

Evaluación del efecto combinado de probióticos y vacuna anticoccidial en pollos de engorde expuestos a coccidia

M. DARDI¹*, M. PAGÈS¹, B. SYED², L. VALENZUELA²

¹HIPRA, Avda. La Selva 135, 17170, Amer (Girona), España. ²Biomin Holding GmbH, Erber Campus 1, 3131 Getzersdorf, Austria.

*Autor corresponsal: martina.dardi@hipra.com

La coccidiosis es una infección de alto riesgo para los sistemas modernos de avicultura comercial, además de presentar el potencial de provocar pérdidas económicas considerables en operaciones a mediana y gran escala. Para minimizar los efectos de esta enfermedad parasitaria, se han empleado fármacos veterinarios como los coccidiostáticos. Sin embargo, el desarrollo de resistencias de los patógenos entéricos debido al uso prolongado de estos fármacos es motivo de preocupación. En consecuencia, los avicultores han dirigido su atención a nuevas herramientas como el uso de vacunas anticoccidiales y probióticos. El presente estudio evaluó el efecto combinado de un fármaco simbiótico (combinación sinérgica de cepas de probióticos y un prebiótico) y una vacuna anticoccidial como herramientas para controlar la enfermedad tras la exposición a una mezcla de cepas de *Eimeria* spp. en un ensayo de campo. Los resultados demostraron que esta combinación resulta beneficiosa al aumentar el rendimiento zootécnico de las aves y reducir los recuentos de ooquistes y las puntuaciones de las lesiones tras la exposición a coccidiosis.

Coccidiosis is a high-risk infection in modern commercial poultry systems, as well as being capable of causing considerable economic losses to any medium- and large-scale operation. To minimize the effect of this parasitic disease, veterinary drugs such as coccidiostats have been employed. However, there are concerns about enteric pathogen resistance because of the prolonged use of these drugs. Therefore, new tools, such as anticoccidial vaccines and probiotics have drawn the attention of poultry producers. The present study evaluated the combined effects of a synbiotic (synergistic combination of probiotic strains and a prebiotic) and a coccidiosis vaccine as tools to control mixed *Eimeria* spp.-induced challenge in a field trial. The results proved that this beneficial combination increased the zootechnical performance of the birds and decreased the oocyst counts and lesion scores after a coccidiosis challenge.

Palabras clave: vacunas; simbiótico; coccidiosis; pollos de engorde

Introducción

La coccidiosis es una enfermedad aviar importante y muy extendida que genera un gran impacto económico en la industria avícola. El uso de fármacos quimioterápicos para controlar la enfermedad ha dado resultados satisfactorios en muchas partes del mundo. No obstante, cada vez es mayor la presión sobre el sector para reducir la dependencia de estos compuestos, debido a que presentan una eficacia irregular y a la creciente demanda de productos aviares sin quimioterápicos. Las vacunas y los probióticos se consideran dos métodos nuevos para controlar la enfermedad sin dependencia de los fármacos anticoccidiales, más

conocidos como coccidiostáticos. Además, y como consecuencia de lo anterior, el uso de las vacunas anticoccidiales ha aumentado de manera significativa. Por otra parte, las vacunas anticoccidiales vivas presentan la ventaja de proporcionar buena protección a largo plazo frente a la coccidiosis, junto con su conocida capacidad de restablecer la sensibilidad frente a los coccidiostáticos. En el mercado existen vacunas vivas atenuadas y no atenuadas. Las vacunas vivas no atenuadas consisten en parásitos que siguen manteniendo su virulencia natural. El control de la aparición de reacciones adversas (la enfermedad de la coccidiosis) se alcanza mediante el uso de un número reducido de ooquistes en los preparados de la vacuna y, en algunos casos, incluso mediante el uso de coccidiostáticos para controlar la excesiva propagación de las cepas vacunales. Por el contrario, las vacunas vivas atenuadas están específicamente diseñadas para generar una respuesta inmunitaria, pero limitando el riesgo de posibles acontecimientos adversos. El sistema de atenuación más usado es la selección de las cepas mediante el desarrollo precoz (Jeffers 1975). Además, se ha observado que la adición de probióticos en seres humanos y animales aumenta los mecanismos intestinales de defensa frente a los patógenos entéricos. Los probióticos se conocen como aditivos microbianos para alimentación directa y se clasifican como microorganismos vivos no patógenos que son capaces de mantener una población normal en el microbioma intestinal (Patterson 2003, Ohimain 2012). Los probióticos se han usado ampliamente en la producción aviar dados los beneficios que aportan en términos de rendimiento, protección frente a las enfermedades entéricas e inmunidad en aves (Lutful-Kabir 2009). La introducción precoz de los microorganismos no patógenos resulta más efectiva para su establecimiento en el tracto digestivo, ya que la microbiota intestinal comienza a establecerse horas después de la eclosión (Timmerman 2006, Torok 2007). Mediante sus múltiples mecanismos de acción que implican antagonismo patógeno, exclusión competitiva y estimulación del sistema inmunitario, los probióticos ayudan a mantener un equilibrio saludable de los microorganismos intestinales (Torok 2007, Cox 2015). Además, los probióticos de múltiples especies pueden ser capaces de atenuar el estrés provocado por la administración precoz de la vacuna. En este estudio se evaluó el efecto protector aditivo del simbiótico (combinación sinérgica de probióticos más un prebiótico), PoultryStar® (PoultryStar, BIOMIN GmbH, Austria) que contiene *Enterococcus* sp., *Bifidobacterium* sp., y *Lactobacillus* sp., más fructoligosacárido (FOS) derivado de inulina en pollos vacunados frente a la coccidiosis con una vacuna viva atenuada, HIPRACOX® (comercializada por HIPRA y que contiene ooquistes esporulados de forma precoz de *Eimeria acervulina* 003, *E. maxima* 013, *E. mitis* 006, *E. praecox* 007 y *E. tenella* 004) inmediatamente después de incubar e inyectar la mezcla de especies de coccidia el día 15.

