

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

**USO DE UN INMUNOMODULADOR COMO APOYO A LA
RESPUESTA INMUNE DEL POLLO DE ENGORDA EN LA
VACUNACIÓN CONTRA COCCIDIA**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

CRISTINA ORTEGA TAPIA

Asesores:

MVZ. MC. Magdalena Escorcía Martínez

Dra. Andrea Rodríguez Ropón

MVZ. Jaime Alonso Navarro Hernández

México, D. F. 2008.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esa gran mujer que tengo como madre, por enseñarme que ésta vida es para vivirla día a día con una sonrisa y buscando siempre la forma de salir adelante. Gracias por seguirme consintiendo como si aún fuera una niña y por siempre darme todo tu apoyo.

A mi padre, porque nunca importa la hora, siempre tienes tiempo para una charla. Porque aunque siempre me das tus opiniones, al final me dejas tomar mis propias decisiones. Por ser mi ejemplo a seguir y porque hoy he llegado hasta aquí y soy lo que soy gracias a tus enseñanzas de vida.

A esas dos personas con las cuáles muchas veces la pagaron sin deberla pero que al final siempre me apoyaron y pusieron su granito de arena en esta tesis, gracias hermanos saben que los quiero y que siempre contarán conmigo.

A toda mi familia por siempre estar en las buenas y en las malas apoyandome y enseñarme el gran valor de una familia unida.

Gracias Dios por dejarme vivir un día más....

AGRADECIMIENTOS

JURADO

Gracias por su exigencia y estricto control al calificar este proyecto que se culmina, logrando que sea de calidad y que hoy sea un mejor profesional: Dr. Froylan Ibarra Velarde, Dr. Nestor Ledesma Martínez, Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara y Dr. Gary García Espinosa.

ASESORES

M en C. Magdalena Escorcía Martínez, por la gran oportunidad de trabajar a su lado y aprender de una gran profesional; la dedicación y entrega que siempre mostro ayudo a forjarme como una mejor profesionalista.

Dra. Andrea Rodríguez Ropón, gracias por la disposición y paciencia mostrada conmigo, logrando que en los momentos difíciles de este proyecto sintiera su apoyo en todo aspecto.

MVZ. Jaime Alonso Navarro Hernández por todo su apoyo, entusiasmo, amistad y gran trabajo.

COLABORADORES

Al Dr. Marco Antonio Quiroz de laboratorios Novus International Inc. por su valiosa aportación y apoyo brindado.

Gracias a todas las personas que colaboraron en la realización de este proyecto: MVZ. Jaime Orozco q.e.p.d., Dr. Valentín Espinosa Ortíz, Dr. Humberto Ramírez Méndez, MVZ. Griselda Ponce y MVZ. Araceli Lima Melo.

Al MVZ. Javier Gutiérrez Molotla y al MVZ. Julio Guarnero Cruz del Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) por las facilidades prestadas para la elaboración de éste proyecto.

A la Dra. Dolores Correa Beltrán, MC. Sara Teresa Méndez y QFB. Luz Belinda Ortíz Alegría, del Instituto Nacional de Pediatría por su amable atención y apoyo.

A mi gran amiga Norma Santiago, por siempre ofrecerme tu ayuda y porque sé que este trabajo también lo sentiste como tuyo. Y a esa gran persona que nunca tuvo un no, para apoyarme y darme su amistad: Luis Montesinos.

A mis compañeros y amigos que participaron de alguna manera en este proyecto: Genoveva, Israel, Samuel, Verónica, Cesar, María de Jesús, Gabriel y Jazmín.

Y a la persona que no teme soñar a mi lado, por ayudarme y apoyarme siempre en todo y dejarme aprender de él: Andrés Iniesta.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Calostro.....	5
Factor de transferencia.....	5
JUSTIFICACIÓN.....	7
HIPÓTESIS.....	7
OBJETIVO GENERAL.....	8
Objetivos específicos.....	8
MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
Producción del inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino.....	9
Inmunización.....	9
Centrifugación.....	10
Diálisis.....	10
Concentración proteica.....	10
Presencia de péptidos de bajo peso molecular.....	10
Prueba biológica <i>in vivo</i>	11
Evaluación de lesiones.....	12
Longitud de vellosidades.....	12
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	13
RESULTADOS.....	13

Concentración proteica.....	13
Análisis de lesiones.....	14
Homogeneidad entre las lesiones.....	14
Homogeneidad entre lesiones por Eimeria.....	14
Homogeneidad entre lesiones dentro del grupo.....	15
Comparación entre grupos.....	16
Contrastes de lesiones entre grupos.....	16
Longitud de vellosidades.....	18
DISCUSIÓN.....	18
CONCLUSIONES.....	20
REFERENCIAS.....	21
ANEXO 1. FOTOS.....	26
ANEXO 2. FIGURAS.....	29
ANEXO 3. CUADROS.....	33

RESUMEN

ORTEGA TAPIA CRISTINA. Uso de un inmunomodulador, como apoyo a la respuesta inmune del pollo de engorda en la vacunación contra coccidia (bajo la dirección de: MVZ. MC. Magdalena Escorcía Martínez, Dra. Andrea Rodríguez Ropón y MVZ. Jaime Navarro Hernández).

El presente estudio tuvo por objetivo evaluar el uso de un inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino, en pollos de un día de edad como apoyo a la vacunación contra las coccidias. Se trabajó una población de 210 pollos de engorda de la estirpe Ross 308 de un día de edad, distribuidos en seis tratamientos con 35 aves cada uno, consistentes en tres grupos testigo positivo (grupo A) y tres grupos experimentales (grupo C); a cada ave, de ambos grupos, se le aplicó una dosis de vacuna comercial contra *Eimeria* en alimento y a las aves del grupo experimental, se les aplicó un inmunomodulador elaborado a partir de calostro bovino al día 2, 3, 4, 17 y 19 de edad. Transcurridos 35 días posteriores a la inoculación, las aves fueron sacrificadas mediante dislocación cervical y se evaluó el efecto del inmunomodulador a través del grado de lesión macroscópica de acuerdo a la escala de Johnson y Reid de 1970 e histológicamente la longitud de las vellosidades intestinales. Los resultados mostraron que el uso del inmunomodulador, asociado a la vacuna contra coccidias redujo el grado de lesión intestinal en la región donde prolifera *Eimeria máxima* ($P < 0.05$) y la longitud de las vellosidades de las aves a las que se les aplicó la vacuna junto con el inmunomodulador, fue mayor para las tres secciones de intestino evaluadas.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad conocida como coccidiosis aviar, es causada por un protozoo de la familia *Eimeridae* que presenta una multiplicación asexual y sexual¹. Estos organismos pertenecen al género *Eimeria*, el cual produce parasitosis en las aves ocasionando lesión sobre vellosidades intestinales que alterará la absorción de nutrientes y pigmentos². Se han encontrado 9 especies que afectan a las aves comerciales en México, entre las cuales, se consideran como las más patógenas e importantes: *E. tenella*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, y *E. acervulina*³. La prevalencia de una especie en particular, depende de factores, como el ciclo biológico, la supervivencia de los oocistos a varios climas, las condiciones de sanidad, la susceptibilidad de diferentes estirpes de pollos y la edad de las aves, entre otros⁴.

La presencia de signos clínicos depende de factores como: la especie de coccidia, número de coccidias, integridad del sistema inmune, edad del ave y el sistema de confinamiento, entre otros. En una misma granja pueden encontrarse combinaciones de especies de *Eimeria*, esto establece una dificultad para atribuir las pérdidas financieras a una especie en particular; ya que algunas especies, únicamente reducen los índices de peso, la absorción de nutrientes y el adecuado depósito de pigmento, mientras que otras como *E. necatrix* y *E. tenella*, pueden causar mortalidad y aumentar los efectos antes mencionados^{5,6,7}.

La coccidiosis presenta pérdidas económicas que exceden entre US \$1.5 y 2 billones¹ anuales en la industria del pollo en todo el mundo⁸. Solo en la Unión

¹Un billón americano representa 10⁹.

Europea, el total de costos por infecciones de coccidias se estima en por lo menos £42 millones por año, de los cuales el 74% es debido a la reducción en la ganancia diaria de peso y en la conversión alimenticia, mientras que el 24% es por costo de adición de coccidiostatos al alimento y tratamiento de las aves enfermas⁷. La coccidiosis aviar representa grandes pérdidas a la avicultura debido a los altos costos por tratamientos, a las pérdidas por mortalidad cuando se presentan ciertas especies de *Eimeria*, la predisposición a otras enfermedades como la enteritis necrótica o la micotoxiosis, la disminución en la ganancia diaria de peso, lo que trae como consecuencia un aumento en el índice de conversión alimenticia y a la alteración en la absorción de nutrientes, provocando que no haya una adecuada pigmentación. En México éste último factor cobra importancia, debido a que los consumidores asocian erróneamente una buena pigmentación con el estado de salud de las aves y la frescura de las canales en algunas zonas del país.

Aunque los pigmentos son considerados aditivos y no ofrecen ningún aporte nutricional al alimento del ave, en la industria avícola mexicana son de uso básico ya que la demanda de dicho producto depende del grado de pigmentación de la piel del ave.

