Argentina and confirmation of seven species of *Eimeria*. *Avian Dis.* 44: 711-714.
- **MCALLISTER, T.A.; WANG, Y.; HRISTOV, A.N.; OLSON, M.E.; CHEEKE, P.R.** 1998. Applications of *Yucca schidigera* in livestock production. Proc. 33<sup>rd</sup>. Pacific N.W. Animal Nutr. Conf. pp. 109-119.
- **MCCLURE, C.D.; NOLAN, L.L.** 1996. Herb extracts as potential antiprotozoal agents. *Acta Hort.* 426: 91-103.
- **MCDUGALD, L. R.** 1983a. Los ionóforos: qué son, cómo funcionan... Los pronósticos para su uso futuro. *Avicultura profesional.* 1 (2): 52-53.
- **MCDUGALD, L.R.** 1983b. Terapia y control de la coccidiosis. **In:** V Seminario Internacional en patología aviar, Memorias. Athens, Georgia, USA. 114p.

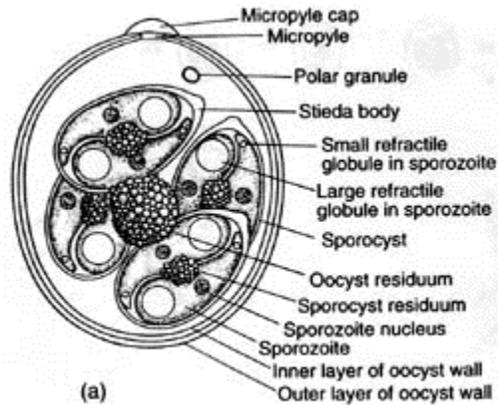
- **MCDUGALD, L.R.; DA SILVA, J.M.L; SOLIS, J.; BRAGA, M.** 1987. A survey of sensitivity to anticoccidial drugs in 60 isolates of coccidia from broiler chickens in Brazil and Argentina. *Avian Dis.* 31: 287-292.
- **MCDUGALD, L. R.** 1994. Control de la coccidiosis en el siglo XXI. **In:** VII Seminario internacional en patología aviar, Memorias. Atlanta, Georgia. pp. 277-284.
- **MCDUGALD, L.R.** 1997. Coccidiosis. **In:** Calneck W: Diseases of poultry 10° ed. Ames Iowa, USA. Iowa State University Press. pp. 865-878.
- **MCDUGALD, L. R.** 1999. Perspectives in coccidiosis and other poultry parasites in Latin America. **In:** IV Seminario internacional AMEVEA. Sta. Cruz, Bolivia. pp. 127-128.
- MCDUGALD, L.R.; FITZ-COY, S.H.** 2008. Protozoal Infections. **In:** Saif, Y.M. Diseases of Poultry. 12<sup>th</sup> ed. Blackwell Publishing. Iowa, USA. pp. 1067 – 1120.
- **MCKENZIE, M.E.; LONG, P.L.; BURKE, W.H.** 1986. Concentration of globulins in intestinal tissues of immunized and non-immunized chickens infected with *Eimeria acervulina*. *J Parasitol.* 72 (5): 791-792.
- **MELHORN, H.** 1993. Manual de parasitología veterinaria. Bogotá, Colombia. Grass. pp. 282-292.
- **MSHVILDADZE, V.; FAVEL, A.; DELMAS, F.; ELIAS, R.; FAURE, R.; DECANOSIDZE, G.; KEMERTELIDZE, E.; BALANSARD, G.** 2000. Antifungal and antiprotozoal activities of saponins from *Hederacolchica*. *Pharmazie* 55: 325-326.
- **MORRISSEY, J. P.; OSBOURN, A. E.** 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 708-724.
- **NASRI, S.; BEN SALEM, H.; VASTA, V.; ABIDI, S.; MAKKAR, H.P.S.; PRIOLO, A.** 2011. Effect of increasing levels of *Quillaja saponaria* on digestión, growth and meat quality of Barbarine lamb. *Anim. Feed Sci. Technol.* 164: 71-78.
- **NAWAZ, H.R.; MALIK, A.; KHAN, P.M.; SHUJAAT, S.; ATTA-UR-RAHMAN.** 2000. A novel glucuronidase inhibiting triterpenoid from *Paeoniaemodi*. *Chem. Pharm. Bull.* 48: 1771-1773.
- **NIFURI, P.A.** 2005. Efecto antiprotozoario de saponinas del quillay (*Quillaja saponaria* Molina) Sobre Coccidiosis Aviar. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria.
- **NORTH, M.** 1990. Manual de producción avícola. México. Manual moderno. pp: 751-757.
- **NORTON, C.C.; CHARD, M.J.** 1983. The oocyst sporulation time of *Eimeria* species from the fowl. *Parasitology* 86 (2): 193-198.
- **OGAWA, S.; YOKOTA, T.** 1985. Surfactants. *JPatent* 60, 190, 224.
- **OGAWA, S.; MURAKAMI, F.** 1987. Saponin purification. *JPatent* 62, 10, 628.