Materiales y métodos

456 pollos de engorde machos de un día de edad (DOC) de la raza ROSS 308 fueron alojados durante 35 días en corrales cubiertos con virutas de madera de aproximadamente 5 cm de espesor. Se instaló una bandeja de alimentación comercial con un depósito de alimentos y cuatro tetinas de bebedero en el interior del corral. La ventilación y la calefacción se regularon de forma automática. Los corrales estaban fabricados en materiales no perjudiciales para la salud de las aves. Su diseño y construcción eran conformes a la Directiva 2010/63/UE, de modo que no produjesen lesiones en los animales. Estaban fabricados en materiales resistentes a las operaciones de limpieza y descontaminación. Se proporcionó pienso y agua a voluntad. El pienso comercial no contenía ni aditivos antimicrobianos ni anticoccidiales. Los animales se dividieron en tres grupos de tratamiento: 152 animales con 8 réplicas por grupo (Tabla 1).

Tabla 1. Grupos del estudio

Grupos	Descripción
UUC (Controles sin tratar y sin exposición)	No tratados con HIPRACOX® ni PoultryStar® y sin exposición posterior
IUC (Controles sin tratar y con exposición)	No tratados con HIPRACOX® ni PoultryStar® y con exposición posterior
HCPS	HIPRACOX® + PoultryStar® (agua + alimentación) y con exposición posterior

El grupo HCPS recibió la vacuna HIPRACOX® en la granja el día de llegada disuelta en el agua de los bebederos de campana y la solución PoultryStar® (20 mg/pollo/día) disuelta en el agua de los bebederos de campana durante los tres primeros días. Además, PoultryStar® se aplicó con los alimentos con dosis de 1 kg/t durante la fase inicial (1-14) y 0,5 kg/t durante la fase de crecimiento (15-35).

Se utilizó el siguiente inóculo el día 15 para inocular a las aves de los grupos IUC y HCPS (a una dosis de 1 ml/pollo) (Tabla 2). Las cepas de *Eimeria* utilizadas para la exposición eran cepas patógenas aisladas en Alemania.

Tabla 2. Inóculo para exposición a Eimeria

	<i>E. acervulina</i>	<i>E. maxima</i>	<i>E. tenella</i>	<i>E. mitis</i>	Total
Ooquistes esporulados/ml	118.318	11.985	8.005	138.308	276.615

Los días 21 y 22 (días 6 y 7 después de la exposición a las cepas patógenas), se seleccionaron aleatoriamente 2 pollos de cada corral, se pesaron y fueron sacrificados siguiendo la normativa de manejo de aves en experimentación. Las puntuaciones de las lesiones de *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* se realizaron con el método de Johnson & Reid (Johnson 1970). A continuación, se registraron las puntuaciones de las lesiones como la media de dos aves para cada segmento. La puntuación total de las lesiones se calculó como la suma de las puntuaciones de las lesiones en tres segmentos intestinales (duodeno, intestino medio y ciego). Se recogieron muestras de heces de todos los grupos y se determinó el recuento de ooquistes por gramo los días 6 y 7 después de la vacunación, y los días 7 y 14 después de la exposición a las cepas patógenas. Se recogieron deposiciones fecales frescas y se agruparon para cada grupo. Las muestras de cada grupo se guardaron en bolsas de plástico independientes y herméticas, homogeneizadas a través de una mezcladora doméstica, y se conservaron refrigeradas hasta la determinación del recuento de ooquistes mediante el método de McMaster. Las cifras de ooquistes se determinaron mediante la dilución y el recuento microscópico y se expresaron en ooquistes por gramo (OPG) de excreción.

