

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFICACIA DEL TOLTRAZURIL ADMINISTRADO SOLO Y EN COMBINACIÓN
CON ACETURATO DE DIMINACENO O TRIMETOPRIM EN CORDEROS
INFECTADOS NATURALMENTE CON *Eimeria* spp.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

ALBERTO BUTRÓN MANCILLA

Aseoras:

Dra. Lilia Gutiérrez Olvera
Dra. Yazmín Alcalá Canto

México, D.F.
2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi papá Alberto Butrón Olvera, mi mamá Angelina Mancilla Guerrero, mis hermanas Elsa A. Butrón Mancilla y Sandra G. Butrón Mancilla, mis sobrinos Alejandra Sánchez Butrón y Luis Reséndiz Butrón, a mi novia Adriana Ballesteros Lozada.

Son las personas más importantes en mi vida, los amo más de lo que puedo expresar. Estoy muy feliz por compartir con ustedes este trabajo que representa el término de mi etapa de estudiante de licenciatura.

Mi compromiso es mejorar mis habilidades y conocimientos y seguirme preparando

Ustedes son la razón por la cual despertar todos los días es maravilloso.

Adri tu has sido parte esencial en ese proceso, este trabajo es tuyo también, eres ese empujón extra que da fuerza para seguir adelante, te amo.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento en la realización de este trabajo es para Dra. Yazmín Alcalá Canto, Dra. Lilia Gutiérrez Olvera, Dr. Aldo B. Alberti Navarro. Sin su ayuda y tiempo invertido este trabajo no hubiera sido posible.

Dr. Aldo gracias por su amistad y apoyo, haberlo conocido ha sido verdaderamente un placer.

Dra. Yazmín no hay forma que olvide todo el apoyo otorgado en la realización de este trabajo.

CONTENIDO

TEMA	PÁGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MATERIAL Y MÉTODOS	22
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	34
REFERENCIAS	36
FIGURAS	41
CUADROS	51

RESUMEN

BUTRÓN MANCILLA ALBERTO. Eficacia del toltrazuril administrado solo y en combinación con aceturato de diminaceno o trimetoprim en corderos infectados naturalmente con *Eimeria* spp. (Bajo la dirección de: Dra. Lilia Gutiérrez Olvera y Dra. Yazmín Alcalá Canto)

La coccidiosis en corderos es una infección intestinal caracterizada clínicamente por diarrea y deshidratación. La causa principal de coccidiosis ovina es *Eimeria ovinoïdalis*, pero otras especies llegan a estar asociadas con esta enfermedad. En este estudio se utilizaron 4 grupos experimentales y un grupo testigo de ovinos infectados naturalmente para evaluar la eficacia anti-*Eimeria* spp. de 4 tratamientos: toltrazuril + trimetoprim + aceturato de diminaceno (grupo A); toltrazuril + trimetoprim (grupo B), toltrazuril + aceturato de diminaceno (grupo C) y toltrazuril comercial (Baycox[®]) (grupo D). La valoración de la eficacia se basó en la excreción de ooquistes por gramo de heces (opg), consistencia fecal y ganancia diaria de peso (gdp) de los animales tratados en comparación con los no tratados (grupo E). La reducción promedio de opg y eficacia anticoccidiana en los grupos tratados fue respectivamente de: 2183.33 y 96% (A); 1400 y 98% (B); 2516.67 y 99% (C); 1500 y 99% (D). Estos resultados contrastaron con el aumento medio de 1712.50 opg en los testigos no tratados (E). La gdp media en los ovinos tratados fue de 0.15 kg en comparación con 0.08 kg en los testigos. La consistencia fecal observada 45 días post-tratamiento en los grupos A-D fue sólida, mientras que en los testigos las heces fueron acuosas a todo lo largo del estudio. Los resultados permiten afirmar que las combinaciones experimentales probadas son efectivas para el tratamiento de la coccidiosis ovina y pueden ser una alternativa viable para el control y prevención de esta enfermedad sin la necesidad de utilizar un producto importado. Se sugiere realizar estudios posteriores para determinar la eficacia anticoccidiana de estas combinaciones experimentales contra otras especies de *Eimeria* e incluso otros protozoarios de distintos géneros.

INTRODUCCIÓN

Las coccidias comprenden un grupo diverso de protozoarios intracelulares obligados de vertebrados, con unas pocas especies que infectan invertebrados. Estos parásitos han sido clasificados en el Phylum *Apicomplexa* que se caracteriza por la presencia de un conjunto de organelos que son muy importantes para la invasión y supervivencia dentro de las células del huésped (Jolley y Bardsley, 2006). Los agentes causales de la eimeriosis o coccidiosis en rumiantes son organismos que se desarrollan dentro de las células intestinales de los huéspedes. Debido a que el desarrollo intracelular provoca la destrucción de las células en las que se multiplican, se les considera parásitos aunque no lleguen a provocar la enfermedad (Taylor y Catchpole, 1994). La mayoría de las especies que infectan rumiantes no provocan signos a pesar de que cuando se realizan análisis diagnósticos estándar se encuentren en cantidades elevadas. Consecuentemente, es importante diferenciar las especies patógenas de las de menor importancia clínica (Kauffman, 1996). Los organismos abordados en este capítulo se agrupan taxonómicamente dentro del género *Eimeria* perteneciente a la familia *Eimeriidae* del Phylum *Apicomplexa*. En general, todas las especies de *Eimeria* que infectan rumiantes son capaces de completar su desarrollo y reproducción en el tracto digestivo de huéspedes específicos y genéticamente compatibles (Long, 1990). Algunas de las especies de *Eimeria* más comunes en ovinos son *E. ovina*, *E. ovinoidalis*, *E. ahsata*, *E. parva*, *E. intricata*, *E. bakuensis*, *E. crandallis*, *E. faurei*, entre otras. Cabe señalar que *E. ovinoidalis* se consideran una de las especies más patógenas (Mehlhorn, 2004).

Distribución geográfica

La eimeriosis en rumiantes es una enfermedad cosmopolita. Sin embargo, la frecuencia, incidencia, prevalencia, morbilidad y mortalidad varía según las regiones, tipo de explotación y medidas de bioseguridad que se aplican en el manejo del ganado (Levine, 1985).

Importancia

Los factores considerados en la estimación de pérdidas a causa de eimeriosis en ovinos se deben principalmente a la disminución del crecimiento, retraso en la conversión alimenticia y costos generados por tratamientos. La coccidiosis clínica provoca lesiones severas en el intestino de los rumiantes y la atrofia de las vellosidades intestinales puede ser una secuela que resulte en mala absorción (Taylor, 1995). Con respecto a su importancia en salud pública, se considera que el riesgo de zoonosis a causa de esta enfermedad es mínimo (Mehlhorn, 2004).

Morfología

Los parásitos *Apicomplexa* se denominan así por su complejo apical celular distintivo que contiene organelos llamados rhoptrios, micronemas, conoide y anillo polar apical (Figura . Los rhoptrios y micronemas son organelos que secretan moléculas necesarias para la motilidad, adhesión a las células huésped e invasión de células huésped. El conoide es una estructura pequeña formada por filamentos en espiral y se cree que desempeña un papel mecánico en la invasión celular. El anillo polar apical sirve como un centro de organización de microtúbulos. Además del complejo apical, estos parásitos tienen otras estructuras únicas, tales como un organelo esencial similar a un cloroplasto llamado apicoplasto. Además, los organismos de este *Phylum* están

rodeados por una película, estructura que está formada por una membrana plasmática y un complejo interno de membranas que contiene vesículas aplanadas.

El estadio inmóvil se denomina ooquiste u oocisto. Los **ooquistes** son estadios que generalmente se excretan con las heces del huésped. La esporogonia es el proceso mediante el cual un **esporonte** (zigoto) lleva a cabo una serie de divisiones dentro de la pared del ooquiste para formar **esporozoitos**, los cuales en el caso de *Eimeria* se encuentran contenidos dentro de **esporoquistes**. Los ooquistes del género *Eimeria* presentan en su interior cuatro esporoquistes cada uno con dos esporozoitos. Estudios ultraestructurales del ooquiste han demostrado la presencia de diversos organelos dependiendo de la especie de *Eimeria*, entre ellos el gránulo polar, cuerpo residual del ooquiste, micrópilo y tapón del micrópilo (Eckert *et al.*, 1995). El esporoquiste posee una pared y un residuo, mientras que el esporozoito presenta un núcleo, y los cuerpos retráctiles anterior y posterior (Long, 1990).

Ciclo Biológico

La Figura 2 muestra el ciclo biológico del género *Eimeria*, el cual se divide en 3 fases:

1. Esporogonia
2. Merogonia o esquizogonia
3. Gametogonia o gamogonia

Esporogonia.- Los **ooquistes esporulados** constituyen el estadio infeccioso del género *Eimeria*. Bajo condiciones adecuadas de oxigenación, humedad elevada y temperaturas óptimas de alrededor de 27°C, el núcleo se divide dos veces y la masa protoplásmica forma 4 cuerpos cónicos a partir de una masa

central. Cada uno de estos conos se redondea y forma un **esporoblasto**, aunque en algunas especies el protoplasma restante forma el cuerpo residual del ooquiste. Cada esporoblasto secreta una pared de material refráctil que se conoce como **esporoquiste**, mientras que en el interior el protoplasma se divide y forma dos **esporozoitos**. En algunas especies el protoplasma restante dentro del esporoquiste forma un cuerpo residual del esporoquiste. Bajo condiciones ambientales óptimas, esta fase del ciclo se realiza en 2-4 días (Levine, 1985).

Merogonia o esquizogonia (reproducción asexual).- El huésped se infecta al ingerir el ooquiste esporulado. Los esporoquistes se liberan ya sea mecánicamente o por el estímulo del CO₂ y los esporozoitos se liberan al ser activados por la tripsina y bilis. En muchas especies, cada esporozoito penetra una célula epitelial, se redondea y se le conoce como **trofozoito**. Después de algunos días, cada trofozoito se divide por fisión binaria múltiple y forma el **meronte o esquizonte**, estructura que está formada por un elevado número de organismos elongados nucleados conocidos como **merozoitos**. Cuando la división se completa y el meronte madura, la célula huésped y el meronte se rompen, por lo que los merozoitos se liberan e invaden células adyacentes. La merogonia puede repetirse varias generaciones dependiendo de la especie de *Eimeria* (Mehlhorn, 2004; Urquhart *et al.*, 1996).

Gametogonia o gamogonia (reproducción sexual).- La merogonia concluye cuando los merozoitos forman gametocitos machos (microgametocitos) y hembras (macrogametocitos). Estos estadios de vida pueden distinguirse de los trofozoitos o merozoitos en desarrollo por el hecho de que tienen un núcleo único y grande. Los microgametocitos se dividen repetidamente para formar un

gran número de organismos flagelados con un solo núcleo, a los que se les denomina **microgametos**. Los protozoarios presentan órganos de locomoción solamente durante esta breve fase de su ciclo de vida. Los microgametos se liberan por la ruptura de la célula huésped, uno penetra un macrogameto y se lleva a cabo la fusión de los núcleos del microgameto y macrogameto. Se forma una pared quística alrededor del **zigoto (zigotoquiste u ooquiste)**, el cual se libera de las heces como un **ooquiste no esporulado**. El periodo prepatente, es decir, antes del inicio de la excreción de ooquistes (Mundt *et al.*, 2005) dura en promedio 3-4 semanas (Urquhart *et al.*, 1996).