- **PELLERDY, L.P.** 1965. Coccidia and coccidiosis. Ed. Akademiai. Kiadó, Budapest. pp: 246-249, 267-270.
- **POMIANO, J.** 2000. Interacciones de las coccidias y los anticoccidiales en la nutrición del pollo de engorde. Mundo avícola y porcino. 33: 13-15.
- **RECCHIA, J.; LURANTOS, M.H.; AMSDEN, J.A.; STOREY, J.; KENSIL, C.R.** 1995. A semisynthetic *Quillaja* saponin as a drug delivery agent for amino-glycoside antibiotics. Pharma. Res. 12: 1917-1923.
- **RIGUERA, R.** 1997. Isolating bioactive compounds from marine organisms. J. Marine Biotechnol. 5: 187-193.
- **ROBERTSON, L.** 1986. Fármacos contra protozoos. **In:** Booth, M; Mc Donald, L: farmacología y terapéutica veterinaria. 2ªEd. España. Acribia. 215p.
- **ROCHER, Y.** 1969. Method of extracting saponins. United States patent US 3 464 972.
- **RUBIO, J.; DARDI, M.; MAARTEN, G.; VAN MULLEM, K.; VAN MEIRHAEGHE, H.** 2012. Uso de vacunas en broilers frente a coccidiosis en rotación con productos coccidiostatos. Evaluación de los resultados zootécnicos y económicos. Jornadas Profesionales de Avicultura. Sevilla, España.
- **RUIZ, H.** 1990. Coccidiosis Aviar. Ed. Litopar, C.A, Caracas, Venezuela. 158 pp.
- **SALINAS, M.E.** 2000. Niveles de ooquistes de *Eimeria spp.* en cama y su relación con las lesiones intestinales en pollos broiler. Tesis Bachiller Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 32p.
- **SAN MARTÍN, R.; BRIONES, R.** 1999. Industrial Uses and Sustainable Supply of *Quillaja saponaria* (Rosaceae) Saponins. Econ Bot. 53 (3): 302-311.
- **SHIRLEY, M.W.** 1979. A reappraisal of the taxonomic status of *Eimeria mivati* Edgar and Seibold 1964, by enzyme electrophoresis and cross-immunity tests. Parasitol. 78: 221-237.
- **SHIRLEY, M.W.** 1994. Epizootiología. Simposio internacional sobre coccidiosis. Sao Paulo, Brasil. pp. 11-12.
- **SIMS, M.D.; MATHIS, G.F.; WALTER, R.D.** 2001. Safety evaluation of the anticoccidial Cocci-Guard in broiler chickens. Concurrent meeting of the Southern poultry science society. 22º annual meeting and the Southern conference of avian diseases. 42º annual meeting. Abstract Nº72.
- **SOTO, E.** 1984. Coccidiosis de las aves. Informaciones avícolas. 75: 16-20.
- **SOULSBY, E.J.L.** 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. 7ªed. Ed. Interamericana. Ciudad de México, México. pp. 639-658.
- **STIFF, M.I.; BAFUNDO, K.W.** 1993. Development of immunity in broilers continuously exposed to *Eimeria sp.* Avian Dis. 37 (2): 295-301.