Los parámetros productivos se registraron tal como se indica en la tabla 3.

Tabla 3. Resumen de los parámetros productivos registrados

Parámetros	Días posteriores a la vacunación (dpv)				
	1	8	15	22	35
Mortalidad	A diario				
Peso corporal, ingesta de alimentos y conversión alimentaria	X	X	X	X	X

La metodología de análisis estadístico fue conforme a lo descrito en las directrices de la WAAVP para la evaluación de la eficacia de los fármacos anticoccidiales en pollos y pavos (Holdsworth 2004). Los datos se analizaron con R. Data sobre el peso corporal (PC), el aumento de peso diario (APD), la ingesta de alimento diaria (IAD), el índice de conversión alimenticia (ICA), la puntuación total de las lesiones intestinales (PLI) y OPG, utilizando un modelo de regresión lineal que utilizaba el grupo de tratamiento como efecto fijo (procedimiento lm del paquete principal). Se realizó una transformación logarítmica natural $[\ln(x+1)]$ sobre los datos de OPG para obtener la distribución normalizada. En los casos en los que se observó una alta mortalidad, se analizó la mortalidad utilizando un modelo de riesgos proporcionales de Cox (procedimiento coxph del paquete supervivencia). Los valores de p de los modelos de regresión se calcularon comparando el valor de t frente a la distribución normal estándar utilizando una prueba del valor de z . Se comprobaron las gráficas de residuos para evaluar la adecuación del modelo. La significación estadística se evaluó con un valor de $p \leq 0,05$.

Resultados y discusión

En la tabla 4 se muestra la puntuación de coccidiosis media total por día del estudio y grupo. El día 21 se observó una diferencia significativa en la puntuación de las lesiones entre los grupos IUC y HCPS. De hecho, los pollos del grupo HCPS mostraron puntuaciones de las lesiones significativamente inferiores en comparación con el grupo IUC ($p < 0,05$). El día 22, la puntuación de las lesiones en el grupo HCPS fue numéricamente inferior en comparación con el grupo IUC, pero sin significación estadística.

Tabla 4. Puntuación de coccidiosis media total: Día 21, día 22. Las diferencias se analizaron mediante modelos de regresión lineal utilizando el tratamiento como efecto categórico fijo (procedimiento lm del paquete principal). Se calcularon los estadísticos para los grupos HCPS y UUC frente a los del grupo IUC.

Grupo	Día 21		Grupo	Día 22	
	Media	Valor de p		Media	Valor de p
IUC	3,4	Ref.	IUC	3,6	Ref.
HCPS	2,3	0,01	HCPS	2,5	0,054
UUC	0,8	< 0,001	UUC	0,6	< 0,001

En la tabla 5 se muestran los OPG en ooquistes por gramo por grupo y día del estudio. El grupo IUC muestra recuentos de OPG de cero en los días 6 y 7 con un incremento pronunciado en el día 22 (143 000) —dado que se trataba del grupo con exposición y sin tratamiento—, así como una reducción en el día 29, que revela que tras la exposición las aves adquirieron inmunidad y se redujo la producción de ooquistes. El grupo UUC mostró también un recuento de ooquistes de cero en los días 6 y 7, y niveles bajos de OPG los días 22 y 29. Esto indica que, después de la exposición, se observó como una contaminación cruzada en los pollos sin tratamiento y sin exposición. Finalmente, el grupo HCPS muestra, tal como se esperaba, niveles de OPG debidos a la vacuna los días 6 y 7. El día 22, los niveles de ooquistes fueron menos de la mitad

(67600) de los niveles observados en el grupo IUC, indicando que los pollos ya estaban inmunizados y bien protegidos en el momento de la exposición. En el día 29, los niveles de OPG fueron tan bajos como los de un lote que no excreta ooquistes gracias a la vacunación.