Los pigmentos deben ser adicionados al alimento debido a que el ave no es capaz de sintetizarlos por sí misma; este manejo representa costos que fluctúan entre ¢0.50 - ¢0.90 por ave⁹.

La pigmentación del pollo de engorda permite la diferenciación entre empresas productoras, que muchas veces logran un sobreprecio o mayor demanda de sus productos. Cuando no se alcanza la pigmentación requerida por el mercado, existe un castigo económico que fluctúa entre ¢0.50 y hasta \$1.00 por kilogramo de pollo⁹.

Es importante; sin embargo, que no se elimine por completo a la *Eimeria* del intestino del ave y que se presente cierto estado de coccidiasis, pues la permanencia de éste parásito en intestino estimula de manera constante la respuesta inmune y esto a su vez permite la presencia constante de los elementos inmunológicos que controlen un brote de campo.

Una forma de regular la presencia de *Eimeria* en intestino es con el uso de coccidiostatos, los cuales fueron introducidos en la década de los años 40's.

Para evitar la resistencia a estos fármacos, se utilizan programas de rotación¹⁰, sin embargo, el temor a la presencia de residuos en canal ha ocasionado recientemente la prohibición de éstos fármacos en Europa^{11, 12, 13}.

Las coccidias son altamente inmunogénicas, por lo que el desarrollo de vacunas desde los años 50's en Estados Unidos de Norteamérica ofreció una alternativa para el control de ésta enfermedad¹⁴. En la industria farmacéutica existe una gran gama de vacunas que contienen cepas vivas de *Eimeria* virulentas o atenuadas, sin embargo existen algunos aspectos que se tienen que cuidar al usarlas, debido a que la protección inmunitaria es específica de especie y la administración de una vacuna de oocistos vivos que contenga únicamente tres o cuatro especies puede no proteger adecuadamente contra brotes causados por diferentes a las contenidas en la vacuna¹³.

Otra alternativa para el tratamiento de la coccidiosis es el uso de inmunomoduladores, los cuales como su nombre lo indica, controlan la respuesta inmune, incrementando la magnitud de ésta respuesta (inmunoestimulante) o bien disminuyéndola. Varios agentes químicos y sustancias biológicas se han utilizado como inmunomoduladores, en el control

de *Eimeria* en las aves, algunos actúan sobre la integridad de la mucosa intestinal y en el sistema inmune¹³.

Calostro

Una de las principales funciones de la secreción de la glándula mamaria de los mamíferos que se provee al recién nacido entre las primeras 24 a 48 horas después del parto¹⁵ es proporcionar inmunidad pasiva¹⁶ a través de la alimentación; se ha demostrado que ésta aumenta la respuesta mediada por células T y mejora la inmunidad de células B en el sistema inmune del recién nacido¹⁷. El calostro bovino contiene algunas hormonas como estrógenos, progesterona, prostaglandinas¹⁸ y factores de crecimiento, vitaminas, inmunoglobulinas, lactoperoxidasa, lisozima y sustancias inmunomoduladoras¹⁹ entre las cuales se encuentran: moléculas de bajo peso molecular (*Low Molecular Weigth, LMW*) <10 KDa (IL-1 β , IL-1 ra, IL-6, TNF α y el IFN γ), péptidos ricos en prolina (*proline-rich peptid, PRP*), nucleótidos, nucleósidos y otros mensajeros químicos de origen proteico como el Factor de Transferencia (FT)²⁰.

Factor de Transferencia

En los años 40 se descubrió por primera vez la transferencia de la respuesta inmune celular (RIC) en animales de un donador inmune a uno no inmune. Lawrence en 1949²¹ demostró que esta respuesta también podía ser transferida en humanos mediante la inyección de un extracto de leucocitos y postuló que el extracto contenía un factor capaz de transferir la inmunidad del donante al receptor, denominando a esta sustancia Factor de Transferencia que puede ser usado como terapia para enfermedades que involucran el sistema inmune, especialmente los linfocitos T.

Puede obtenerse de linfocitos de sangre periférica, de ganglios linfáticos de bovino, bazo y placenta de diferentes especies, sin embargo, cuando se obtiene del calostro, se encuentra 1,000 veces más concentrado que el obtenido a partir de sangre²²; en la mayoría de los individuos que se ha probado, el factor de transferencia calostrual (FTcal) no es alergénico por lo que es igualmente eficaz ya sea administrado de forma oral o parenteral²³.

No existe una barrera interespecie, por lo que se puede utilizar FT obtenido en una especie y aplicarse en otra sin ninguna complicación y con excelentes resultados²⁴.

Lisonbee *et al* en 2004 señala que el factor de transferencia esta formado de 44 aminoácidos e incluye tres fracciones:

- Fracción inductiva.
- Fracción inmune supresora.
- Fracción antígeno específica.

La fracción antígeno específica del factor de transferencia está formada por dos fracciones, la primera de 8-12 aminoácidos y la segunda, altamente conservada de 10 aminoácidos que tiene alta afinidad por el receptor de linfocito T²⁵. Estas fracciones poseen distintos pesos moleculares en donde:

- ✓ 1% constituido de moléculas mayores a 10 000 Da,
- ✓ 65 a 95% con peso molecular de 2000 a 6000 Da,
- ✓ 10 a 30% con peso molecular de 1000 a 2000 Da.
- ✓ menos del 10%, de menor peso molecular a 1000 Da²⁶.

El factor de transferencia promueve la maduración de células T en el timo e incrementa significativamente la actividad de las células NK²⁷. Es análogo de los anticuerpos, pero en escala más pequeña; tanto el factor de transferencia como los anticuerpos incluyen sitios antígeno-específico y tienen regiones altamente conservadas que interactúan con receptores en sus respectivas células efectoras²⁵.

Como antecedentes a este trabajo, podemos citar a Wilson, que en 1988 utilizó en aves, Factor de Transferencia a partir de calostro bovino para enfermedad de Newcastle (ENC), laringotraqueitis infecciosa (LTI) y enfermedad de la bolsa de Fabricio (IBF) consiguiendo aumentar el título de anticuerpos²¹.

JUSTIFICACIÓN

La vacunación contra coccidias ha sido una de las alternativas para el control de la enfermedad, sin embargo, no siempre se genera una adecuada respuesta inmune a ella y las lesiones producidas por la vacuna se exacerban llegando a provocar la enfermedad. Por lo tanto, el presente estudio se considera necesario para saber si el uso de un inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino, en pollos ayuda a controlar la presentación de lesiones y a mantener una adecuada longitud de vellosidades.

HIPÓTESIS

La administración de una vacuna de coccidias producirá lesiones intestinales distribuidas entre las lesiones de magnitud +1 a +4 según la escala de Johnson & Reid de 1970, mientras que la adición de dicho antígeno en presencia de un inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino, producirá lesiones de magnitudes +1 y +2 de dicha escala. Así mismo permitirá mantener una adecuada integridad intestinal facilitando la absorción de nutrientes y pigmentos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de utilizar un inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino, simultáneamente a la vacunación contra coccidia, en pollos de un día de edad, sobre la homogeneidad de las lesiones intestinales inducidas por las coccidias, mediante el grado de lesión intestinal, utilizando la escala de valor de Johnson & Reid de 1970, para mejorar la pigmentación en el pollo de engorda.

Objetivos Específicos

1. Elaborar un inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino mediante procesos físicos como centrifugación y diálisis, para utilizarlo en la vacunación de pollos de engorda contra Eimerias.
2. Aplicar un inmunomodulador vía oral, elaborado a partir de calostro de bovino, solo y combinado con la vacuna de Eimerias en pollos de engorda de un día de edad para observar si hay homogeneidad de lesiones.
3. Evaluar a la necropsia el efecto de un inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino, en el desarrollo de lesiones a nivel intestinal basadas en la clasificación de Johnson & Reid.
4. Evaluar la longitud de las vellosidades intestinales a los diferentes niveles del intestino de todos los grupos de aves, usando el programa AXIOVISION^{MR}.
5. Analizar estadísticamente los resultados para determinar la significancia del uso de un inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino, en pollo de engorda.

MATERIAL Y MÉTODOS

Producción del inmunomodulador, a partir de calostro de bovino.

Inmunización. Se inoculó una vaca gestante clínicamente sana (sin patologías clínicas aparentes) de raza Holstein, por vía intradérmica, en edad reproductiva; la vaca recibió 3 dosis de inmunógeno de 2 ml cada una. Los 2 ml fueron repartidos en cuatro puntos anatómicos del bovino de 0.5 ml cada uno: dos a nivel de tablas del cuello, una de cada lado, y dos en la región de la babilla, una de cada lado; la distribución del volumen total se realizó debido a que el adyuvante puede irritar la zona de aplicación²⁸. Cada inmunización fue aplicada con una diferencia de 15 días entre ellas, a partir de los 7.5 meses de gestación. El inóculo fue elaborado con 5 mg de proteína total de antígeno vacunal contra *E. tenella*, *E. maxima* y *E. acervulina*, la que fue inactivada mediante sonicación. La proteína se suspendió en solución salina isotónica y un adyuvante elaborado a partir de aceite de cacahuete (vol/vol). Posterior al nacimiento, se colectó el calostro por medio del ordeño de la vaca, el cual se mantuvo congelado a - 20°C hasta que se le hiciera una serie de tratamientos para la obtención del inmunomodulador. El bovino inmunizado permaneció con el resto del rebaño, bajo las mismas condiciones de estabulación y alimentación en el Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM), localizado en San Miguel Topilejo, México D.F.