Patogenia

La severidad de la infección por *Eimeria* en rumiantes depende de dos factores importantes: los parásitos como tales y la reacción del huésped hacia ellos. Una reacción severa por parte del huésped puede causar más daño que los mismos parásitos. Ambos causan cambios estructurales que reducen la función de los órganos afectados y se desencadena una serie de cambios fisiológicos (Mehlhorn y Piekarski, 1993). Algunas de las reacciones del huésped se producen como respuestas generales a la interferencia con sus tejidos, mientras que otras son respuestas específicas hacia las coccidias. El intestino delgado de los rumiantes es muy largo, lo cual proporciona un gran número de enterocitos que permiten la multiplicación excesiva del parásito sin que se provoque mucho daño por lo general. En caso de que se afecte la absorción, el intestino grueso puede ejercer un cierto efecto compensatorio (Dougshcies y Najdrowski, 2005). Las coccidias que afectan el intestino grueso tienden a ser más patógenas que aquéllas que infectan el delgado. Esto puede deberse a

que la regeneración celular es menor, parcialmente debido a que en el intestino grueso existen más organismos oportunistas que pueden aprovechar para invadir una mucosa dañada (Smyth, 1994). Las coccidias menos dañinas causan pérdida de la superficie celular, mientras que las especies más patogénicas provocan cambios que derivan en pérdida de las células de la cripta y ruptura de vasos sanguíneos (Urquhart *et al.*, 1996). Con respecto a la histopatología, se presentan los siguientes procesos (Mehlhorn, 2004):

1. Cambios vasculares – Se observan hiperemia, edema y hemorragia de acuerdo con el grado de severidad del daño. Esto puede ser parte de una respuesta general inflamatoria que puede ser generada también por bacterias oportunistas. Puede incrementarse la permeabilidad del endotelio y epitelio, derivando en edema e incremento en la pérdida de fluidos (Levine, 1985).

2- Infiltración celular – Los neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y macrófagos se acumulan como parte de la respuesta inflamatoria. Se observa una gran cantidad de neutrófilos en las áreas de ruptura del recubrimiento epitelial, especialmente si hay invasión de bacterias. Los macrófagos, neutrófilos y eosinófilos desempeñan un papel importante en la destrucción de los merontes de primera generación (Long, 1990).

3. Hiperplasia epitelial – Todas las infecciones causadas por coccidias dañan el epitelio provocando una respuesta de hiperplasia o proliferación celular. En la mayoría de los casos proliferan únicamente las células no infectadas, pero en otros casos las células infectadas con coccidias continúan dividiéndose (Catchpole, 1985). La proliferación continua de las células intestinales resulta en el alargamiento de las criptas intestinales y en la disminución de la tasa vellosidad/cripta y debido a que las paredes son muy gruesas, disminuye la

absorción de nutrientes (Mehlhorn y Piekarski, 1993). La hiperplasia puede ser focal o difusa. La primera causa la formación de “parches de ooquistes” y pólipos en el caso de *E. ovina* y *E. ahsata*. Estas lesiones focales resultan de la liberación de merozoitos dentro de la lámina propia. Los pólipos se forman debido al alargamiento excesivo de las vellosidades causado por la hiperplasia de las criptas o por el aumento del tiempo de vida de cada enterocito (Beldomenico *et al.*, 2003).

4. Pérdida epitelial – Los enterocitos generalmente completan su tiempo de vida en unos pocos días. Cuando llegan a la superficie de la mucosa, se liberan al lumen o son absorbidos por los enterocitos adyacentes. En las infecciones causadas por coccidias, los enterocitos se pierden prematuramente, probablemente debido a la anoxia que ocurre en los rumiantes cuando los merontes gigantes separan al epitelio de su fuente de sangre (Gregory *et al.*, 1989). También puede deberse a una reacción de hipersensibilidad en la que la acumulación de fluidos debajo del epitelio forma hojas de epitelio a partir del estroma. En estos casos las células mueren por necrosis (Lucas *et al.*, 2007). Otro mecanismo es la apoptosis o muerte celular programada tanto en la superficie intestinal como en las criptas. La pérdida de epitelio en el intestino delgado provoca atrofia de las vellosidades. Si las criptas resultan intactas, la hiperplasia de las criptas producirá nuevas células para restaurar la arquitectura de las vellosidades (Allen, 2007). Sin embargo, se reduce el área de epitelio de absorción, aumenta la cantidad de enterocitos inmaduros por la tasa aumentada de generación celular y consecuentemente disminuye la absorción de nutrientes. Si la pérdida celular se extiende a las criptas, puede provocar atrofia de las mismas. Si el epitelio no se regenera, se presenta

denudación en el área, lo cual implica dos hechos: pérdida de epitelio de absorción y acceso de bacterias y hongos oportunistas a los tejidos (Craig *et al.*, 2007). La pérdida de epitelio de absorción puede producir diarrea y la invasión por organismos oportunistas puede causar necrosis del tejido y muerte del huésped. Una de las causas de mortalidad es la absorción de toxinas resultantes de la proteólisis excesiva (Jolley y Bardsley, 2006).

Lesiones

Las células invadidas por esporozoitos presentan varios grados de hipertrofia del nucleólo, núcleo y citoplasma. Además, el número masivo de merontes provoca engrosamiento de la mucosa. Los merontes de las coccidias de rumiantes se observan como manchas blanquecinas sin necesidad de emplear lentes especiales (Dougshies y Najdrowski, 2005). Los merontes en grandes cantidades pueden causar edema y hemorragias en corderos. Los merontes gigantes en rumiantes generalmente se rodean de células inflamatorias, particularmente neutrófilos. Los merontes destruidos por polimorfonucleares se observan como “fantasmas”, es decir, aglomeraciones de macrófagos y detritos celulares (Mehlhorn, 2004). En la mayoría de las relaciones coccidias/huésped, éste es el estadio más patogénico, quizás por ser el más numeroso. Se observa engrosamiento, edema, hemorragias petequiales o de gran extensión. Pueden existir membranas diftéricas de material necrótico y puede continuar la división y lesiones hiperplásticas difusas o focales (Smyth, 1994). Las células pueden detener su división pero permanecer en su lugar hasta que el parásito madure. En las áreas en las que las células detienen su división se nota una pérdida evidente del epitelio. Como mecanismo de reacción por parte del

huésped, las células se desprenden de la membrana basal y se pierden en el lumen intestinal. Sin embargo, este proceso resulta en pérdida de grandes áreas de mucosa en infecciones masivas, y la recuperación puede tardar varias semanas (Reeg *et al.*, 2005).

Signos clínicos

Se ha establecido que *E. ovinoidalis* puede ser muy patógena y que otras especies tales como *E. ovina* y *E. crandallis* pueden exacerbar los signos de la primera especie (Mehlhorn y Piekarski, 1993). Los brotes de coccidiosis generalmente son agudos y se caracterizan por una morbilidad moderada y baja mortalidad. Se observa una diarrea acuosa verde o amarillenta con olor fétido y ocasionalmente con sangre (Mundt *et al.*, 2005). Los animales muestran dolor abdominal, , anemia macrocítica hipocrómica, pérdida del apetito, deshidratación, tenesmo, debilidad y pérdida de peso. También son evidentes la depresión, inactividad y recumbencia. La eimeriosis puede presentarse junto con miasis, diarrea bacteriana y septicemia. Los animales recién nacidos son relativamente resistentes a la infección y su susceptibilidad se incrementa a las 4 semanas de edad por la condición de estrés que desarrollan los animales al ser transferidos al corral de engorda, pues esto tiene un efecto depresor sobre la respuesta inmune que debe ser considerada en la presentación de enfermedades en el periodo de adaptación (Tórtora, 2003).

Diagnóstico

Los animales jóvenes que comienzan a mostrar signos como diarrea, anemia, deshidratación, debilidad, anorexia y emaciación deben ser examinados para

diagnosticar eimeriosis. El examen microscópico de las heces es el método de diagnóstico más efectivo desde el punto de vista costo-beneficio, así como el más sencillo y directo, aunque también se han desarrollado métodos serológicos analíticos mediante inmunoensayos o ensayos de genética molecular (Berriatua, 1995; Jolley y Bardsley, 2006). El análisis fecal habitual involucra la concentración de los ooquistes de las heces mediante el método de flotación con azúcar o sal, seguido de la identificación de las especies mediante la diferenciación microscópica de los ooquistes concentrados. La cuantificación de la carga parasitaria puede realizarse mediante el conteo de ooquistes en la cámara de McMaster (Thienpont *et al.*, 1990). Las descargas diarreicas, generalmente sin sangre, causadas por virus, bacterias u otras etiologías a veces contienen ooquistes en cantidades moderadas o elevadas de especies no patógenas de *Eimeria*. En estas situaciones, la identificación de las coccidias en especímenes fecales es esencial para un diagnóstico exacto del problema clínico que podría no estar relacionado con los protozoarios (Reeg *et al.*, 2005). Los ooquistes son más numerosos en las heces o tejidos durante el periodo temprano de patencia (inicio de excreción de ooquistes) y permanecen elevados durante 3 a 7 días, después de los cuales se completa el ciclo endógeno y las cuentas de ooquistes fecales caen a cero (da Silva y Miller, 1991). Se sugiere que las heces deben ser colectadas de los animales al inicio de la fase diarreica, en lugar de una semana o dos después del inicio de la fase clínica (Mundt *et al.*, 2005). Si el huésped sobrevive a la infección clínica y comienza a recuperarse, las infecciones subclínicas no comenzarán hasta semanas o meses después. (Dougschies y Najdrowski, 2005).

Tratamiento

Anticoccidianos

La administración de fármacos anticoccidianos puede reducir significativamente la coccidiosis si se utiliza junto con medidas adecuadas de higiene y bioseguridad, además de procurar disminuir las situaciones estresantes para los corderos.

Los quimioterapéuticos anticoccidianos se clasifican en coccidiostatos o coccidicidas. Se conoce como un fármaco coccidiostato al agente químico que generalmente se administra como aditivo alimenticio o en el agua de bebida y que actúa en las primeras fases del ciclo evolutivo del protozooario. Los ionóforos poliéteres (monensina y lasalocid) y el decoquinato son los coccidiostatos aprobados por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA por sus siglas en inglés) de EE.UU. para ser administrados a ovinos (www.fda.gov). La monensina y el lasalocid actúan solamente contra los merozoitos libres, provocando que estalle la película, el retículo endoplásmico y otros organelos internos. Sin embargo, no son efectivos contra estadios intracelulares. El decoquinato es una quinolona que inhibe la respiración de los merontes de primera generación y la esporulación de las coccidias (Sumano y Ocampo, 2006). Cuando se administran los fármacos a niveles efectivos durante el periodo de la infección, se desarrolla un nivel protector de inmunidad hacia las especies involucradas de *Eimeria*, después de lo cual debe discontinuarse la medicación para que exista una protección significativa contra la reinfección con la especie inicial (Gregory y Catchpole, 1989). En contraste, un fármaco coccidicida es el que evita la formación de lesiones intestinales severas y reduce drásticamente la eliminación de ooquistes en

heces (Wang, 1997). Por lo tanto, se reduce el tiempo de contacto de los parásitos con el huésped y se induce la inmunidad. El diclazuril y toltrazuril se consideran coccidicidas, y a pesar de estar solamente aprobados para ser administrados a aves y porcinos (FDA), en nuestro país se han utilizado para el tratamiento de la coccidiosis ovina, ya que puede usarse como aditivo alimenticio en rumiantes.

Como se mencionó en el subcapítulo relativo a la morfología de las coccidias, el apicoplasto es un organelo característico. Se ha sugerido que los organismos *Apicomplexa* evolucionaron de un ancestro algal en el periodo Precámbrico-Cámbrico, quizás hace 500 millones de años. A pesar de que el apicoplasto perdió su capacidad para la fotosíntesis, retiene muchas funciones metabólicas, incluyendo aquéllas ligadas con el metabolismo energético. Se ha demostrado que los *Apicomplexa* no pueden sobrevivir sin un apicoplasto funcional. Muchos de los procesos que se llevan a cabo en ese organelo son diferentes de los del huésped mamífero, por lo que los agentes químicos que inhiben estas vías metabólicas son difícilmente tóxicos para el huésped. Una de las enzimas presentes en estas vías es el blanco de un herbicida con actividad antiparasitaria denominado toltrazuril. Este producto actúa en la proteína D1 de los centros de reacción fotosintéticos en el apicoplasto. Es efectivo contra los estadios de la merogonia y gametogonia de las coccidias y se ha demostrado su efectividad si se administra durante el periodo prepatente (Mehlhorn, 1988; Alzieu *et al.*, 1999; Gjerde y Helle, 1991). Se ha documentado que no influye sobre la inmunidad celular (Platzer *et al.*, 2005) y la dosis sugerida en ovinos es de 20 mg/kg en ovinos (Stafford *et al.*, 1994). El amprolio, y las sulfonamidas pueden ser utilizados como coccidiostatos o

coccidias dependiendo del modo y tiempo de administración, por ejemplo, el amprolio tiene actividad coccidicida si se administra por 5 días, y coccidiostática si se emplea por 21 días (Croft, 1997). El amprolio actúa como un inhibidor competitivo de la tiamina. Las coccidias que se dividen rápidamente tienen requerimientos mayores de tiamina que el huésped, por lo que su toxicidad es baja. Las sulfonamidas son estructuralmente similares al ácido *p*-aminobenzoico (PABA) y compiten con el PABA por sitios de unión en la enzima que lo convierte a folato. El folato, a su vez, es transformado a tetrahidrofolato y finalmente a timidilato y ADN. El trimetoprim actúa del mismo modo, compitiendo con el folato e interfiriendo con la producción de tetrahidrofolato. Las sulfonamidas y el trimetoprim son solamente efectivos contra los estadios de protozoarios intracelulares que carecen de sus propios mecanismos para transportar el folato a la célula. En las coccidias, esto significa que son efectivos contra los estadios asexuales durante la merogonia, más que durante la gametogonia (Sumano y Ocampo, 2006).