Tabla 5. OPG total

Tratamiento Grupo	D6	D7	D22	D29
IUC	0	0	143.000	200
HCPS	17.200	52.400	67.600	800
UUC	0	0	30.000	16.600

A pesar de no haber una diferencia estadísticamente significativa, la tasa de mortalidad en el grupo de HCPS fue numéricamente inferior en comparación con el grupo IUC (Tabla 6).

Tabla 6. Mortalidad. Las diferencias en la mortalidad total se analizaron utilizando un modelo de riesgos proporcionales de Cox. En la tabla siguiente se muestra el porcentaje de mortalidad, los cocientes de riesgos instantáneos y el valor de p. Se calcularon los estadísticos para los grupos HCPS y UUC frente a los del grupo IUC.

Grupo	Porcentaje	Cociente de riesgos instantáneos	Valor de <i>p</i>
IUC	7,26	Ref.	Ref.
HCPS	2,44	0,32	0,09
UUC	0,81	0,11	0,03

Los resultados de los parámetros productivos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Parámetros productivos. Las diferencias se analizaron mediante modelos de regresión lineal utilizando el tratamiento como efecto categórico fijo (procedimiento Im del paquete principal). ^{a-b}Las medias dentro de la mismas filas que no tienen el mismo superíndice del grupo IUC difieren significativamente ($p \leq 0,05$) de este grupo de referencia.

Parámetros	Tratamientos		
	IUC	HCPS	UUC
D1-D8			
PC día 1, g	41,2 ^a	41,5 ^a	40,8 ^a
PC día 8, g	174 ^a	169^b	172 ^a
APD, g	19,0 ^a	18,2^b	18,8 ^a
IAD, g/pollo	19,9 ^a	19,6 ^a	19,3 ^a
ICA	1,04 ^a	1,08 ^a	1,03 ^a
D8-D15			
PC día 15, g	485 ^a	449^b	483 ^a
APD, g	44,3 ^a	40,0^b	44,4 ^a
IAD, g/pollo	57,0 ^a	53,8 ^a	57,7 ^a
ICA	1,29 ^a	1,34 ^a	1,30 ^a
D15-D22			
PC día 22, g	733 ^a	775 ^a	960^b
APD, g	35,7 ^a	46,8^b	67,8^b
IAD, g/pollo	78,6 ^a	87,1 ^a	94,5^b
ICA	1,29 ^a	1,34 ^a	1,30 ^a
D22-D35			
PC día 35, g	2086 ^a	2210^b	2313^b
APD, g	104,2 ^a	109,5 ^a	104,2 ^a
IAD, g/pollo	171,2 ^a	168,3 ^a	164,2 ^a
ICA	1,65 ^a	1,54^b	1,58 ^a
D1-D35			
APD, g	51,5 ^a	54,8^b	59,0^b
IAD, g/pollo	81,3 ^a	83,2 ^a	84,6 ^a
ICA	1,58 ^a	1,52 ^a	1,43^b
D15-D35			
APD, g	74,1 ^a	82,9^b	88,9^b
IAD, g/pollo	130,4 ^a	133,9 ^a	135,0 ^a
ICA	1,77 ^a	1,62^b	1,52^b

El día 1 no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de tratamiento y el grupo IUC. El día 8, las aves del grupo HCPS presentaban un peso significativamente inferior al de las aves del grupo IUC, aunque estas diferencias eran solo numéricas. El día 15 (antes de la inoculación), se observó un peso corporal significativamente inferior en el grupo HCPS, probablemente provocado por la replicación de la vacuna. El día 22 (después de la inoculación), las aves del grupo UUC presentaban un peso

significativamente superior al de las aves del grupo IUC. En este punto no se observaron diferencias significativas entre el grupo HCPS y el grupo IUC, lo que indica un crecimiento compensatorio. El día 35, las aves del grupo HCPC y del grupo UUC presentaban un peso significativamente superior al de las aves del grupo IUC.

Desde los días 1-8 y a partir de los días 8-15, las aves del grupo HCPS aumentaron de peso de forma significativamente menor en comparación con el grupo IUC, probablemente debido al estrés generado por la replicación de la vacuna. Durante la fase que cubrió los días 15-22 (fase aguda posterior a la inoculación), las aves del grupo HCPS y del grupo UUC presentaron un aumento de peso significativamente superior en comparación con las aves del grupo IUC. Entre los días 22-35 (periodo de recuperación), no se observaron diferencias significativas. En términos globales, a partir de los días 1-35 y 15-35, las aves del grupo HCPS y del grupo UUC presentaron un aumento de peso significativamente superior en comparación con las aves del grupo IUC.