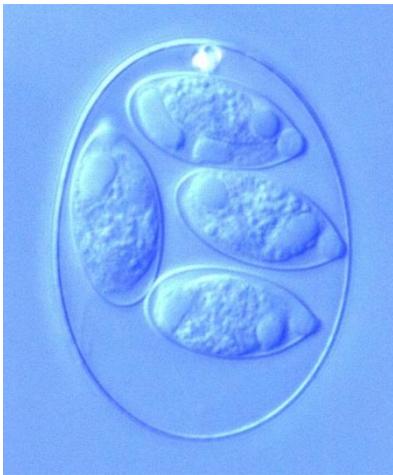
- **TAMASAUKAS, R.** 1996. Vacuna contra coccidiosis aviar. *Parasitología al Día*. 20 (1-2): 45-53.
- **TSUJI, N.; KAWAZU, S.; OHTA, M.; KAMIO, T.; ISOBE, T.; SHIMURA, K.; FUJISAKI, K.** 1997. Discrimination eight chicken *Eimeria* species using the two-step polymerase chain reaction. *J. Parasitol.* 83: 966–970.
- **UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA).** 2012. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. [en línea] <[http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock\\_poultry.pdf](http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf)> [consulta: 02-03-2014].
- **VERTOMEN, M.; KOUWENHOMEN, A.** 1994. Factores que contribuyen a la presencia de coccidiosis. *Rev. de Ciencias Veterinarias*. 4: 3-4.
- **WALLACE, R. J.** 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proc. Nutr. Soc.* 63: 621–629.
- **WATKINS, K.** 1998. Tendencia actual en el control de la coccidiosis. *Mundo avícola y porcino*. Lima, Perú. 26: 25-27.
- **WHITEMAN, C.; BICKFORD, L.** 1983. Enfermedades de las aves. American association of avian pathologists. Poultry pathology laboratory. Univ. Pennsylvania. New Balton Center, USA. pp. 171-177.
- **WILLIAMS, R.B.; ANDREWS, S.J.** 2001. The origins and biological significance of the coccidial lesions that occur in chickens vaccinated with a live attenuated anticoccidial vaccine. *Avian Pathol.* 30: 215-220.
- **YANG, R.Y.; FENG, P.Y.; LI, Q.** 2006. Research advances on the activity of endophyte pesticides. *Agrochemicals*. 45 (7): 440–444.
- **YOSHIKI, Y.; KUDUO, S.; OKUBO, K.** 1998. Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 2291–2299.
- **YUÑO, M.M.; GORGOZA, L.M.** 2008. Coccidiosis Aviar: Respuesta Inmune y Mecanismos de Control en la Industria Avícola. *Rev. vet.* 19 (1): 61–66.

## ANEXOS

- **Anexo 1:** Estructura de un ooquiste esporulado de *Eimeria* y fotografía microscópica de ooquiste de *Eimeria*. Los ooquistes esporulados de todas las *Eimerias* contienen 4 esporoquistes, cada uno con 2 esporozoitos.