Centrifugación. Con el objetivo de separar células, caseína y grasa del calostro, éste se centrifugó en 4 diferentes ciclos, a 4°C; el primer ciclo de 11,000 a 15,000 g durante 15-30 min; el segundo ciclo de 11,500 a 15,000 g durante 30-45 min, el tercer ciclo fue de 8,000

a 12,000 g durante 1-2 horas y el cuarto ciclo de 10,000 a 15,000 g también durante 1-2 horas en un rotor Beckman JA-10 y una ultracentrífuga Sorval Herdeus respectivamente. Entre cada centrifugación, se colectó el sobrenadante, el cual se sometió al siguiente ciclo de centrifugado. Finalmente el calostro centrifugado fue congelado a - 20°C, para su posterior tratamiento.

Diálisis. El sobrenadante del calostro centrifugado fue colocado en un sistema de diálisis con una membrana con un punto de corte de 12 kDa. El sistema se dejó reposar durante 24-48 horas a 4-6°C y finalmente, el líquido de la diálisis se colectó en condiciones asépticas, se filtró por una membrana de 0.4 y 0.22 µm, y finalmente se le congeló a -20°C; a la par se colectaron muestras para determinar su concentración proteica.

Concentración proteica. Se envió al laboratorio de Patología Clínica del Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM, una alícuota del calostro dializado para la determinación de proteínas totales por el método de Biuret.

Presencia de péptidos de bajo peso molecular. Se realizó una electroforesis del calostro dializado en gel de poliacrilamida al 12-15%-SDS²⁹, para evidenciar la banda de péptidos de bajo peso molecular. El gel se tiñó mediante la técnica de tinción de plata Bio-Rad Silver Strain Kit en el Instituto Nacional de Pedriatría (INP).

Prueba biológica in vivo.

Se trabajó una población de 210 pollos de engorda de la estirpe Ross 308 de un día de edad, los cuales fueron distribuidos aleatoriamente en seis tratamientos con 35 aves cada

uno, consistentes en: tres grupos testigo positivos (grupo A) y tres grupos experimentales (grupo C). Se administró un alimento balanceado para aves libres de patógenos específicos (ALPES®), donado por Investigación Aplicada S.A. de C.V. (IASA).

La manipulación de los tratamientos consistió en lo siguiente:

Grupos testigo positivo: Inoculación de vacuna viva al día de edad contra *E. tenella* (35 aves), *E. maxima* (35 aves) y *E. acervulina* (35 aves), vía alimento (1 dosis /ave, según las recomendaciones del fabricante), sin inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino y sin coccidiostato.

Grupos experimentales: Inoculación de vacuna viva al día de edad contra *E. tenella* (35 aves), *E. maxima* (35 aves) y *E. acervulina* (35 aves), vía alimento (1 dosis /ave, según las recomendaciones del fabricante), más inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino al segundo, tercero, cuarto, diecisiete y diecinueve días de edad, sin coccidiostato.

Las aves fueron alojadas en piso, en unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal Aves (DPAA) de la FMVZ-UNAM, bajo condiciones de temperatura controlada: 1ra. semana: 32° C, 2da. semana: 30°C, 3ra. semana: 28°C y la 4ta. semana: 26° C³⁰; se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*, libre de coccidiostatos.

Evaluación de lesiones.

A los 35 días de edad se aplicó eutanasia a los sujetos del experimento mediante dislocación cervical. Se les practicó la necropsia y se recolectaron muestras a tres niveles intestinales: duodeno, yeyuno-íleon y ciego en formalina al 10% para estudio de

histopatología. Las muestras histopatológicas fueron procesadas por métodos histológicos convencionales: fueron cortadas con el microtomo de rotación a 3 micras y teñidas con hematoxilina y eosina para su evaluación. Posteriormente, a partir de las muestras de intestinos y bajo condiciones de ceguera de los tratamientos, se realizaron dos lecturas independientes, por inspección visual, de cada lesión en cada muestra, para tener un total de N=420 observaciones (n=70 por cada tratamiento). La respuesta al tratamiento consistió en la lesión observada en la muestra, cada una de las cuales fue clasificada de acuerdo a una escala ordinal, propuesta por Johnson y Reid³¹, cuyo rango incluye los valores 0, 1, 2, 3 y 4, correspondiendo cero a la muestra sin lesión aparente y 4 a la lesión de mayor magnitud.

Longitud de vellosidades.

Para estudiar el efecto del tratamiento sobre esta estructura, se enviaron al laboratorio de biología de IASA muestras de intestino escogidas al azar, de cada grupo. Se seleccionaron aleatoriamente 10 vellosidades, y se midió su longitud desde el límite de la capa muscular interna de la mucosa y la lámina propia, hasta el borde del epitelio en la parte apical de las vellosidades, con el objetivo panorámico 4X del microscopio, usando el programa AXIOVISION^{MR}.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Una vez clasificadas las lesiones, se contó el número de muestras observadas (frecuencias absolutas, f_i) en cada nivel (magnitud) de lesión de cada tratamiento. Con las frecuencias

obtenidas se calcularon las frecuencias relativas (proporciones, $p_i = f_i/N$) correspondientes, con las cuales se realizaron los contrastes estadísticos de homogeneidad entre las lesiones, Para contrastar la homogeneidad de las lesiones, entre los tratamientos, respecto tanto de grupos, como de eimerias, se realizó la prueba de Cochran-Mantel-Haenszel (CMH) a nivel $\alpha=0.05$ como criterio de significación estadística, y *a posteriori*, la prueba Z para comparar diferencias entre pares de proporciones en los casos necesarios. Por último, para comparar la diferencia de los promedios de la longitud de las vellosidades entre los grupos, se aplicó la prueba *t* de *Student* para dos muestras independientes a nivel $\alpha = 0.05$ como criterio de significación estadística, por medio del programa Stats®.

Resultados

Concentración proteica.

De acuerdo a los resultados reportados por el laboratorio de Patología Clínica del Departamento de Patología de la FMVZ- UNAM, se encontró una concentración proteica de 3.3 µg/ml, del calostro dializado, para determinar de manera indirecta la presencia del inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino. Asegurando posteriormente la presencia de la banda de bajo peso molecular correspondiente al inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino en gel de poliacrilamida al 12-15% con tinción especial de plata (Foto 1).

Análisis de lesiones.

Homogeneidad entre las lesiones.

En el análisis general de proporciones se observó heterogeneidad significativa entre niveles de lesión, ($U = 375.9$; $P < 0.0001$). Se puede afirmar que, independientemente del tratamiento, la mayor proporción de muestras no presentaron lesión alguna (lesión 0) (Foto 2, 6 y 10) o bien, ésta fue mínima (lesión 1) (Fotos 3, 7 y 11), no observándose diferencia significativa entre estos niveles ($Z = 0.629$; $P = 0.2646$); asimismo, se observó que las proporciones de muestras sin lesión o con lesión mínima fueron significativamente mayores que para las lesiones de magnitud 2 y 3, conservándose esta misma relación entre las lesiones 2 y 3, respectivamente ($P < 0.0001$) (Figura 1, Cuadro 4).

Homogeneidad entre lesiones por Eimeria.

Con el fin de determinar si la heterogeneidad observada en el patrón general entre las lesiones es atribuible a la exposición a la vacunación con Eimeria (testigo positivo) o a la aplicación de inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino (grupo experimental), se realizó el análisis de contingencia entre Eimerias y nivel de lesión y se determinó la razón de verosimilitud (LR) del mismo, observándose un patrón significativo de heterogeneidad de las lesiones entre las distintas Eimerias ($\chi^2_{LR;6,417} = 89.965$; $P < 0.0001$), (Figura 4). Posteriormente, se realizó el análisis de CMH estratificando la intervención experimental (control y experimental) en cada Eimeria, para establecer si dicha intervención determina la heterogeneidad de las lesiones, observándose que ésta fue significativa, tanto en cada Eimeria ($\chi^2_{3,417} = 71.5104$; $P < 0.0001$), como en cada intervención experimental $\chi^2_{1,417} = 61.0849$; $P < 0.0001$.

La heterogeneidad de las lesiones, en las distintas Eimerias, presentó las siguientes relaciones (Figura 4, Fotos 4-5, 8-9 y 12):

Eimeria Ea: Lesión 1 > (Lesión 0 = Lesión 2) > Lesión 3.

Eimeria Em: Lesión 1 > Lesión 0 > Lesión 2 > Lesión 3.

Eimeria Et: Lesión 0 > Lesión 1 > Lesión 2 > Lesión 3.

De lo anterior se observa que, en las tres Eimerias, la mayoría fueron casos sin lesión o con lesiones de magnitud baja (0 ,1) y que la minoría fueron lesiones de magnitud 3. En ninguna muestra se observaron lesiones severas (de magnitud 4).

