



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
*PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL*

**Actividad inmunogénica de mimotopos del
esporozoito de *Eimeria tenella* seleccionados por
bibliotecas de *Phage display***

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal**

PRESENTA:

Marco Antonio Juárez Estrada

TUTOR

Rogelio Alejandro Alonso Morales F.M.V.Z.- U.N.A.M.

COMITÉ TUTOR

Ernesto Ávila González F.M.V.Z.- U.N.A.M.

Juan Joel Mosqueda Gualito F.C.N.- U.A.Q.

Ciudad Universitaria, Cd. México.

Junio 2022



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

In memoriam

A mi papá el Dr. Heriberto Elías Juárez Brito, sin él, definitivamente no estaría donde estoy, ni sería quién soy

“Porque soy y vivo en el presente que es todo lo que hay.... “

¡ Gracias Valedor !!!

Le dedico el presente trabajo a Claudia Anabel, mi esposa, sin su invaluable apoyo y su inmesurable amor jamás hubiera finalizado una tarea como esta, te amo

¡ Muchas gracias nenita !!!

A mi mamá, Delia Estrada Garduño, por su fe, su alegría en la vida, los inescrutables caminos que tiene el amor de madre para expresarse y ser, predominar sobretodo y todos

¡ Gracias por estar siempre !!!

Dedico este estudio a todas mis unidades experimentales, a todas esas aves que involuntariamente contribuyeron a mi trabajo, aquellas que cada vez que tenían que tragarse de golpe todas las estrellas... yo sentía un nudo en la garganta, y que cada vez que las recuerdo, aún lo siento ¡!!

*Podría estar encerrado en una cáscara de nuez
y sentirme rey de un espacio infinito...*

SHAKESPEARE

Hamlet, segundo acto, escena 2

El hombre es llama viviente...

OSHO

Agradecimientos

Gracias a la dirección general de asuntos del personal académico (DGAPA-UNAM) por el apoyo a estudios de Doctorado a través del Programa de Apoyos para la Superación del Personal Académico de la UNAM (PASPA) 2015-2019.

Agradecimientos a la DGAPA-UNAM por el apoyo otorgado al presente estudio de Doctorado a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN223115.

Deseo expresar mi más profundo sentido de gratitud a mi mentor en esta increíble aventura del conocimiento, al Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales, estoy muy contento de haber podido trabajar con usted. ¡ Muchas gracias Doc !!!

Un agradecimiento desde el fondo de mi corazón a mi querido amigo Guillermo Téllez Isaías, un ser humano en verdad excepcional. ¡ Hasta la victoria siempre !!!

Les agradezco también toda su templanza, conocimiento y atenciones a los Doctores Ernesto Ávila González y Juan Joel Mosqueda Gualito. El más acertado comité tutorial que pude tener. ¡ Gracias señores !!!

Agradezco a todos los miembros del laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Bioestadística, y del Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la F.M.V.Z.- U.N.A.M., que me ayudaron y apoyaron en este trabajo doctoral. Especialmente a Juan Pablo Pintor, Mario Fragoso, Jessica Molina, Amanda Gayosso, Víctor David González, Issac Martínez, Vianney Ramírez, Ruben Merino, Juanito Merino, Félix D. Sánchez, Leopoldo H. Paasch, Norma L. Calderón, Alberto Ramírez, Shayra Martínez y José Luis Gómez. ¡ Muchas gracias !!!

Un agradecimiento especial a todos los académicos hombres y mujeres, verdaderos universitarios que han ayudado a crear y consolidar el gran proyecto institucional nacional que es la U.N.A.M. ¡Gracias totales !!!

Así es la vida, don Juan.

—Es verdad, así es la vida.

—La cebada está crecida.

—Con estas lluvias...

Y van

las habas que es un primor.

—Cierto; para marzo, en flor.

Pero la escarcha, los hielos...

—Y, además, los olivares
están pidiendo a los cielos

aguas a torrentes.

—A mares

ANTONIO MACHADO

Resumen

La coccidiosis es la parasitosis aviar más importante a nivel mundial. *Eimeria tenella* produce un cuadro clínico muy severo. Este padecimiento se ha controlado medicando el alimento con fármacos anticoccidianos, sin embargo, la creciente resistencia hacia estos ha conducido a la búsqueda de métodos alternativos. La vacunación con antígenos recombinantes ofrece una alternativa viable. Un desafío clave es obtener una vacuna diseñada genéticamente con antígenos capaces de estimular una respuesta inmune sólida. En el presente estudio se diseñó y analizó una vacuna experimental de esporozoitos completos de *E. tenella* emulsionados en un adyuvante de nanopartículas (EtSz-IMS1313). El índice anticoccidial (ACI=187) obtenido mostró la eficacia de esta vacuna. Adicionalmente, se observó que la suplementación oral con IgYs de yema de huevo específicas vs *Eimeria* sp. es una alternativa viable para evitar brotes graves de la enfermedad. Los anticuerpos (Abs) IgG zoito-específicos de *E. tenella* de conejos vacunados con EtSz-IMS1313 mostraron la identificación exitosa de antígenos tipo B celular, estos Abs se purificaron y utilizaron en dos bibliotecas de fagos aleatorios (12 mer y c7c lin) para seleccionar péptidos recombinantes afines. Después de tres rondas de selección se obtuvieron las secuencias de nucleótidos de 20 clonas de cada biblioteca y su reactividad hacia los Abs anti-esporozoito de *E. tenella* fue evaluada. La secuencia deducida de aminoácidos mostró alta coincidencia con diversas proteínas de *E. tenella*. Las clonas de c7c lin mostraron mayor identidad con dominios extracelulares repetidos similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y trombospondina tipo I (TSP-1) de la proteína micronemal 4 de *E. tenella* ambos de la familia TRAP. Las clonas obtenidas de la biblioteca 12 mer revelaron coincidencias con un homólogo de *Cullin*, el factor de elongación 2 (EF-2), una cadena beta-dineína y una proteína putativa de *E. tenella*. Se seleccionaron 4 clonas para inmunizar conejos. En ELISA y *Western blot* los Abs anti-clona mostraron reactividad con los antígenos nativos de *E. tenella*. Los péptidos seleccionados corresponden a mimotopos de antígenos del esporozoito de *E. tenella*. Algunos de estos inmunotopos individualmente o en grupo fueron evaluados en ensayos de inmunización/desafío, ambos tipos de inmunógenos mostraron protección parcial contra *E. tenella*. La utilización de Abs heterólogos vs el esporozoito de *E. tenella* para identificar epítomos inmunogénicos constituye una estrategia para descubrir péptidos candidatos con potencial para ser utilizados como vacunas subunitarias contra *E. tenella*.

Palabras clave: Apicomplexa, Mimotopos, Merozoitos, Péptidos, Protozoarios, Vacuna.

Abstract

Avian coccidiosis has long been recognized as an economically important disease of poultry industry worldwide. Specifically, *Eimeria tenella* is a dreadful disease. It has been controlled by routine medication of feed. However, the rising emergence of drug resistance has led to search for alternative methods of parasite control. Vaccination with recombinant antigens offers a feasible option. Some of the main challenges to obtain a successful genetically engineered vaccine is vinculated to appropriate identification of antigens that can stimulate a sterilizing immunity. Here, we assayed an experimental vaccine composed of *E. tenella* whole-sporozoites emulsified in a novel nanoparticle adjuvant (EtSz-IMS1313). The anticoccidial index (IAC=187) showed the effectiveness of EtSz-IMS1313 as a vaccine. In fact, we demonstrated that oral supplementation of chickens with egg yolk *Eimeria* sp.-specific immunoglobulins can be a viable alternative to avoid severe outbreaks of the disease. The *E. tenella* zoite-specific IgG antibodies (Abs) from vaccinated rabbits demonstrated the feasibility for successful B cell antigen identification. This rabbit IgG fraction from *E. tenella* sporozoite antiserum was purified and used to screen two random Phage-display libraries (12 mer and c7c link). After three rounds of selection, 20 clones were picked up from each library, their nucleotide sequence obtained and their reactivity to anti-sporozoite *E. tenella* Abs were evaluated. The deduced amino acid sequence of the selected peptide clones showed good matches with several *E. tenella* proteins. The c7c link selected clones found identity with the extracellular domains of the epidermal growth factor-like (EGF-like) and the thrombospondin type-I (TSP-1) both repeats of *E. tenella* micronemal protein 4. Clones obtained from the 12-mer library phage revealed coincidences with a Cullin homologue, elongation factor 2 (EF-2), a beta-dynein chain, and a putative *E. tenella* protein. Four clones were selected to immunize rabbits. Anti-clone Abs showed reactivity to *E. tenella* native antigens by ELISA and Western blott. Hence, the selected *Phage displayed* peptides correspond to true mimotopes. Some of these immunotopes were tested in priming/challenge assays, individually or in a pool feature both showed partial protection against *E. tenella*. This study elicited the feasibility of using heterologous Abs against *E. tenella* sporozoites to identify strongly immunogenic immunotopes. In addition, this work evaluated a strategy for discovering of candidate peptides with the potential to be used as *E. tenella* epitope-based subunitary vaccine.

Key words: Apicomplexa, Mimotopes, Merozoites, Peptides, Poultry, Vaccine.

Contenido

1.0	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Generalidades de <i>Eimeria</i> en la avicultura	1
1.2	Etiología y ciclo de vida.....	3
1.2.1	Patogénesis y patología de <i>Eimeria</i> en la avicultura	8
1.2.2	Manifestaciones clínicas de la infección por <i>Eimeria</i>	12
1.2.3	Diagnóstico de la coccidiosis aviar	13
1.3	Epidemiología de la coccidiosis aviar	14
1.4	Prevención y control de la coccidiosis aviar	16
1.4.1	Puntos críticos del control y prevención de la coccidiosis aviar	17
1.5	Respuesta Inmunológica de las aves a la coccidiosis	19
1.5.1	Respuesta Inmune Celular	21
1.5.2	Respuesta Inmune Humoral	23
1.5.3	Inmunidad pasiva en la coccidiosis aviar	24
1.6	Vacunación	26
1.6.1	Vacunación contra la coccidiosis aviar	27
1.6.2	Vacunas subunitarias contra coccidia	29
1.6.3	Vacunación génica en el <i>phylum</i> Apicomplexa (<i>Eimeria</i> sp)	31
1.6.4	Vacunas subunitarias basadas en epítomos recombinantes	36
1.7	Mecanismos de patogenicidad: Epítomos de antígenos críticos, identificación y caracterización	37
1.7.1	Bibliotecas combinatorias de péptidos desplegados aleatoriamente en bacteriófagos de tipo filamentosos	38
1.7.2	Estrategia para la obtención de mimótopos inmunogénicos	39
1.7.3	Importancia de generar mimótopos vacunales en parásitos del <i>phylum</i> Apicomplexa	40
1.7.4	Perspectiva en la identificación y selección de mimótopos inmunogénicos....	41
1.8	Justificación	43
1.9	Hipótesis de Investigación	43
1.10	Objetivo General	43
1.10.1	Objetivos Particulares	44
1.10.2	Metas	44

2.0	MATERIAL Y MÉTODOS	45
2.1	<i>Cepa patógena de Eimeria tenella</i>	46
2.1.1	Aislamiento de la cepa de <i>E. tenella</i> patógena de campo	46
2.1.2	Purificación de la cepa salvaje de <i>E. tenella</i>	46
2.1.3	Propagación de los ooquistes esporulados de <i>E. tenella</i>	48
2.1.4	Limpieza y desinfección de los ooquistes de <i>E. tenella</i>	48
2.2	<i>Obtención de esporoblastos y esporozoitos de E. tenella</i>	48
2.2.1	Obtención de esporoblastos de <i>E. tenella</i>	48
2.2.2	Purificación de los esporoblastos de <i>E. tenella</i>	49
2.2.3	Obtención y purificación de los esporozoitos de <i>E. tenella</i>	49
2.2.4	Obtención de antígenos solubles a partir de esporozoitos de <i>E. tenella</i>	50
2.3	<i>Aislamiento de merozoitos de segunda generación de E. tenella</i>	50
2.3.1	Obtención de merozoitos de segunda generación de <i>E. tenella</i>	51
2.3.2	Purificación de merozoitos de segunda generación de <i>E. tenella</i>	51
2.3.3	Obtención de antígenos solubles a partir de merozoitos de segunda generación de <i>E. tenella</i>	52
2.3.4	Cuantificación de antígeno de esporozoitos y merozoitos de segunda generación por la técnica de Bradford	52
2.4	<i>Obtención de anticuerpos séricos policlonales positivos a E. tenella</i>	52
2.4.1	Animales y alojamiento	53
2.4.2	Parásito	53
2.4.3	Diseño experimental	53
2.4.4	Recolección de ooquistes y suero sanguíneo	54
2.4.5	Preparación de antígenos de esporozoitos y merozoitos de <i>E. tenella</i>	55
2.4.6	SDS-PAGE, <i>Western blotting</i>	55
2.4.7	ELISA	56
2.4.8	Parámetros para evaluar el grado de inmunidad adquirida	56
2.5	<i>Metodología de evaluación de la respuesta inmune humoral generada contra el protozoo Apicomplexa aviar Eimeria tenella</i>	57
2.5.1	Titulación del antígeno de esporozoitos por medio de la técnica de ELISA indirecta	57
2.5.2	Titulación con ELISA indirecta del suero hiperinmune de gallinas (<i>Gallus gallus</i>) contra el antígeno de esporozoitos de <i>E. tenella</i>	58
2.5.3	Titulación mediante ELISA indirecta del antígeno de merozoitos de <i>E. tenella</i>	

de segunda generación.....	59
2.5.4 Titulación del suero hiperinmune de ave contra el antígeno de merozoitos de segunda generación de <i>E. tenella</i> mediante ELISA indirecta	59
2.5.5 Caracterización de polipéptidos en los sobrenadantes de antígenos de esporozoitos y merozoitos de 2ª generación de <i>E. tenella</i> por medio de WB .	59
2.6 <i>Evaluación del probable uso de Abs policlonales vs Eimeria sp, como reactivo-ligando para el tamizaje de 2 bibliotecas de Phage display</i>	61
2.6.1 Infección con <i>E. tenella</i> para evaluar el grado de protección de anticuerpos policlonales IgY vs <i>Eimeria</i> sp terapéuticamente administrados a aves SPF..	62
2.6.2 Animales experimentales	63
2.6.3 Parásitos	63
2.6.4 Antisuero e IgYs policlonales de la yema de huevo versus <i>E. tenella</i>	63
2.6.5 IgYs policlonales de yema versus <i>Eimeria</i> sp., para el ensayo de inmunoterapia	64
2.6.6 Anticuerpos IgY de yema versus el esporozoito de <i>E. tenella</i>	65
2.6.7 Aislamiento y purificación de esporozoitos y merozoitos de <i>E. tenella</i>	65
2.6.8 Preparación de suspensión de Ags de esporozoitos y merozoitos <i>E. tenella</i> .	65
2.6.9 SDS-PAGE y análisis de pureza de Abs IgY de la yema de huevo del SC....	66
2.6.10 ELISA	66
2.6.11 SDS-PAGE, <i>Western blotting</i>	67
2.6.12 Diseño experimental	68
2.6.13 Desafío-Infección	69
2.6.14 Parámetros para evaluar la eficacia de la inmunoterapia	69
2.6.15 Estudio histológico	71
2.6.16 Análisis estadístico	71
2.7 <i>Inmunización de conejos New Zealand White y aves SPF Leghorn White con esporozoitos de E. tenella</i>	72
2.7.1 Inmunización con esporozoitos inactivados completos de <i>E. tenella</i> en conejos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) y gallinas (<i>Gallus gallus</i>) SPF Leghorn White	73
2.7.2 Purificación, cuantificación y caracterización de las IgGs de conejo	74
2.7.3 Titulación de las IgGs purificadas del suero hiperinmune de conejo contra el esporozoito y merozoito de 2ª generación de <i>E. tenella</i> por ELISA indirecta ..	74
2.8 <i>Identificación y amplificación de péptidos recombinantes de epítomos del</i>	