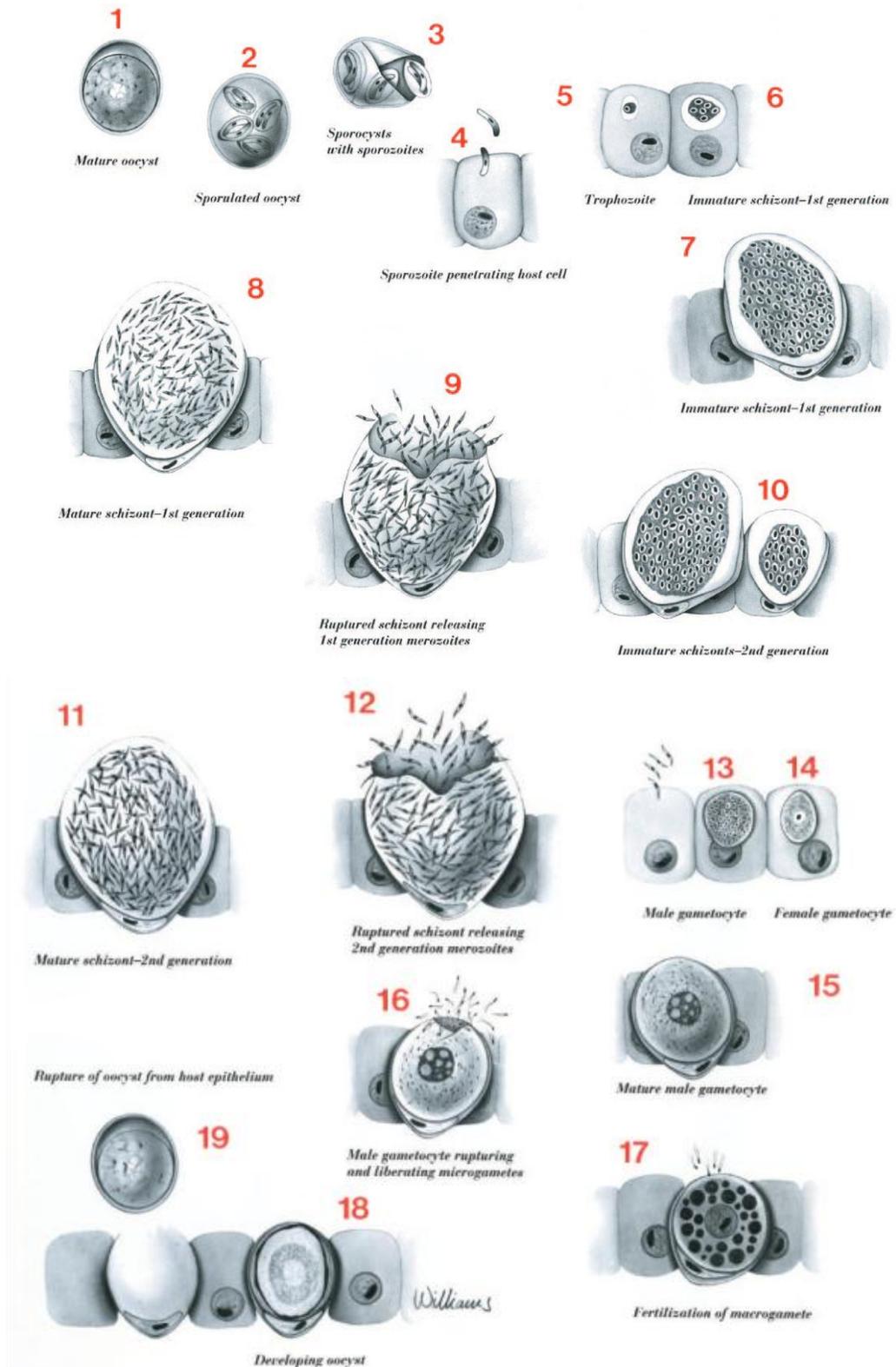


**Fuente:** McDougald y Fitz-Coy, 2008.



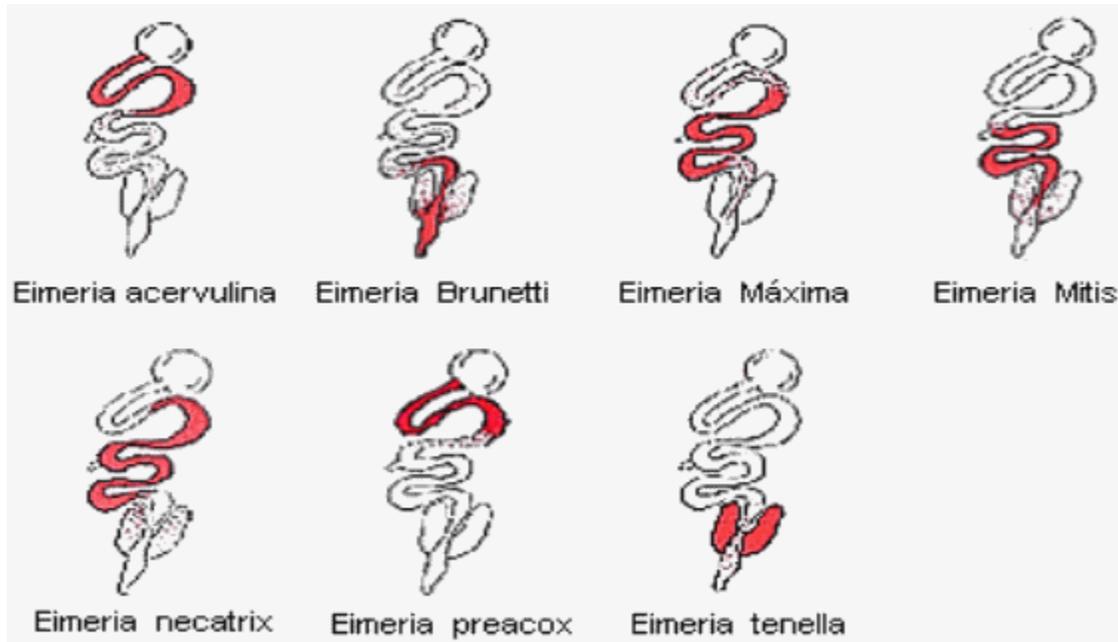
**Fuente:** Fotografía de S.J. Upton, Universidad Estatal de Kansas.

