

Magni-Phi® Ambientes de Alto Desafío de Enfermedades:

1. Alteración de Poblaciones de poblaciones bacterianas seleccionadas

Kenneth W. Bafundo, Ph.D.

Phibro Animal Health Corporation, Teaneck, NJ

Resumen

Una serie de cuatro pruebas en corrales en piso fueron llevados a cabo para determinar los efectos de Magni-Phi® (MP) en ambientes de alto desafío de enfermedades. En cada prueba, se utilizaron las camas de granjas que habían tenido brotes de enteritis necrótica y problemas con *Salmonella*. Adicionalmente, se usaron ooquistes de coccidia al inicio de cada prueba para incrementar el desafío. El MP fue adicionado a 0, 250 y 500 ppm administrándolo durante los 42 días que duró la prueba. A los 42 días de edad, el desempeño y mortalidad fueron determinados. Las lesiones por coccidia fueron calificadas al día 21, y se seleccionaron muestras intestinales y/o fecales colectadas a los días 21 y 42 para cuantificar al *Clostridium perfringens* y la incidencia de *Salmonella*. Los resultados demostraron que las aves adicionadas con MP mostraron mejoramientos lineales ($P < 0.001$) en su desempeño, la mortalidad y la calificación de lesiones por coccidias. Tanto en el día 21 como en el 42, se observaron reducciones lineales significativas ($P < 0.001$) en los conteos de *Clostridium* en muestras fecales y en los números de aves que tenían *Salmonella*. Esto indica que al adicionar MP ayuda a reducir las poblaciones de bacterias conocidas por causar efectos adversos importantes sobre el desempeño y la aceptabilidad del producto.

Introducción

Las saponinas son productos naturales de origen vegetal. En trabajos previos (1-4) con saponinas derivadas de las plantas de Yucca (*Yucca schidigera*) y los árboles de Quillaja (*Quillaja saponaria*), se ha demostrado que en pollos de engorda y pavos se potencian las propiedades anticoccidianas de los coccidiostatos utilizados.

Como los productores se han movido hacia ambientes libres de antibióticos (ABF) o en ambientes nunca con antibióticos (NAE), la combinación única con Yucca y Quillaja que contiene Magni-Phi ha jugado un papel significativo en el mantenimiento en estos ambientes desafiantes. Además, los reportes de campo indican que las aves adicionadas con MP muestran una menor mortalidad y un mejoramiento de su salud intestinal aun cuando fueron criadas en estas situaciones de alto desafío de enfermedades. Consecuentemente, el propósito de estos estudios aquí reportados fue el examinar los efectos en las aves de la adición con MP en situaciones de alto desafío, de evaluar las lesiones de coccidia, la incidencia de *Salmonella* en pollos de engorda positivos y de realizar el conteo del *Clostridium perfringens* en el tracto intestinal inferior.

Materiales y Métodos

Se llevó a cabo una serie de cuatro estudios en corrales de piso en la principal zona productora de pollos de engorda de EE. UU. Todas las pruebas fueron conducidas en ambientes de alto desafío de enfermedades empleando camas usadas y adicionándolo con la cama que se sabía que contenía *C. perfringens* y una variedad de serotipos de *Salmonella*. Esta cama suplementada fue tomada de granjas comerciales conocidas por haber presentado brotes de enteritis necrótica y *Salmonella*.

Un laboratorio externo independiente determinó los serotipos de *Salmonella* presentes en la cama que fueron *enteritidis*, *typhimurium*, *kentucky*, *indiana* y *heidelberg*. Antes de iniciar cada prueba, se adicionaron ooquistes de coccidia (*E. acervulina* y *E. maxima*) a cada corral.

Todas las aves en todas las pruebas fueron vacunadas contra coccidiosis con Coccivac B52®, aplicada en la incubadora. Ya que el objetivo de estas pruebas fue el determinar los efectos del incremento de las tasas de inclusión de MP sobre las poblaciones de bacterias patógenas seleccionadas, el MP fue añadido a 0, 250 ó 500 ppm por todos los 42 días de la prueba. En una de las pruebas, solo se evaluó la inclusión de 0 y de 250 ppm. Los tratamientos fueron replicados al menos 10 veces en cada prueba, y un total de 50 réplicas de cada tratamiento fueron relacionados para el análisis estadístico de datos. Al inicio de cada prueba los corrales contenían 55 pollos de engorda Cobb 500.