Homogeneidad entre lesiones dentro del grupo.

El análisis CMH muestra que en ambas intervenciones (testigo positivo o grupo experimental), se observó el mismo patrón de heterogeneidad entre las lesiones que en el patrón general; esto es: no hubo diferencias significativas entre las proporciones de las muestras sin lesión (lesión 0) y con lesión mínima (lesión 1) ($P > 0.05$). Asimismo, la heterogeneidad entre las lesiones muestra que las proporciones de muestras sin lesión o con lesión 1 fueron significativamente mayores que las de nivel 2 y 3, al mismo tiempo que entre éstas últimas, la proporción fue mayor en lesiones de magnitud 2 que 3, respectivamente ($P < 0.0001$), (Cuadro 6, Figura 3). El análisis CMH muestra que no existe una homogeneidad de lesiones dentro del grupo.

Comparación entre grupos.

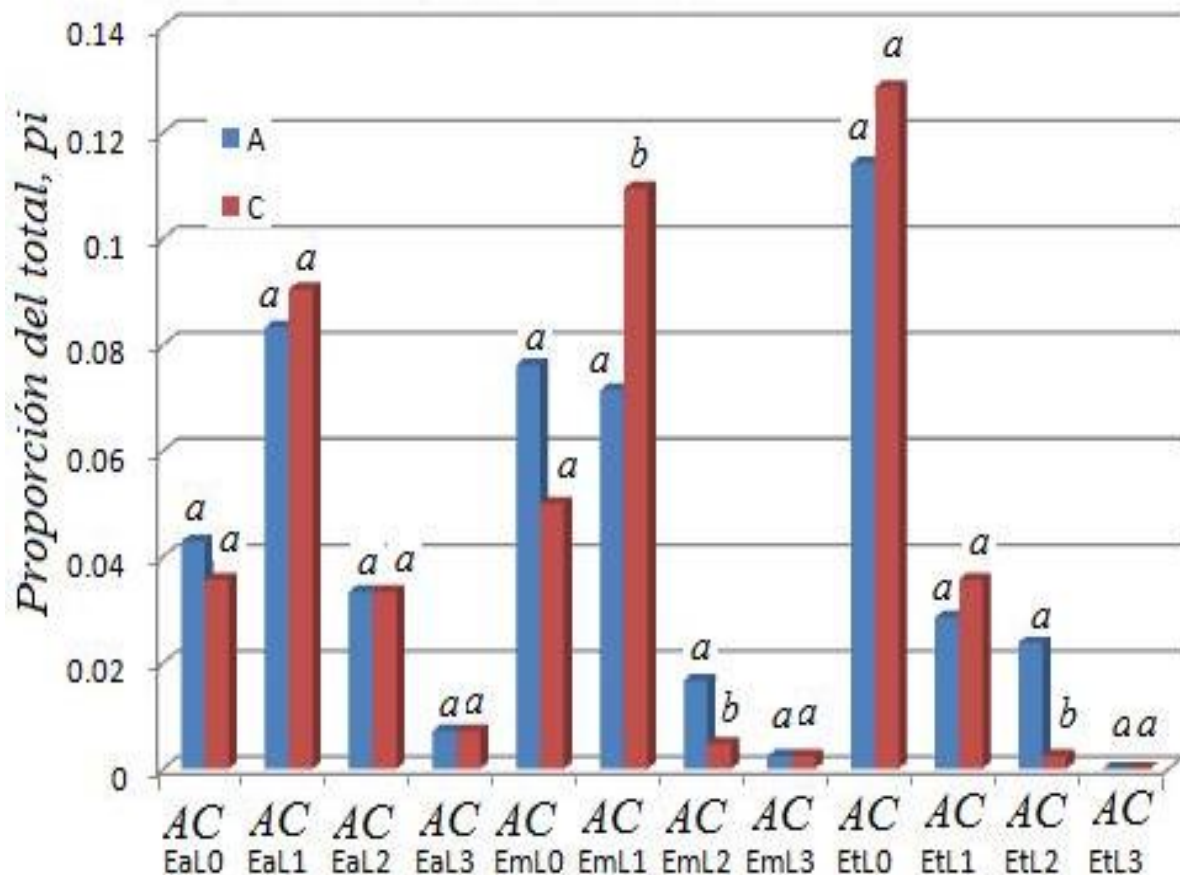
La evidencia muestra que en ambos grupos (testigo positivo vs experimental), no hubo diferencia entre las proporciones de muestras sin lesión (lesión 0) y con lesión 3 ($Z_0 = 0.583$; $P = 0.2798$; $Z_3 = 0.000$; $P = 0.5000$) respectivamente, mientras que la proporción de muestras con lesión 1, fue mayor en el grupo experimental que en el testigo positivo ($Z = -1.664$; $P = 0.0481$) y con lesión 2, fue mayor en el testigo positivo, respectivamente ($Z = 2.030$; $P = 0.0212$). La prueba de Z mostró que el grupo experimental presentó menor grado de lesión en comparación con el grupo testigo (Cuadro 5, Fig. 2).

Contrastes de lesiones entre grupos.

Con base en el análisis estratificado de las lesiones, para el tipo de Eimeria, la magnitud de lesión y la intervención experimental de manera conjunta, se puede afirmar, que: para la Eimeria Ea, las lesiones se distribuyen homogéneamente en el rango 0-3 sin diferencia entre los grupos ($\chi^2_{LREa;3,137} = 0.396$; $P = 0.94$); en Eimeria Em, ocurren más lesiones nivel

1 con inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino que sin él, pero menos de nivel 2 con inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino que sin él ($\chi^2_{LREm;3,137} = 8.635$; $P = 0.0346$) y para la eimeria Et, el uso de inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino sólo disminuye las lesiones de nivel 2, sin modificar las de nivel 0, 1 ó 3, respecto de no usar inmunomodulador ($\chi^2_{LREa;3,137} = 9.234$; $P = 0.0099$). (Figura 5, Cuadro 7).

FIGURA 5. Lesiones intestinales en pollos de 5 semanas de edad, por grupo, Eimeria y magnitud de lesión.



En el eje de las abscisas: EaL0: *Eimeria acervulina*, lesión 0. EaL1: *Eimeria acervulina*, lesión 1. EaL2: *Eimeria acervulina*, lesión 2. EaL3: *Eimeria acervulina*, lesión 3. EmL0: *Eimeria maxima*, lesión 0. EmL1: *Eimeria maxima*, lesión 1. EmL2: *Eimeria maxima*, lesión 2. EmL3: *Eimeria maxima*, lesión 3. EtL0: *Eimeria tenella*, lesión 0. EtL1: *Eimeria tenella*, lesión 1. EtL2: *Eimeria tenella*, lesión 2. EtL3: *Eimeria tenella* lesión, 3. A: testigo positivo. C: grupo experimental. Literales distintas indican diferencia significativa $P < 0.05$.

Longitud de vellosidades

Se comparó la diferencia de los promedios de la longitud de las vellosidades entre los grupos aplicándose la prueba *t* de *Student* para dos muestras independientes a nivel $\alpha = 0.05$ como criterio de significancia estadística, por medio del programa Stats®. Los resultados indican que la longitud de vellosidades a nivel de duodeno, ileon-yeyuno y ciego fue mayor para las aves del grupo experimental en comparación al grupo control (Figuras 5, 6 y 7).

DISCUSIÓN

La ausencia de lesiones intestinales mayores (magnitud 4) en el presente estudio sugiere cuatro posibles explicaciones: 1) La calidad de la vacuna utilizada en el presente estudio facilitó generar una adecuada inmunidad (coccidiasis) sin llegar a provocar un cuadro de coccidiosis. La vacuna que se utilizó asegura la viabilidad de los oocistos y la pureza de la

misma sin la presencia de contaminantes^{32,33}. 2) Las condiciones experimentales en las que se mantuvieron las aves evitó que su sistema inmune se deprimiera, como sucede con las aves de producción. Graat y col. en 1998 mencionan que el adecuado manejo, la buena higiene, y la ausencia de otro tipo de aves en la granja y de otras enfermedades, ayudarán a que no se agrave la enfermedad. 3) El porcentaje de especies de eimerias presentes en las vacunas puede estar influenciada por el tipo de vacuna que se esté utilizando. Dalloul y Lillehoj¹³ mencionan que en las vacunas vivas no atenuadas, al no ser modificadas en ninguna forma, no contienen una cantidad adecuada de especies más patógenas para evitar que se genere la enfermedad. En el presente estudio la vacuna que se utilizó no era atenuada, por lo tanto, se concluye que posiblemente al ser *Eimeria tenella* la más agresiva entre las tres utilizadas, el laboratorio comercial incluyó una cantidad menor de oocistos de ésta especie por lo que no se generaron lesiones grado 3-4. 4) La presentación de mayor número de lesiones por determinadas especies de acuerdo a la composición del alimento que se le administra a las aves ha sido reportada por Lee en 2006³⁴ quien menciona que las dietas altas en proteína tienden a reducir el desarrollo de lesiones asociadas con *E. máxima*, aunque aumenta la de lesiones asociadas con el desarrollo de *E. tenella* en pollos vacunados. En el presente trabajo no se realizó el análisis químico proximal para saber el porcentaje de cada nutriente de la dieta, lo cual hubiera permitido descartar que la presentación de lesiones se viera influenciado por tales variables.