- **Anexo 2:** Ciclo evolutivo tipo de *Eimeria spp.*



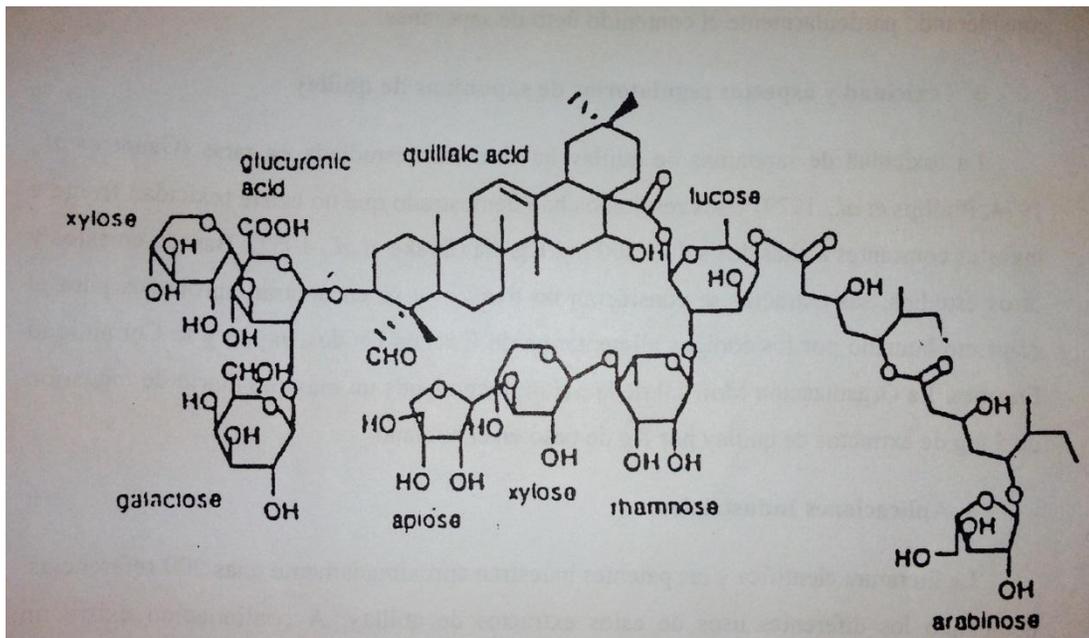
Fuente: Conway y McKenzie, 2007.

- **Anexo 3:** Ubicación de las diferentes especies de *Eimeria* en el intestino de las aves.



**Fuente:** Conway y McKenzie, 2007.

- **Anexo 4:** Estructura química de *Quillaja saponaria*.



**Fuente:** Recchia *et al.*, 1995.

- **Anexo 5:** Certificado de aprobación del comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.



UNIVERSIDAD DE CHILE  
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias  
Comité de Bioética Animal

Santiago, 06 de Noviembre de 2013

### CERTIFICADO N°01-2013

En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, tenida a la vista la metodología del Proyecto financiado por la empresa Desert King: **“EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LAS SAPONINAS DEL QUILLAY (Quillaja saponaria) COMO INHIBIDORAS DEL DESARROLLO DE COCCIDIAS INTESTINALES EN POLLOS DE ENGORDA”** cuyo investigador principal es el **Dr. Héctor Hidalgo**, y sus detalles contenidos en el Formulario para obtención de certificado de Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, este Comité certifica que el Proyecto satisface lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigación biomédica, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité, y se ajusta a la legislación chilena vigente sobre la materia, incluida la Norma NCh 324-2011.

A este respecto este Comité entiende que el Investigador Responsable tiene la idoneidad necesaria para el manejo de las aves que serán sujeto de estudio, y cuenta con un recinto apto para su mantención y supervisión durante el transcurso de la investigación.

  
Dra. Tamara Tadich G.  
Director  
Comité de Bioética Animal



  
Dr. Santiago Urcelay V.  
Presidente  
Comité de Bioética Animal

- **Anexo 6:** Detalle de lesiones encontradas en los pollos experimentales.



Lesión grado 1,5 de la escala de Johnson y Reid encontrada en duodeno del grupo Control C/S (grupo con desafío coccidial y sin saponinas en el agua de bebida).



Lesión grado 1 de la escala de Johnson y Reid encontrada en duodeno de grupos 1 y 2 (grupos con 125 y 250 ppm de saponinas en el agua de bebida respectivamente).

- **Anexo 7:** Detalle del examen histopatológico para los diferentes grupos.



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
Departamento de Patología Animal  
Laboratorio de Patología Aviaria

Avenida Santa Rosa 11.735  
Casilla 2 Correo 15,  
Teléfonos.: 56-2-9785540  
56-2-9785558  
SANTIAGO-CHILE

## INFORME DE HISTOPATOLOGÍA

### Nº de Ficha: TESIS COCCIDIAS

Se realiza evaluación de fragmentos de intestino (Duodeno, Yeyuno y Ciego). En este documento se detallan los hallazgos. Se entrega un documento adjunto con el resumen de estos.