<i>esporozoito de E. tenella seleccionados por dos bibliotecas de Phage display</i>	75
2.8.1 Tamizaje de péptidos en dos bibliotecas de fagos M13 utilizando como ligandos Abs IgG de conejo <i>versus</i> el esporozoito completo de <i>E. tenella</i>	75
2.8.1.1 Primer Tamizaje	75
2.8.1.2 Segundo Tamizaje	78
2.8.1.3 Tercer Tamizaje	79
2.8.1.4 Selección de clonas individuales	81
2.8.1.5 Amplificación de los fagotopos seleccionados.....	81
2.8.1.6 Purificación del ADN de cada clona del fagotopo seleccionado	82
2.8.1.7 Secuenciación del ADN de cada fagotopo	82
2.8.1.8 Análisis de las secuencias de cada clona seleccionada	82
2.8.2 Caracterización con ELISA de las clonas seleccionadas en el tercer tamizaje	83
2.8.3 Selección de clonas candidatas	83
2.8.4 Inmunización de conejos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) con cada clona candidata .	84
2.8.5 Caracterización del antisuero contra las clonas candidatas mediante ELISA..	85
2.8.6 Caracterización <i>Western blot</i> de los antígenos nativos del esporozoito y el merozoito de 2ª generación de <i>E. tenella</i> con cada suero anti-clona	86
2.9 <i>Evaluación de mimótopos del esporozoito de E. tenella como inmunógenos individuales contra una infección con E. tenella en aves SPF Leghorn White</i> .	87
2.9.1 Animales <i>experimentales</i> y parásitos	87
2.9.2 Aislamiento y purificación de las dos fases asexuales de <i>E. tenella</i>	88
2.9.3 Vacuna experimental de esporozoítos completos inactivados de <i>E. tenella</i> ...	88
2.9.4 Preparación de los antígenos de esporozoítos y merozoitos de <i>E. tenella</i>	89
2.9.5 ELISA	89
2.9.6 Cuantificación de ooquistes y muestras serológicas	89
2.9.7 Diseño experimental	89
2.9.8 Parámetros utilizados para evaluar la inmunoprotección	91
2.9.9 Análisis estadístico	92
2.9.10 Declaración bioética de los estudios realizados con animales vivos	93
2.10 <i>Evaluación inmunoprotectiva de dos mezclas de 3 clonas de péptidos recombinantes mimótopos del esporozoito de E. tenella cada una frente a un desafío con una alta dosis de ooquistes esporulados de E. tenella</i>	93
2.10.1 Animales <i>experimentales</i> y parásitos	93

2.10.2	Aislamiento y purificación de las dos fases asexuales de <i>E. tenella</i>	94
2.10.3	Vacuna de esporozoítos completos inactivados de <i>E. tenella</i>	94
2.10.4	Antígenos de esporozoítos y merozoítos de <i>E. tenella</i>	94
2.10.5	ELISA	95
2.10.6	Cuantificación de ooquistes y muestras serológicas	95
2.10.7	Diseño experimental	95
2.10.8	Parámetros usados para evaluar el nivel de inmunoprotección	97
2.10.9	Análisis estadístico	98
3.0	RESULTADOS	100
3.1	Cepa patógena de <i>E. tenella</i>	100
3.1.1	Aislamiento de la cepa de <i>E. tenella</i>	100
3.1.2	Purificación de la cepa de <i>E. tenella</i>	100
3.1.3	Propagación de los ooquistes esporulados de la cepa de <i>E. tenella</i>	100
3.1.4	Limpieza y desinfección de ooquistes de <i>E. tenella</i>	101
3.2	Obtención de esporoblastos y esporozoítos de <i>E. tenella</i>	102
3.2.1	Obtención de esporoblastos de <i>E. tenella</i>	102
3.2.2	Purificación de los esporoblastos obtenidos	104
3.2.3	Obtención y purificación de los esporozoítos de <i>E. tenella</i>	105
3.2.4	Obtención de antígenos solubles a partir de esporozoítos de <i>E. tenella</i>	116
3.3	<i>Merozoítos de segunda generación de E. tenella</i>	116
3.3.1	Obtención de merozoítos de segunda generación de <i>E. tenella</i>	116
3.3.2	Purificación de merozoítos de segunda generación de <i>E. tenella</i>	117
3.3.3	Obtención de antígenos solubles a partir de merozoítos de <i>E. tenella</i>	117
3.3.4	Cuantificación de antígeno de esporozoítos y merozoítos de segunda generación por la técnica de Bradford	117
3.4.	<i>Determinación de dosis óptima de inmunización para obtener mayor cantidad de ooquistes, título y mejor inmunoreactividad de anticuerpos positivos a E. tenella</i>	117
3.4.1	Signos clínicos y mortalidad	117
3.4.2	Eliminación de ooquistes	118
3.4.3	Cinética temporal de la respuesta sérica de anticuerpos	118
3.4.4	SDS-PAGE de dos estadios asexuales del ciclo de vida de <i>E. tenella</i>	120
3.4.5	Reconocimiento antigénico de los antisueros de aves inmunizadas y desafiadas	121

3.4.6.	Análisis serológico de tres aves primo-inmunizadas con 5,000 ooquistes de <i>E. tenella</i> cada una	124
3.4.7	<i>Western blot</i> de tres antisueros de pollonas primo-inmunizadas con 5,000 ooquistes de <i>E. tenella</i> cada una	125
3.5	Evaluación inmunológica de los esporozoitos de <i>E. tenella</i>	126
3.5.1	<i>Titulación del antígeno de esporozoitos mediante ELISA indirecta</i>	126
3.5.2	Titulación con ELISA indirecta del suero hiperinmune de gallinas (<i>Gallus gallus</i>) con el antígeno del esporozoito de <i>E. tenella</i>	130
3.5.3	Titulación con ELISA indirecta del antígeno de merozoitos de segunda generación de <i>E. tenella</i>	131
3.5.4.	Titulación con ELISA del suero hiperinmune de ave contra el antígeno de merozoitos de segunda generación de <i>E. tenella</i>	133
3.5.5	Caracterización por <i>Western blotting</i> de polipéptidos en antígenos de esporozoitos y merozoitos de segunda generación de <i>E. tenella</i>	134
3.6	<i>Inmunoprotección con anticuerpos policlonales IgY de yema de gallinas inmunizadas contra E. acervulina, E. maxima y E. tenella administradas a aves SPF Leghorn infectadas con una cepa salvaje de E. tenella</i>	138
3.6.1	Antisuero contra ooquistes orales de <i>E. tenella</i>	138
3.6.2	Antisuero contra esporozoitos completos de <i>E. tenella</i>	139
3.6.3	SDS-PAGE de los anticuerpos IgY de Supracox®	140
3.6.4	ELISA de IgYs de Supracox® e IgYs de la yema de huevos de gallinas inmunizadas con esporozoitos completos de <i>E. tenella</i>	141
3.6.5	<i>Western blot</i> de Supracox® e IgYs de la yema de gallinas inmunizadas con esporozoitos completos de <i>E. tenella</i>	142
3.6.6	Eficacia de Supracox® en los parámetros de protección evaluados	144
3.6.7	Estudio histológico	145
3.7	<i>Inmunización con esporozoitos completos inactivados de E. tenella en conejos (Oryctolagus cuniculus) y gallinas (Gallus gallus)</i>	146
3.7.1	Reactogenicidad en los progamas de inmunización	146
3.7.2	Purificación, cuantificación y caracterización de las IgGs de conejo	149
3.7.3	Titulación por ELISA de las IgG purificadas del suero hiperinmune de conejo contra los antígenos esporozoito y merozoito de <i>E. tenella</i>	153
3.8	<i>Tamizaje de bibliotecas de péptidos desplegados aleatoriamente en fagos filamentosos M13 utilizando como ligandos anticuerpos IgG de conejo</i>	

	<i>(Oryctolagus cuniculus) versus el esporozoito completo de E. tenella</i>	155
3.8.1	Primer Tamizaje (Ensayo completo)	155
3.8.2	Reinicio Primer Tamizaje	166
3.8.3	Segundo Tamizaje	166
3.8.4	Tercer Tamizaje	168
3.8.5	Clonas individuales	169
3.8.6	Secuenciación del ADN de cada fagotopo	170
3.8.7	Análisis de las secuencias de cada clona seleccionada	171
3.8.8	Caracterización con ELISA de las clonas seleccionadas en el tercer tamizaje	174
3.8.9	Selección de clonas candidatas definitivas	178
3.8.10	Caracterización mediante ELISA del antisuero contra las clonas candidatas..	178
3.8.11	Caracterización por <i>Western blot</i> del suero anti- clona contra los antígenos del esporozoito y merozoito de segunda generación de <i>E. tenella</i>	180
3.9	<i>Inmunoprotección en pollos SPF Leghorn con inmunógenos individuales de las clonas F.1 y F.7 de Ph.D. c7c, clonas F.15 y F.18 de Ph.D. 12 mer, ante un desafío con una alta cantidad de ooquistes esporulados de E. tenella</i>	184
3.10	<i>Inmunoprotección de aves SPF Leghorn inmunizadas con inmunógenos mixtos de las clonas F.1, F.6 y F10' de Ph.D. c7c, F.11, F.15 y F.18 de Ph.D. 12 mer, frente a un desafío patógeno con E. tenella</i>	192
4.0	DISCUSIÓN	199
4.1	Cepa de <i>E. tenella</i> , aislamiento, replicación y recolección de ooquistes	199
4.2	Obtención de esporoblastos y esporozoitos de <i>E. tenella</i>	200
4.3	Obtención de merozoitos de segunda generación de <i>E. tenella</i>	202
4.4	Obtención de anticuerpos séricos policlonales positivos a <i>E. tenella</i> y valoración de la máxima cantidad de producción de ooquistes para generación de un lote experimental	203
4.5	Evaluación inmunológica de los esporozoitos de <i>E. tenella</i>	218
4.6	Inmunoterapia con IgYs policlonales de la yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas con <i>Eimeria</i> sp., en aves <i>SPF Leghorn White</i> infectadas con un dosis muy alta de una cepa salvaje de <i>E. tenella</i>	219
4.7	Inmunización con esporozoitos completos inactivados de <i>E. tenella</i> en conejos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) y aves (<i>Gallus gallus</i>) <i>SPF Leghorn</i>	229
4.8	Tamizaje de bibliotecas de péptidos desplegados en fagos M13 (12mer lin y c7c f) utilizando IgG de conejo <i>versus</i> el esporozoito de <i>E. tenella</i>	230

4.9	Inmunoprotección de aves <i>SPF Leghorn</i> inmunizadas con clonas individuales, frente a un desafío con una dosis alta de ooquistes esporulados de <i>E. tenella</i>	242
4.10	Inmunoprotección de aves <i>SPF Leghorn White</i> inmunizadas con inmunógenos mixtos compuestos, frente a un desafío patógeno con <i>E. tenella</i>	252
5.0	REFERENCIAS	262
6.0	ANEXOS	299
6.1	ANEXO 1.- Protocolo de limpieza de los ooquistes de <i>E. tenella</i>	299
6.2	ANEXO 2.- Protocolo de ruptura de los ooquistes de <i>E. tenella</i>	300
6.3	ANEXO 3.- Protocolo para la obtención y purificación de los esporozoitos de <i>E. tenella</i>	301
6.4	ANEXO 4.- Análisis de puntos críticos durante el proceso de obtención de los antígenos solubles provenientes de esporozoitos de <i>E. tenella</i>	303
6.5	ANEXO 5. Purificación de IgGs de conejo vs esporozoitos de <i>E. tenella</i> por cromatografía de afinidad (<i>Protein G Sepharose™ 4 FF</i> , GE HLS)	304

Lista de Tablas

Tabla 1	Principales características patogénicas y patológicas de las especies de <i>Eimeria</i> de las gallinas domésticas (<i>Gallus gallus</i>)	11
Tabla 2	Diseño experimental de infección y grupos	68
Tabla 3	Protocolo de inmunización con esporozoitos completos de <i>E. tenella</i>	73
Tabla 4	Ejemplo títulos de fagos m13 en los eluifos y amplificados de cada biblioteca	78
Tabla 5	Curva de eliminación de ooquistes por gramo de heces durante el periodo de prepatencia en doce aves desafiadas con 1×10^4 ooquistes de <i>E. tenella</i>	101
Tabla 6	Porcentaje de recuperación de ooquistes totales de <i>E. tenella</i> durante el proceso de obtención de ooquistes esporulados	102
Tabla 7	Fraccionamiento de la tercer extracción de ooquistes en solución salina saturada a partir del pellet obtenido en el lavado de la segunda extracción	102
Tabla 8	Cuantificación del contenido de proteína en las muestras de esporoblastos utilizando el reactivo de Bradford	104
Tabla 9	Cuantificación de proteína en muestras de pellets y sobrenadantes de esporozoitos de <i>E. tenella</i> utilizando el reactivo de Bradford	106
Tabla 10.	Cuantificación de proteína en muestras específicas de esporozoitos de <i>E. tenella</i> utilizando el reactivo de Bradford	106
Tabla 11.	Cantidad de esporoblastos por mL en cada una de tres fases de separación por medio de Percoll al 50%	108
Tabla 12.	Rendimiento porcentual de esporozoitos obtenidos en tres lotes de ooquistes de diferente origen	115
Tabla 13.	Parámetros fisiológicos de protección de IgYs de yema de gallinas inmunizadas con <i>Eimeria</i> sp en una infección con una alta dosis de ooquistes de <i>E. tenella</i>	144
Tabla 14.	Inmunoprotección de las IgYs de yema de gallinas inmunizadas con <i>Eimeria</i> sp en una infección con una alta cantidad de ooquistes de <i>E. tenella</i>	144
Tabla 15.	Prueba de Bradford para determinar la cantidad de $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de inmunoglobulinas de conejo purificadas por cromatografía de afinidad con la proteína G	152