Trabajos realizados por Williams y Andrews³⁵ en 2001 coinciden con los resultados reportados en el presente trabajo; estos investigadores pusieron de manifiesto que cuando un grupo de pollos sanos, aislados de infecciones eran vacunados con oocistos vivos, la

mayoría de las lesiones oscilaban entre grado 1 y 2, de acuerdo a la escala de Johnson y Reid; situación que se repitió en el presente trabajo.

En el presente estudio no se observó evidencia concluyente de que el inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino, en presencia de vacunación contra *Eimeria*, disminuya el riesgo de lesiones intestinales mayores (nivel 4), lo que se observó fue que el efecto del inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino sobre la magnitud de las lesiones es irregular entre las *Eimerias*. El comportamiento en los resultados obtenidos en el grupo de *Eimeria máxima* puede estar relacionado a que el inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino indujo la expresión de linfocitos T estimulando la respuesta inmune celular³⁶ y la expresión de ciertas citocinas como IL2 y el IFN γ como demostró Uribe en 2007³⁷ a partir del uso de un inmunomodulador obtenido de sangre periférica de gallinas.

La integridad de las vellosidades intestinales, detectadas mediante sistemas microscópicos, fue mayor en el grupo tratado con inmunomodulador, elaborado a partir de calostro bovino, en comparación con el grupo sin inmunomodulador. La longitud e integridad de vellosidades es clave para que se lleve a cabo una adecuada absorción de nutrientes y en el caso particular de este trabajo, una adecuada absorción de pigmentos; la superficie intestinal presenta microvellosidades en las que se lleva a cabo la secreción de enzimas digestivas que actúan sobre sustratos importantes que dan por resultado que gran cantidad de nutrientes sean absorbidos, la longitud de vellosidades es directamente proporcional a la capacidad de absorción, debido a la mayor superficie de contacto^{38, 39}.

CONCLUSIONES

El uso de un inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino, asociado a una vacuna con oocistos de *Eimeria*, reduce el grado de lesión intestinal en la región del intestino donde prolifera *Eimeria maxima*.

El uso de un inmunomodulador, elaborado a partir de calostro de bovino, permitió que la integridad de las vellosidades intestinales fuera mejor en el grupo experimental con respecto del grupo testigo.

El uso del inmunomodulador, elaborado a partir de calostro bovino, no influye en la homogeneidad de lesiones.

REFERENCIAS

- 1- Soulsby EJ. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domesticos. 7^a ed. México (Distrito federal) Interamericana S.A. de C.V., 1987: 602.
- 2- MacDougal LR. Coccidiosis. In: Saif Y.M. editors. Diseases of poultry, 11th ed., Iowa State Press -Blackwell Publishing Co. Ames, IA. 2003:973-985.
- 3- Moreno DR. Dinámica poblacional de las especies de *Eimeria* en pollo de engorda en varios estados de la República Mexicana (tesis de doctorado). México (Distrito Federal): Universidad Nacional Autónoma de México, 2002.
- 4- Williams RB. A compartmentalized model for estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. Int J Parasitol 1999; 29: 1209-1229.
- 5- Joyner LP, Long PL. The specific characters of the *Eimeria*, with special reference to the coccidia of the fowl. Avian Pathol 1974; 3: 145–157.
- 6- Williams RB. Safety of the attenuated anticoccidial vaccine “Paracox” in broiler chickens isolated from extraneous coccidial infection. Vet Res Commun 1994; 18: 189–198.
- 7- Williams RB. Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. Int J Parasitol 1998; 28: 1089–1098.
- 8- Stevens DA. Coccidiosis. In: Delves PJ, Roitt IM, editors. Encyclopedia of immunology. Vol. 1. 2nd ed, London: Academic Press, 1998: 591-593.

- 9- Uribe CG, Aburto IA, Hernández GM. Importancia de una metodología en la evaluación de la pigmentación en pollo de engorda. Memorias de XI Jornadas Médico Avícolas; 2005 febrero 189-192; México Distrito Federal, 2005.
- 10- Allen PC, Fetterer RH. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. Clin Microbiol 2002; 15: 58–65.
- 11- Chapman HD. Anticoccidial drugs and their effects upon the development of immunity to infections in poultry. Avian Pathol 1999; 28: 521–535.
- 12- Farrant J. Ministers knock out six anticoccidials. Poult World 2001; 5: 155.
- 13- Dalloul RA, Lillehoj HS. A recent advances in immunomodulation and vaccination strategies against coccidiosis. Avian Dis 2004; 49: 1-8.
- 14- Chapman HD, Cherry TE, Danforth HD, Shirley MW, Williams RB, Richards G. Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. Int J Parasitol 2002; 32: 617–629.
- 15- Zoltan MD. Clinical applications: bovine colostrum as immune system modulator. Am J Med 1998; 5: 19-23.
- 16- Sugisawa H, Itou T, Saito M, Moritomo T, Miura Y, Sakai T. A low-molecular-weight fraction of bovine colostrum and milk enhances the oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes. Vet Res Commun 2003; 27: 453-461.

- 17- Pabst HF, Sapdy DW. Effect of breast-feeding on antibody response to conjugate vaccine. *Lancet* 1990; 336: 269-270.
- 18- Alais C. *Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera.* 4^a ed. Barcelona: Reverté, S.A., 1985.
- 19- Quigley JD, Drewry JJ. Nutrient and immunity transfer from cow to calf pre- and postcalving. *J Dairy Sci* 1998; 81: 2779-2790.
- 20- Hagiwara K, Kataoka S, Yamanaka H, Kirisawa R, Iwai H. Detection of cytokines in bovine colostrum. *Vet Immunol Immunopathol* 2000; 76: 183-190.
- 21- Wilson GB, Poindexter C, Fort JD, Ludden KD. De novo initiation of specific cell mediated immune responsiveness in chickens by transfer factor (specific immunity inducer) obtain from bovine colostrums and milk. *Acta Virol* 1988; 32: 6-1.
- 22- Lawrence HS. The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin in man. *Proc Soc Exp Biol Med* 1949; 71: 516-22.
- 23- Kirkpatrick CH. Activities and characteristics of transfer factors. *Biotherapy* 1996; 9: 13-6.
- 24- Klesius PH, Fudenberg HH, Smith CL. Comparative studies on dialyzable leukocyte extracts containing transfer factor -a review. *Comp Immunol Microbiol Infec Dis* 1980; 3: 247-260.
- 25- Lisonbee D, Hennen WJ, Daugherty FJ, inventores. Lisonbee D, Hennen WJ, Daugherty FJ, propietarios. Compositions including different types of transfer factor,

- methods for making the compositions, and methods of treatment using the compositions. US, patente PCT/US2004/030307. 2004 septiembre 15.
- 26- Pekarek J, inventor. Pekarek J, propietario. Transfer factor medicament –ways of manufacturing and use. US, patente PCT/CZ2007/000050. 2007 junio 12.
- 27- Ramaekers JC, inventor. Ramaekers JC, propietario. Encapsulated transfer factor compositions and methods of use. US, patente PCT/US2005/017316. 2005 mayo 17.
- 28- Jones LM. Farmacología y terapéutica veterinarias. 2a ed. México: Hispano-Americana, S.A. de C.V. 1959: 27-28.
- 29- Hawcroft DM. Electrophoresis the Basis. New York: IRL Press at Oxford University Press, 1997.
- 30- Quintana JA. Avitecnia. Manejo de las aves domésticas más comunes. 3ra ed.. México (Distrito Federal) Trillas, 1999: 66.
- 31- Johnson J, Reid WM. Anticoccidial drugs: lesion scoring technique in battery and floorpen experiment with chickens. Exp Parasitol 1970; 28: 30-36.
- 32- [Novusint.com](http://www.novusint.com) [homepage on the Internet]. Novus International; Available from: <http://www.novusint.com/es-ar/pdf/technical-resources/poultry/advent-frequently-asked-questions.pdf>
- 33- Chapman D. Tendencias mundiales en el control de coccidiosis: tratamiento, medicamentos anticoccidianos y vacunas. New trends on Mycoplasma & Coccidia

- control. 2006 Sept 6-9. Puerto Vallarta (México): Intl. Novartis Poultry Symposium, 2006: 101-103.
- 34- Lee JT. Influence of dietary composition on coccidiosis vaccination efficacy in broilers (tesis de doctorado). Estados Unidos (Texas): Texas A&M University, 2006.
- 35- Williams RB y Andrews SJ. The origins and biological significance of the coccidial lesions that occur in chickens vaccinated with live attenuated anticoccidial vaccine. *Avian Pathol* 2001; 30: 215-220.
- 36- Kirkpatrick CH, Rich RR y Smith TH. Effect of transfer factor on lymphocyte function in anergic patients. *J Clin Invest* 1972; 51: 2948-2958.
- 37- Uribe LS. Inducción de la expresión de citocinas por el factor de transferencia aviar en células mononucleares de sangre periférica de gallinas domésticas. (tesis de licenciatura) México (Distrito Federal) México: FMVZ. UNAM, 2007.
- 38- Leeson S, Summers JD. Proteins and amino acids. In: Scott's. *Nutrition of birds*. 4th ed. Canada: University Books, 2001: 9-10.
- 39- Katayama NM, Miyaji CI, Albuquerque LE, Okabayashi S. Doenças do sistema digestivo e anexos. Em: *doenças das aves*. Berchieri JA, Macari M, editores. Brasil: FACTA, 2000: 47-48.