#### Descripción Histopatológica

##### CONTROLES

###### CONTROL DUODENO

- Se analizan 12 muestras: 11 de las 12 muestras presentan estructura histológica conservada, con adecuada relación largo vellosidad:cripta. En todas las muestras hay escasas criptas levemente dilatadas. La muestra 9 presenta expansión moderada de la lámina propia por infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos. En esta muestra hay leve atrofia de vellosidades.

###### CONTROL YEYUNO

- Se analizan 12 muestras: Las muestras 8, 11 y 12 presentan leve acortamiento y engrosamiento de vellosidades. En la lámina propia hay escasos linfocitos y macrófagos. Las muestras restantes presentan estructura histológica conservada.

###### CONTROL CIEGO

- Se analizan 12 muestras: Las muestras 1, 3, 9 y 12 presentan expansión leve de la lámina propia por infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos, plasmocitos y muy escasos heterófilos. En la muestra 1 se observan colonias bacterianas entre las vellosidades y dentro de las criptas. Las muestras restantes presentan marcado aplanamiento de la superficie epitelial, con descamación multifocal del epitelio e infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos y escasos macrófagos.

###### CONTROL 2 DUODENO

- Se analizan 6 muestras: Cinco de ellas presentan estructura histológica conservada. La muestra 3 presenta leve engrosamiento y acortamiento de las vellosidades. Hay leve infiltrado inflamatorio linfocítico y una cripta está levemente dilatada y contiene detritus celular.

###### CONTROL 2 YEYUNO

- Se analizan 6 muestras: Todas presentan cambios similares. Hay engrosamiento leve y acortamiento leve de vellosidades. La lámina propia contiene escasos linfocitos, plasmocitos, histiocitos y muy escasos heterófilos.

#### CONTROL 2 CIEGO

- Se analizan 6 muestras: Las muestras 1, 3, 4 y 5 presentan expansión moderada de la lámina propia producto de infiltrado inflamatorio en que predominan linfocitos, plasmocitos y macrófagos. También se observa cantidad escasa de heterófilos. En esta muestra el epitelio presenta atrofia leve. La muestra 2 presenta características similares a las descritas junto con la presencia de gran cantidad de bacterias bacilares en el lumen de las criptas. La muestra 6 presenta marcado aplanamiento del epitelio. En esta muestra el infiltrado inflamatorio es mínimo y está presente en forma multifocal.

#### TRATAMIENTOS

##### TRATAMIENTO 1 DUODENO

- Se analizan 12 muestras: Estas presentan estructura histológica conservada. En la muestra 5 se observa un quiste coccidial.

##### TRATAMIENTO 1 YEYUNO

- Se analizan 12 muestras: Todas las muestras presentan leve acortamiento de vellosidades.

##### TRATAMIENTO 1 CIEGO

- Se analizan 12 muestras: La muestra 1 presenta marcado acortamiento de vellosidades. La lámina propia está levemente expandida por infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos y macrófagos, junto con cantidad moderada de fibroblastos. Las muestras 2, 3, 7, 8, 9 y 12 presentan moderada expansión de la lámina propia por linfocitos, macrófagos y escasos heterófilos. La superficie epitelial está descamada y sobre estas células hay gran cantidad de bacterias bacilares. Algunas células epiteliales están en degeneración. Las muestras 4, 6, 10 y 11 no presentan cambios histológicos. La muestra 5 presenta aplanamiento marcado de la mucosa. Hay criptas dilatadas que contienen cantidad moderada de detritus celular.

##### TRATAMIENTO 3 DUODENO

- Se analizan 12 muestras: Las muestras 1, 4, 7 y 12 presentan engrosamiento y acortamiento leves de las vellosidades. También en estas muestras hay hiperplasia de células calciformes. La lámina propia está expandida por infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos y escasos histiocitos y plasmocitos. Las muestras restantes presentan estructura conservada.

##### TRATAMIENTO 3 YEYUNO

- Se analizan 12 muestras: Las muestras 2 y 4 presentan expansión leve de la lámina propia por infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos, plasmocitos, macrófagos y muy escasos heterófilos. La muestra 4 presenta marcado acortamiento de las vellosidades y pérdida completa del epitelio de superficie. El resto de las muestras presenta estructura histológica conservada.