Tabla 16.	Tamizaje de <i>Phage display</i> de las bibliotecas 12mer lin y c7c f con IgGs purificadas de conejos hiper- inmunizados con Szs completos de <i>E. tenella</i>	156
Tabla 17.	Título de las clonas de fagos M13 amplificados (12mer lin)	156
Tabla 18.	Título de las clonas de fagos M13 amplificados (c7c f)	157
Tabla 19.	Secuencias de ADN de las clonas de fagos M13 amplificados en la biblioteca 12mer lin	160
Tabla 20.	Búsqueda bio- informática por BLAST <i>protein</i> ► <i>protein</i> * en la base de datos de <i>E. tenella</i> (taxid 5802) de las clonas seleccionadas de la biblioteca 12mer lin	161
Tabla 21.	Secuencias de ADN de las clonas de fagos M13 amplificados en la biblioteca c7c <i>constrained</i>	161
Tabla 22.	Bio- informática BLAST <i>protein</i> ► <i>protein</i> * en la base de datos de <i>E. tenella</i> (taxid 5802) de las clonas seleccionadas de la biblioteca c7c <i>constrained</i>	162
Tabla 23.	Títulos de tamizaje <i>Phage display</i> de bibliotecas 12mer lin y c7c f con IgGs de conejos previamente hiperinmunizados con esporozoitos de <i>E. tenella</i>	165
Tabla 24.	Titulación de fagos en la biblioteca Ph. D. 12mer y Ph. D. c7c	168
Tabla 25.	Títulos del tamizaje de <i>Phage display</i> de las bibliotecas 12mer lin y c7c f con IgGs de conejos hiperinmunizados con esporozoitos completos de <i>E. tenella</i>	169
Tabla 26.	Secuencias de ADN de las clonas de fagos M13 amplificados en la biblioteca 12mer lin	170
Tabla 27.	Secuencias de ADN de las clonas de fagos M13 amplificados en la biblioteca <i>cyclic 7 cistein mer fold</i>	171
Tabla 28.	Bio- informática BLAST <i>protein</i> ► <i>protein</i> * en base de datos de <i>E. tenella</i> (taxid 5802) de las clonas de la biblioteca 12 mer lin, 20 clonas	172
Tabla 29.	Bio- informática BLAST <i>protein</i> ► <i>protein</i> * en base de datos de <i>E. tenella</i> (taxid 5802) de las clonas de la biblioteca c7c lin, 14 clonas	173
Tabla 30.	Bio- informática BLAST <i>protein</i> ► <i>protein</i> * en base de datos de <i>E. tenella</i> (taxid 5802) de las clonas de la biblioteca c7c lin, 5 clonas	174
Tabla 31.	Efecto de la inmunización de aves <i>SPF Leghorn</i> con cuatro mimotopos individuales del esporozoito de <i>E. tenella</i> frente al desafío con 3×10^4	

	ooquistes esporulados de <i>E. tenella</i>	186
Tabla 32.	Efecto de la inmunización de aves Leghorn con dos diferentes mezclas de mimótopos (Bibliotecas Ph. D. c7c y 12 mer) del esporozoito de <i>E. tenella</i> , frente al desafío con 1×10^4 ooquistes de <i>E. tenella</i> al día 25 de edad	193

Lista de Figuras

Figura 1.	Esquematación del ciclo de vida de <i>Eimeria</i> sp y estructura simplificada del esporozoito de <i>Eimeria</i> sp	6
Figura 2.	Protocolo de inmunización en aves híbridas <i>Rhode Island red</i> x <i>Hampshire</i> x <i>Plymouth Rock Barred</i> iniciando con 5,000 y 10,000 ooquistes esporulados	54
Figura 3.	Esquema de inmunización en conejos <i>New Zealand White</i> de 1.5 meses de edad con las cuatro clonas candidatas seleccionadas y el fago M13 <i>wild type</i>	84
Figura 4.	Prueba de potencia en aves <i>SPF Leghorn White</i> desafiadas oralmente con 30,000 ooquistes esporulados de <i>E. tenella</i> /ave al día 21 de edad ...	90
Figura 5.	Prueba de potencia en aves <i>SPF Leghorn White</i> inmunizadas al día 3, 13 y 20 de edad con seis fagos de clonas candidatas	96
Figura 6.	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de muestras de ooquistes con dos procedimientos de ruptura distintos	105
Figura 7.	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de muestras de esporozoitos de <i>E. tenella</i> e inmunoglobulinas Y purificadas	107
Figura 8.	Excreción de ooquistes en heces por ave después de la inmunización primaria con una dosis individual de 5,000 ó 10,000 ooquistes esporulados	119
Figura 9.	Dinámica sérica en ELISA hacia antígenos de Sz y Mz con suero de aves inmunizadas oralmente con 5,000 o 10,000 ooquistes de <i>E. tenella</i> .	120
Figura 10.	Polipéptidos del esporozoito (Sz) y segunda generación del merozoito (Mz) de una cepa salvaje de <i>E. tenella</i> definida en un gel de SDS-PAGE al 12%	121
Figura 11.	Proteínas del Sz y Mz de <i>E. tenella</i> reconocidas en inmunoblots con una mezcla de suero de aves inmunizadas con 5,000 y 10,000 ooquistes/ave	122
Figura 12.	Reactividad hacia los antígenos Sz y Mz de tres antisueros individuales de aves previamente inmunizadas con 5,000 ooquistes de <i>E. tenella</i> /ave.	124
Figura 13.	Inmunotransferencias de Sz y Mz de <i>E. tenella</i> probados con tres sueros individuales de aves inmunizadas primariamente con 5,000 ooquistes/ave	126
Figura 14.	Respuesta en ELISA del antisuero de gallina <i>versus E. tenella</i> (suero referencia 3 "B") a diferentes diluciones del SN de esporozoitos de <i>E.</i>	

	<i>tenella</i>	127
Figura 15.	Reactividad ELISA del antisuero de referencia de gallina <i>versus E. tenella</i> (3 “B”) a diferentes diluciones de un SN de antígenos de Sz de <i>E. tenella</i>	128
Figura 16.	Respuesta del antisuero de referencia de gallina <i>versus E. tenella</i> (3 “B”) a diferentes diluciones de los antígenos del pellet de esporozoitos de <i>E. tenella</i>	129
Figura 17.	ELISA indirecta que mide la reactividad del antisuero de referencia de gallina vs <i>E. tenella</i> (2 “A”) a diferentes diluciones de antígenos del Sz de <i>E. tenella</i>	129
Figura 18.	ELISA indirecta de un antisuero de gallina <i>versus E. tenella</i> (A) con una dilución decreciente en µg de un SN de antígeno del esporozoito de <i>E. tenella</i>	130
Figura 19.	Reactogenicidad en ELISA de dos antisueros de gallinas vs <i>E. tenella</i> (A y B) hacia diluciones de un SN de antígeno de esporozoitos de <i>E. tenella</i>	131
Figura 20.	Reactividad en ELISA del SN y <i>pellet</i> del merozoito de 2ª generación de <i>E. tenella</i> (Mz15= 10 µL/pz) hacia el antisuero del programa “A” contra <i>E. tenella</i>	132
Figura 21.	ELISA del SN de Sz y Mz hacia el antisuero de gallinas inmunizadas primariamente con 5,000 ó 10,000 ooquistes esporulados de <i>E. tenella</i> ..	133
Figura 22.	Inmunorreactividad en ELISA de la dilución de dos antisueros de gallinas hiperinmunizadas <i>versus E. tenella</i> (A y B) contra un SN de Mz de <i>E. tenella</i>	134
Figura 23.	Reactogenicidad en ELISA de dos antisueros de gallinas hiperinmunizadas <i>versus E. tenella</i> (A y B) contra el pellet de Mz de <i>E. tenella</i>	135
Figura 24.	Electroforesis en gel de acril- bisacrilamida (12%) teñido con azul brillante de <i>Coomassie</i> con dos diferentes concentraciones de polipéptidos de Sz y Mz	136
Figura 25.	Electroforesis con diferentes concentraciones de fracciones solubles y <i>pellets</i> de Sz y Mz de <i>E. tenella</i> evaluados en SDS-PAGE (15%)	136
Figura 26	<i>Western blott</i> de fracciones solubles de Sz y Mz a diferentes concentraciones identificadas con el antisuero 2 “A” en membrana PVDF	137
Figura 27.	<i>Western blot</i> de Sz, pellet Sz, ooquistes esporulados y esporoblastos de	

	<i>E. tenella</i> con antisuero de aves inmunizadas con 10,000 ooquistes	137
Figura 28.	Dinámica de la reactividad de anticuerpos hacia los SN de antígenos del Sz y Mz de <i>E. tenella</i> de aves inmunizadas oralmente con <i>E. tenella</i>	138
Figura 29.	Dinámica de reactogenicidad de anticuerpos hacia los SN de antígenos del Sz y Mz de <i>E. tenella</i> de aves inmunizadas con esporozoitos completos de <i>E. tenella</i>	139
Figura 30.	Patrón electroforético de inmunoglobulinas IgY purificadas (Supracox™) en un gel de duodecil sulfato de sodio acril- bisacrilamina al 12%	140
Figura 31.	Reactividad en ELISA de Supracox®, IgY de la yema de huevo de aves SPF inmunizadas con Sz de <i>E. tenella</i> , antisuero positivo y negativo de referencia	141
Figura 32.	Inmunotransferencias de Supracox®, IgY de la yema de huevo de aves SPF inmunizadas con Sz de <i>E. tenella</i> , antisuero positivo y negativo de referencia	143
Figura 33.	Dinámica de anticuerpos contra el antígeno de esporozoitos y merozoitos en conejos y aves SPF después de la inmunización con esporozoitos inactivados completos de <i>E. tenella</i>	146
Figura 34.	<i>Western blot</i> de Sz y Mz probados con antisueros de conejos y aves SPF inmunizados con esporozoitos de <i>E. tenella</i> y suero positivo a <i>E. tenella</i> de referencia	147
Figura 35.	Espectrofotometría a 280 nm de las 8 fracciones obtenidas en el lavado .	148
Figura 36.	Electroforesis de las fracciones purificadas de IgG de conejo obtenidas por cromatografía de afinidad en Sepharosa 4 B FF	149
Figura 37.	<i>Western blot</i> de las fracciones de IgG de conejo obtenidas por cromatografía de afinidad en Sepharosa 4 FF	150
Figura 38.	Espectrofotometría a 280 nm de las 5 fracciones del eluido obtenido	151
Figura 39.	Reactividad espectroscópica de albúmina sérica bovina utilizada como patrón para la curva de correlación proteica con el reactivo de Bradford ..	153
Figura 40.	Reactividad en ELISA de tres fracciones de inmunoglobulinas IgG de conejo purificadas con proteína G 4 FF hacia antígenos de dos zoitos asexuales de <i>E. tenella</i>	154
Figura 41.	Reactogenicidad en ELISA de un <i>pool</i> de tres fracciones de inmunoglobulinas IgG de conejo purificadas con proteína G 4 FF y antisuero original vs antígenos de <i>E. tenella</i>	154

Figura 42.	ELISA indirecta de las clonas seleccionadas de la biblioteca 12mer lin utilizando suero hiperinmune de conejo <i>versus</i> los Szs de <i>E. tenella</i>	157
Figura 43.	ELISA indirecta de las clonas seleccionadas de la biblioteca c7c <i>const</i> utilizando suero hiperinmune de conejo <i>versus</i> los Szs de <i>E. tenella</i>	158
Figura 44.	ELISA indirecta de las clonas seleccionadas de la biblioteca 12mer lin utilizando suero hiperinmune de aves <i>SPF versus</i> los Szs de <i>E. tenella</i> .	159
Figura 45.	ELISA indirecta de las clonas seleccionadas de la biblioteca c7c <i>const</i> utilizando suero hiperinmune de aves <i>SPF versus</i> los Szs de <i>E. tenella</i> ..	160
Figura 46.	ELISA indirecta de clonas seleccionadas de la biblioteca 12 mer utilizando antisuero hiperinmune (Herpesvirus, PrV) de aves <i>SPF Leghorn White</i>	163
Figura 47.	ELISA indirecta de clonas seleccionadas de la biblioteca c7c lin utilizando antisuero hiperinmune (Herpesvirus PrV) de aves <i>SPF Leghorn White</i>	164
Figura 48.	ELISA de diferentes clonas seleccionadas de la biblioteca c7c y 12 mer con anticuerpos primarios vs Laringotraqueítis aviar (X-OVO England) ...	165
Figura 49.	Inmunorreactividad en ELISA indirecta hacia antígenos de <i>E. tenella</i> de IgGs purificadas de conejos hiperinmunizados contra el Sz de <i>E. tenella</i> .	167
Figura 50.	Gel de agarosa al 1% con ADN de 20 clonas seleccionadas a partir del tamizaje de la biblioteca 12mer lin y 20 clonas de la biblioteca c7c f	170
Figura 51.	ELISA indirecta de las clonas de la biblioteca 12mer lin utilizando suero hiperinmune (<i>versus</i> esporozoito completo de <i>E. tenella</i>) de conejos	175
Figura 52.	ELISA indirecta de las clonas de la biblioteca c7c <i>fold</i> utilizando suero hiperinmune (<i>versus</i> esporozoito completo de <i>E. tenella</i>) de conejos	176
Figura 53.	ELISA indirecta de las clonas de la biblioteca 12mer lin utilizando suero hiperinmune (<i>versus</i> esporozoito completo de <i>E. tenella</i>) de aves <i>SPF</i> ...	177
Figura 54.	ELISA indirecta de las clonas de la biblioteca c7c <i>fold</i> utilizando suero hiperinmune (<i>versus</i> esporozoito completo de <i>E. tenella</i>) de aves <i>SPF</i> ...	178
Figura 55.	Cinética de anticuerpos de conejos inmunizados con clonas de fagotopos seleccionados de dos bibliotecas de <i>Phage display</i> y un fago M13 irrelevante	179
Figura 56.	<i>Western blot</i> del esporozoito y merozoito de segunda generación de <i>E. tenella</i> con sueros de conejos anti-clona y un fago M13 irrelevante	181
Figura 57.	<i>Western blot</i> del esporozoito y merozoito de <i>E. tenella</i> , con antisuero de	

	conejos 3 y 4, ambos inmunizados con el fago M13 mp19	183
Figura 58.	<i>Western blot</i> del fago filamentoso M13 mp19 <i>wt</i> probado con suero anti-clona M13 mp19 de los conejos número 3 y número 4	183
Figura 59.	Peso corporal (g) de aves SPF inmunizadas con cuatro clonas individuales de la biblioteca Ph.D. c7c, y Ph.D. 12mer, y grupos control (vacuna, fago y testigos)	184
Figura 60.	Ganancia relativa de peso de aves SPF inmunizadas con cuatro clonas individuales (Ph.D. c7c, y Ph.D. 12mer), y grupos control (vacuna, fago M13 y testigos positivo y negativo)	185
Figura 61.	Cantidad de ooquistes en aves SPF inmunizadas con cuatro clonas individuales (Ph.D. c7c, y Ph.D. 12mer), y grupos control (vacuna, fago M13 y testigos positivo y negativo)	187
Figura 62.	Calificación de Lesiones en aves SPF inmunizadas con cuatro clonas individuales (Ph.D. c7c, y Ph.D. 12mer), y grupos control (vacuna, fago y testigos positivo y negativo)	188
Figura 63.	Mortalidad en aves SPF inmunizadas con 4 clonas individuales (Ph.D. c7c, y Ph.D. 12mer), y grupos control (vacuna, fago y testigos + y -)	189
Figura 64.	Índice de protección anticoccidiana en aves SPF inmunizadas con 4 clonas individuales (Ph.D. c7c, y Ph.D. 12mer), y grupos control	190
Figura 65.	ELISA indirecta en aves SPF inmunizadas con cuatro clonas individuales (Ph.D. c7c, y Ph.D. 12mer), y grupos control (vacuna, fago y testigos positivo y negativo)	191
Figura 66.	Ganancia relativa de peso en aves SPF inmunizadas con dos mezclas de clonas (Ph.D. c7c, y Ph.D. 12mer), y grupos control (vacuna, fago y testigos positivo y negativo)	192
Figura 67.	Viabilidad en aves SPF inmunizadas con 2 mezclas de clonas (Ph.D. c7c, y Ph.D. 12mer), y grupos control (vacuna, fago M13 y testigos + y -).	194
Figura 68.	Calificación de Lesiones en aves SPF inmunizadas con 2 mezclas de clonas (Ph.D. c7c, y Ph.D. 12mer), y grupos control (vacuna, fago y testigos positivo y negativo)	195
Figura 69.	Cantidad de ooquistes en aves SPF inmunizadas con dos mezclas de clonas (Ph.D. c7c, y Ph.D. 12mer), y grupos control (vacuna, fago y testigos positivo y negativo)	196
Figura 70.	Índice de protección anticoccidiana en aves SPF inmunizadas con 2	

	mezclas de clonas (Ph.D. c7c, y Ph.D. 12mer), y grupos control	196
Figura 71.	ELISA indirecta en aves SPF inmunizadas con dos mezclas de clonas (Ph.D. c7c, y Ph.D. 12mer), y grupos control (vacuna, fago M13 y testigos positivo y negativo)	197