Algunas especies de coccidias han desarrollado resistencia a los coccidiostatos utilizados repetidamente durante largos periodos, especialmente en la producción avícola. El uso de coccidiostatos en la producción de rumiantes tiende a ser periódico, más que continuo, por lo que la documentación de casos de resistencia a fármacos anticoccidianos es limitada (Stephan *et al.*, 1997). Básicamente existen dos opciones de tratamiento que se han estudiado comparativamente en el campo:

1. Tratamiento terapéutico: Administración de fármacos después del inicio de la excreción de ooquistes o de la presentación de la enfermedad clínica (Mundt *et al.*, 2005).

2. Tratamiento metafiláctico: Administración de fármacos durante el periodo prepatente, es decir, antes de que sea posible efectuar el diagnóstico *in vivo* de la infección. Por lo tanto, el tratamiento metafiláctico se refiere a la administración del quimioterapéutico en un periodo de tiempo cercano a la observación esperada de signos compatibles con coccidiosis, con base en la historia clínica del rebaño (Dauguschies *et al.*, 2007). Debido a que las ovejas se consideran una fuente potencial de ooquistes, se debe establecer un programa preventivo que inicie tratando a las hembras gestantes 3 semanas antes de la fecha probable de parto. Debido a que a veces se dificulta utilizar medicamentos en el alimento en hembras lactantes o cabritos por su consumo errático de alimento, se sugiere proporcionar un tratamiento individual.

El Cuadro 1 enlista los agentes quimioterapéuticos que se utilizan en la prevención de la eimeriosis en animales domésticos.

Babesiacidas

Aceturato de diminaceno

Este fármaco es útil para el tratamiento de babesiosis con una dosis de 3.5 mg/kg vía intramuscular en bovinos. Este fármaco no elimina el 100% de las babesias, lo que permite un estado de inmunidad mucho más seguro que la esterilización total, en particular en zonas con incidencia endémica de babesiosis. El aceturato de diminaceno interfiere con el ADN del protozoario. Se ha demostrado que la incorporación al núcleo del parásito es muy rápida. Lo paraliza en pocas horas y es susceptible de ser atacado por los sistemas de defensa del organismo. Inhibe drásticamente el metabolismo energético del parásito. Este fármaco es hidrosoluble y por su toxicidad se prefieren la vía

intramuscular o subcutánea. Cuando se aplica por vía subcutánea, se aconseja repartir la dosis en varios sitios, para evitar en lo posible inflamaciones graves. A pesar de que induce la aparición de *Trypanosoma sp* y *Babesia sp* resistentes, aún después de más de 40 años de uso, sigue siendo eficaz en el control de estos protozoarios. El diminaceno es tóxico para el sistema nervioso, ya que puede inducir ataxia y convulsiones. Tiene además la característica de provocar una súbita disminución de la presión sanguínea. Por estas razones, se prefiere no aplicarlo por vía endovenosa. Se ha informado que produce hipersensibilidad en bovinos y no se descarta esta situación en otras especies (Sumano y Ocampo, 2006).

Epidemiología

Ciertos tipos de manejo relacionados con las condiciones de alojamiento de los animales e instalaciones ofrecen condiciones óptimas de temperatura y humedad para la esporulación de ooquistes (Gauly *et al.*, 2001; Gregory *et al.*, 1983). Lo anterior en conjunto con el hacinamiento provoca que incremente el riesgo de una infección masiva. A pesar de que la esporulación de los ooquistes puede ocurrir en tan solo dos días después de ser eliminados con las heces, este periodo es más prolongado en la pastura (Amarante y Barbosa, 1992). Los ooquistes tienen una longevidad notable y pueden persistir por varios años. Por otro lado, existe evidencia de que el ciclo de vida de algunas especies de *Eimeria* en rumiantes puede retardarse o puede presentarse disminución en el desarrollo de la fase de merogonia para continuarlo varios

meses después con la eliminación subsecuente de ooquistes (Dougshies y Najdrowski, 2005). La mayoría de los rumiantes mayores de 1 año han adquirido inmunidad protectora específica de especie de infecciones iniciales. La inmunidad no es absoluta, pero puede prevenir episodios clínicos de la magnitud de la infección inicial (Catchpole y Norton, 1993). Las células del huésped son altamente inmunorreactivas y capaces de producir un amplio rango de citocinas proinflamatorias, iniciando así el reclutamiento de polimorfonucleares (PMN), linfocitos T y monocitos hacia el sitio de infección (Mundt *et al.*, 2005). Los PMN se acumulan tempranamente en el sitio de formación de esquizontes en roedores infectados con *Eimeria* spp. y se ha demostrado que matan los esporozoitos de *E. falciformis in vitro*. Los PMN generan IL-1 β , IL-10, IL-12, IL-8 y TNF- α para atraer otras células inmunocompetentes al sitio de infección. La mayoría de las exposiciones a coccidias resultan en infecciones subclínicas que provocan diarreas leves o ningún signo (Reeg *et al.*, 2005; Svensson *et al.*, 1996). Sin embargo, estos animales son portadores y pueden eliminar ooquistes en sus heces. Las infecciones pueden permanecer en niveles subclínicos hasta que la resistencia del animal se reduce por el estrés provocado por diversas situaciones, tales como el destete, embarque, hacinamiento, clima, cambios de raciones, entre otros. Este cambio permite el incremento considerable de las poblaciones de coccidias y la presentación de signos clínicos, así como la presentación de enfermedades oportunistas. Los animales jóvenes son los más susceptibles a la coccidiosis, ya que el sistema inmune no ha madurado y las coccidias no estimulan una buena protección. En animales maduros se presentan infecciones con especies patógenas y no patógenas de coccidias que son

transmisibles a los animales jóvenes (Jolley y Bardsley, 2006). La susceptibilidad aumenta durante la exposición al estiércol en climas húmedos y cálidos. Los ooquistes que sobreviven al frío o desinfectantes y se vuelven infecciosos en el estiércol no removido pueden ser ingeridos cuando el animal se lame o mediante la succión de una ubre de un animal que se haya postrado sobre el pasto o corral contaminado (O'Callaghan *et al.*, 1987). Es importante la rotación de potreros (Catchpole y Harris, 1989), alejar a los animales de las áreas con estiércol concentrado y procurar que las instalaciones se mantengan secas, ya que la deshidratación excesiva mata a los ooquistes. La severidad del daño al huésped depende del estado inmunológico del hospedador y del número de ooquistes ingeridos (Reeg *et al.*, 2005).

Prevención y control

Las estrategias efectivas de prevención y control de la eimeriosis en rumiantes incluyen la práctica de minimizar la exposición de animales jóvenes a los ooquistes infecciosos y la administración de fármacos anticoccidianos metafilácticos a los animales infectados durante los estadios de desarrollo asexual del protozoario. Después del inicio de la formación intracelular de los ooquistes, éstos se hacen impermeables a los fármacos y a la mayoría de los agentes químicos (Yvoré *et al.*, 1992). Se debe procurar prevenir la deshidratación de los animales, infecciones secundarias, privación nutricional y la exposición a temperaturas extremas para minimizar las muertes (Argüello y Cordero del Campillo, 1999). Las instalaciones con pisos tipo slats, los comederos elevados que reducen el riesgo de ingerir ooquistes a nivel del piso, los bebederos protegidos de la contaminación fecal y el uso de productos

quimioterapéuticos anticoccidianos reducen las pérdidas de producción en rumiantes (Agyei, 2003). Sin embargo, ninguno de estos procedimientos es 100% efectivo. El desarrollo y pruebas de vacunas contra *Eimeria* en aves ha demostrado que los procedimientos son caros y en ocasiones no se obtiene una eficacia deseable, ya que implica procesos complejos como la producción y colecta de ooquistes de los animales huéspedes, ensayos para alterar la patogenicidad o infectividad de los esporozoitos contenidos en el ooquiste, determinación y administración de dosis inmunogénicas pero no patogénicas y otros temas logísticos (Svensson *et al.*, 1996). El uso de vacunas para el control de la eimeriosis en bovinos no es significativo actualmente (Jolley y Bardsley, 2006). El manejo adecuado, las decisiones basadas en el conocimiento de la biología básica, epidemiología, diagnóstico y control de la eimeriosis en ovinos podrán incrementar la producción y hacerla más eficiente y redituable.

Justificación

A causa de la aparición de cepas de *Eimeria* resistentes a los fármacos anticoccidianos que se utilizan actualmente, y en vista de la importancia sanitaria y económica de esta enfermedad, es importante probar nuevas preparaciones farmacéuticas a base de agentes con actividad contra protozoarios para valorar su actividad anticoccidiana.

HIPÓTESIS

Eimeria spp., el agente causal de la coccidiosis o eimeriosis ovina, se relaciona filogenéticamente con otros protozoarios, entre ellos, *Babesia* spp, dado que ambos géneros pertenecen al Phylum *Apicomplexa*. Por lo tanto, los compuestos activos que se utilizan contra *Babesia* spp. pueden tener actividad contra *Eimeria* spp. Asimismo, dado que el trimetoprim se utiliza en combinación con sulfonamidas para la prevención de la coccidiosis, puede potencializar la actividad del toltrazuril.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia del tratamiento con toltrazuril solo o en combinación con aceturato de diminaceno o trimetoprim contra *Eimeria* spp. en ovinos infectados naturalmente, con base en parámetros parasitológicos y clínicos,

específicamente consistencia fecal, excreción de ooquistes y ganancia de peso.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar las consistencias fecales y variación en el peso corporal de los animales tratados y testigos.
2. Comparar la excreción de ooquistes de *Eimeria* spp. entre los animales tratados con distintas combinaciones farmacológicas y los testigos no tratados; así como en identificar la frecuencia de especies de *Eimeria* spp. presentes en los ovinos tratados y testigos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales. Se utilizaron 4 grupos (n=6) experimentales y 1 grupo testigo (n=4) de corderos destetados machos y hembras razas pelibuey y Suffolk. Solamente se incluyeron en el estudio animales infectados naturalmente con *Eimeria* sin tratamientos anteriores a base de anticoccidianos, o corticosteroides. Se consideró la inclusión de los ovinos con cargas parasitarias ≥ 500 de ooquistes de *Eimeria* spp. por gramo de heces (opg). Durante el estudio no se utilizaron quimioterapéuticos que pudieron haber interactuado con el tratamiento experimental, *i.e.* sulfonamidas. Los animales se mantuvieron sin aislamiento del resto de los semovientes en las instalaciones del Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (C.E.P.I.P.S.A.) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ/UNAM), ubicado en la Ciudad de México a una altura de 2760 msnm, 19° 13' N, 99° 8' W. A los ovinos se les proporcionó alimento comercial (Purina), así como alfalfa, heno de avena enmelazado y ensilado de maíz. Los animales tuvieron acceso *ad libitum* al agua.

Examen clínico

Se realizó un examen físico y pesaje individual antes de los tratamientos y al finalizar el estudio, el cual tuvo una duración de 45 días.