### TRATAMIENTO 3 CIEGO

- Se analizan 12 muestras: Las muestras 1, 2, 3, 7, 10, 11 y 12 presentan aplanamiento mínimo de la superficie epitelial. Hay infiltrado inflamatorio mínimo, linfocítico en la lámina propia. Las muestras 4, 5, 6, 8 y 9 presentan infiltrado similar, con aplanamiento moderado a marcado de la superficie epitelial.
  
- Comentarios generales: Las muestras de los distintos grupos presentan cambios leves y corresponden a inflamación predominantemente linfocítica difusa, de grados mínimo a leve. Las muestras más afectadas corresponden a los ciegos, particularmente los de los grupos de tratamientos, en que se observa dilatación del órgano y aplanamiento de la mucosa. En estas muestras frecuentemente se observan abundante bacterias bacilares sobre el epitelio y en las criptas. Solo en algunas muestras se observó organismos coccidiales. Estos siempre fueron observados en forma individual en el epitelio. En ninguno de los casos la evidencia histológica es suficiente para sospechar que estas coccidias son el agente etiológico responsable de los cambios histológicos observados. En algunas muestras del ciego de los grupos de tratamientos se observaron estructuras ovaladas de 50 micras aproximadamente en el lumen, asociadas a restos de contenido intestinal. Estas estructuras no presentan detalles morfológicos por lo que no fueron consideradas en el conteo de parásitos.



*Dr. Federico Cifuentes Ramos*

- **Anexo 8:** Detalle de pesos promedio (gramos) para los diferentes grupos, con sus respectivos subgrupos y edades.
  - o Control C/S: grupo **con** desafío coccidial y agua **sin** aditivo de saponinas (30 pollos).
  - o Grupo 1: grupo **con** desafío coccidial y agua **con** saponinas en una concentración de **125 ppm** (30 pollos).
  - o Grupo 2: grupo **con** desafío coccidial y agua **con** saponinas en una concentración de **250 ppm** (30 pollos).
  - o Grupo 3: grupo **con** desafío coccidial y agua **con** saponinas en una concentración de **500 ppm** (30 pollos).

- Control S/S: grupo **sin** desafío coccidial y agua **sin** aditivo de saponinas (12 pollos).

GRUPO	SUBGRUPO	PESO 4 DÍAS	PESO 8 DÍAS	PESO 14 DÍAS	PESO 21 DÍAS
Control C/S	1	54	103	249	470,17
Control C/S	2	54	105	269	452,67
Control C/S	3	54	98	229	460,00
Control C/S	4	54	101	230	478,17
Control C/S	5	54	93	226	472,00
<b>1</b>	1	54	96	243	463,67
<b>1</b>	2	54	87	213	417,50
<b>1</b>	3	54	90	205	415,60
<b>1</b>	4	54	106	253	460,67
<b>1</b>	5	54	92	228	448,33
<b>2</b>	1	54	106	254	471,67
<b>2</b>	2	54	103	240	472,83
<b>2</b>	3	54	107	245	429,33
<b>2</b>	4	54	119	252	482,00
<b>2</b>	5	54	119	265	466,33
<b>3</b>	1	54	105	235	486,00
<b>3</b>	2	54	92	218	445,50
<b>3</b>	3	54	95	221	423,50
<b>3</b>	4	54	104	236	463,67
<b>3</b>	5	54	99	230	461,00
Control S/S	1	54	115	277	476,00
Control S/S	2	54	108	317	467,00

- **Anexo 9:** Detalle de consumo de alimento promedio (gramos) para los diferentes grupos, con sus respectivos subgrupos y edades.
  - Control C/S: grupo **con** desafío coccidial y agua **sin** aditivo de saponinas (30 pollos).
  - Grupo 1: grupo **con** desafío coccidial y agua **con** saponinas en una concentración de **125 ppm** (30 pollos).
  - Grupo 2: grupo **con** desafío coccidial y agua **con** saponinas en una concentración de **250 ppm** (30 pollos).

- Grupo 3: grupo **con** desafío coccidial y agua **con** saponinas en una concentración de **500 ppm** (30 pollos).
- Control S/S: grupo **sin** desafío coccidial y agua **sin** aditivo de saponinas (12 pollos).