Lista de Abreviaturas

Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ADCC	Citotoxicidad celular mediada dependiente de anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AMA	Antígeno de membrana apical
ANDEVA	Análisis de varianza
BCR	Complejo receptor- células B antígeno-específico
BSA	Albúmina sérica bovina
CA	Conversión alimenticia
CBB	Azul brillante de Coomassie
Cr₂K₂O₇	Dicromato de potasio
Cs-A	Ciclosporina A
CD	Determinante de grupo inmunológico
CDR	Region complementaria determinística del anticuerpo
cfu	Unidades formadoras de colonias
CH	Región constante del anticuerpo
CPA	Célula presentadora de antígenos profesional
CV	Coeficiente de variación
Φ	Diámetro
DAB	3,3'-diaminobencidina
DC	Células dendríticas
DE	Desviación estándar
DEO	Tasa de disminución en la eliminación de ooquistes
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EF-2	Factor de elongación- 2
EF-1α	Factor de elongación- 1 α
EGF-like	Parecido al factor de crecimiento epidermal
ELISA	Prueba de reacción ligada a enzimas
ESM	Error estándar de las medias
EtMIC2	Proteína micronemal 2 de <i>E. tenella</i>
F	Fagotopo
Fab	Fragmento de unión al antígeno

FcY	Receptor de cadena pesada
FF	Flujo rápido
GALT	tejido linfoide asociado al intestino de los pollos
GAM	Antígeno del gametocito
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GDP	Ganancia diaria de peso
GLM	Modelo lineal general
GRP	Ganancia relativa de peso
GPC	Ganancia de peso corporal
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico
HCT	Porcentaje de hematocrito
HE	Heterófilos
HRP	Peroxidasa de rabano
HSP	Proteína de choque calorífico
IAC	Índice anticoccidial
ID	Inmunizado- Desafiado
IgG	Inmunoglobulina G
igM	Inmunoglobulina M
IgY	Inmunoglobulina Y
IFN-γ	Interferon Gamma
IPSL	Índice protectivo basado en calificación de severidad de lesiones
IMP	Proteína mapeada inmune
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil β-D-1 tiogalactopiranósido
kDa	Kilo daltones
LAP	Leucina aminopeptidasa
LB-Xgal	Caldo Luria con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido
LB	Linfocitos B
LT	Linfocitos T
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz – Tiempo de vuelo
mA	Miliamperios

Ma	Mastocitos
MAbs	Anticuerpos monoclonales específicos
MΦ	Macrófagos
M	Peso molecular estándar
MDO	Máxima densidad óptica
MIC	Micronemal
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MJ	Unión- móvil de membrana
MO	Microorganismo (s)
MOI	Multiplicidad de infección
MS	Espectrometría de masas
Mz	Merozoito
NaCl	Cloruro de Sodio
NCBI	Centro Nacional de Información sobre Biotecnología
NID	No inmunizado-Desafiado
NIND	No inmunizado- No desafiado
NK	Células asesinas naturales
NF-κβ	Factor mediador intracitoplasmático Kappa-Beta
OD	Densidad óptica
OGM	Organismos genéticamente modificados
OmpU	Proteína de membrana externa U
O/N	Toda la noche
OPD	Orto-fenil- endiamina
OPGH	Ooquistes por gramo de heces
OPGT	Ooquistes por gramo de tejido de sacos ciegos
ORF	Marco de lectura abierto
OTUs	Unidades taxónomicas operacionales cripticas
PBS	Solución salina tampon o bufferada
PCR	Prueba de reacción en cadena de la polimerasa
PD	Post-desafío
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrogeniones
Ph D	Desplegamiento de péptidos en fagos
PI	Post-infección

PrV	Herpesvirus pseudorabia (Aujesky)
PVDF	Membrana de difluorido polivinilidano
PV	Vacuola Parasitófora
ROPGH	Porcentaje protección basado en reducción de ooquistes eliminados
SAG	Antígeno de superficie
SN	Sobrenadante
Sc	Subcutánea
SC	Producto comercial Supracox®
scFv	Fragmento variable de cadena única
SDS-PAGE	Gel de eletroforesis de poliacrilamida sulfato duodecilo sódico
SO7	Cuerpo refráctil en esporozoitos de <i>Eimeria sp</i>
SPF	Libres de patógenos específicos
SS	Super sensible
SSS	Solución salina saturada (>5M NaCl)
Sz	Esporozoito
TAE	Tris-acetato-EDTA
TAXA	Grupo taxonómico
TCR	Receptores- de células T antígeno-específico
TGF-β	Factor de crecimiento tisular beta
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TΦ	Agar LB del tope superior
TRAP	Proteína adhesiva relacionada con trombospondina
TSP-1	Trombospondina 1
UCE	Proteína con dominio de la enzima conjugadora de ubiquitina
UFP	Unidades formadoras de placas
V	Voltios
VENC	Virus de la enfermedad de Newcastle
VH	Fracción variable de la cadena pesada
VL	Fracción variable de la cadena ligera
WB	<i>Western blot</i>
wt	<i>Wild type</i> (Tipo salvaje o de campo)
Xi²	Prueba Chi cuadrada

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de *Eimeria* en la avicultura

Conforme la población humana continúa en incremento existe un aumento de la presión para maximizar la producción de alimentos con el fin de cubrir su creciente demanda. A la par existe un aumento en el requerimiento del consumidor por productos alimenticios de origen animal que sean producidos bajo estrictas medidas de inocuidad (UNA, 2021). La industria avícola se encuentra bajo constante presión para maximizar la productividad y retorno económico mientras al mismo tiempo se promueve el bienestar animal, la obtención de carne de alta calidad y una rápida accesibilidad a los productos destinados a satisfacer la demanda del consumidor final. La producción avícola es una de las actividades pecuarias más dinámicas de crecimiento mundial aportando casi una tercera parte de la proteína de origen animal destinada al consumo humano, en México es la de mayor consumo *per capita* anual (24.06 kg de huevo y 33.56 kg de carne de pollo) (UNA, 2021). Se ha pronosticado que la expansión de la producción avícola mundial continuará al menos durante los próximos 30 años, lo cual hace que esta actividad productiva se encuentre sujeta a enormes desafíos en lo relativo a prevención y control de los principales agentes patógenos que la afectan, además de implementar mejoras continuas en las prácticas de producción (Blake et al., 2020a). La producción de aves domésticas se enfrenta cotidianamente a diferentes riesgos, dentro de los cuales las enfermedades infecciosas son muy importantes, entre ellas destacan coccidiosis aviar, influenza aviar, enfermedad de Newcastle, Salmonelosis aviar, Paratifoideas, Marek, enteritis necrótica y otras. Entre todas estas enfermedades, las de tipo entérico son una preocupación constante para la industria avícola, no solo debido a las pérdidas acumuladas por el aumento en los costos de producción, mortalidad y reducción en el bienestar de las aves inherentes a las mismas, sino que constituyen también un riesgo constante de contaminación de los productos avícolas destinados al consumo humano. La coccidiosis aviar es causada por un protozoario intracelular del *phylum* Apicomplexa perteneciente a la familia Eimeriidae que incluye diferentes especies del género *Eimeria* (Ogedengbe et al., 2018). Es la enfermedad parasitaria más importante de las aves domésticas a nivel mundial y constituye la enfermedad parasitaria aviar que genera la mayor pérdida económica. Recientemente se determinó que por cada pollo producido globalmente se genera un costo de UK £0.16 (Blake et al., 2020a). En el Reino Unido se ha estimado que las pérdidas debidas a infecciones por coccidia durante el 2016 fueron de 99.2 millones de libras esterlinas (rango: £73.0–£125.5 millones), de los cuales el 74% se debió a los efectos clínicos y subclínicos de la enfermedad, el 26% restante se erogó en profilaxis y tratamientos

terapéuticos (Williams, 1999; Blake et al., 2020a). Este protozoario usualmente ataca, invade y prolifera en los tejidos epiteliales del intestino de su huésped, lo que resulta en daño severo e interrupción de la digestión y absorción de los nutrientes. Este compromiso en la función del intestino conduce a un crecimiento deficiente y grandes pérdidas económicas debidas a la enfermedad (Blake et al., 2020a). En México, la coccidiosis es la enfermedad parasitaria más importante del sector avícola, actualmente se desconoce la cantidad exacta de pérdidas por esta enfermedad, sin embargo, con base a un modelo de compartimentalización categórico se consideran márgenes de pérdida similares a las categorías observadas en el Reino Unido, USA, Venezuela y Brasil (Blake et al., 2020a). Hace 20 años, Moreno et al (2001) describió que el costo únicamente por el uso de fármacos anticoccidianos en México era de 300 millones de pesos al año, esto sin incluir los costos por tratamientos terapéuticos o las pérdidas económicas atribuidas a la presentación subclínica vinculada a este padecimiento, si consideramos que la producción de pollo de engorda ha tenido un crecimiento medio anual cercano al 2.4% durante al menos los dos últimos lustros (2009-2019) (UNA, 2021), el costo actual debido a los efectos negativos de esta enfermedad en la avicultura nacional son altamente significativos. Además, a diferencia de otros países, en México la coccidiosis toma mayor relevancia debido a que se deben considerar pérdidas colaterales atribuidas a un castigo en el precio de comercialización al avicultor debido a una inapropiada pigmentación de la canal del pollo, la cual se atribuye principalmente a los efectos clínicos y subclínicos de esta enfermedad. Se deben considerar también las consecuencias de salud colaterales en las aves debida a complicaciones como disbiosis y enteritis necrótica. Cualquier afectación de la salud de las aves debida a coccidiosis clínica o subclínica repercute directamente en la calidad y precio del producto, y por lo tanto en el desenvolvimiento de la actividad, la cual en México es la más importante del sector pecuario (36.65% del PIB pecuario nacional) (UNA, 2021), situación que condiciona su permanencia en el mercado como uno de los alimentos de mayor valor nutrimental ofrecido al menor precio, pone en riesgo su abasto y conduce a un riesgo real en la seguridad alimenticia del país, riesgo que debe asumirse con responsabilidad por parte de todos los sectores involucrados, esto debido a la soslayada atención que se ha prestado a este padecimiento durante los últimos años debido al impacto real y mediático que han tenido otras enfermedades emergentes como Influenza Aviar o la enfermedad de Newcastle en su presentación velogénica.

Resumiendo, las principales pérdidas en México se deben a que la coccidiosis subclínica afecta los parámetros productivos, causa deterioro en la conversión alimenticia, retraso en el

crecimiento, disminución de peso corporal, mala uniformidad, un pobre rendimiento a la finalización, inadecuada pigmentación de la canal, aumento de decomisos en rastro y ocasionalmente de acuerdo a la especie de *Eimeria* involucrada (*E. tenella*, *E. necatrix*) puede presentarse un cuadro clínico con incremento significativo de mortalidad en la parvada (30-50%) (Moreno e Ibarra, 2002; Mesa et al., 2021). La resiliencia, alta tasa reproductiva y corto ciclo de vida del parásito aunado a las altas densidades de aves criadas en las casetas avícolas modernas garantizan que este parásito sea un patógeno omnipresente y altamente persistente dentro de las granjas avícolas de México y el mundo.

1.2 Etiología y ciclo de vida

La coccidiosis es producida en huéspedes vertebrados e invertebrados por un parásito protozario del género *Eimeria* del phylum Apicomplexa. Una gran proporción de animales domésticos son infectados por una o más especies de *Eimeria*. Se han descrito más de 1,200 especies de *Eimeria*, virtualmente cada una de ellas se encuentra restringida a una sola especie de huésped (Ogedengbe et al., 2016, 2018). La gallina doméstica puede ser infectada por *Eimeria tenella* junto con *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. mitis* y *E. praecox*, cada una de estas siete especies se desarrolla y coloniza un sitio específico del intestino de los pollos (Cowper et al., 2012; Ogedengbe et al., 2018). *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. tenella*, y *E. brunetti* comúnmente se consideran las especies de coccidia más importantes debido a ciertos factores como su mayor tasa de incidencia, fecundidad y patogenicidad. Aunque todas las especies pueden socavar la salud y el bienestar general de las aves *E. tenella* es la especie de *Eimeria* en pollos económicamente más importante, además de ser la más estudiada (Clark et al., 2017; Juárez-Estrada et al., 2021a). *Eimeria mitis* y *E. praecox* no se han asociado con enfermedades graves en aves de corral, pero se ha informado que reducen la eficiencia alimenticia en pollos (Conway et al., 1993). Regularmente *E. tenella*, *Eimeria necatrix* y *E. brunetti* se asocian con coccidiosis hemorrágica, mientras que *E. acervulina*, *E. maxima* *E. mitis* y *E. praecox* se vinculan en gran medida a patologías de malabsorción (Blake et al., 2015). Recientemente se han descrito tres nuevas especies de *Eimeria* de las gallinas domésticas, esta descripción se ha hecho basándose en sus características morfológicas, sitio de replicación específico, patología, periodo de prepatencia y principalmente en la secuenciación genómicas de tres unidades taxonómicas crípticas operacionales (OTU's), las cuales han sido descritas de manera recurrente en los dos últimos lustros (Clark et al., 2017; Blake et al., 2021a). La capacidad de estas OTU's para comprometer la ganancia de peso

de los pollos de engorda y escapar de la inmunidad inducida por las vacunas anticoccidiales disponibles comercialmente indica que podrían representar una futura amenaza para la salud, bienestar y productividad de las aves (Blake et al., 2021a).