ANEXO 1. FOTOS

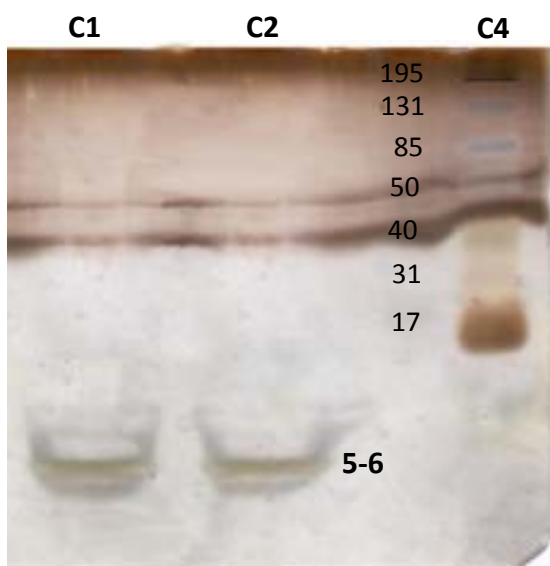


Foto 1. Presencia de péptidos de bajo peso molecular. Gel de poliacrilamida al 12-15% con tinción especial de plata. Carril uno (C1) y carril dos (C2): muestra el calostro dializado, evidenciando la banda con peso molecular de 5-6 kDa. Carril 4: (C4): marcador de peso molecular cuya masa (kDa) se indica a la izquierda



Foto 2. Lesión de *E. acervulina* en pollos de cinco semanas de edad, grado 0.



Foto 3. Lesión de *E. acervulina* en pollos de cinco semanas de edad, grado 1.



Foto 4. Lesión de *E. acervulina* en pollos de cinco semanas de edad, grado 2.



Foto 5. Lesión por *E. acervulina* en pollos de cinco semanas de edad, grado 3.

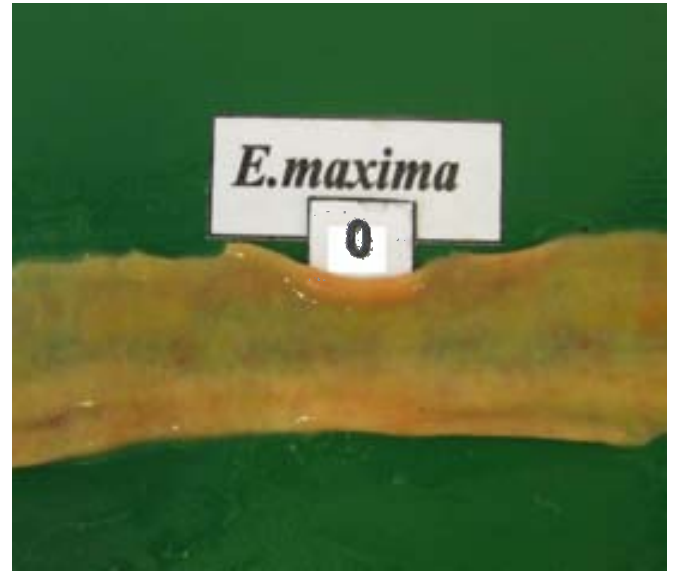


Foto 6. Lesión por *E. maxima* en pollos de cinco semanas de edad, grado 0.

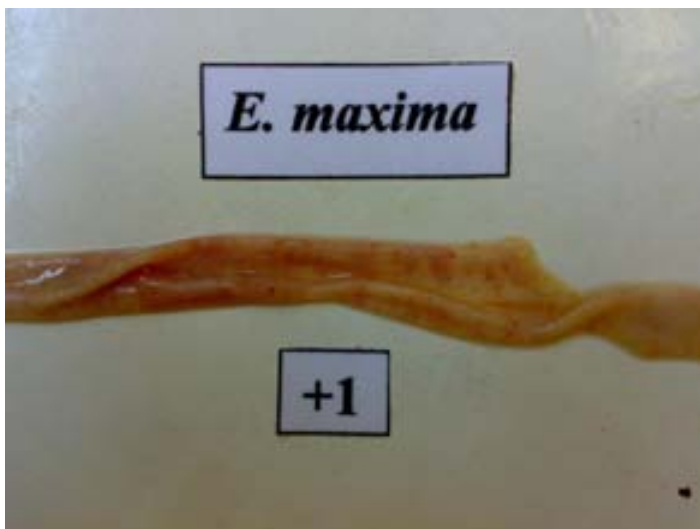


Foto 7. Lesión por *E. maxima* en pollos de cinco semanas de edad, grado 1.



Foto 8. Lesión por *E. maxima* en pollos de cinco semanas de edad, grado 2.

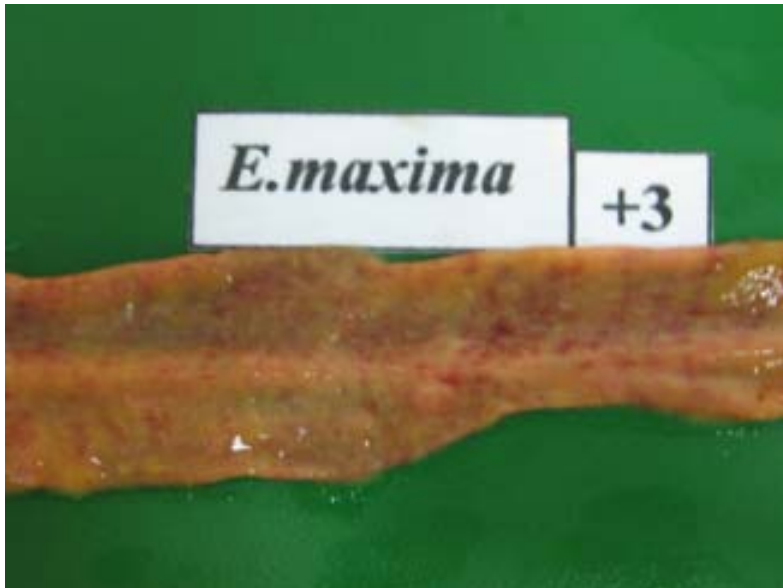


Foto 9. Lesión por *E. maxima* en pollos de cinco semanas de edad, grado 3.



Foto 10. Lesión por *E. tenella* en pollos de cinco semanas de edad, grado 0.

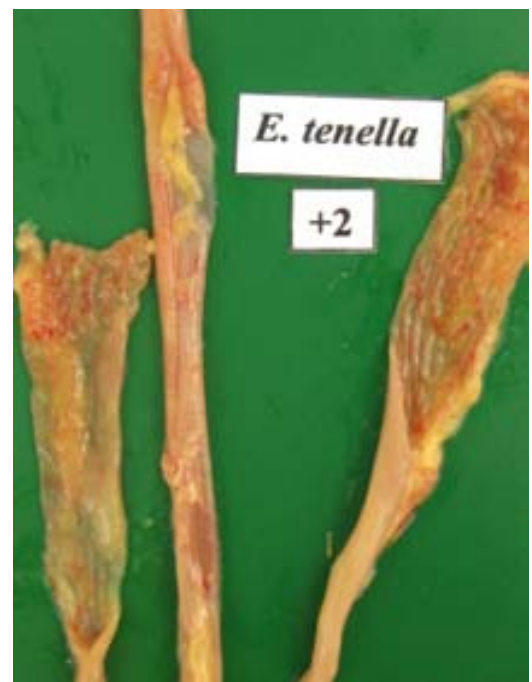
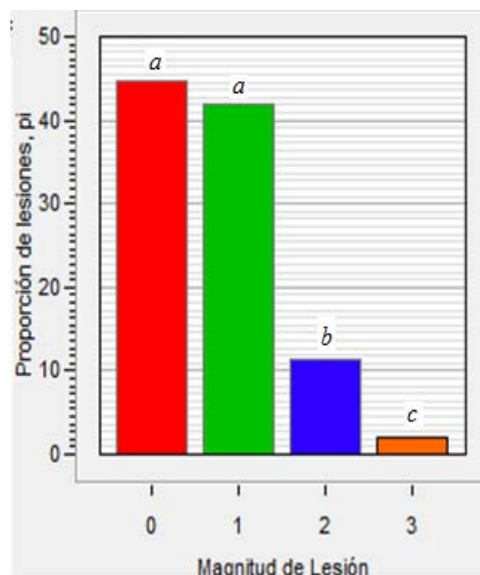


Foto 11. Lesión por *E. tenella* en pollos de cinco semanas de edad, grado 1.

Foto 12. Lesión por *E. tenella* en pollos de cinco semanas de edad, grado 2.