Examen parasitológico

Se tomaron muestras de material fecal directamente del recto del animal el día 0 y al administrar los tratamientos (día 1). Posteriormente se colectaron las muestras a los 7, 21, 30 y 45 días. El material fecal se transportó al Laboratorio de Investigación del Departamento de Parasitología de la FMVZ/UNAM y las muestras se examinaron inmediatamente utilizando la técnica modificada de McMaster (Taylor *et al.*, 1995). Se registró la consistencia fecal de acuerdo con la siguiente clasificación: 1: firmes, sólidas y formadas; 2: semilíquidas a líquidas; 3: acuosas y 4: hemorrágicas con/sin tejido (Mundt *et al.*, 2005). Los resultados cuantitativos obtenidos se registraron como ooquistes por gramo de heces (opg) y se analizaron en términos de la siguiente clasificación: (0= ooquistes no detectables; $1 \leq 100$ opg; $2 \leq 1000$ opg; $3 \leq 10,000$ opg; $4 \geq 10,000$ opg) (Mundt *et al.*, 2005). Se identificaron las especies de *Eimeria* después de provocar la esporulación *in vitro* en dicromato de potasio al 2% durante 20 días bajo oxigenación constante y controlando la humedad de las muestras (Eckert *et al.*, 1995). Las cuentas de ooquistes se registraron por separado para las especies más patógenas.

Tratamientos

Se dividieron los ovinos al azar en 4 grupos experimentales (n=6) y un grupo testigo (n=4) en el que 2 corderos murieron por causas distintas a coccidiosis. Los animales fueron alojados, alimentados y manejados en condiciones similares. El grupo denominado con la literal A fue tratado *per os* con una combinación de activos a base de toltrazuril (20 mg/kg), aceturato de

diminaceno (3.5 mg/kg) y trimetoprim (5 mg/kg). Al grupo B se le administró *per os* una combinación de toltrazuril (20 mg/kg) con trimetoprim (5 mg/kg). Los ovinos del grupo C fueron tratados *per os* con toltrazuril (20 mg/kg) combinado con aceturato de diminaceno (3.5 mg/kg). Al grupo D se le administraron *per os* 20 mg/kg de toltrazuril comercial (Baycox[®], Bayer). El grupo "Test" fungió como el testigo no tratado, y se le administró un placebo por vía oral.

Análisis estadístico

Las variables se estratificaron por grupo de tratamiento y fueron comparadas descriptivamente. Para las variables continuas se calcularon las siguientes estadísticas descriptivas: media, desviación estándar, mediana, mínimo, máximo, percentil 25% y percentil 75%. El resto de las variables se estudiaron utilizando un análisis de varianza. Se aplicó la prueba de Spearman para determinar la correlación entre la excreción de ooquistes y la consistencia fecal. En todos los casos se usó un nivel de significancia nominal del 5%.

RESULTADOS

Consistencia fecal y excreción de ooquistes

La Figura 3 muestra que en todos los grupos de ovinos tratados, la excreción de ooquistes disminuyó significativamente ($P \leq 0.05$) con relación al grupo testigo y al día 0, antes de la administración de los tratamientos. La eficacia anticoccidiana de cada tratamiento fue: 96% (toltrazuril + aceturato de diminaceno + trimetoprim); 98% (toltrazuril + trimetoprim); 99% (toltrazuril + aceturato de diminaceno) y 99% (toltrazuril comercial). No existió diferencia estadísticamente significativa entre los 4 grupos tratados con respecto a la media de ooquistes excretados el día 45. La Figura 4 muestra la excreción media de ooquistes en cada ovino del grupo A después del tratamiento con toltrazuril + trimetoprim + aceturato de diminaceno. Un ovino de este grupo experimental presentó un aumento significativo ($P \leq 0.05$) en los opg excretados el día 21, pero este valor disminuyó 14 días después. La Figura 5 ilustra la excreción media de opg en cada ovino del grupo B después del tratamiento con toltrazuril + trimetoprim. En la Figura 6 se observa la cinética de eliminación de opg en los ovinos del grupo C, tratados con toltrazuril + aceturato de diminaceno. De manera interesante, se notó un incremento significativo ($P \leq 0.05$) en la excreción de ooquistes a los 7 días después de iniciar el experimento en un ovino de este grupo. La Figura 7 permite observar la eliminación de opg en los ovinos tratados con Baycox[®], en los que 2 de ellos mostraron un pico en la excreción de ooquistes en heces. El pico disminuyó significativamente ($P \leq 0.05$) 14 días después en uno de estos animales. En el otro ovino de este grupo experimental tratado con Baycox[®], la reducción de opg se registró 5 semanas después. El análisis en términos de la clasificación

asignada a los opg cuantificados demostró que en todos los grupos tratados existió una reducción en el número de opg. En contraste, en el grupo testigo esta clasificación permitió detectar un aumento significativo ($P \leq 0.05$) en la cantidad de opg excretados.

Con respecto a la valoración de la consistencia fecal, la Figura 8 muestra que se observó una consistencia más sólida de las heces 45 días después del tratamiento en los 4 grupos experimentales, mientras que en el grupo testigo la consistencia fecal se mantuvo igual o empeoró. El análisis cuantitativo permitió demostrar que las tasas de excreción de ooquistes se correlacionaron significativamente con la consistencia fecal.

Ganancia de peso

La Figura 9 ilustra la diferencia significativa ($P \leq 0.05$) que se presentó en la ganancia de peso de los ovinos tratados. La gdp promedio en los 45 días del estudio en los 5 grupos fue de: 0.150 kg (A), 0.150 kg (B), 0.170 kg (C); 0.150 kg (D) y 0.08 kg (testigos).

Especies identificadas

Después de mezclar las muestras fecales individuales con dicromato de potasio al 2% en un matraz con constante oxigenación y humedad durante 20 días, se observó que *E. ovinoidalis*, *E. ovina* y *E. parva* fueron las especies más frecuentemente excretadas en los animales testigos y tratados (Figura 10).

DISCUSIÓN

En este estudio se observó que los ovinos presentaron una infección natural a causa de *Eimeria*, principalmente de las especies *E. ovinoidalis*, *E. ovina* y *E. parva*. Cabe señalar que estas 2 especies han sido documentadas como las más patógenas en ovinos (Mehlhorn, 2004). Estos resultados coinciden con el diagnóstico realizado por Lima *et al.* (1995) en ovinos ubicados en las instalaciones del C.E.P.I.P.S.A; y no se encontraron todas las especies descritas en explotaciones cercanas a este centro de producción (González Mora *et al.*, 1990). Los resultados del presente estudio demostraron que la especie más prevalente en los ovinos muestreados en el C.E.P.I.P.S.A fue *E. ovinoidalis*, lo cual está en concordancia con los hallazgos publicados por Yvoré *et al.* (1992) y Gauly *et al.* (2001), ya que estos autores la refieren como una de las especies más frecuentemente encontrada en rebaños ovinos.

Con respecto a la tasa de excreción, se observó que en un ovino del grupo A existió un incremento significativo entre el día 7 y 21, en uno del grupo C ocurrió lo mismo entre el día 1 y 7 e interesantemente 2 ovinos tratados con Baycox® tuvieron incrementos significativos antes de 24 horas y entre el primer y séptimo día post-tratamiento, respectivamente. Este aumento en la presencia de ooquistes en heces y en general la diferencia entre los perfiles de excreción que se presentaron en todos los animales tratados a lo largo del estudio son hallazgos que coinciden con resultados publicados previamente (Gregory e Yvoré, 1989; Hindson y Winter, 2002). Estos autores consideraron que las condiciones estresantes relacionadas con el destete y cambio de alojamiento pueden influir sobre el aumento en la infección de los corderos, sobre todo en el caso de animales que son cambiados a corrales sin limpieza adecuada y por

lo tanto, se exponen a heces de adultos con infecciones subclínicas y altas prevalencias. Sin embargo, en el presente estudio, los corrales de los corderos destetados fueron limpiados y desinfectados antes de la introducción de los ovinos. Por otro lado, los autores referidos realizaron el estudio en un centro de producción en el que destetan a los corderos a los 8 días de edad, mientras que en el C.E.P.I.P.S.A. el destete se lleva a cabo después de los 2 meses aproximadamente.

Por consiguiente, se especula que los picos que se presentaron en el presente estudio en los ovinos tratados se debieron posiblemente a la exposición con material fecal de los animales testigos y con los que no fueron tratados y estaban alojados en los mismos corrales; por lo tanto se produjo una reinfección. Por otro lado, debido a que este experimento se realizó bajo un esquema de infección natural, no era posible determinar el estadio del ciclo de vida de las coccidias y posiblemente el tratamiento fue administrado al momento en que los estadios de coccidias se encontraban fuera de las células del huésped y por consiguiente fueron refractarios a los quimioterapéuticos. Adicionalmente, los ooquistes recién formados son impermeables a los fármacos y por lo tanto se detectó un aumento en su excreción en heces. Esta propuesta se refuerza si se consideran los estudios realizados por Alzieu *et al.* (1999) y Maes *et al.* (1997), quienes demostraron que la reabsorción de un activo análogo al toltrazuril, el diclazuril, es baja en corderos, ya que se excreta por las heces y disminuye al aumentar la edad. Es importante señalar que la eficacia del toltrazuril sobre los esquizontes de última generación y gamontes es pobre debido a que se llegan a encontrar cantidades numerosas de estos estadios los días 6 y 7 después de la infección (Reynaud *et al.*, 1999). Por lo

tanto, es razonable sugerir que un tratamiento administrado durante las fases extracelulares de los parásitos resultará inefectivo para evitar la excreción de ooquistes. Sin embargo, después de algunos días de administrar el tratamiento sobrevendrá una reducción en la producción de ooquistes porque la actividad del toltrazuril sobre los merontes de primera generación es excelente y eso reduce la producción de ooquistes. Otra posible explicación de la disminución en la excreción de ooquistes después de la presentación de picos podría fundamentarse en el desarrollo de inmunidad contra el protozoario (Catchpole *et al.*, 1993).

Las prevalencias e intensidades de las especies patógenas (*E. ovinoidalis* y *E. ovina*) fueron paralelas a los patrones totales de excreción y la frecuencia de su presentación se redujo en los grupos tratados. Es decir, la excreción de las especies más patógenas disminuyó significativamente después del tratamiento en comparación con los valores pre-tratamiento y testigos.

Aunque existió ausencia de signos clínicos de coccidiosis severa en el grupo testigo, se presentó una menor ganancia de peso en comparación con los ovinos tratados, resultados que contrastan con los hallazgos publicados por Alzieu *et al.* (1999), autores que atribuyen la escasa ganancia de peso en los animales tratados al hecho de administrar el fármaco durante la gametogonia tardía, ya que como se había mencionado anteriormente, los ooquistes son impermeables al toltrazuril.

A pesar de que los 4 grupos de animales tratados excretaron menos ooquistes que los testigos y tuvieron una eficacia anticoccidiana superior al 95%, el grupo A (combinación farmacológica de toltrazuril con trimetoprim y aceturato de diminaceno) resultó ser menos eficaz con respecto a la clasificación

cuantitativa de la excreción fecal de ooquistes (1-4) en comparación con los grupos B (toltrazuril + trimetoprim), C (toltrazuril + aceturato de diminaceno) y D (toltrazuril comercial), aunque no existió diferencia estadísticamente significativa con respecto a la media de ooquistes excretados entre los 4 grupos tratados.

La presentación de resistencia contra el toltrazuril (Suo *et al.*, 2006) ha estimulado la búsqueda de posibles blancos farmacológicos para el diseño de nuevos agentes quimioterapéuticos con actividad coccidiostática o coccidicida. Sin embargo, las pruebas necesarias para lograr el registro y comercialización de un nuevo activo farmacológico llegan a tardar varios años, ya que se requiere de estudios numerosos para poder registrarlo. En el presente estudio se probaron 3 preparados farmacéuticos a base de activos disponibles actualmente en el mercado y aprobados para su uso como antiprotozoarios, ya que sustentan su eficacia en pruebas *in vitro* e *in vivo* (Coombs y Müller, 2002). Se ha comprobado que el toltrazuril y trimetoprim, fármacos probados en este estudio, tienen actividad contra *Eimeria* spp. El trimetoprim se ha probado combinado con sulfas (Sumano y Ocampo, 2006) y se ha documentado previamente la eficacia del toltrazuril (Ramisz, 1999; Coombs y Müller, 2002). Sin embargo, hasta donde tenemos conocimiento, no existe evidencia del uso del aceturato de diminaceno, ni del trimetoprim en combinación con toltrazuril con o sin aceturato de diminaceno como fármacos anti-*Eimeria* spp. El trimetoprim demostró una actividad anticoccidiana eficaz (98%) al combinarse con toltrazuril, pero inferior a la del Baycox® (99%). No obstante, la eficacia del trimetoprim + toltrazuril fue superior a la obtenida con la combinación de trimetoprim + toltrazuril + aceturato de diminaceno (96%). El hecho de que la

combinación de trimetoprim + toltrazuril + aceturato de diminaceno produjo la menor eficacia permite especular que posiblemente existió una actividad antagonista parcial. Para poder responder esta interrogante se sugiere realizar estudios posteriores basados en pruebas de afinidad por receptores a través de estudios de acoplamiento molecular (“AutoDock”) *in silico* para descartar esta suposición. En contraste, la combinación del toltrazuril + aceturato de diminaceno tuvo la misma eficacia del Baycox® (99%); pero con una ganancia de peso y reducción de opg aparentemente mayores; aunque no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la excreción de opg y gdp entre el toltrazuril + aceturato de diminaceno y el Baycox®.