En cualquiera de los periodos, los días 1-8, 8-15, 22-35, 15-35 y en términos globales los días 1-35, no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos en lo que respecta a la ingesta de alimento diaria. Únicamente entre los días 15-22, las aves del grupo UUC presentaron una ingesta de alimento diaria superior en comparación con las aves del grupo IUC.

Los periodos que cubren los días 1-8, 8-15 y 15-22 no presentaron diferencias significativas entre los tres grupos en lo que respecta al ICA. En el periodo que cubre los días 22-35, los dos grupos presentaron un ICA inferior frente al grupo IUC, aunque esta diferencia solo resultó significativa para el grupo HCPS. En los periodos que cubren los días 1-35 y 15-35, las aves del grupo HCPS y del grupo UUC presentaron un ICA inferior al de las aves del grupo IUC.

En este estudio, el efecto protector añadido del simbiótico fue evidente en pollos vacunados frente a la coccidiosis inmediatamente después de la incubación y exposición a una mezcla de cepas de coccidia infecciosas el día 15. La exposición a especies de *Eimeria* pareció ser un éxito, ya que los pollos de todos los grupos inoculados presentaron algún grado de puntuación de lesiones intestinales para *Eimeria* spp. en los días 21 y 22, excepto los pollos del grupo UUC. Los días 21 y 22, las puntuaciones de la lesión en pollos del grupo HCPS fueron inferiores en comparación con el grupo IUC. Los pollos tratados con HCPS podrían suprimir en mayor medida la excreción de ooquistes que los pollos del grupo IUC. Al comparar los parámetros de rendimiento, los datos de los pollos del grupo UUC y del grupo IUC mostraron que la infección por coccidiosis tuvo un impacto sobre el rendimiento global de las aves. Al considerar el periodo completo del estudio, los pollos del grupo UUC presentaron un mejor rendimiento con relación al peso corporal, el aumento de peso y el ICA en comparación con los pollos del grupo IUC. Los pollos tratados con HIPRACOX® + PoultryStar® presentaron un mejor rendimiento con respecto a los pollos de los grupos IUC en lo que respecta al aumento de peso y el ICA. En el periodo previo a la exposición (días 1-15), el aumento de peso diario fue inferior entre los pollos del grupo HCPS, potencialmente debido a la replicación de las cepas de la vacuna, pero debido al crecimiento compensatorio registrado posteriormente esto no tuvo ningún impacto en el peso final de los pollos al finalizar el estudio (día 35).

En conclusión, los resultados del presente estudio muestran que la combinación de HIPRACOX® y PoultryStar® tiene un impacto positivo en el rendimiento zootécnico de los pollos y sobre las lesiones de coccidiosis después de la inducción experimental de coccidiosis. Esto sugiere un efecto beneficioso de la combinación HIPRACOX® y PoultryStar® sobre la digestión y la salud intestinal general.

Referencias

- COX C.M. y DALLOUL R.A.** (2015). Immunomodulatory role of probiotics in poultry and potential in ovo application. *Benef. Microbes* **6**:45–52.
- HOLDSWORTH P.A., CONWAY D.P., MCKENZIE M.E., CHAPMAN H.D., MATHIS G.F., SKINNER J.T., MUND H.-C. y WILLIAMS R.B.** (2004). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of anticoccidial drugs in chickens and turkeys. *Vet. Parasitol.* **121 (3-4)**:189-212.

- JEFFERS T.K.** (1975). Attenuation of *Eimeria tenella* through selection for precociousness. *J. Parasitol.* **61** (6):1083-90.
- JOHNSON J. y REID W.M.** (1970). Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp. Parasitol.* **28**: 30-36.
- LUTFUL-KABIR S. M.** (2009). The role of probiotics in the poultry industry. *Int. J. Mol. Sci.* **10**:3531–3546.
- OHIMAIN E.I. y OFONGO R.T.S.** (2012). The effect of probiotic and prebiotic feed supplementation on chicken health and gut microflora: a review. *Int. J. Anim. Vet. Adv.* **4**:135–143.
- PATTERSON J.A. y BURKHOLDER K.M.** (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult. Sci.* **82**:627–631.
- TIMMERMAN H.M., VELDMAN A., VAN DEN ELSEN E., ROMBOUITS F.M. y BEYNEN A.C.** (2006). Mortality and growth performance of broilers given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics. *Poult. Sci.* **85**:1383–1388.
- TOROK V.A., OPHEL-KELLER K., HUGHES R.J., FORDER R., ALI M. y MACALPINE R.** (2007). Environment and age: impact on poultry gut microflora. *Aust. Poult. Sci. Symp.* **19**:149–152.