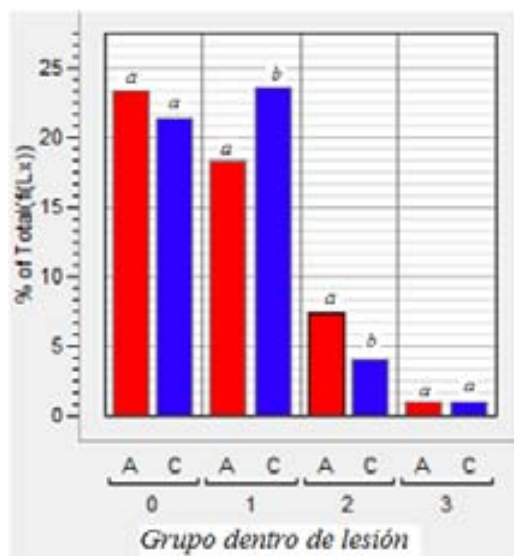
ANEXO 2. FIGURAS

FIGURA 1. Patrón general de heterogeneidad entre lesiones, de las 420 observaciones.



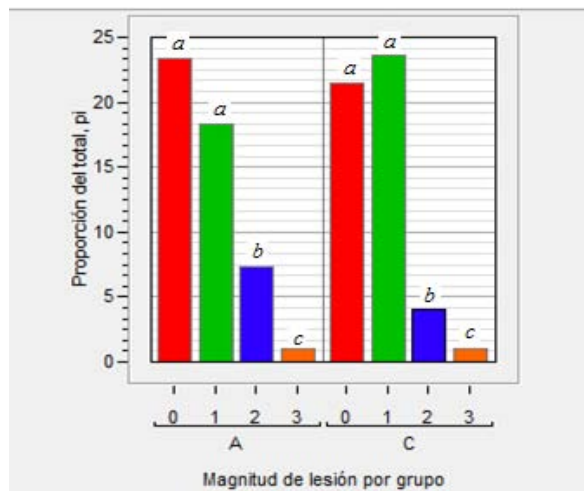
En el eje de las abscisas, grados de lesión de acuerdo a la escala de Jonson y Reid (el grado de lesión 4 no se incluye debido a que no se presentó en ningún grupo). Literales distintas indican diferencia significativa de $P < 0.0001$: entre la lesión de magnitud 0 y 1 no hay diferencia estadística, pero sí entre los demás grados de lesión.

FIGURA 2. Proporción de lesiones entre grupos.



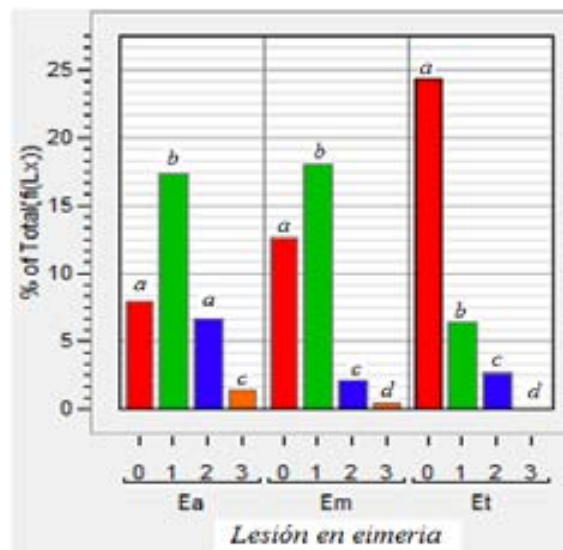
En el eje de las abscisas: grados de lesión (0, 1, 2 y 3) A: testigo positivo, C: grupo experimental. Literales distintas indican diferencia significativa $P < 0.05$.

FIGURA 3. Heterogeneidad de lesiones por grupo.



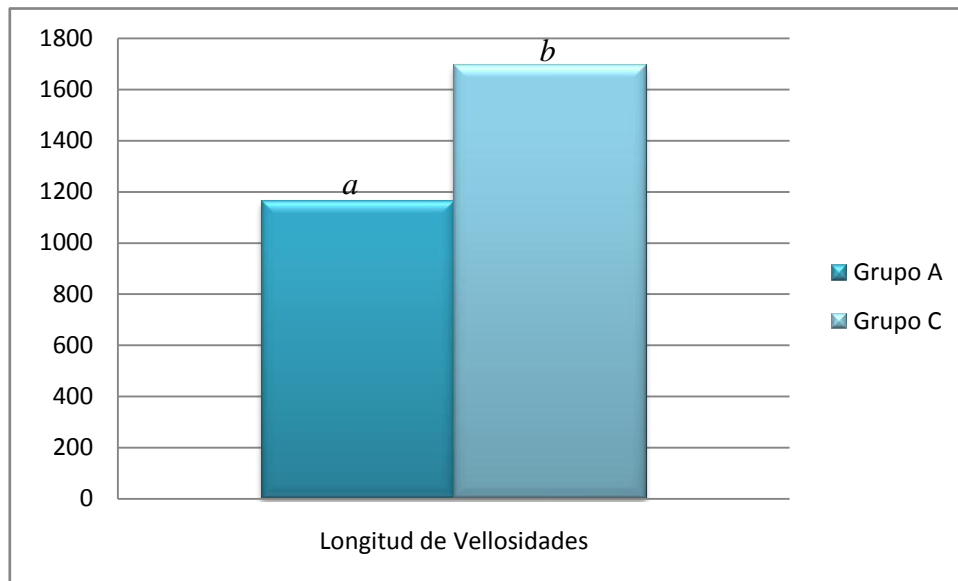
Proporción de la magnitud de lesión por grupo, respecto del total 420. En el eje de las abscisas: grados de lesión de la escala Johnson y Reid. A: testigo positivo. C: grupo experimental. Literales distintas indican diferencia significativa $P < 0.01$.

FIGURA 4. Lesión en Eimeria.



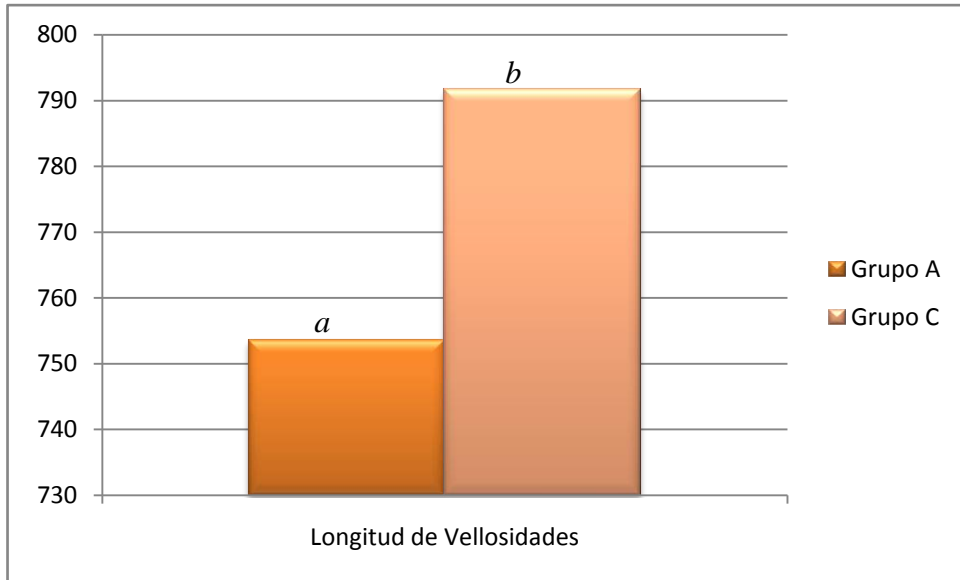
En el eje de las abscisas: grados de lesión de la escala Johnson y Reid Ea: *Eimeria acervulina*. Em: *Eimeria máxima*. Et: *Eimeria tenella*. Literales distintas indican diferencias significativas entre lesiones $P < 0.05$.

FIGURA 5. Longitud de vellosidades de duodeno.



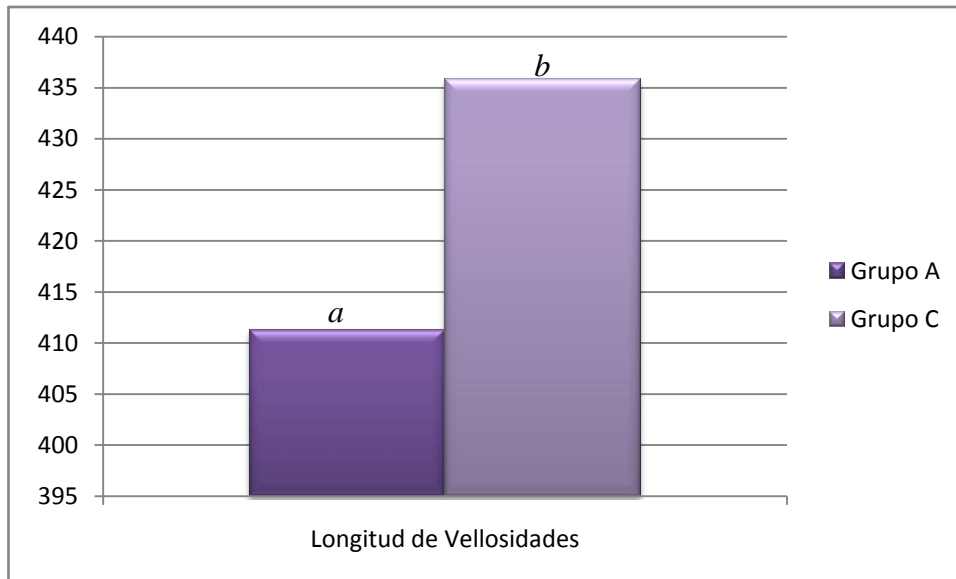
Grupo A: Testigo positivo. Grupo C: Grupo experimental. Literales distintas indican diferencias significativas entre lesiones $P < 0.05$.