El aceturato de diminaceno se ha utilizado como un producto con excelente actividad anti-*Babesia*. Por lo tanto, se sugiere llevar a cabo estudios posteriores para evaluar si esta combinación ejerce un efecto detrimental sobre este piroplásmido, lo cual permitiría contar con un quimioterapéutico de mayor espectro. La eficacia anti-*Eimeria* de la combinación toltrazuril + aceturato de diminaceno (99%) se debió posiblemente a la relación genética que existe entre *Eimeria* y *Babesia*; pues ambos protozoarios pertenecen al Phylum *Apicomplexa*, es decir, poseen un complejo apical típico y un “apicoplasto” que se originó por el englobamiento de un organismo del linaje de las algas rojas (Foth y McFadden, 2003). Sería interesante realizar estudios futuros para determinar si la combinación del aceturato de diminaceno con toltrazuril tiene actividad sobre el apicoplasto.

La evidencia ofrecida en este estudio permite concluir que el tratamiento de la coccidiosis ovina es complicado, debido a que los signos de la enfermedad no son notables hasta que la infección es avanzada. Los primeros signos de

coccidiosis provocada por *E. ovinoidalis*, por ejemplo, se presentan alrededor de 20 días después de la ingestión de los ooquistes. En este periodo, la fase del ciclo biológico en el huésped ya ha sido completado y ya se ha producido la mayor parte de la invasión de la mucosa intestinal. Por lo tanto, el tratamiento administrado durante este periodo puede cuando mucho disminuir los signos clínicos de coccidiosis. No obstante, si se administra el tratamiento oportunamente, los signos clínicos de la infección pueden prevenirse en gran proporción o incluso por completo. Tanto los productores como los Médicos Veterinarios deben tener en cuenta que el tiempo que transcurre entre la ingestión de ooquistes infecciosos y su eliminación con las heces es en promedio de 3 semanas; por lo que se sugiere medicar a las ovejas gestantes 21 días antes de la fecha probable de parto, o en su defecto, tratar a los corderos con dos dosis consecutivas entre los días 10 y 14 de vida.

El toltrazuril ha demostrado ser uno de los mejores productos antiprotozoarios disponibles actualmente en la industria farmacéutica veterinaria (Mundt *et al.*, 2005). Sin embargo, debe considerarse en primer lugar que el toltrazuril comercialmente disponible generalmente es de procedencia extranjera, lo que aumenta su costo. En el presente estudio se sugiere el uso de un producto de desarrollo nacional. Por otro lado, Mehlhorn *et al.* (2004) han documentado que las combinaciones de fármacos minimizan la presentación de resistencia química, como el caso del metilbenzocato + metilclorpidol (Lerbek®, Rhône Merieux), o para extender el espectro de actividad contra especies más patógenas de *Eimeria*; aunque estos estudios solamente se han realizado para el tratamiento de la coccidiosis aviar, mediante la adición de etopabato y arsenicales orgánicos a la combinación de amprolio y dinitolmida para incluir en

el espectro de acción a las especies del tracto intestinal superior; ya que originalmente el tratamiento actuaba solamente contra *E. maxima*, *E. acervulina*, y *E. mitis* (Ernkik y Bedrnik, 2001). Existen publicaciones en la literatura clínica que proporcionan evidencia sobre la eficacia de administrar fármacos registrados con otros usos para el tratamiento de parasitosis. Por ejemplo, el alopurinol se utilizaba originalmente para tratar la gota y el ketoconazol como un quimioterapéutico antifungal. Sin embargo, se demostró la eficacia del alopurinol contra la leishmaniasis, especialmente si se utilizaba adjunto a otros agentes antileishmaniales. El ketoconazol se ha probado contra tripanosomiasis con buenos resultados. Por otro lado, la azitromicina, un antibacteriano, ha tenido resultados promisorios contra la toxoplasmosis *in vivo* (Vivas *et al.*, 2007). Por lo tanto, se sugiere realizar más estudios con las combinaciones de activos probadas en el presente estudio para evaluar su eficacia contra otros parásitos, así como valorar su actividad en otros huéspedes de *Eimeria* como las aves y bovinos, en los que el impacto sanitario y económico también es considerable.

CONCLUSIONES

La coccidiosis o eimeriosis ovina provoca pérdidas en la producción debido a que las infecciones subclínicas a menudo no son diagnosticadas con oportunidad y ello repercute en la disminución de la ganancia de peso y en la presentación de enfermedades oportunistas que incluso llegan a causar la muerte de los ovinos. Esta enfermedad se controla mediante el uso de productos quimioterapéuticos los cuales son costosos y cada vez menos eficaces en virtud del uso indiscriminado y equívoco que se hace de ellos, generando como consecuencia serios problemas de resistencia que disminuyen aún más su eficiencia. Los parásitos del Phylum *Apicomplexa* que incluye a las coccidias parecen ofrecer muchas posibilidades para el ataque selectivo que no llegue a afectar a sus huéspedes. El número de blancos farmacológicos incrementará considerablemente sin duda a medida que los proyectos de secuenciación genómica progresan. Desafortunadamente, este proceso puede ser largo y costoso, especialmente cuando no es tan sencillo lograr deleciones genéticas. En este estudio se presentó una alternativa para el tratamiento de la coccidiosis ovina mediante el uso de combinaciones de fármacos con actividad contra protozoarios, pero que no habían sido utilizados en una sola formulación farmacéutica contra *Eimeria* spp. en ovinos. Los resultados obtenidos permiten concluir que se obtuvo una eficacia alta ($\geq 96\%$) en los grupos tratados, por lo que se sugiere probarlos en otras especies animales susceptibles a coccidiosis y probar su actividad contra más especies de coccidias, principalmente evaluar su actividad contra las más patógenas de

aves, bovinos, caprinos y conejos. Además sería deseable conocer si las combinaciones con aceturato de diminaceno tienen actividad contra otros protozoarios. El uso racional de agentes quimioterapéuticos para prevenir y controlar la coccidiosis ovina, junto con la aplicación apropiada de medidas de bioseguridad en las producciones ovinas, permitirán disminuir la prevalencia de esta enfermedad en áreas endémicas y por lo tanto, reducir los gastos directos que genera su tratamiento o indirectos a causa de disminución en la producción.

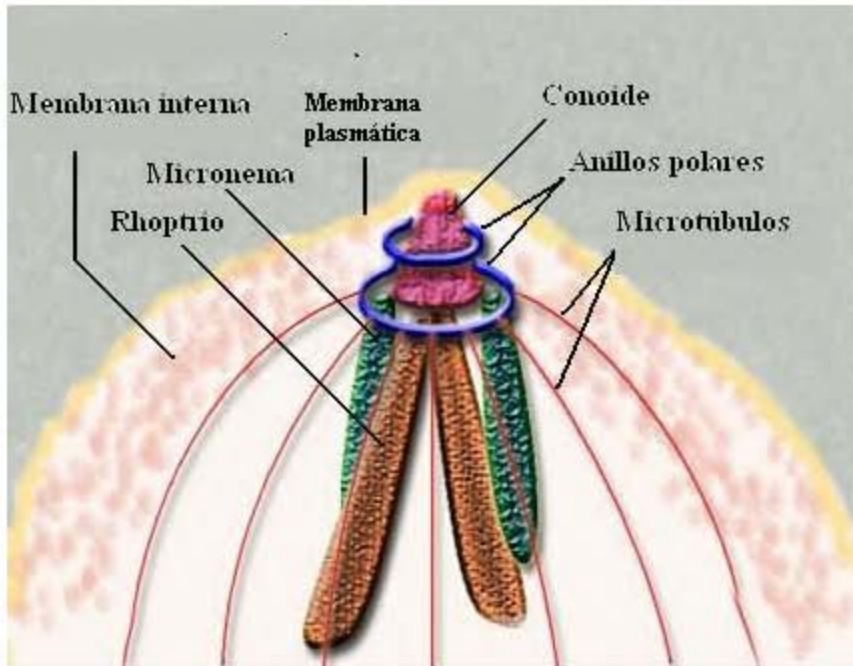


Figura 1. Estructura del complejo apical de los organismos del *Phylum Apicomplexa*.

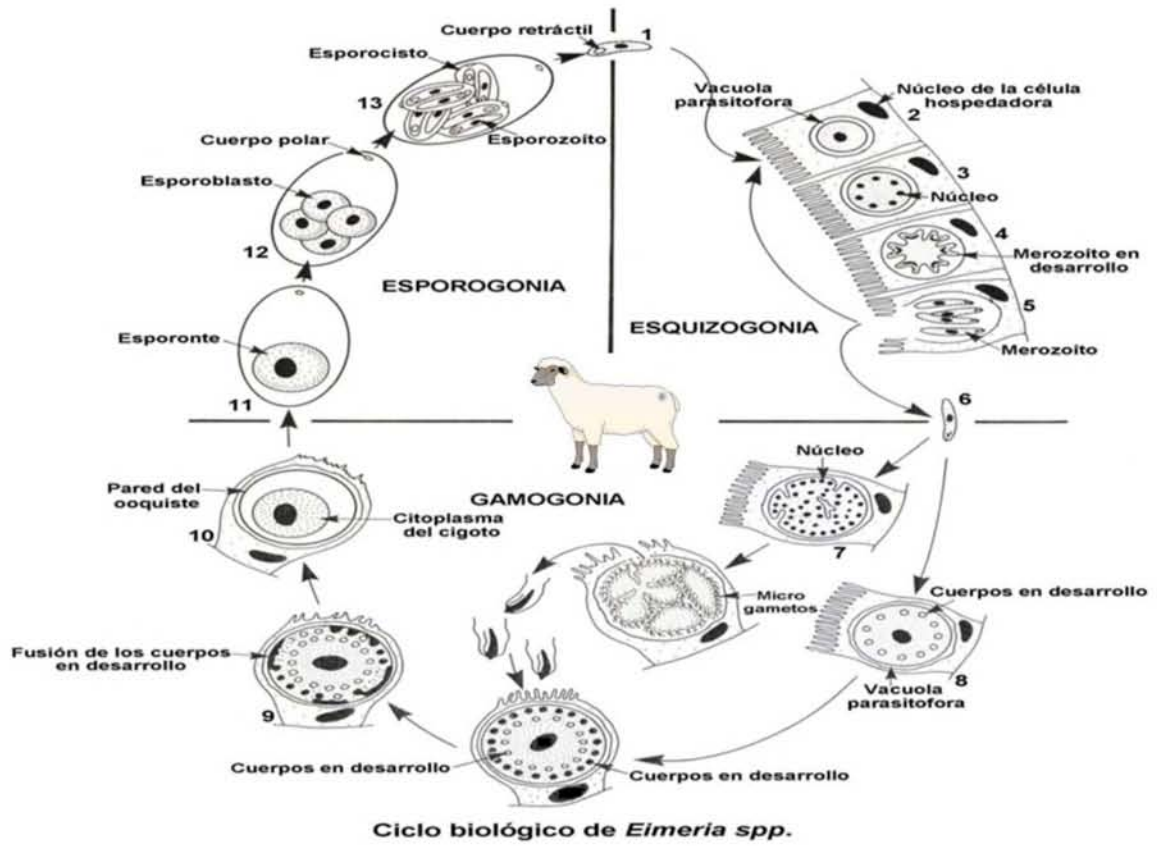


Figura 2. Ciclo biológico de *Eimeria* spp.