Eimeria tiene un ciclo de vida directo (oral-fecal), las especies de *Eimeria* usualmente infectan un solo huésped durante todo su ciclo de vida por lo cual son tipo monogénico (López-Osorio et al., 2020). Presentan un ciclo coccidial de tres estadios principales, que involucran dos multiplicaciones asexuales (esquizogonia, conocida también como merogonia), esporogonia (fase de esporulación) y una multiplicación sexual (gametogonia). El estadio de transmisión infectante del parásito es el ooquiste esporulado, el cual es liberado a partir del huésped a través de las heces, el ooquiste cuenta con una pared oval o semi-esférica de doble capa *sui generis* de *Eimeria* que es muy resistente a las condiciones adversas del medio ambiente y que hacen que el ooquiste persista en el medio ambiente durante un largo periodo de tiempo (Belli et al, 2006). La esporogonia ocurre cuando los ooquistes que contiene un huevo o cigoto se ven sujetos a una división reductiva para formar cuatro esporoblastos haploides y cada esporoblasto se desarrolla a su vez para formar dos esporozoitos, cada uno con una pared celular diferenciada. Después de la ruptura del ooquiste en los ventrículos gástricos del ave, secuencialmente junto con la acción enzimática gastrointestinal del ave se liberan ambos esporozoitos en la luz intestinal y estos constituyen la fase infectante de *Eimeria* a nivel celular intestinal (Allen y Fetterer, 2002; Belli et al, 2009; Cowper et al., 2012). El proceso de esporulación se encuentra influenciado por la humedad relativa, la temperatura y los niveles de oxígeno, factores comúnmente presentes dentro de las casetas de crianza donde se efectúa la producción comercial de pollos de engorda, situación que se ve favorecida en lugares con climas cálido- húmedo o bien durante la temporada de lluvias (Mesa et al., 2021). El ciclo siempre inicia con un huésped susceptible que ingiere por accidente un ooquiste esporulado del medio ambiente (las aves escarban e ingieren), cada ooquiste esporulado contiene cuatro esporoblastos y cada esporoblasto contiene dos esporozoitos, por lo cual, cuando cada ooquiste se exquista en el intestino libera 8 esporozoitos móviles. Inmediatamente después de su ingesta y bajo la acción enzimática de los componentes liberados en el proventrículo el ooquiste se rompe gracias a las contracciones mecánicas del ventrículo gástrico (molleja), posteriormente en el primer tercio del duodeno bajo la acción de las enzimas liberadas por el páncreas (tripsina, quimotripsina) y las sales biliares de la vesícula del ave los esporoblastos liberan a los esporozoitos, los cuales de forma activa por medio de la formación de un complejo específico de unión (*complex-juction, CJ*) (Besteiro et al., 2011) se adhieren a la membrana

celular y penetran a las células epiteliales del intestino en una ubicación específica, en el caso de las especies de *Eimeria* aviar invaden incluso activamente a linfocitos intraepiteliales y macrófagos que les sirven de transporte a capas epiteliales más profundas (Trout y Lillehoj, 1993, 1995; Dowse y Soldati, 2004; Frölich et al., 2012; Cowper et al., 2012; Li et al., 2020). La invasión exitosa de la célula huésped por el parásito apicomplejo depende de la secreción secuencial de proteínas y otras moléculas a partir de las roptrias, las micronemas y los gránulos densos, lo cual ayuda a formar la CJ y da como resultado la formación de la vacuola parasitófora (PV), la invasión es un proceso muy rápido que ocurre entre 10 y 15 segundos, una vez iniciada la invasión esta es irreversible (Morgan et al., 2007; Lamarque et al., 2011; Besteiro et al. 2011). Posterior a la adhesión, unión e invasión el parásito se encapsula dentro de la PV en el interior de las células huésped, lo cual le brinda acceso a nutrientes intracelulares y lo protege del sistema inmunitario del huésped (Morgan et al., 2007; Frölich et al., 2012). En un periodo de 12 a 48 horas se transforma en una etapa de alimentación y replicación conocida como trofozoíto. El trofozoíto se replica agrandándose y el núcleo se divide mediante un proceso de división asexual conocido como esquizogonia, en esta etapa el parásito se conoce como esquizonte de primera generación. El ciclo de vida del parásito involucra ambos estadios asexuales (esquizogonia) y sexual (gametogonia) de desarrollo. Después de una serie de divisiones nucleares de multiplicación (endodiotogénesis) y posterior a la citocinesis se produce una gran cantidad de merozoitos. La multiplicación de los merozoitos continúa dentro de la PV (división merogónica), esto obliga a que la célula infectada se rompa y cada merozoito (dotado también de complejo apical) se libere en la luz intestinal allí penetra en una nueva célula epitelial sana adyacente generando un nuevo ciclo de multiplicación. Se ha observado que cada especie de *Eimeria* está programada genéticamente para un número específico de divisiones merogónicas (esquizogonia), la mayoría muestran varias generaciones de forma continua (de dos a cuatro generaciones), A través de estos ciclos de replicación el parásito invade las células, daña el intestino y produce una patología grave. De hecho, la selección de diferentes cepas de *Eimeria* sp aviar con menor cantidad de generaciones acorta su periodo total de prepatencia, estas cepas producen menos daño al intestino y esta metodología selectiva constituye la base para la obtención de cepas precoces de tipo vacunal (McDonald et al., 1986; Shirley y Bedrnik, 1997; Kawasoe et al., 2005; Jorgensen et al., 2006). Después de la última generación merogónica específica de especie, los merozoitos invaden los enterocitos para diferenciarse en células masculinas (Microgametocitos, menos abundantes) y femeninas (Macrogametocitos, más abundantes) iniciándose así la fase sexual conocida como

gametogonia mediante la cual se produce una nueva generación de ooquistes diploides no esporulados. Los microgametocitos se producen a partir de microgametos, cuando se multiplican (endodiogénesis) en demasía rompen la célula infectada y se liberan hacia la luz intestinal donde fertilizan a los macrogametos al penetrar en los enterocitos que contienen a estos (Figura 1).

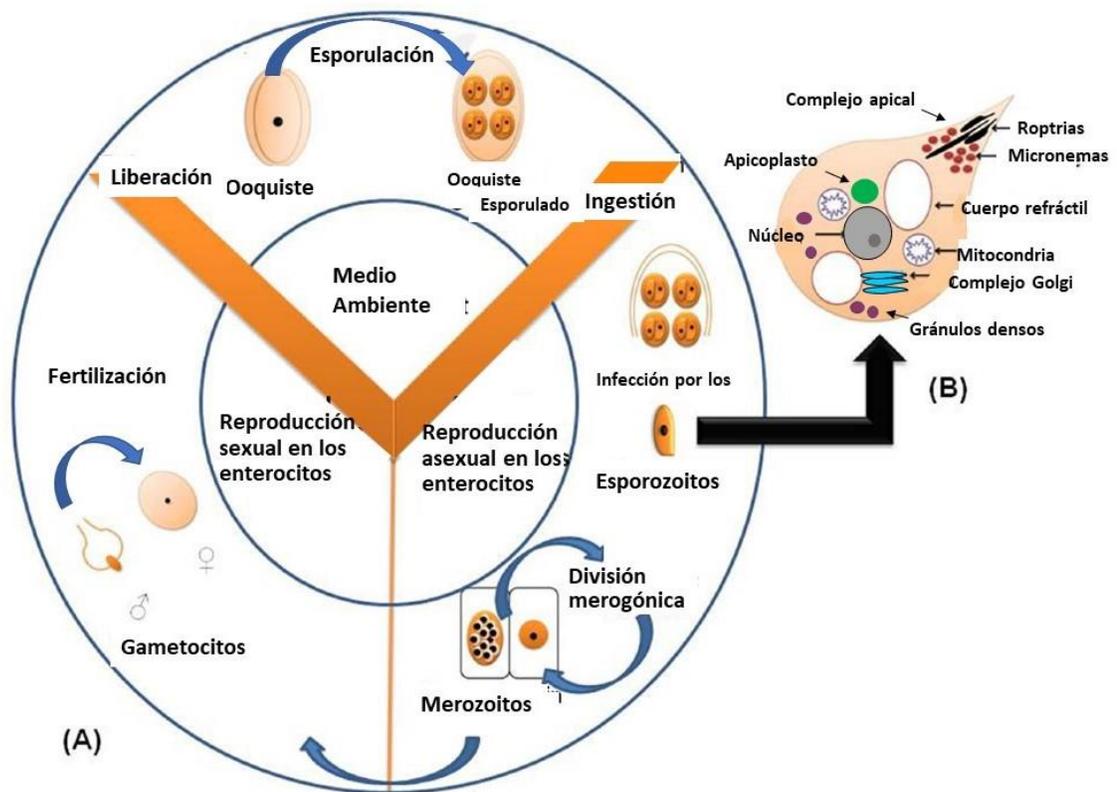


Figura 1. Esquematación del ciclo de vida de *Eimeria* sp (A) y estructura simplificada del esporozoito de *Eimeria* sp (B). Modificado de Ahmad et al (2016).

Posteriormente se producen huevos o cigotos que precipitan a su alrededor a partir de compuestos específicos (cuerpos formadores de la pared I y II) una doble pared gruesa de naturaleza proteica-quitinosa impermeable muy resistente, formando así los ooquistes completos (Belli et al, 2006, 2009). Después de la fertilización y formación completa de la pared, el oocisto se desprende de los enterocitos del hospedador eliminándose a través de las heces (Lillehoj y Trout, 1996, López-Orsorio et al., 2020). Conforme el parásito se desarrolla y multiplica, se observa la destrucción del tejido intestinal del huésped lo cual conduce a diferentes manifestaciones clínicas que se observan cuando existe un brote de la

enfermedad (Johnson y Reid, 1970; Williams, 1973, 2001; Soutter et al., 2021). Inicialmente, cuando el ooquiste se libera en las heces no se encuentra esporulado, contiene únicamente un solo huevo o cigoto el cual aún no es infeccioso. La tercera fase del ciclo de vida, la esporogonia, ocurre en el medio ambiente externo, bajo condiciones ambientales óptimas de oxígeno, calor y humedad, el ooquiste esporula y se forman 8 esporozoitos dentro del mismo, en ese momento se vuelve infeccioso (oocisto esporulado) y cuando un nuevo huésped susceptible ingiere accidentalmente el ooquiste esporulado, el ciclo de vida continúa (Figura 1).

Aunque cada especie de *Eimeria* que afecta a los pollos y su patología asociada se conoce desde la década de 1930 (Long et al., 1976), el alcance de la diversidad genética y las estructuras de población de estos parásitos apenas están emergiendo (Prakashbabu et al., 2017; Blake et al., 2020b, 2021a, 2021b). Estos nuevos desarrollos son resultado del interés sobre la epidemiología y diversidad de los parásitos debido a la necesidad mundial de la industria avícola por obtener vacunas efectivas y accesibles como alternativa a las drogas anticoccidianas (Clark et al., 2017; Prakashbabu et al., 2017; Blake et al., 2017; 2021a; Juárez-Estrada et al., 2021a). La reducción en los costos de secuenciación, una mayor eficiencia en los análisis bioinformáticos y la obtención de nuevos genomas de referencia han contribuido a abordar cada vez más nuevos estudios genómicos en estos parásitos (Reid et al., 2014; Prakashbabu et al., 2017; Hinsu et al., 2018; Blake et al., 2020b, 2021b). Para el caso específico de *Eimeria* aviar, la secuenciación de su genoma inició en 2002 analizando la cepa de referencia Houghton de *E. tenella* (Novaes et al., 2012). Actualmente después de más de una década de investigación de un consorcio de veinte instituciones diferentes en diez distintos países existen publicadas ya las secuencias del genoma de las siete especies de *Eimeria* que se encuentran asociadas con la coccidiosis en pollos (Reid et al., 2014). Estos estudios son fundamentales para ayudar a desarrollar mejores métodos de control de esta enfermedad (Prakashbabu et al., 2017; Hinsu et al., 2018; Blake et al., 2015, 2021b). La opinión negativa y la presión sobre el uso de agentes quimioterapéuticos por parte de los consumidores en los últimos años ha llevado a la promulgación de leyes que reducen el uso de antibióticos en la cadena alimentaria y han alentado la búsqueda de medidas alternativas de control (Morgan et al., 2007; Blake y Tomley, 2014; Juárez-Estrada et al., 2021a, 2021b). Entre las siete especies de *Eimeria* y las tres nuevas especies propuestas de OTU's existen ligeras diferencias a nivel fenotípico y molecular, estas se vinculan además del número de generaciones durante la fase de esquizogonia, a diferentes características físicas como tamaño, forma y color de los ooquistes, y características

biológicas y moleculares como el sitio anatómico de su desarrollo en el intestino del ave, periodo de prepatencia, duración del periodo de esporulación, grado de patogenicidad, tipo de lesión, grado de inmunogenicidad, capacidad de multiplicación y susceptibilidad particular a cada uno de los fármacos anticoccidianos (Li et al., 2020; Blake et al., 2020b, 2021b; Mesa et al., 2021). A pesar de estas ligeras variaciones entre especies, básicamente todas las especies muestran una patogénesis similar (López-Osorio et al., 2020).

1.2.1 Patogénesis y patología de *Eimeria* en la avicultura

De todas las especies de *Eimeria* aviar cinco de ellas producen lesiones patológicas relevantes y cuatro son más importantes en términos de afectación epidemiológica global e impacto económico (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* y *E. tenella*) (Williams, 1998; Sakkas et al., 2018; Blake et al., 2020). Las fases endógenas del parásito (esquizogonia y gametogonia) producen lesiones debido a que las células en las cuales los parásitos se desarrollan son estructural y funcionalmente dañadas, eventualmente son destruidas por el parásito o por el sistema inmune del huésped. El sitio de la infección dentro del intestino del ave varía de acuerdo a la especie de *Eimeria* involucrada; *E. acervulina* y *E. praecox* afectan principalmente el duodeno, *E. maxima*, *E. mitis* y *E. necatrix* el intestino medio, la infección puede extenderse al intestino posterior, *E. tenella* se desarrolla en los sacos ciegos donde *E. necatrix* completa también su desarrollo sexual y *E. brunetti* infecta el recto (Johnson y Reid, 1970). La magnitud de la infección y la diferente patogenicidad de las especies determina la extensión del daño causado al intestino (Johnson y Reid, 1970; Long et al., 1986; Williams 1973, 2001). Se ha documentado que las infecciones por *Eimeria* en aves de corral dificultan la digestión de diversos nutrientes y aditivos, especialmente de aminoácidos, vitaminas liposolubles, minerales y pigmentos, además de disminuir la mineralización ósea (Joyner et al., 1975; Su et al., 2014; Sakkas et al., 2018). Especies menos patógenas como *E. acervulina* y *E. mitis* producen una enteritis leve, mientras que especies altamente patógenas como *E. necatrix* y *E. tenella* causan la destrucción masiva de las vellosidades intestinales ocasionando hemorragias profusas, toxemia y muerte (Jeffers, 1975; Juárez et al., 2007; Su et al., 2014; Suprihati y Yunus, 2018). La infección por coccidia puede causar cambios en la permeabilidad de la mucosa intestinal que resultan en una fuga de proteínas plasmáticas hacia la luz del intestino, reducción de la motilidad intestinal y aumento del pH (Joyner et al., 1975; Juárez et al., 2007). Debido a la presencia de más de una especie en un brote, la falta de inmunidad cruzada entre especies y la competencia entre las especies de *Eimeria* por una región particular del intestino las lesiones usualmente son cronológicamente

secuenciales, esto puede complicar los cuadros patológicos, el efecto de estos en las aves y su diagnóstico apropiado sobre todo cuando la infección es mixta. La competencia por los mismos enterocitos entre *E. acervulina* y *E. mitis*, *E. praecox* y *E. maxima* o *E. tenella* y *E. necatrix* puede conducir a una preponderancia de especie e incluso de la misma fase del parásito. Se ha descrito un fenómeno conocido como "efecto de saturación" (*crowding effect*) que ocurre cuando hay competencia dentro y entre especies por una región particular del intestino que puede suceder cuando hay más de una especie involucrada en un brote (Williams, 1973). Regularmente el grado de extensión del daño patológico ocasionado se encuentra determinado por la cantidad inicial de ooquistes infectantes ingeridos (Williams, 1973, 2001; Suprihati y Yunus, 2018; Soutter et al., 2021). La cantidad de ooquistes viables depende a su vez de su tasa de esporulación en el ambiente.