GRUPO	SUBGRUPO	CONSUMO 4-8 DÍAS	CONSUMO 8-14 DÍAS	CONSUMO 14-21 DÍAS
Control C/S	1	74	247	432
Control C/S	2	80	242	495
Control C/S	3	69	214	472
Control C/S	4	69	225	504
Control C/S	5	65	226	452
<b>1</b>	1	68	246	489
<b>1</b>	2	51	208	444
<b>1</b>	3	57	189	502
<b>1</b>	4	79	245	454
<b>1</b>	5	59	221	530
<b>2</b>	1	82	243	491
<b>2</b>	2	73	237	447
<b>2</b>	3	81	236	495
<b>2</b>	4	92	250	485
<b>2</b>	5	84	263	480
<b>3</b>	1	85	225	474
<b>3</b>	2	55	226	507
<b>3</b>	3	66	219	465
<b>3</b>	4	62	247	490
<b>3</b>	5	73	225	485
Control S/S	1	86	261	456
Control S/S	2	78	299	479

- **Anexo 10:** Detalle de ganancia de peso promedio (gramos) para los diferentes grupos, con sus respectivos subgrupos y edades.
  - Control C/S: grupo **con** desafío coccidial y agua **sin** aditivo de saponinas (30 pollos).
  - Grupo 1: grupo **con** desafío coccidial y agua **con** saponinas en una concentración de **125 ppm** (30 pollos).

- Grupo 2: grupo **con** desafío coccidial y agua **con** saponinas en una concentración de **250 ppm** (30 pollos).
- Grupo 3: grupo **con** desafío coccidial y agua **con** saponinas en una concentración de **500 ppm** (30 pollos).
- Control S/S: grupo **sin** desafío coccidial y agua **sin** aditivo de saponinas (12 pollos).

GRUPO	SUBGRUPO	GANANCIA 4-8 DÍAS	GANANCIA 8-14 DÍAS	GANANCIA 14-21 DÍAS
Control C/S	1	49,00	146,00	221,16
Control C/S	2	51,02	163,83	183,66
Control C/S	3	43,68	130,83	231,33
Control C/S	4	46,52	129,33	248,16
Control C/S	5	39,00	133,33	246,16
1	1	41,68	146,83	221,00
1	2	33,02	126,00	205,00
1	3	35,52	114,83	215,00
1	4	51,52	147,00	208,00
1	5	38,00	136,17	220,00
2	1	51,68	148,33	217,50
2	2	48,68	137,50	232,50
2	3	52,85	138,00	184,33
2	4	65,00	133,83	229,66
2	5	65,02	146,17	201,00
3	1	51,02	129,83	251,00
3	2	38,02	125,83	227,50
3	3	40,85	126,00	202,50
3	4	50,02	132,17	228,00
3	5	44,85	130,83	231,16
Control S/S	1	61,00	162,00	199,00
Control S/S	2	54,00	209,00	250,00

- **Anexo 11:** Detalle del IECA promedio para los diferentes grupos, con sus respectivos subgrupos y edades.
  - Control C/S: grupo **con** desafío coccidial y agua **sin** aditivo de saponinas (30 pollos).

- Grupo 1: grupo **con** desafío coccidial y agua **con** saponinas en una concentración de **125 ppm** (30 pollos).
- Grupo 2: grupo **con** desafío coccidial y agua **con** saponinas en una concentración de **250 ppm** (30 pollos).
- Grupo 3: grupo **con** desafío coccidial y agua **con** saponinas en una concentración de **500 ppm** (30 pollos).
- Control S/S: grupo **sin** desafío coccidial y agua **sin** aditivo de saponinas (12 pollos).

GRUPO	SUBGRUPO	IECA 4-8 DÍAS	IECA 8-14 DÍAS	IECA 14-21 DÍAS
Control C/S	1	1,51	1,69	1,95
Control C/S	2	1,57	1,48	2,70
Control C/S	3	1,58	1,64	2,04
Control C/S	4	1,48	1,74	2,03
Control C/S	5	1,67	1,69	1,83
<b>1</b>	1	1,63	1,67	2,21
<b>1</b>	2	1,54	1,65	2,17
<b>1</b>	3	1,60	1,64	2,33
<b>1</b>	4	1,53	1,67	2,18
<b>1</b>	5	1,55	1,62	2,41
<b>2</b>	1	1,59	1,63	2,26
<b>2</b>	2	1,50	1,73	1,92
<b>2</b>	3	1,53	1,71	2,69
<b>2</b>	4	1,42	1,87	2,11
<b>2</b>	5	1,29	1,80	2,39
<b>3</b>	1	1,67	1,73	1,89
<b>3</b>	2	1,45	1,80	2,23
<b>3</b>	3	1,62	1,74	2,29
<b>3</b>	4	1,24	1,87	2,15
<b>3</b>	5	1,63	1,72	2,10
Control S/S	1	1,41	1,61	2,29
Control S/S	2	1,44	1,43	1,92