Figura 3

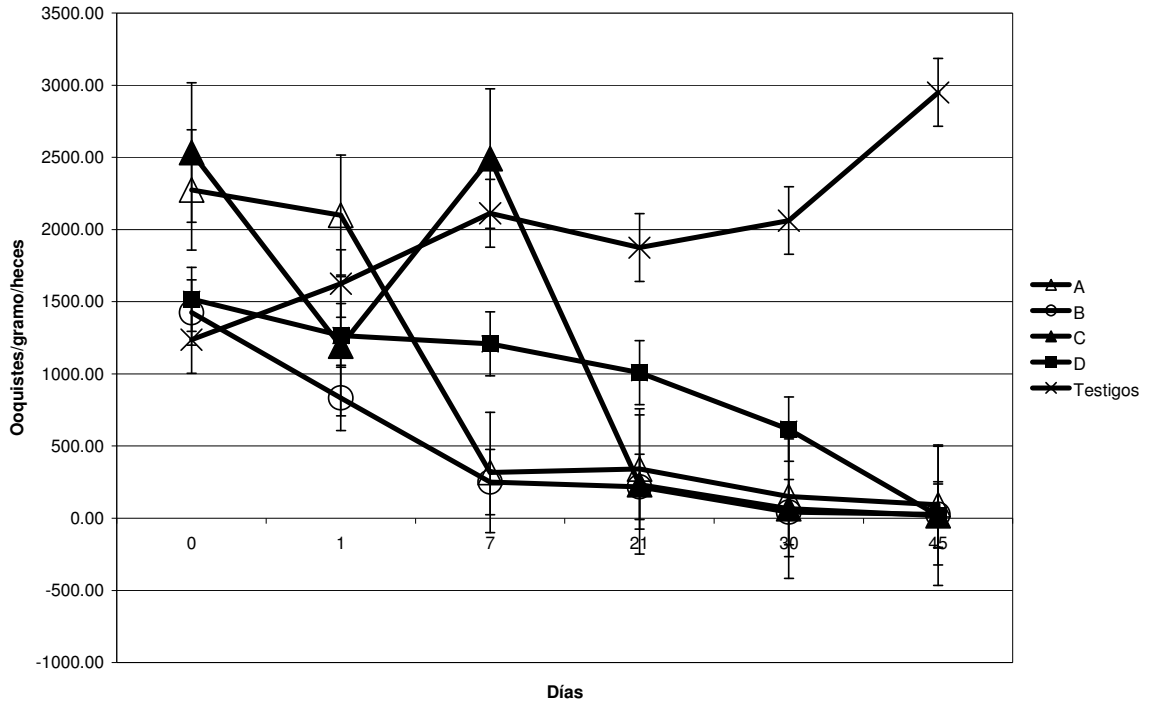


Figura 3. Excreción media de ooquistes por gramo de heces en los grupos tratados con: A. toltrazuril + aceturato de diminaceno + trimetoprim; B. toltrazuril + trimetoprim; C. toltrazuril + aceturato de diminaceno; D. toltrazuril comercial (Baycox[®]) y testigos sin tratamiento. Eje X: 1: Días post-tratamiento. Eje Y: Excreción de ooquistes por gramo de heces.

Figura 4

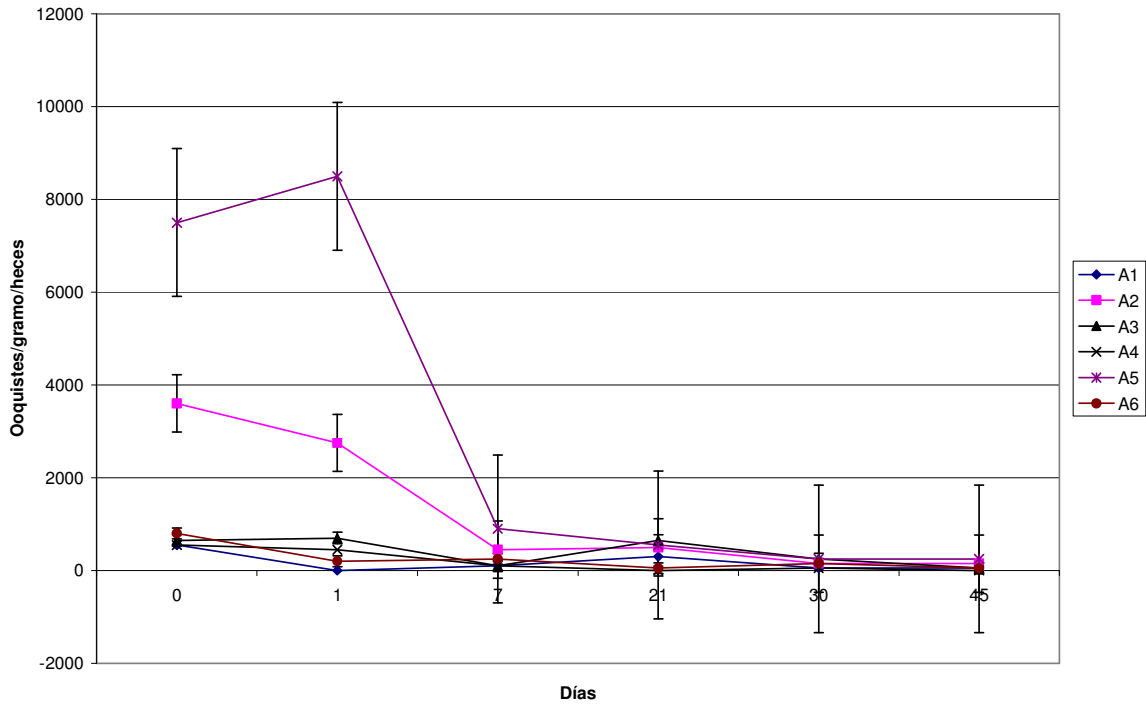


Figura 4. Excreción media de ooquistes por gramo de heces en los 6 ovinos (A1-A6) del grupo A tratados con toltrazuril + trimetoprim + aceturato de diminaceno.

Figura 5

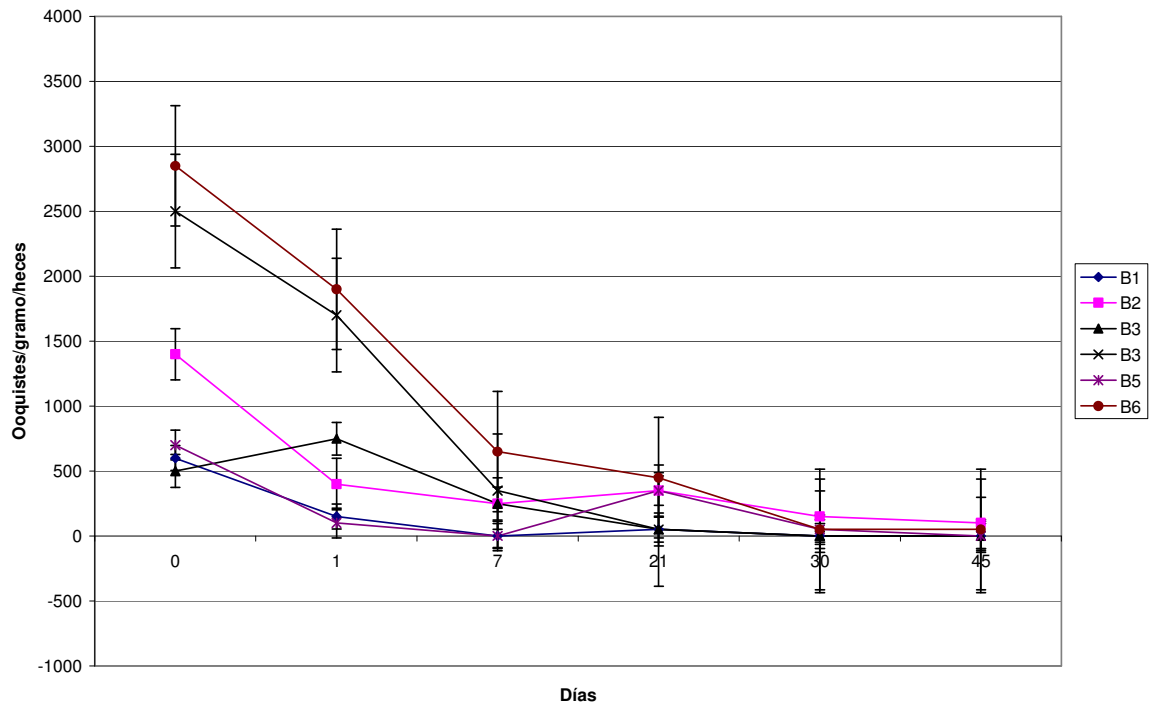


Figura 5. Excreción media de oocistes por gramo de heces en los 6 ovinos (B1-B6) del grupo B tratados con toltrazuril + trimetoprim.

Figura 6

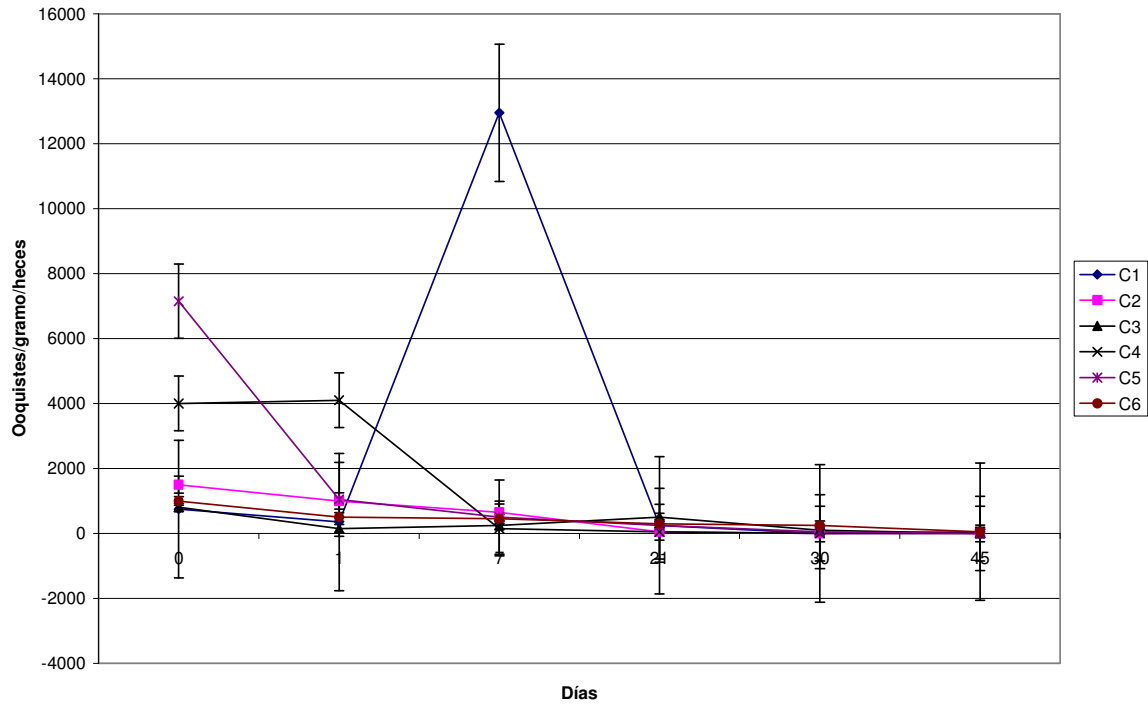


Figura 6. Excreción media de ooquistes por gramo de heces en los 6 ovinos (C1-C6) del grupo C tratados con toltrazuril + aceturato de diminaceno.