Inmediatamente después de penetrar el epitelio superficial, los esporozoitos de *E. tenella* y *E. necatrix* son transportados por macrófagos y LT CD8+ a la lámina propia, específicamente a las glándulas de Lieberkühn donde ocurre su desarrollo posterior (Lillehoj and Trout, 1996). Los esquizontes de segunda generación de estas especies son responsables de profusas hemorragias (McDonald y Shirley, 1987; Juárez-Estrada et al., 2021b). *Eimeria tenella* induce un aumento de tamaño del ciego, la pared se engrosa, hay petequias, equimosis o sufusiones y a menudo se observa sangre sin coagular o parcialmente coagulada en la luz del órgano, en casos graves hay presencia de exudado caseoso (Jeffers, 1975; Johnson y Reid, 1970; Suprihati y Yunus, 2018; Juárez-Estrada et al., 2021b). La infección con *E. necatrix* en el tercio medio del intestino ocasiona enteritis con focos blancos opacos rodeados por hemorragias (Johnson y Reid, 1970; McDonald y Shirley, 1987). *Eimeria maxima* es moderadamente patógena y la mayor parte de la patología se debe a sus etapas sexuales, en una infección grave, la pared intestinal se engrosa y se observan abundantes petequias además de producción excesiva de moco, el cual es de color naranja (Johnson y Reid, 1970; Sakkas et al., 2018). *Eimeria acervulina* se considera una especie menos patógena. Por ejemplo, en aves infectadas experimentalmente, se requiere más de un millón de ooquistes para causar mortalidad, mientras que con *E. tenella* 3×10^4 ooquistes esporulados/ave son suficientes para matar a la tercera parte de las aves infectadas (Joyner et al., 1975; Kawazoe et al., 2005; Juárez-Estrada, et al., 2021a). Gran parte de la investigación sobre el efecto específico de la infección de *Eimeria* sobre la absorción de nutrientes se ha centrado en *E. acervulina*, debido a que esta especie infecta principalmente el duodeno, donde ocurre la mayor parte de la digestión y absorción de nutrientes (Joyner et al., 1975; Kawazoe et al., 2005;). La infección con *E. acervulina* se acompaña de absorción

deficiente de glucosa, grasas, aminoácidos, calcio, zinc, xantofilas, vitamina A y carotenoides (Joyner et al., 1975; Su et al., 2014; Frade-Negrete et al., 2016). Se ha observado que la actividad enzimática del borde de cepillo de las vellosidades intestinales disminuye significativamente en aves infectadas con *E. acervulina* y *E. mitis* (Kawazoe et al., 2005; Su et al., 2014). La pérdida de peso, eficiencia alimenticia y falta de pigmentación de las aves son una consecuencia frecuente en las infecciones clínicas y subclínicas por *E. acervulina* y *E. maxima* (Juárez et al., 2007; Su et al., 2014; Hamzik et al., 2015). En México un incremento de cepas resistentes a los anticoccidianos ha conducido a que el “*crowding effect*” ocasione que la reproducción autolimitante de *E. acervulina* se prolonge más en la vida del pollo de engorda, por lo cual las infecciones subsecuentes con *E. maxima* y *E. tenella* se presentan cada vez más tarde en la vida de estas aves lo cual provoca un efecto negativo más grave en pollos de más peso y mayor consumo de alimento (observación personal 2005-2006). Los estudios de digestibilidad ileal de aminoácidos en pollos de engorda vacunados y desafiados con una dosis alta mixta de *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* revelaron una reducción general en la digestibilidad de los aminoácidos con mayor efecto negativo para aminoácidos de cadena ramificada (Leu, Ile, Val), Thr y Cys (Joyner et al., 1975). El mecanismo exacto de la reducción de nutrientes en el intestino debido a la infección por *Eimeria* aún no es suficientemente claro, sin embargo, recientes trabajos de genética molecular han indicado una reducción en la expresión de genes responsables del transporte de aminoácidos en el intestino y una regulación a la baja de la enzima aminopeptidasa en el borde de cepillo del enterocito (Su et al., 2014). Bajo el microscopio, la patología incluye disminución en la longitud de vellosidades, microvellosidades y profundidad de las criptas del intestino lo cual puede indicar la extensión de la infección, en casos graves se observa inflamación, hemorragias, necrosis y apoptosis (Kawazoe et al., 2005; Suprihati y Yunus, 2018). Durante las primeras siete semanas de vida del pollo de engorda en México es común encontrar en la cama o las heces de una sola parvada al menos tres especies (Ej. *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*) (Moreno e Ibarra, 2002). Cinco de las especies, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. brunetti* y *E. necatrix*, son ampliamente conocidas e identificables debido a que producen lesiones características en el tracto digestivo, su patogenicidad varía de moderada a severa (Long y Joyner, 1984; Abu-Akkada et al., 2012) (Tabla 1). Al verificar si había correlación entre cantidad de ooquistes de *Eimeria*, el daño patológico producido y el rendimiento final de los pollos de engorda, se observó una correlación directa entre la abundancia de ooquistes de *E. maxima* en cama y la mortalidad

Tabla 1. Principales características patogénicas y patológicas de las especies de *Eimeria* de las gallinas domésticas (*Gallus gallus*)

Especie	Sitio de desarrollo	Patogenicidad	Lesiones macroscópicas y efectos
<i>E. acervulina</i>	Duodeno, Yeyuno (grave)	+++	Enteritis catarral con pérdida de fluidos, diarreas, mucosa blanca-amarillenta, malabsorción de nutrientes, placas blanquecinas desde serosa, apariencia de peldaños de escalera, intestino pálido. Deterioro crecimiento, mala absorción, empeora índice de conversión alimenticia.
<i>E. maxima</i>	Yeyuno e Ileón	+++	Balonamiento, inflamación de pared intestinal, petequias, equimosis y desprendimiento epitelial, moco naranja. Retraso del crecimiento, mala absorción, peor índice de conversión alimenticia.
<i>E. tenella</i>	Sacos ciegos	++++	Engrosamiento de pared cecal, contenido sanguinolento a caseoso, distensión cecal y destrucción de vellosidades, hemorragia extensa, anemia y mortalidad. Deterioro del desarrollo.
<i>E. necatrix</i>	Yeyuno, Ileón y Sacos ciegos	++++	Inflamación del intestino, engrosamiento de mucosa, luz llena de líquido, sangre y restos de tejido, placas negras y blancas con apariencia de sal y pimienta.
<i>E. brunetti</i>	Sacos ciegos y Recto	+++	Inflamación severa de pared intestinal, petequias y desprendimiento epitelial.
<i>E. mitis</i>	Ileón	++	Pérdida de líquidos como resultado de enteritis limitada, malabsorción.
<i>E. praecox</i>	Duodeno y Yeyuno	++	Moco, cilindros mucoides, contenido intestinal acuoso.

++ indican menor patogenicidad +++ indican patogenicidad moderada y ++++ indican alta patogenicidad

de los pollos, sin embargo, no se observó correlación entre los niveles de ooquistes y parámetros productivos (GDP y CA) (Hamzik et al., 2015).

Se ha reportado que *E. necatrix* es la especie de *Eimeria* más patógena que infecta a los pollos, sin embargo, *E. tenella* es mucho más común y tiene un mayor impacto en la producción avícola (Lee et al., 2012; Blake et al., 2015; Mesa et al., 2021).

1.2.2 Manifestaciones clínicas de la infección por *Eimeria*

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad se han categorizado en dos presentaciones, ambas se basan en el grado de patogénesis de la enfermedad. La presentación subclínica es la más común, usualmente no muestra signología médica aparente, presenta una interacción intermedia entre el parásito y el huésped, el cual puede manifestar baja eficiencia alimenticia, pérdida de energía, baja ganancia de peso e inapropiada pigmentación de la piel (Haug et al, 2008, Frade-Negrete et al., 2016; Soutter et al., 2020). Las aves susceptibles con coccidiosis clínica presentan decaimiento, alas caídas, diarrea mucosa o sanguinolenta, deshidratación, despigmentación y mortalidad. En pollo de engorda la tasa de crecimiento se afecta significativamente y en el caso de coccidiosis cecal presentan anemia (Juárez-Estrada et al, 2021b). Los pollos recuperados de la coccidiosis o aquellos con infecciones subclínicas generalmente se desempeñan de manera poco eficiente a lo largo de su vida. En México se afecta el grado de pigmentación del pollo de engorda destinado a comercializarse en pie y mercado público, lo cual repercute en incremento de pérdidas económicas para el productor y encarecimiento del producto para el consumidor final (Frade-Negrete et al, 2016). Los efectos de la infección son el resultado de la mala absorción de nutrientes lo cual se debe al daño del epitelio intestinal, adicionalmente la infección puede conducir también a una mayor susceptibilidad a agentes patógenos oportunistas. Los signos clínicos de la coccidiosis cecal incluyen anorexia, plumas erizadas, deshidratación severa, diarreas acuosas y sanguinolentas que regularmente son muy aparatosas, se altera la digestión, se produce mala absorción, hay disbiosis y aumento de susceptibilidad a patógenos oportunistas como *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Salmonella* sp y diferentes tóxicos del orden Clostridial y Enterobacteriaceae lo cual puede conducir a alta mortalidad, sobre todo en aves jóvenes (Arakawa y Ohe, 1975; Kimura, 1976; MacDonald et al., 2017; Chen et al., 2020; Zhou et al., 2020). La severidad de la infección también depende de la cantidad de ooquistes ingeridos, la presentación leve ocurre cuando las aves ingieren una cantidad baja de ooquistes, y una presentación moderada o severa se presenta cuando se ingiere una gran cantidad de ooquistes (Conway et al, 1993; Williams, 2001; Johnston et al., 2001; Suprihati y Yunus, 2018; Soutter et al., 2021). Ciertas prácticas deficientes de manejo como alta densidad de

aves y camas húmedas pueden aumentar la cantidad de ooquistes en cama y contribuir así a exacerbar los signos clínicos (Moreno e Ibarra, 2002; Lee et al., 2012; Mesa et al., 2021).

1.2.3 Diagnóstico de la coccidiosis aviar

Las especies de *Eimeria* patógenas usualmente se pueden diferenciar con base a la signología clínica de las aves afectadas, a la necropsia, las lesiones típicas infringidas y el sitio específico de replicación de las fases sexuales y asexuales, adicionalmente se pueden obtener ooquistes directamente de frotis intestinales o heces, posteriormente estos pueden ser identificados observándolos al microscopio con base a su morfología, tamaño y apariencia (Haug et al., 2008). Para un diagnóstico más preciso se pueden analizar histológicamente algunas de las etapas intracelulares del parásito, además de evaluar sus características reproductivas y biológicas como prolificidad, periodo de prepatencia, patencia y tiempo requerido para su esporulación. Con la finalidad de ayudar a un diagnóstico más certero se han implementado algunas técnicas bioquímicas y de biología molecular. Las primeras técnicas fueron desarrolladas para identificar a las diferentes especies basándose en el patrón de isoenzimas de los ooquistes (Shirley, 1975), después se implementaron pruebas de replicación y análisis de rARN y rADN (Haug et al, 2007). La técnica de PCR se considera como un método rápido y preciso que ha conducido a su consolidación como una técnica precisa de identificación (Haug et al, 2007; Ogedengbe et al., 2016, 2018; Soutter et al., 2021). Esta técnica permite la amplificación de secuencias específicas de ADN de unas cuantas copias a millones de ellas en solo un par de horas, las copias obtenidas se separan por electroforesis, se tiñen con un agente fluorescente (EthBr) y se pueden visualizar con UV. Adicionalmente la técnica de qPCR permite la cuantificación más aproximada de ooquistes en la muestra analizada (Soutter et al., 2021). La metodología de PCR diseñada para una identificación precisa a través de la secuenciación de los diferentes blancos seleccionados puede contribuir a determinar la incidencia, ocurrencia y carga parasitaria de las diferentes especies de *Eimeria* en el campo, esto ayudará en el futuro a una apropiada documentación de la evaluación de las medidas de control propuestas para la coccidiosis aviar (Haug et al, 2008; Ogedengbe et al., 2018; Soutter et al 2020, 2021). Existen estudios de identificación de antígenos específicos determinados por *Phage display* para la discriminación de *Eimeria* sp aviar, sin éxito aparente (U. Nottingham). Actualmente se está evaluando la metodología de citometría de flujo para el diagnóstico de especies de *Eimeria* a partir de ooquistes presentes en heces, sin embargo, esta evaluación ha sido a nivel experimental, por lo cual se requiere aún su amplia validación con muestras de campo.

1.3 Epidemiología de la coccidiosis aviar

Las aves susceptibles adquieren la infección por vía fecal-oral, esta ocurre únicamente después de la ingestión accidental de ooquistes esporulados. Los ooquistes se pueden encontrar en la cama, el alimento o el agua de bebida. Los pollos entre 3 y 18 semanas de edad son los más afectados por las diferentes especies de *Eimeria*, la infección con algunas de las especies puede causar alta mortalidad en aves jóvenes, de acuerdo a la estirpe hay aves que no desarrollan inmunidad apropiada hasta después de las 3 semanas de edad (Lillehoj, 1988). Cuando las aves en ausencia de inmunidad protectora están expuestas a dosis diarias de ooquistes esporulados excretan ooquistes de manera continua hasta por 25 días (Stiff y Bafundo, 1993; Chapman et al, 2005b). La mayor tasa de excreción de ooquistes es entre 3 y 7 semanas de edad (Williams, 1998; Lee et al, 2012), esto aumenta la susceptibilidad de las aves jóvenes a la infección y propagación del parásito, lo que significa que la infección puede persistir en la caseta durante largo tiempo. La producción continua de ooquistes es la clave para establecer la infección y generar autoinmunidad dentro de una parvada (Joyner y Norton, 1973; Stiff y Bafundo, 1993). El ambiente interno de la caseta afecta la tasa de acumulación de ooquistes en la cama (Moreno e Ibarra, 2002; Mesa et al., 2021). Debido a que las aves se crían en contacto con sus propias heces acumuladas en la cama, la enfermedad seguirá presentándose. El fotoperiodo es otro factor importante para la acumulación de ooquistes. Los ciclos de luz y oscuridad dentro de la caseta estimulan periódicamente a las aves a rascar activamente en la cama, lo que puede favorecer la aireación, esporulación e ingestión de ooquistes. Se ha propuesto que, durante las horas de oscuridad, el acceso a los anticoccidianos en el alimento se reduce debido a una menor ingesta de este lo cual favorece la invasión de las etapas extracelulares del parásito y puede conducir a una exacerbación de la enfermedad. El aumento de la cantidad inicial de ooquistes, la densidad de aves por área cuadrada y la mayor susceptibilidad innata de las aves jóvenes aumenta significativamente la probabilidad de infección por coccidia. Al ser una parasitosis generada por las condiciones en las que se crían las aves debe buscarse un equilibrio (ambiente-parásito-huésped) que no afecte el rendimiento de las aves, es importante enfatizar sobre el establecimiento de una apropiada vigilancia epidemiológica con la finalidad de obtener un mejor conocimiento sobre la eficacia de los programas de medicación y vacunación empleados (Lee et al., 2012). El agente causal específico de la coccidiosis cecal en las aves es *Eimeria tenella*, desde el punto de vista patogénico, inmunológico y epidemiológico es un padecimiento importante, ya que en forma conjunta con el manejo que se efectúa en gallinas y pollos criados en piso es prácticamente imposible de