Los datos del desempeño fueron colectados a los 21 y 42 días de edad; las aves fueron evaluadas por las lesiones por coccidias al día 21 (5). Las evaluaciones bacterianas se llevaron a cabo a partir de las muestras fecales e intestinales que fueron colectadas del piso en cada corral en los días 21 y 42. Los procedimientos usados para el conteo de *Clostridium* y la determinación del porcentaje de *Salmonella* en pollos positivos se describirá a continuación:

Conteos de *Clostridium perfringens* en muestras fecales:

Se removieron cuatro aves por corral y se tomaron muestras fecales frescas de cada ave. Se diluyó cada muestra separadamente en 1:10 con fluido de dilución de peptona. Las muestras se diluyeron diez veces al añadir 1 ml en cada dilución hasta el nivel máximo. Las muestras diluidas se inocularon en placas de agar TSC sin yema de huevo. Se añadió agar TSC sin yema de huevo líquido a cada placa de manera que el inóculo estuviera completamente cubierto, de manera que se crean condiciones anaeróbicas de crecimiento. Después que el agar TSC se solidificó, cada placa fue incubada bajo condiciones anaeróbicas a 35°C por 20 – 24 horas. Seguido de la incubación, se contaron y registraron el número de colonias negras con una zona blanca opaca a su alrededor. Las UFC fueron determinadas por el conteo de colonias y la tasa de dilución. Los datos fueron convertidos a un log₁₀ por cálculo, y reportados como unidades log₁₀

Incidencia de *Salmonella* en pollos de engorda criados en corral:

El procedimiento estuvo dirigido para la determinación de la presencia de cualquier tipo de *Salmonella* en los contenidos intestinales; este no determinó los serotipos de estas. Se seleccionaron aleatoriamente cuatro aves de cada corral y fueron sacrificadas en el momento apropiado (21 ó 42 días de edad). Se tomó 1 cc de alimento digerido del tracto digestivo inferior de cada ave y luego fue sometido a un proceso doble de enriquecimiento con caldo TT. Después de ser incubado por 24 horas, se tomaron 10µl del caldo TT y después colocados en placas XLT4 y placas BG Sulfa e incubadas a 35°C por 18 – 24 horas. Los positivos se determinaron cuando se observaron colonias negras o rojas después de la incubación en el medio XLT4, o cuando se observaron colonias rosadas opacas en las placas BG Sulfa. Las placas negativas sospechosas fueron reincubadas por otras 24 horas adicionales y revisadas para ver algún crecimiento. El porcentaje de pollos de engorda positivos a *Salmonella* por corral (fuera de los cuatro) fue calculado.

Análisis de los Datos

Para todas las variables, la media del corral fue considerada como la unidad observacional. Los datos representados aquí son los resultados conjuntos de las cuatro pruebas. Todos los datos fueron analizados por procedimientos ANOVA y los efectos lineales de la adición con MP fueron determinados por cada variable. Para todos los datos conjuntos, la media de los tratamientos fue separada por el HSD de Tukey, donde $P < 0.05$ fue determinado como significativo.

Resultados y Discusión

El objetivo primario de esta serie de pruebas fue el determinar los efectos al administrar MP en ambientes de alto riesgo de enfermedad. La Tabla 1 muestra que la mortalidad general registrada para las aves control en esta serie de pruebas fue de 10.5%. Ya que estos números están considerablemente por arriba del promedio de la industria Americana, el objetivo general de criar aves en ambientes con alto desafío. En este ambiente, el MP adicionado a las aves mostró que redujo significativamente la mortalidad, y las aves adicionadas con niveles de 250 o con 500 ppm de MP, teniendo ambos una mejora significativa en su CA comparada con los controles. De la misma manera, las ganancias de peso corporal respondieron de manera similar. También se observaron efectos lineales significativos para cada una de las variables presentadas, en este ambiente, con cada nivel de MP adicionado las aves mejoraron en comparación con los grupos adicionados con los niveles más bajos.

En un trabajo previo (2, 3, 4) se ha demostrado la habilidad del MP, cuando se adicionó a las aves, para ayudar a reducir el desafío con coccidias y mejorar el desempeño en condiciones donde se sabe que la *Eimeria spp.* es un problema. La calificación de las lesiones por coccidia se registró en el presente estudio (Tabla 2) y fueron consistentes con estas observaciones, y cuando las aves fueron adicionadas con cada nivel de MP la severidad de las lesiones presentes se redujeron significativamente. Se observó una reducción lineal significativa de las lesiones por coccidias ($P < 0.001$).