FIGURA 6. Longitud de vellosidades de yeyuno-íleon.



Grupo A: Testigo positivo. Grupo C: Grupo experimental. Literales distintas indican diferencias significativas entre lesiones $P < 0.05$.

FIGURA 7. Longitud de vellosidades de ciego.



Grupo A: Testigo positivo. Grupo C: Grupo experimental. Literales distintas indican diferencias significativas entre lesiones $P < 0.05$.

ANEXO 3. CUADROS

CUADRO 1. Frecuencias absolutas de lesión intestinal en testigo positivo (aves vacunadas, grupo A) y grupo experimental (aves vacunadas más inmunomodulador, grupo C) de tres Eimerias.

	<i>fi</i>	Lesión				
Grupo	Eimeria	0	1	2	3	$N_{A,Eimeria}$
A	nEa	18	35	14	3	70
	nEm	32	30	7	1	70
	nEt	48	12	10	0	70
	$N_{A, Lesión}$	98	77	31	4	210
	<i>fi</i>	Lesión				
C	Eimeria	0	1	2	3	$N_{C,Eimeria}$
	nEa	15	38	14	3	70
	nEm	21	46	2	1	70
	nEt	54	15	1	0	70
	$N_{C, Lesión}$	90	99	17	4	210
	Total, Lesión	188	176	48	8	420

Muestra las frecuencias absolutas del número de lesiones observadas, agrupadas de acuerdo al nivel de la lesión y al tratamiento. *fi*: Frecuencia absoluta. N,n: Totales de frecuencias absolutas. Ea: *Eimeria acervulina*. Em: *Eimeria maxima*. Et: *Eimeria tenella*.

CUADRO 2. Frecuencias relativas por Eimeria y lesión en testigo positivo (aves vacunadas, grupo A) y grupo experimental (aves vacunadas más inmunomodulador, grupo C) de tres Eimerias.

		p_i	Lesión			
Grupo	Eimeria	0	1	2	3	
A	Ea	0.04286	0.08333	0.03333	0.00714	
	Em	0.07619	0.07143	0.01667	0.00238	
	Et	0.11429	0.02857	0.02381	0.00000	
	$PTotal_{Lesión}$	0.23333	0.18333	0.07381	0.00952	
		p_i	Lesión			
	Eimeria	0	1	2	3	
C	Ea	0.03571	0.09048	0.03333	0.00714	
	Em	0.05000	0.10952	0.00476	0.00238	
	Et	0.12857	0.03571	0.00238	0.00000	
	PC	0.21429	0.23571	0.04048	0.00952	
	$PTotal_{Lesión}$	0.44762	0.41905	0.11429	0.01905	

Incluye las proporciones correspondientes a las frecuencias del cuadro 1, con respecto del total de observaciones del estudio (N=420). Proporciones: $p_i = f_i/n$. $PTotal$: Proporción total por cada magnitud de lesión. Ea: *Eimeria acervulina*. Em: *Eimeria maxima*. Et: *Eimeria tenella*.

CUADRO 3. Frecuencias absolutas y frecuencias relativas acumuladas de los grupos testigo positivo (aves vacunadas) y experimental (aves vacunadas + inmunomodulador, entre Eimerias, para distinto nivel de lesión.

Gpo A-C (f_i)	Lesión				
Eimeria	0	1	2	3	Σ
Ea	33	73	28	6	140
Em	53	76	9	2	140
Et	102	27	11	0	140
Σ	188	176	48	8	420

Gpo A-C (p_i)	Lesión				
Eimeria	0	1	2	3	Σ
Ea	0.07857143	0.17380952	0.06666667	0.01428571	0.33333333
Em	0.12619048	0.18095238	0.02142857	0.0047619	0.33333333
Et	0.24285714	0.06428571	0.02619048	0	0.33333333
Σ	0.44761905	0.41904762	0.11428571	0.01904762	1

Muestra las frecuencias relativas y absolutas del grupo A y grupo C de acuerdo a la escala de lesión de Johnson y Reid. Gpo. A-C (f_i): Frecuencia absoluta. Gpo A-C (p_i): Frecuencias relativas. Σ : sumatoria por cada *Eimeria*. Ea: *Eimeria acervulina*. Em: *Eimeria maxima*. Et: *Eimeria tenella*.

CUADRO 4. Contrastes entre magnitud de lesiones.

(Patrón General)

	Diferencia entre magnitud de lesiones					
	0 - 1	0 - 2	0 - 3	1 - 2	1 - 3	2 - 3
Estimado	0.02857	0.33333	0.42857	0.30476	0.40000	0.09524
Z	0.629	10.174	16.51	9.411	15.545	5.537
P*	0.2646	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

*: Los valores $P < 0.05$ indican diferencia estadística significativa entre las proporciones comparadas. 0-1,0-2,0-3,1-2,1-3,2-3: comparación entre grados de lesión de acuerdo a la escala de Johnson y Reid.

CUADRO 5. Contrastes de lesiones entre grupos.

Grupo	Magnitud de Lesión				Σ
	0	1	2	3	
p_A	0.23333	0.18333	0.07381	0.00952	0.5
p_C	0.21429	0.23571	0.04048	0.00952	0.5
n	188	176	48	8	N = 420
Σp_i	0.44762	0.41905	0.11429	0.01905	1
Diferencia $p_A - p_C$	0.01904	-0.05238	0.03333	0.00000	-
Estadístico Z:	0.583	- 1.664	2.030	0.000	-
P	0.2798	0.0481	0.0212	0.500	-

p_A , p_C : Proporciones de sujetos con lesión en los grupos A y C. n: Total de sujetos en ambos grupos (A,C), en cada nivel de lesión. Σp_i : Proporción de sujetos con lesión en ambos grupos (A,C), con respecto al total. Σ : Total. n: Casos observados en cada magnitud de lesión. N: Total de observaciones en el estudio. Estadístico Z: Resultado del contraste de la diferencia entre las proporciones de lesiones entre los grupos A y C. P: Diferencia estadísticamente significativa entre las proporciones de A y C en cada nivel de lesión, cuando $P < 0.05$.

CUADRO 6. Comparación entre lesiones por grupo.

Grupo	Estimado	Magnitud de lesión					
		0 - 1	0 - 2	0 - 3	1 - 2	1 - 3	2 - 3
A	Diferencia ^(a)	0.05000	0.15952	0.22381	0.10952	0.17381	0.06429
	Z ^(b)	1.592	6.16	10.447	4.533	8.832	4.681
	P*	0.0557	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
C	Diferencia	-0.02143	0.17381	0.20476	0.19524	0.22619	0.03095
	Z	-0.654	7.516	9.842	8.198	10.556	2.869
	P*	0.2565	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.002
General	Diferencia	0.02857	0.33333	0.42857	0.30476	0.40000	0.09524
	Z	0.53	10.173	16.514	9.409	15.548	5.541
	P*	0.2644	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

(a). Diferencia de las proporciones entre los niveles de lesión que se comparan. (b). Estadístico de prueba (de la distribución normal) del contraste de las proporciones entre niveles de lesión. *. Los valores P < 0.05 indican diferencia estadística significativa entre las proporciones comparadas.

CUADRO 7. Comparación de grupos por Eimeria y lesión.

Eimeria ^(a)	Estimado	Comparación (Grupo:Lesión) ^(b)			
		AL0-CL0	AL1-CL1	AL2-CL2	AL3-CL3
Ea	Diferencia ^(c)	3	-3	0	0
	Z ^(d)	0.525	-0.351	0	0
	P*	0.3007	0.3627	0.5	0.5
Em	Diferencia	11	-16	5	0
	Z	1.515	-1.843	1.672	0
	P*	0.0649	0.0327	0.04272	0.5
Et	Diferencia	-6	-3	9	0
	Z	-0.594	-0.578	2.738	0
	P*	0.2761	0.2818	0.003	.

(a). Ea: *Eimeria acervulina*; Em: *Eimeria maxima*; Et: *Eimeria tenella*. (b). AL0: Grupo A: Lesión 0; CL0: Grupo C: Lesión 0. (c). Diferencia: Diferencia de proporciones entre los grupos y la lesión que se comparan. (d). Estadístico (de la distribución normal) del contraste de las proporciones. (*). Significación estadística del contraste. El valor P < 0.05 indica diferencia significativa entre las proporciones comparadas.