erradicar; lo cual se ha complicado por las particularidades inmunogénicas ligadas a esta especie como son la falta de protección temprana en la vida del pollo de engorda o a su aparente baja capacidad inmunogénica (Rose y Long, 1962; Mocket y Rose, 1986; Williams, 1995; Shirley y Millard, 2007; Juárez et al, 2007). La coccidiosis muestra un alto impacto en la industria avícola principalmente porque la transmisión de estos parásitos se ve favorecida por las prácticas de producción moderna que implican la crianza intensiva de una gran cantidad de aves confinadas a un área muy reducida (Blake y Tomley, 2014; Snyder et al., 2021). Estas prácticas de crianza han conducido a un aumento en los niveles de estrés en las aves, y en consecuencia a un aumento en la incidencia de esta enfermedad (Yun et al., 2000). Por ejemplo, una caseta moderna de pollo de engorda puede alojar de 20,000 hasta 30,000 aves bajo un solo techo con densidades de población de hasta 33-36 kg/m², adicionalmente, puede haber hasta 10 casetas con estas características en una sola granja. Además, las áreas de la industria avícola tienden a estar restringidas a un sitio geográfico, por ejemplo, en México una de las zonas de mayor producción de pollo de engorda se encuentra confinada a unos cuantos municipios alrededor de la ciudad de Córdoba en el estado mexicano de Veracruz (UNA, 2021). Es así, que bajo las condiciones comerciales de crianza del pollo de engorda se proveen las condiciones ideales para la transmisión y permanencia del parásito dentro y entre las granjas (Chapman et al., 2016). Se ha observado que la coccidiosis es menos frecuente cuando el número de trabajadores en la granja y su movilidad de una granja a otra es limitado. En un estudio epidemiológico hecho en México sobre la incidencia de coccidia en una zona cálida y de alta humedad del estado de Veracruz, realizado a través de un muestreo longitudinal estratificado de siete diferentes granjas de una misma región, se identificó que las especies de *Eimeria* con mayor frecuencia fueron *E. tenella* (57%), *E. acervulina* (17%), *E. brunetti* (13%) y *E. maxima* (13%); la de mayor presencia en todas las granjas fue *E. tenella*, mientras que *E. acervulina* predominó en cuatro de las granjas, *E. brunetti* en dos y *E. maxima* solo en una (Moreno e Ibarra, 2002). En México, algunos estudios indican que la especie de *Eimeria* más comúnmente aislada es *E. tenella* (Moreno, 1980; Moreno et al., 2001; Moreno e Ibarra, 2002), especie que muestra un rango de infección del 45 al 75% y una mortalidad del 20 al 50% con repercusiones negativas severas en GDP, CA e incremento de aves seleccionadas (remolacha o churpios). En otros sitios del mundo *E. tenella* se ha diagnosticado como la especie de coccidia más comúnmente involucrada en infecciones de campo, Abu-Akkada et al., (2012) determinaron que en la producción avícola convencional de Egipto *E. tenella* es la coccidia más común en pollo de engorda, esta especie muestra un rango de infección en las parvadas de 20 a 100%

y una mortalidad del 20 al 60% que se acompaña de disminución en ganancia de peso y eficiencia alimenticia. Abu-Akkada et al., (2012) pudieron diferenciar distintos grados de patogenicidad entre cinco diferentes aislamientos geográficos de *E. tenella*. En un estudio hecho en 2019, Mesa et al (2021) determinaron que *E. tenella* mostró el segundo lugar de prevalencia en las cuatro principales regiones avícolas de Colombia solo después de *E. acervulina*. Recientemente, la genotipificación de un gran número de muestras de campo ha revelado la existencia de tres nuevas unidades taxonómicas operativas (OTUs) crípticas y divergentes de *Eimeria*, genotipos denominados OTUx, OTUy y OYUz que se describieron por primera vez en Australia en 2007 (Clark et al., 2017; Blake et al., 2020). OTUx, OTUy y OYUz están más relacionados con *E. maxima*, *E. brunetti* y *E. mitis* respectivamente que con otras especies. No se ha establecido al 100% si estas variantes pueden eludir la protección inmunológica ofrecida por las vacunas vivas usadas actualmente (Clark et al., 2017 Blake et al., 2020b; Blake et al., 2021a). Se ha informado que una de estas variantes estaba presente en un 100% de un caso reportado, y que una parvada en uno de estos dos grupos de aves que había sido vacunada con una vacuna viva mostró un problema de coccidiosis recurrente, lo que sugiere una posible evasión en la inmunoprotección por la vacuna. No debe disminuirse la importancia de comprender la estructura y distribución de la población coccidiana, porque esto constituye la base para explicar la epidemiología de la enfermedad y ayudará al desarrollo de medidas efectivas de prevención y control a largo plazo (Lee et al., 2012; Hinsu et al., 2018; Snyder et al., 2021; Mesa et al., 2021). El conocimiento de la diversidad antigénica de especies y cepas de campo circulantes, la probabilidad de coinfección por cepas genéticamente distintas y la comprensión de la eficacia de la protección cruzada contribuirá a generar una predicción válida sobre la longevidad y posible eficacia futura de las vacunas subunitarias y de ADN en condiciones de campo (Blake et al., 2020b, 2021a)

1.4 Prevención y control de la coccidiosis aviar

Históricamente, la forma más efectiva para el control de la coccidiosis clínica y subclínica ha sido agregar fármacos anticoccidianos de síntesis química y productos de fermentación biológica (antibióticos poliésteres ionóforos) en el alimento (quimioterapia profiláctica) o bien, a través de la vacunación (Allen y Fetterer, 2002; Lee et al., 2012; Chapman et al, 2016). Si bien estas medidas de control han hecho que la coccidiosis sea menos problemática que en el pasado, aún con innovaciones como el uso de programas rotativos (*Shuttle*) y combinados; recientemente debido al uso continuo e intensivo de los anticoccidianos se ha

observado el surgimiento de cepas de *Eimeria* sp., que se han vuelto significativamente resistentes a los fármacos (Abbas et al., 2011), ésta resistencia asegura la continua presencia de estos organismos donde quiera que un pollo es criado. Aunada a esta limitante y debido a que actualmente en México y el mundo existen movimientos pro- producción animal 100% inocua (orgánica) que han tomado un fuerte auge bajo un contexto de bienestar animal y promoción de la salud humana, se ha restringido y en algunos casos se ha prohibido la administración de sustancias químicas o Xenobióticos en la alimentación de los animales domésticos (LPOAA, 2013). El requerimiento de tolerancia cero en el contenido de residuos químicos en la carne de pollo y huevo para plato suscrito en la mayor parte de la legislación vigente relativa a inocuidad alimentaria y a la producción orgánica de alimentos de origen animal, ha incrementado el interés por el uso de vacunas de *Eimeria* sp, las que se encuentran permitidas para su uso en la mayor parte de sistemas de producción y constituyen una opción viable para el control de la coccidiosis aviar. Se han propuesto varios criterios para la selección de los ooquistes vacunales, es así que se han aplicado vacunas vivas virulentas con base a una composición o mezcla de diferentes especies de coccidia seleccionadas con base a su capacidad inmunogénica, índice coccidiano (multiplicidad a partir de un solo ooquiste) o su grado de sensibilidad a las drogas anticoccidiales comúnmente utilizadas; también se han usado vacunas vivas atenuadas (Shirley y Bedrnik, 1997; Jorgensen et al., 2006), además de vacunas de coccidia seleccionadas primariamente por ser benignas desde el punto de vista patogénico pero que aún conservan su capacidad inmunogénica. Sin embargo, bajo cualquier esquema de uso de vacunas de coccidia viva siempre existe el riesgo latente de un brote clínico con todas las repercusiones que este exhibe sobre la salud de las aves.

1.4.1 Puntos críticos del control y prevención de la coccidiosis aviar

En diferentes estudios de campo efectuados en los dos últimos lustros se han identificado algunos puntos críticos en la prevención y control de la coccidiosis, los cuales han conducido a graves fallas en el cuidado de la salud de los pollos de engorda. Uno de los puntos críticos se encuentra vinculado al uso indiscriminado y poco racional de los anticoccidianos de tipo químico y antibióticos ionóforos (principales herramientas de control químico-biológico del parásito) (Lee et al., 2012; Abbas et al., 2011; Mesa et al 2021). En México por ejemplo, el uso irracional de estos compuestos ha conducido al aumento en la presión de selección genética de cepas de *E. acervulina*, las cuales son cada vez menos sensibles a los antibióticos ionóforos, ocasionando que su replicación en el intestino de las aves de acuerdo

a la curva epidemiológica en el desafío coccidiano normal de las parvadas de pollo de engorda se prolongue cronológicamente en la vida del ave, lo cual ha hecho que el pico máximo de su replicación y la generación de inmunidad autolimitante que permiten este tipo de compuestos ionóforos (permisibilidad de escape), que en el pollo de engorda regularmente ocurre al día 21 de edad, este se atrase hasta el día 28 a 32 de edad, lo cual ha ocasionado que si existe presencia de *E. maxima* en la cama de la caseta, esta especie de coccidia ingrese tardíamente a la curva epidemiológica de desafío (*crowded effect*) con una replicación tardía y lenta en el momento en que las aves comen más para crecer, lo cual en la práctica ha ocasionado un aumento en la incidencia de procesos de mala absorción de forma más recurrente y severa repercutiendo en un deterioro de la salud de las aves, provocando malas respuestas vacunales, desnutrición crónica, mala uniformidad, aumento de CA y adicionalmente una inapropiada pigmentación del pollo (observación personal, 2005-2006, Córdoba, Veracruz). Adicionalmente, en un estudio efectuado por Juárez et al (2007) se determinó que la cepa de *E. maxima* utilizada en una vacuna de coccidias vivas de origen extranjero (Coccivac-B™) no mostró protección cruzada inmune homologa satisfactoria frente a un desafío con una cepa de *E. maxima* aislada en campo en México. Aunque esta falta de protección atribuida a la amplia variabilidad antigénica presente entre distintas cepas de la misma especie provenientes de diferentes localidades geográficas se encuentra ya previamente documentada (Long y Millard, 1979; Martin et al, 1997; Barta et al, 1998; Smith et al, 2002) en México no se había reportado y aparentemente no es un criterio considerado por las autoridades sanitarias dentro del proceso de aprobación de vacunas foráneas en México. Otro punto crítico surgido en este estudio (Juárez et al., 2007) fue que la cepa vacunal de *E. tenella* de origen extranjero muestra una tasa baja de inmuno- protección (Falta de protección del 100% contra un desafío homologo con la misma especie, pero de una cepa aislada localmente) lo cual ocasiono una seria falla de inmunoprotección en las aves vacunadas. La razón por la cual una cepa vacunal de *E. tenella* viva no induce inmunidad esterilizante en las aves desafiadas no sé pudo determinar exactamente en ese estudio, sin embargo, de acuerdo a la consulta efectuada en la literatura especializada se cree que se encuentra vinculado a la complejidad del tipo de respuesta inmune generada hacia este protozooario por parte de aves jóvenes menores a tres semanas de vida, las cuales aún muestran un sistema inmune inmaduro (Lillehoj, 1988), esto aun cuando en el estudio de Juárez et al (2007) las aves al momento del desafío tenían 21 días de edad. Algunas otras posibles razones de este aparente fracaso inmunitario se relacionan con la falta de reciclamiento apropiado de los ooquistes en la cama, la uniformidad en la inmunización o

bien el grado de patogenicidad de la cepa vacunal la cual cuando es muy patógena aún con pocos ooquistes en la dosis vacunal llega a provocar daños severos en la primoinmunización lo cual a nivel de mucosa intestinal hace que disminuya la cantidad de células inmunes competentes (DC, MΦ, LT CD8+, LT CD4+, LT NK) aptas para montar la inmunidad protectora requerida, situación que puede agudizarse aún más en aves menores a 3 semanas de edad (Lillehoj, 1988). Aún, cuando se ha determinado que un contacto patogénico con diferentes especies de *Eimeria* de aves conduce al desarrollo de inmunidad protectora contra una segunda exposición con la misma especie de coccidia (Stiff y Bafundo, 1993); lo que se sabe acerca de los mecanismos patogénicos del parásito durante la infección y los mecanismos inmunológicos que utilizan las aves para protegerse de las coccidias es aún relativamente escaso, esta situación ha conducido al estudio inmunológico de esta relación (Lawn y Rose, 1982; Rose y Hesketh, 1979, 1982; Lillehoj, 1986, 1987; Lillehoj et al, 1989; Juárez et al, 1999). En los pollitos neonatos criados sobre cama, por ejemplo, la administración de ooquistes vivos desde el inicio de la crianza y durante al menos 16-25 días favorece que la replicación continua de todos los estados reproductivos del parásito (asexuales y sexuales) induzcan inmunidad natural contra *E. acervulina* (16 d), *E. maxima* (25 d) y *E. tenella* (26 d) (Stiff y Bafundo 1993). Se ha observado que para generar una inmunidad sólida a los ooquistes de *Eimeria* sp, es esencial que exista una re-infección que favorezca el contacto continuo con los diversos componentes derivados de la infestación activa por parte de los ooquistes infectantes (para inmunidad) (Williams, 1995; Chapman et al. 2005b, Constantinoiu et al, 2008).

1.5 Respuesta inmunológica de las aves a la coccidiosis

Las respuestas de los huéspedes a las infecciones con *Eimeria* son complejas, se encuentran influenciadas por el genotipo del huésped, la epidemiología de la infección y la dosis del parásito (Rose y Hesketh, 1979; Lillehoj, 1988; Dalloul y Lillehoj, 2006). Las respuestas inmunológicas a este tipo de parásito involucran los dos tipos de inmunidad específica: celular y humoral (Frölich et al., 2012). Se han hecho estudios con aves bursaectomizadas que aún bajo esta condición muestran desarrollo de resistencia inmune a las coccidias, lo que no sucede en las aves que fueron timoectomizadas, en las que se observan lesiones severas, lo cual indica un papel clave para las células linfoides de tipo T desde el principio de la infección (Lillehoj, 1987, 1998). Aunque, no se conocen aún los mecanismos inmunológicos exactos involucrados en la protección contra la coccidiosis aviar, algunos estudios sobre la respuesta inmune del huésped contra las coccidias *in vivo*, o sus

antígenos *in vitro* revelan que la respuesta mediada por células juega un papel principal. La proliferación de linfocitos T *in vitro* aumenta significativamente en respuesta a la infección con diferentes antígenos de origen coccidiano (*E. tenella*, *E. acervulina* y *E. maxima*), lo cual proporciona una idea acerca de la importancia de la protección conferida por estas células contra las coccidias en general (Lillehoj et al, 1986; Lillehoj et al, 1989; Martin et al, 1993, Juárez et al 1999; Breed et al., 1999). A partir de los años 80's la expansión en el conocimiento de los mecanismos inmunológicos de los mamíferos ha sido exponencial, sin embargo, la falta de aves con modificaciones genéticas (*knockout*), y la carencia de anticuerpos monoclonales para la caracterización de los determinantes de sub- poblaciones de células inmunes (CD) y la descripción de sus funciones se ha ralentizado; lo cual ha ocasionado que sea más difícil estudiar la respuesta inmune de las aves a la coccidiosis (Rose, 1987; Lillehoj y Trout, 1996; Dalloul y Lillehoj, 2006). Un problema para la comprensión de los mecanismos inmunológicos que se desencadenan frente a una infección con *Eimeria* ha sido la falta de integración de los resultados de las diversas investigaciones hechas en este campo. Se han descrito algunos eventos fundamentales del sistema inmune del ave frente a *Eimeria*: Las células esplénicas y linfocitos sanguíneos periféricos de aves inmunes son capaces de transferir resistencia a aves que no son inmunes (Rose y Hesketh, 1982). Una de las citocinas de mayor involucramiento en esta actividad es IFN- γ (Rose et al, 1991; Juárez y Fehervari, 2006; Frölich et al., 2012). La inmunidad no previene la invasión de las células por los esporozoitos, pero si previene el desarrollo posterior de los mismos a la PV (Lillehoj et al, 1986, 1998). Los pollos desarrollan inmunidad esterilizante a una infección secundaria homóloga siempre y cuando el grado de daño epitelial durante el ciclo de prepatencia de la primo- infección no haya sido severo (Davis et al., 1978; Williams, 2001; Soutter et al, 2021). La mayor resistencia genética hacia la coccidiosis está vinculada a un incremento temprano y significativo de células NK (Lillehoj, 1987; Frölich et al., 2012). El papel de los LT en la resistencia a la coccidiosis ha sido investigado con agentes que suprimen las respuestas inmunes mediadas por células, como la ciclosporina A (Cs-A), betamethasona y dexamethasona (Lillehoj, 1987; Hernández et al, 1999). Cuando la Cs-A es proporcionada junto con los ooquistes, la infección se ve reducida, posiblemente por su efecto negativo directo sobre los ooquistes, sin embargo, cuando se ha proporcionado antes del desafío, la susceptibilidad a la infección incrementa, y cuando la Cs-A se administró antes de un desafío secundario la inmunidad protectora se abatió (Lillehoj, 1987). Los leucocitos sanguíneos periféricos circulantes durante los 3 primeros días de la reinfección no muestran acción protectora cuando se transfieren a animales no inmunes que son desafiados