Figura 7

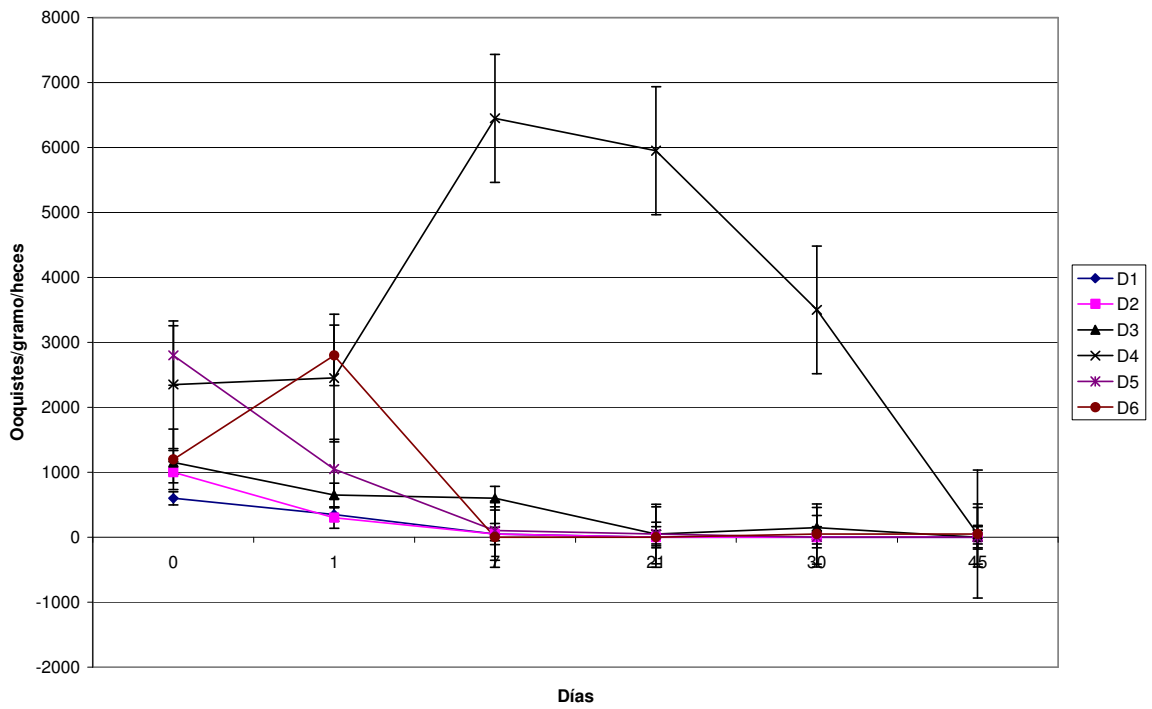


Figura 7. Excreción media de ooquistes por gramo de heces en los 6 ovinos (D1-D6) del grupo D tratados con Baycox®.

Figura 8A

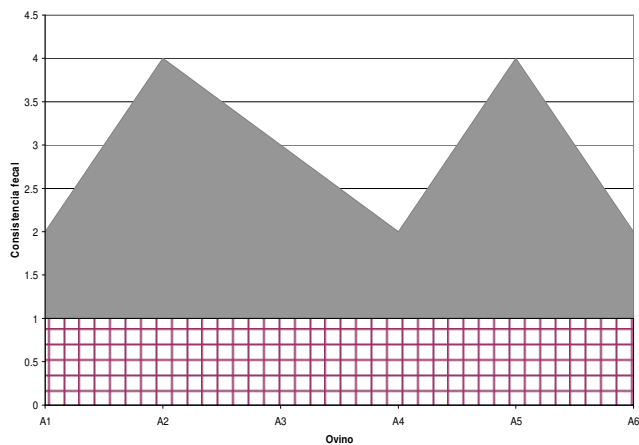


Figura 8B

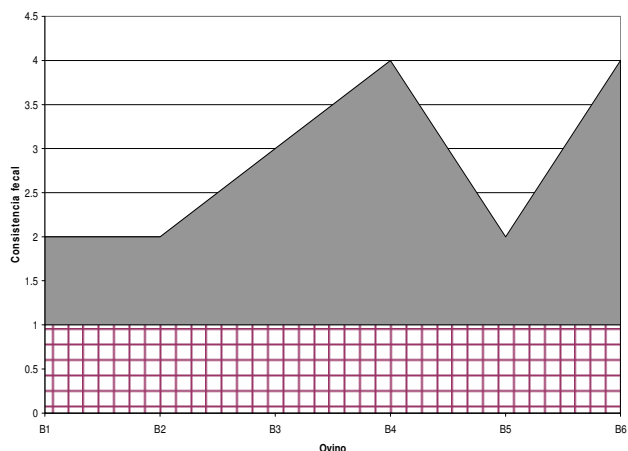


Figura 8C

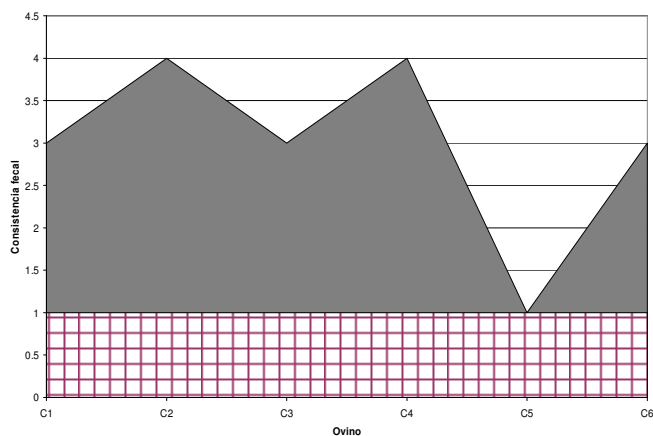


Figura 8D

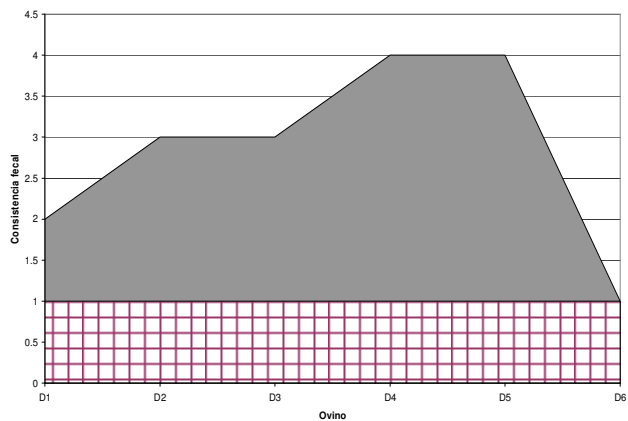


Figura 8Test

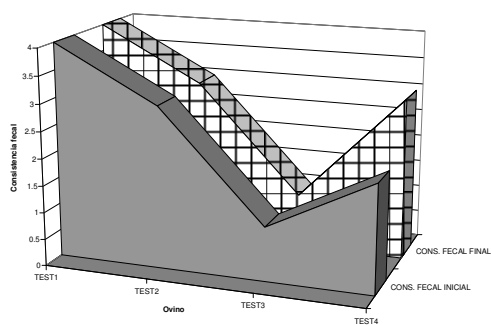


Figura 8. Frecuencias de las consistencias fecales (Consistencia 1: firmes, sólidas y formadas; Consistencia 2: semilíquidas a líquidas; Consistencia 3: acuosas y Consistencia 4: hemorrágicas con/sin tejido) de ovinos de los grupos tratados con: (8A) toltrazuril + trimetoprim + aceturato de diminaceno; (8B) toltrazuril + trimetoprim; (8C) toltrazuril + aceturato de diminaceno; (8D) Baycox® y (8Test) testigos sin tratamiento. La serie gris ilustra la consistencia inicial y la serie a cuadros la consistencia final.

Figura 9

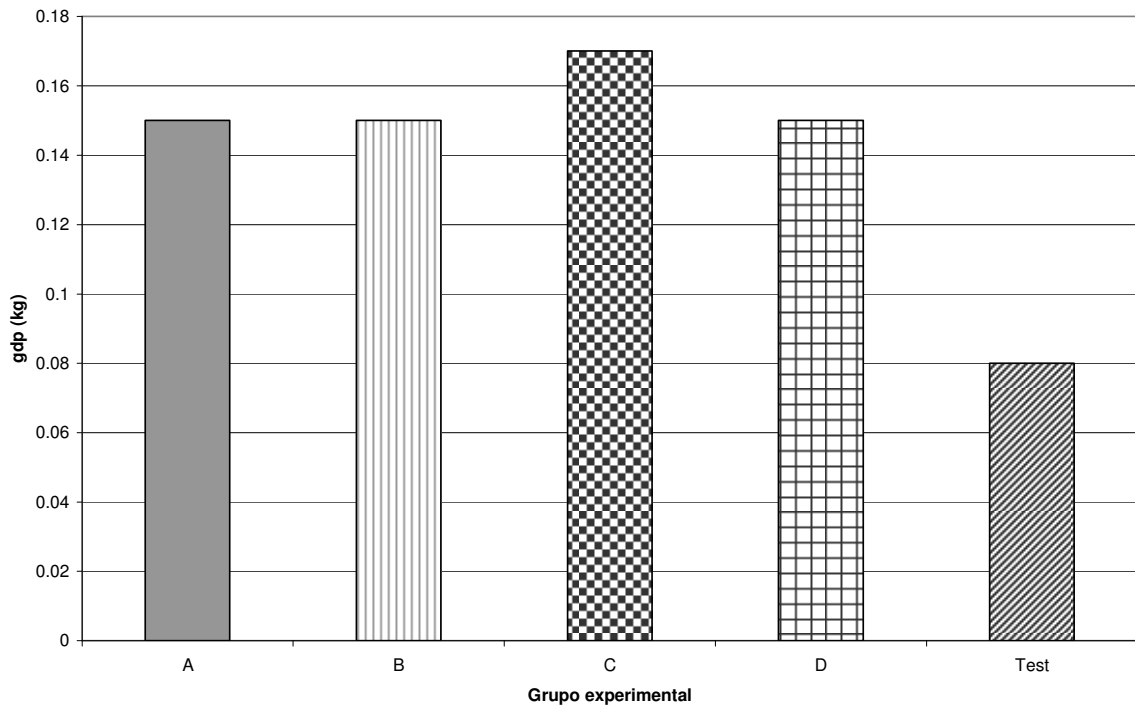


Figura 9. Ganancia diaria de peso (gdp) media en los grupos tratados con: A. toltrazuril + aceturato de diminaceno + trimetoprim; B. toltrazuril + trimetoprim; C. toltrazuril + aceturato de diminaceno; D. Baycox® y testigos sin tratamiento.

Figura 10

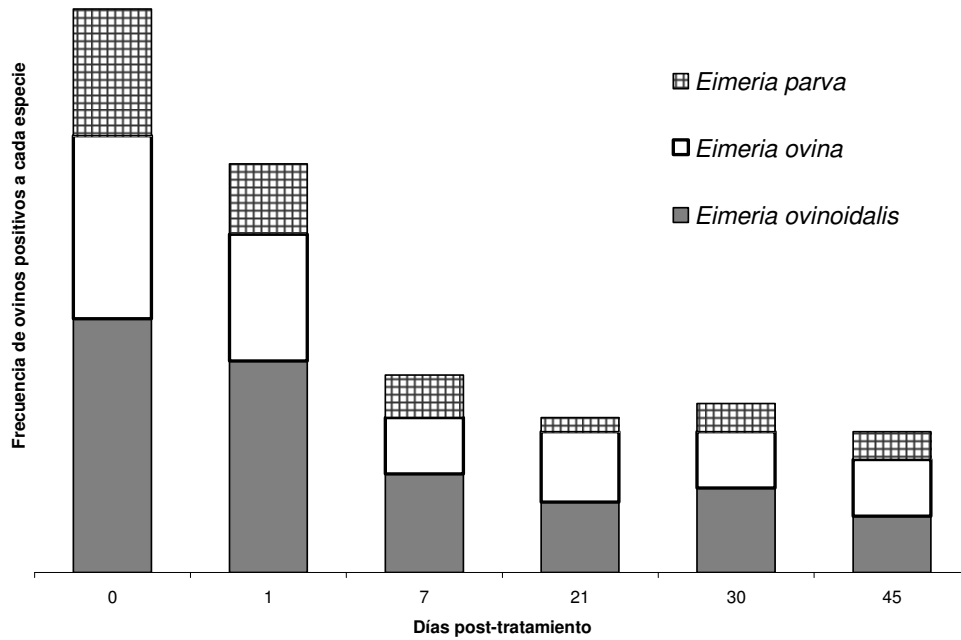


Figura 10. Frecuencia de ovinos (n=28) positivos a *Eimeria parva*, *E. ovina* y *E. ovinoidalis* durante el periodo de estudio.