Los resultados del conteo de *C. perfringens* (Tabla 2) fueron consistentes con la mortalidad y las calificaciones de las lesiones por coccidia presentadas arriba. En ambos intervalos donde el *Clostridium* fue contado logarítmicamente, las aves adicionadas con MP exhibieron reducciones significativas relacionadas al nivel en los números de microorganismos

presentes (efecto lineal $P < 0.001$). Cuando estos mismos datos son expresados en forma natural (sin convertirse a logaritmos), las respuestas indican que al menos se presentaron reducciones tres veces menores de los conteos de *Clostridium* producidos por la adición de MP a las dietas. Tomado en consideración estos resultados combinados (las lesiones por coccidias y el conteo de *Clostridium*) podemos explicar los efectos vistos en las aves adicionadas con MP, en donde la mortalidad al día 42 fue reducida.

Así como los datos del *Clostridium* presentados arriba, la Tabla 3 indica los efectos del MP en la dieta de las aves sobre la incidencia con *Salmonella* que fue menor en el intestino. En ambos intervalos donde estas mediciones fueron hechas, el MP redujo significativamente el porcentaje de pollos de engorda con *Salmonella*. Además, fueron evidentes las reducciones lineales ($P < 0.001$) en estos porcentajes sobre el rango del tratamiento probado.

Los datos contenidos aquí claramente muestran que los beneficios de adicionar el MP se extienden más allá de las mejoras aditivas en el control de la coccidiosis reportado en estudios previos (1 – 4). Quizás la mayor significancia son los resultados reportados cuando las aves adicionadas con MP tuvieron números reducidos de *Clostridium* en las heces y hubo una menor incidencia de aves con *Salmonella*. Estos resultados son probablemente los primeros en documentar la evidencia de estos efectos, y parecen ser consistentes con observaciones de campo hechas durante el uso comercial, donde se observó una baja mortalidad y una mejor salud intestinal. Ambos hallazgos son significativos debido a que estas bacterias imponen un gran riesgo para el desempeño óptimo del ave, la inocuidad alimentaria y la aceptabilidad de los productos avícolas.

Aunque la habilidad de adicionar MP para potenciar las propiedades anticoccidianas y anti-protozoarios es razonablemente comprendido, los efectos de adicionar las saponinas en MP sobre los efectos antimicrobianos es limitado. Mientras que se ha reportado alguna actividad de las saponinas de la Yucca y la Quillaja sobre bacterias Gram positivas (6), otros reportes han encontrado pocos efectos antibacterianos sobre organismos Gram negativos (7). En ambos casos, la actividad antibacteriana no se considera que tendrá un futuro prominente para estos productos (8, 9), y en nuestros propios estudios sobre inhibición bacteriana con el MP se apoya esta conclusión. Consecuentemente, se ve improbable que los efectos reportados aquí sean asociados con la actividad antimicrobiana dirigida específicamente contra el *Clostridium* y la *Salmonella*. En controversia, Cheeke (9) describió una variedad de diferentes procesos fisiológicos en el intestino que están influenciados por las saponinas de la Yucca y la Quillaja. Entre estos están el incremento de la permeabilidad del intestino, incremento de la formación de micelas y la absorción de grasa, protección de los ácidos biliares de la degradación bacteriana y la mejora en la absorción de vitaminas y minerales. Estos, por supuesto, son mejoramientos bien caracterizados de la inmunidad (9) y reducen la exposición a las coccidias (1 – 4). Como resultado, esto se ve más probable que los efectos de adicionar MP estén asociados con una modificación del ambiente intestinal, lo que puede permitir que las poblaciones de bacterias que contienen menos patógenos se establezcan. Los estudios actuales, diseñados para determinar si el adicionar MP incluyen cambios en las poblaciones de bacterias intestinales, deben de proporcionar la información necesaria para apoyar o refutar esta hipótesis.

Literatura Citada

- (1) Bafundo, K.W., G.F. Mathis and B. Lumpkins. The effects of Nutrafito Plus and virginiamycin on the performance and anticoccidial responses of broilers vaccinated for coccidiosis. *Poultry Sci.* 93: (E-Suppl. 1) p. 41. 2014.
- (2) Bafundo, K.W., G.F. Mathis and B. Lumpkins. Anticoccidial Effects of Magni-Phi, a Triterpenoid Saponin, When Combined with Salinomycin or Used to Support the Effectiveness of a Coccidiosis Vaccine. *Proceedings of the American Assn. Avian Pathologists*, Boston, MA. 2015.
- (3) Bafundo, K.W. and G.F. Mathis. Performance and Anticoccidial Effects of Magni-Phi in Coccidia-Vaccinated Broilers. *International Poultry Scientific Forum*, Atlanta, Ga. 2016.
- (4) Bafundo, K.W., M. Blakley and G.F. Mathis. The Effects of Magni-Phi in Floor Pen- and Commercially-Raised Turkeys. *International Poultry Scientific Forum*, Atlanta, Ga. 2018.
- (5) Johnson, J. and M.W. Reid. Anticoccidial Drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor pen experiments with chickens. *Exp. Parasitol.* 28: 30 – 36. 1970.
- (6) Hassan, S.M. Antimicrobial activities of saponin-rich guar meal extract. Ph.D. Thesis, Texas A&M University, College Station, TX. 2008.
- (7) Sen, S., H.P.S. Makkar, S. Muetzel, and K. Becker. Effect of Quillaja saponaria saponins and Yucca schidigera plant extracts on growth of *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 27:35-38. 1998.
- (8) Sparg, S., M. Light and J. van Staden. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacology* 94:219-243. 2004.
- (9) Cheeke, P.R. Actual and potential applications of Yucca schidigera and Quillaja saponaria saponins in human and animal nutrition. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia* 13: 115-126. 2001.

Tabla 1. Desempeño conjunto del periodo de cuarenta y dos días y mortalidad total registrada de los pollos de engorda Cobb adicionados con niveles graduales de Magni-Phi en cuatro pruebas en corral en piso.

	CA (gr:gr)	GPC (Kg)	Mortalidad (%) al D42
Magni-Phi (ppm)*			
0	1.920 ^a	2.784 ^a	10.5 ^a
250	1.844 ^b	2.881 ^b	3.1 ^b
500	1.810 ^c	2.894 ^b	2.2 ^b

Los resultados representan datos conjuntos de cuatro pruebas involucrando niveles graduales de Magni-Phi, donde cada tratamiento fue replicado 10 veces por prueba. En total 50 réplicas por tratamiento comprendido en el análisis conjunto.
*El efecto lineal de Magni-Phi fue significativo ($P < 0.001$) para todas las variables presentadas. ^{a-c} Diferentes superíndices en cada columna denota diferencias estadísticas ($P < 0.005$) determinado por HSD de Tukey.

Tabla 2. Calificaciones de lesiones conjuntadas y conteos de *Clostridium* determinado a los intervalos seleccionados en aves adicionadas con niveles graduales de Magni-Phi en cuatro de pruebas en corrales en piso.

Magni-Phi (ppm)*	Calificación de lesiones de Coccidias Día 21	Conteo de <i>Clostridium perfringens</i> (\log_{10})	
		Día 21	Día 42
0	1.71 ^a	4.09 ^a	4.06 ^a
250	1.12 ^b	3.56 ^b	3.57 ^b
500	0.47 ^c	3.13 ^b	3.42 ^b

Los resultados representan datos conjuntos de cuatro pruebas involucrando niveles graduales de Magni-Phi, donde cada tratamiento fue replicado 10 veces por prueba. En total 50 réplicas por tratamiento comprendido en el análisis conjunto. Se evaluaron cuatro aves por corral en cada intervalo en todas las pruebas.
*El efecto lineal de Magni-Phi fue significativo ($P < 0.001$) para todas las variables presentadas. ^{a-c} Diferentes superíndices en cada columna denotan diferencias estadísticas ($P < 0.005$) determinado por HSD de Tukey.

Tabla 3. Incidencia conjunta de *Salmonella* determinada en dos intervalos en pollos de engorda Cobb adicionados con niveles graduales de Magni-Phi en cuatro pruebas en corrales en piso.

Magni-Phi (ppm)*	Incidencia de <i>Salmonella</i> (Porcentaje)	
	Día 21	Día 42
0	78.1 ^a	70.0 ^a
250	54.3 ^b	44.7 ^b
500	33.2 ^c	37.7 ^b

Los resultados representan datos conjuntos de cuatro pruebas involucrando niveles graduales de Magni-Phi, donde cada tratamiento fue replicado 10 veces por prueba. En total 50 réplicas por tratamiento comprendido en el análisis conjunto.
*El efecto lineal de Magni-Phi fue significativo ($P < 0.001$) tanto para los datos del día 21 - y 42-
^{a-c} Diferentes superíndices en cada columna denotan diferencias estadísticas ($P < 0.005$) determinado por HSD de Tukey.

Esta información fue preparada únicamente para técnicos profesionales de la industria, y puede ser presentada y discutida por ellos ante su petición. Para más información llame al 800-677-4623.