Cuadro 1

ANTICOCCIDIANOS UTILIZADOS EN RUMIANTES

Quimioterapéutico	Uso	Especie animal*	Dosis (mg/kg)
Amprolio	Coccidicida	B	10 mg/kg/día/5 días
		O	50 mg/kg/día/5 días
		C	100 mg/kg/día/5 días
	Coccidiostato	B, O, C	5-10 mg/kg/día/21 días
Sulfonamidas			
Sulfametazina	Coccidicida	B, O, C	50-100 mg/kg/día/4 días
Sulfaquinoxalina	Coccidicida	B, O, C	15 mg/kg/día/4 días <i>per os</i>
Sulfaguanidina	Coccidiostato	B, O, C	0.5-3 g/animal/día/20 días
Ionóforos			
Monensina	Coccidiostato	B, O, C	1 mg/kg/30 días
Lasalocid	Coccidiostato	B, O, C	0.5-1 mg/kg/día/hasta 6 semanas
Otros compuestos			
Decoquinato	Coccidiostato	B, O, C	0.5 mg/kg en alimento por al menos 28 días
Diclazuril	Coccidicida	B, O, C	20 mg/kg <i>per os</i>
Toltrazuril	Coccidicida	B, O, C	20 mg/kg tratamiento único

*B (Bovino), O (Ovino), C (Caprino)

REFERENCIAS

1. Jolley WR, Bardsley KD. Ruminant coccidiosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2006;22:613-21.
2. Taylor MA, Catchpole J. Coccidiosis of domestic ruminants. *Appl Parasitol* 1994;35:73-86.
3. Kauffman J. Parasitic infections of domestic animals. A Diagnostic Manual. Birkhäuser Boston, 1996.
4. Long PL. Coccidiosis of man and domestic animals. CRC Press. Boca Raton, FLA, 1990.
5. Taylor MA. Diagnosis and control of coccidiosis in sheep. *In Practice* 1995;17:172-177.
6. Mehlhorn H. Encyclopedic reference of parasitology. Second edition. Springer-Verlag Heidelberg. Düsseldorf, 2004.
7. Levine ND. Veterinary protozoology. Ames (IA): Iowa State University Press; 1985.
8. Urquhart M, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, and Jennings F W. Veterinary Parasitology. Second Edition. Blackwell Publishing. Ames, Iowa, 1996.
9. Mehlhorn H., Piekarski G. Fundamentos de Parasitología: Parásitos del hombre y de los animales domésticos. Acribia S.A. España, 1993.
10. Eckert, J., Taylor, M., Catchpole, J., Licois, D., Coudert, P., Bucklar, H., 1995. Morphological characteristics of oocysts, in: European Cooperation in the field of Scientific and Technical Research (COST). European Commission, Luxembourg, Report 89/820: Biotechnology—Guidelines on techniques in coccidiosis research, pp. 103–119.
11. Dougschies A, Najdrowski M. Eimeriosis in cattle: current understanding. *Journal of Veterinary Medicine* 2005;52:417–27.
12. Smyth JD. Introduction to animal parasitology. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.
13. Reeg KJ, Gauly M, Bauer C. Coccidial infections in housed lambs: oocyst excretion, antibody levels and genetic influences on the infection. *Vet Parasitol* 2005;127:209–19.
14. Mundt HC, Bangoura B, Rinke M, Rosenbruch M, Daugschies A. Pathology and treatment of *Eimeria zuernii* coccidiosis in calves: investigations in an infection model. *Parasitol Int* 2005;54:223-230.

15. Lucas AS, Swecker WS, Lindsay DS, Scaglia G, Elvinger FC, Zajac AM. The effect of weaning method on coccidial infections in beef calves. *Vet Parasitol* 2007;145:228-233.
16. Craig BH, Pilkington JG, Kruuk LE, Pemberton JM. Epidemiology of parasitic protozoan infections in Soay sheep (*Ovis aries* L.) on St Kilda. *Parasitology* 2007;134:9-21.
17. Beldomenico PM, Uhart M, Bono MF, Marull C, Baldi R, Peralta JL. Internal parasites of free-ranging guanacos from Patagonia. *Vet Parasitol* 2003;118:71-77.
18. Allen PC. Anticoccidial effects of xanthohumol. *Avian Dis.* 2007;51:21-26.
19. Tórtora J. Memorias del Segundo Seminario Sobre Producción Intensiva de Ovinos. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tab. 2003
20. Catchpole J, Gregory MW. Pathogenicity of the coccidium *Eimeria crandallis* in laboratory lambs. *Parasitology.* 1985;91 (Pt 1):45-52.
21. Gregory MW, Catchpole J, Nolan A, Hebert CN. Ovine coccidiosis: studies on the pathogenicity of *Eimeria ovinoidalis* and *E. crandallis* in conventionally-reared lambs, including possible effects of passive immunity. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1989;96:287-292.
22. Berriatua E, Gibson WC, Morgan KL. Development of DNA probes for the ovine *Eimeria* species *E. crandallis* and *E. ovinoidalis*. *Parasitol Res* 1995;81:222-229.
23. Gregory MW, Catchpole J. Ovine coccidiosis: heavy infection in young lambs increases resistance without causing disease. *Vet Rec* 1989;124:458-461.
24. da Silva NR, Miller JE. Survey of *Eimeria* spp. oocysts in feces from Louisiana State University ewes. *Vet Parasitol* 1991;40:147-150.
25. Food and Drug Administration Home Page. [http:// www.fda.gov](http://www.fda.gov)
26. Sumano HS y Ocampo L. *Farmacología Veterinaria*. 3ª. Edición. McGraw-Hill (2006) c.680 pp.
27. Wang CC. Validating targets for antiparasitic chemotherapy. *Parasitology* 1997;114:31-44.
28. Croft SL. The current status of antiparasitic chemotherapy. *Parasitology* 1997;114:3-15.

29. Stephan B, Rommel M, Dauschies A, ad Haberkorn A. Studies of resistance to anticoccidials in *Eimeria* field isolates and pure *Eimeria* strains. *Vet Parasitol* 1997;69:19–29.
30. Dauschies A, Agneessens J, Goossens L, Mengel H, Veys P. The effect of a metaphylactic treatment with diclazuril (Vecoxan) on the oocysts excretion and growth performance of calves exposed to a natural *Eimeria* infection. *Vet Parasitol* 2007 doi:10.1016/j.vetpar.2007.08.003
31. Mehlhorn H, Schmahl G, Haberkorn A. Toltrazuril effective against a broad spectrum of protozoan parasites. *Parasitol Res* 1988;75:64-66.
32. Alzieu JP, Mage C, Maes L, de Muelenaere C. Economic benefits of prophylaxis with diclazuril against subclinical coccidiosis in lambs reared indoors. *Vet Rec* 1999;144:442-444.
33. Gjerde B, Helle O. Chemoprophylaxis of coccidiosis in lambs with a single oral dose of toltrazuril. *Vet Parasitol* 1991;38:97-107.
34. Platzer B, Prosl H, Cieslicki M, Joachim A. Epidemiology of *Eimeria* infections in an Austrian milking sheep flock and control with diclazuril. *Vet Parasitol* 2005;129:1-129.
35. Stafford KJ, Weste DM, Vermunt JJ, Pomroy W, Adlington BA, Calder SM. The effect of repeated doses of toltrazuril on coccidial oocysts output and weight gain in suckling lambs. *New Zeal Vet J* 1994;4:117-119.
36. Thienpont D, Rochette F, Vanparijs OFJ. Diagnose von Helminthosen durch koproskopische Untersuchung. Beerse' Janssen Pharmaceutica; 1990.
37. Gaulty M, Krauthahn C, Bauer C, Erhardt G. Pattern of *Eimeria* oocyst output and repeatability in naturally infected suckling Rhon lambs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2001;48(9):665-673.
38. Gregory MW, Catchpole J, Joyner LP, Parker BN. Observations on the epidemiology of coccidial infections in sheep under varying conditions of intensive husbandry including chemoprophylaxis with monensin. *Parasitology*. 1983;87 (Pt 3):421-427.
39. Amarante AF, Barbosa MA. Species of coccidia occurring in lambs in Sao Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol* 1992;41(3-4):189-193.
40. Catchpole J, Norton CC, Gregory MW. Immunisation of lambs against coccidiosis. *Vet Rec* 1993;132(3):56-59.
41. Svensson C, Olofsson H, Ugglå A. Immunisation of calves against *Eimeria alabamensis* coccidiosis. *Appl Parasitol*. 1996;37(3):209-216.

42. Chartier C, Yvore P, Pors I, Mancassola R. Absence of protection against *Eimeria ninakohlyakimovae* after primo-infection with *E ovinoidalis* in new-born kids. *Vet Res.* 1994;25(1):66-70.
43. Yvoré P, Cabaret J, Solon S. Repeatability of ovine faecal oocyst counts in natural infections with *Eimeria* spp. *Int J Parasitol* 1992;22:515-518.
44. Argüello HMR y Cordero del Campillo M. Parasitosis del aparato digestivo. En: Cordero del Campillo M, Rojo Vázquez FA. (editores) *Parasitología veterinaria*. McGraw Hill Interamericana. Madrid, 1999.
45. Agyei AD. Epidemiological studies on gastrointestinal parasitic infections of lambs in the Coastal Savanna regions of Ghana. *Trop Anim Health Prod.* 2003;35:207-217.
46. O'Callaghan MG, O'Donoghue PJ, Moore E. Coccidia in sheep in South Australia. *Vet Parasitol.* 1987;24:175-183.
47. Catchpole J, Harris TJ. Interaction between coccidia and *Nematodirus battus* in lambs on pasture. *Vet Rec* 1989;124(23):603-605.
48. Taylor M, Catchpole J, Marshall R, Norton CC, Green J. 1995 *Eimeria* species of sheep. En: Eckert J (Ed.). *Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research*. European Commission. Luxemburg, pp. 25-39.
49. Lima MA, Romero CE, Tapia PG. Diagnóstico e identificación de las diferentes especies de *Eimeria* en ovinos del Valle de México. *Vet Mex* 1995;26:8.
50. González Mora J, Sánchez Albarra A, Vazquez Prats V. Presence and dynamics of oocysts of some species of *Eimeria* in ewes and lambs during the perinatal period in Huixquilucan Mexico. *Mem. III Congr Nal Prod Ovina*. Tlaxcala, México. *Protozool Abstr* 1990;15:1302.
51. Gregory MW, Yvoré P. Epidemiology and control of ovine coccidiosis. En: *Proceedings of the V International Coccidiosis Conference on Coccidia and International Coccidiomorphs*. Tour, France. INRA Publisher 1989 pp. 409-418.
52. Hindson JC, Winter AC. *Manual of Sheep diseases*. Blackwell Science, Oxford, 2002, p. 289.
53. Maes L, de Muelenaere C, Veys P. Diclazuril (Vecoxan), a new anticoccidial medication for weaned lambs. En: *Proceeding of the 7th Internacional coccidiosis Conference*. oxford, UK. 1997, p. 45.
54. Reynaud MC, Chauve CM, Gastellu J, Gounel JM. Administration of toltrazuril during experimental coccidiosis in mule ducks: comparison of the efficacy of a single administration at two different endogenous stages. *Vet Parasitol* 1999;81:265-274.

55. Suo X, Zhang JX, Li ZG, Yang CT, Min QR, Xu LT, Liu Q, Zhu XQ. The efficacy and economic benefits of Supercox, a live anticoccidial vaccine in a commercial trial in broiler chickens in China. *Vet Parasitol* 2006;142:63-70.
56. Coombs GH, Müller GH. Recent advances in the search for new anti-coccidial drugs. *Int J Parasitol* 2002;32:497-508.
57. Ramisz AB. The usefulness of Baycox (Bayer) for coccidiosis control of lambs. *Wiad Parazytol* 1999;45:187-191.
58. Foth BJ, McFadden GI. The apicoplast: a plastid in *Plasmodium falciparum* and other Apicomplexan parasites. *Int Rev Cytol* 2003;224:57-110.
59. Ernik E, Bedrnik P. Controlling coccidiosis in broiler growing. *Poult Int* 2001;40:36-42.
60. Vivas L, Rattray L, Stewart LB, Robinson BL, Fugmann B, Haynes RK, Peters W, Croft SL. Antimalarial efficacy and drug interactions of the novel semi-synthetic endoperoxide artemisone *in vitro* and *in vivo*. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:658-665.