(Rose y Hesketh, 1982). Estudios de depleción linfocitaria revelan la importancia de los LT CD8⁺ TCR2 $\alpha\beta$ ⁺ en la inmunidad protectora contra la coccidiosis aviar (Lillehoj, 1998; Frölich et al., 2012). En la respuesta primaria y secundaria los LT CD 8⁺ residentes en los tejidos linfoides asociados al intestino (IEL's) muestran un papel protector de tipo efector directo (Lillehoj and Trout, 1996; Trout y Lillehoj, 1995; Frölich et al., 2012). Todas las especies de *Eimeria* que infectan al pollo de engorda son inmunogénicas, sin embargo, notablemente la especie más inmunógena es *E. maxima*, la infección con solo cinco ooquistes de *E. maxima* generan una inmunidad protectora completa (Blake et al, 2005; Chapman et al. 2005b). La inmunidad protectora ha mostrado ser especie-específica y en algunos casos como por ejemplo con *E. maxima* ha mostrado ser cepa -específica (Joyner, 1969; Barta et al., 1998; Danforth, 1998; Smith et al, 2002), sin embargo, las bases genéticas, bioquímicas e inmunológicas para esta falta de inmunidad cruzada entre cepas de *E. maxima* permanece aún sin esclarecer (Martin et al, 1997; Basak et al, 2006; El-Ashram et al. 2015).

1.5.1 Respuesta Inmune Celular

El tejido primario para la invasión de la coccidia es el epitelio intestinal (Lawn y Rose, 1982). El GALT de los pollos que incluye células inmunorreguladoras y efectoras, ha mostrado en diferentes situaciones de desafío ser la primera línea de defensa a nivel del epitelio intestinal (Lillehoj y Trout, 1996). El conocimiento de la interacción existente entre células DC, macrófagos, LT y coccidias a nivel de mucosa intestinal es crucial. La esfera de las respuestas inmunes celulares producidas por las infecciones coccidianas a nivel de la mucosa intestinal involucra ambos tipos de inmunidad, adquirida e innata, estas incluyen a heterófilos, mastocitos, factores solubles (complemento), células asesinas naturales, macrófagos, DC, LT cooperadores y LT citotóxicos (Lillehoj, 1998; Lillehoj y Trout, 1996, Caldwell et al, 2004; Del Cacho et al., 2011, 2012). La inmunidad innata es responsable de la eliminación de parásitos durante las fases tempranas de una infección primaria, mientras que la inmunidad adquirida se considera usualmente en el contexto de una infección secundaria que resulta en una reducción en el número de ooquistes eliminados, así como una atenuación de los signos clínicos y lesiones (Lillehoj y Trout, 1996; Frölich et al., 2012). En las aves, como en los mamíferos, las células T comprenden dos tipos celulares distintos que varían en sus funciones, estas son las células cooperadoras (T CD4⁺) y las células efectoras (T CD8⁺), las primeras auxilian en la síntesis de anticuerpos y reacciones de hipersensibilidad, mientras que las segundas regulan efectos citotóxicos. La identificación de antígenos determinantes de superficie de grupo (*cluster*) como el complejo polipéptido CD3+

encontrado en asociación con receptores- de células T antígeno-específico (TCR) caracterizado por sus heterodímeros $\alpha\beta$ (TCR2) o $\gamma\delta$ (TCR1) ha hecho posible la distinción entre linfocitos T cooperadores con marcador CD4+ que reconocen péptidos exógenos de antígenos extraños en asociación con moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y linfocitos efectores con marcador T CD8+ (citotóxico/supresor) que reconocen péptidos endógenos de antígenos extraños asociados a moléculas clase I del MHC, lo cual se ha efectuado utilizando Abs monoclonales que reconocen estos fenotipos, sin embargo, estos antígenos determinantes no son indicadores absolutos de una sola función. En los pollos las células T con TCR1 $\gamma\delta$ + pueden ser CD4+ o CD8+ (Allen y Fetterer, 2002). En los eventos celulares fundamentales frente a *Eimeria* los dos tipos celulares de linfocitos (T CD4+ y T CD8+) son muy importantes, sin embargo, requieren al menos dos eventos de infección para actuar eficazmente. Los LT CD4+ se activan en una primo- infección, sin embargo, los LT CD8+ ejercen su función citolítica principal durante una segunda infección (Rose et al, 1992; Lillehoj, 1998). En la batalla contra *Eimeria* se ha observado que el incremento de la actividad citotóxica de las células inmunocompetentes se encuentra relacionada con la presencia de anticuerpos (Zhang et al., 1995; Del Cacho et al., 2011, 2012; Lee et al., 2012). Desde las primeras horas de la infección se sintetizan diferentes citocinas (IFN- γ , IL4, IL2, IL10, IL15, TGF- β y TNF- α) que dirigen y coordinan la respuesta inmune celular y humoral (Juárez et al., 1999; Lillehoj y Lillehoj, 2000; Frölich et al., 2012; Del Cacho et al., 2016). A la luz de los datos encontrados, hoy en día se considera que el mecanismo inmune más eficaz en la lucha contra *Eimeria* es la citotoxicidad celular mediada dependiente de anticuerpos (ADCC) (Dalloul y Lillehoj, 2006; Del Cacho et al., 2012). En este mecanismo es imprescindible que los antígenos del parásito se expresen en la superficie de la célula hospedera, a partir de estos antígenos se forman inmunocomplejos que son reconocidos por receptores tipo FcYRI (CD64), FcYRII (CD32) y FcYRIII (CD16) expresados por una gran variedad de células inmunocompetentes que usualmente son activadas por IFN- γ (Davidson et al., 2008; Abbas et al., 2012; Frölich et al., 2012). Reconocida la célula parasitada por los inmunocomplejos expresados en su superficie las células inmunes efectoras activan sus mecanismos citotóxicos tipo ADCC (Granzima B, perforina) (Abbas et al., 2012). Por ejemplo, los LT CD8+ inducen la muerte de la célula parasitada por medio de moléculas apoptóticas como granzima B. Las células NK y eosinófilos promueven la formación de microporos en la membrana del parásito produciendo desequilibrio electrolítico e intoxicación celular que mata al parásito. Bajo este contexto inmunológico se puede explicar por qué las vacunas con parásitos vivos son las únicas que

han funcionado de manera aceptable hasta hoy en día, son las únicas capaces de activar de forma sincronizada la respuesta inmune celular y humoral, en consecuencia, son capaces de generar ADCC que muestra su mayor efecto en la destrucción de las células infestadas de esquizontes (Dalloul y Lillehoj, 2006; Del Cacho et al., 2011, 2012). La vacunación que es el primer contacto con el parásito induce la activación de los LT CD4+ que por entorno se polarizan con citocinas de perfil Th1 (Dalloul y Lillehoj, 2006). En las fases posteriores de reciclamiento de ooquistes vacunales se perfecciona la producción de Abs y se activa la ADCC (vía CD8+). Las vacunas de ooquistes vivos requieren una multiplicación y al menos dos reciclajes posteriores para desarrollar un estado de inmunidad protectora eficaz (esterilizante). En la práctica las aves inmunizadas no son capaces de resistir una infección severa por *Eimeria* hasta después de la 3ª semana post-vacunación (Juárez et al., 2007).

1.5.2 Respuesta Inmune Humoral

La infección por *Eimeria* desencadena la generación de anticuerpos frente al parásito, sin embargo, durante muchos años se puso en duda la eficacia de estos anticuerpos frente a un desafío con *Eimeria*. La concentración de inmunoglobulinas anti-*Eimeria* comienza a aumentar a lo largo de la primera semana post-infección, alcanza su máximo a la tercera semana y se mantiene en meseta al menos durante dos meses (Guzman et al., 2003, Constantinoiu et al., 2007; Constantinoiu et al., 2011; Juárez-Estrada et al., 2021b). En mamíferos se observó que las IgG e IgA son capaces de disminuir la multiplicación del parásito, una vez que el isotipo IgG se une a los esporozoitos y merozoitos desencadena el sistema del complemento produciendo la muerte del parásito (Rose et al., 1984). Debido a que los anticuerpos presentan una acción directa contra *Eimeria* (Rose y Long, 1971; Long y Rose, 1972; Rose y Hesketh, 1987), se ideó utilizar la capacidad del huésped para poder sintetizar anticuerpos contra el parásito por medio de generar una vacuna similar a las empleadas exitosamente frente a virus y bacterias. Estas vacunas se basan en que los anticuerpos generados por el hospedador bloquean los receptores de superficie que el patógeno utiliza para penetrar en la célula blanco, sin embargo, debido a que no se conocían los receptores específicos que el parásito emplea para identificar e infectar a su célula huésped, se aislaron moléculas antigénicas de la superficie de esporozoitos y merozoitos y se administraron como vacuna, sin embargo, biológicamente e inmunológicamente los parásitos del *Phyllum* Apicomplexa no son ni como virus ni como bacterias, por lo cual estas vacunas inicialmente fracasaron. A partir de entonces una gran parte del esfuerzo de investigación en el *Phyllum* Apicomplexa se ha enfocado a estudiar las características

estructurales, morfológicas y genómicas de las diferentes fases infectantes de este tipo de parásitos con la finalidad de conocer la forma en que el parásito ingresa y se multiplica dentro de la célula huésped. Por largo tiempo se pensó que únicamente la inmunidad celular era la única capaz de ejercer un efecto protector efectivo contra *Eimeria* sp., sin embargo, recientemente el papel de la inmunidad humoral en esta protección integral se ha revalorado, por ejemplo, se ha evaluado ya el efecto protector contra *Eimeria* sp de la inmunidad pasiva por medio de profilaxis en alimento o inmunoterapia *per os* de inmunoglobulinas IgY provenientes de la yema de aves inmunizadas vs *Eimeria* sp (Lee et al., 2009ab, Xu et al., 2013a, Juárez-Estrada et al., 2021b), sin embargo, aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual estos anticuerpos IgY protegen contra *Eimeria* sp.

1.5.3 Inmunidad pasiva en la coccidiosis aviar

El interés en la transmisión pasiva de inmunidad se incrementó desde el trabajo de Rose (1971) donde infectó pollos con ooquistes de *E. maxima* y después de 2-3 semanas obtuvo el suero sanguíneo que utilizó para inyectar a otros pollos susceptibles infectados con *E. maxima* observando una reducción <50% de OPGH en estas aves comparadas con las aves control. Las especies de *Eimeria* antigénicamente son complejas a lo largo de todo su ciclo de vida (Shirley et al., 2007, Constantinoiu et al., 2008; Reid et al., 2014), se ha indicado que sus estadios de desarrollo endógeno más tempranos son los más importantes para la inducción de respuestas inmuno-protectoras (McDonald et al., 1988). Sin embargo, otros estadios del ciclo de vida que incluye a los estadios de reproducción sexual que involucran diferentes componentes de los gametocitos femeninos y masculinos han mostrado ser inhibidos por la inmunidad protectora ligada a linfocitos T y B por medio de inmunidad pasiva (Wallach et al., 1995, 2010; Jun et al., 2012; Wiedmer et al., 2017). La inducción de transmisión pasiva de inmunidad específica por medio de la inmunización activa de las madres es la base de acción de la única vacuna de tipo sub-unitario comercializada a la fecha (CoxAbic®) (Abic Biological Laboratories, Israel), esta vacuna utiliza fracciones moleculares del gametocito de *E. maxima* (Wallach, 1997; Wallach et al., 1995, 2008; Ziomko et al., 2005), se encuentra compuesta con antígenos derivados de los cuerpos formadores de la pared de los gametocitos de *E. maxima* (Belli et al., 2004, 2009; Sharman et al., 2010), los cuales se purifican por afinidad y son inyectados intramuscularmente en las aves reproductoras pesadas (Wallach et al., 2010). La acción principal de esta vacuna es por medio de la activación específica de células B y células plasmáticas, los anticuerpos IgY producidos por las células plasmáticas del ave pasan al embrión a través del saco vitelino, lo

cual les confiere protección inmune pasiva parcial contra la infección con *E. maxima*, se ha descrito que a diferencia de lo que ocurre *in vivo* con una infección activa por *E. maxima*, los Abs generados también son capaces de proporcionar inmunidad cruzada contra algunas especies heterólogas como *E. acervulina* y *E. tenella* (Wallach et al., 1995), aun cuando esta inmunoprotección cruzada no se observa durante una infección natural (Rose y Long, 1962). La protección inmune pasiva amortiza el desarrollo de inmunidad específica adquirida a través de una infección natural al mismo tiempo que ayuda a minimizar la severidad patogénica de esta infección y permite a los pollitos madurar inmunológicamente durante las primeras semanas de vida al tener contacto con una pequeña cantidad de ooquistes esporulados (n=50), lo cual contribuye a montar una mejor respuesta inmune sin deterioro de la condición de salud de las aves, la condición clave aquí es que el reto coccidiano durante esta etapa no sea muy elevado (Ziomko et al., 2005). Independiente a este tipo de transmisión pasiva protectora de IgYs, durante mucho tiempo se consideró que únicamente la respuesta celular era importante en la protección contra coccidiosis, sin embargo, actualmente se está revalorizando el papel que tienen los anticuerpos *per se* en la protección específica e integral contra coccidia (Guzman et al, 2003; Lee et al, 2009ab; Wallach, 2010; Xu et al, 2013a; Juárez-Estrada et al., 2021a, 2021b). Al evaluar un producto anticoccidiano elaborado con IgYs purificadas a partir de la yema de aves previamente inmunizadas contra *E. maxima*, *E. acervulina* y *E. tenella* (Supracox® IASA Tehuacán, México) (SC) con la finalidad de verificar si estos anticuerpos reconocían una estructura particular en los ooquistes infectantes de *E. tenella* por medio de *Western-blot*, *dot-blot* y E.L.I.S.A., Castelló (2009) determino que las proteínas lisadas y purificadas a partir de oocistos de *E. tenella* o el antígeno recombinante EtMIC2 no eran reconocidos por los anticuerpos del SC. Al efectuar las pruebas de reconocimiento *in situ* por medio de inmuno-histoquímica a través de la incubación de Abs policlonales de SC y un control de antisuero proveniente de aves previamente inmunizadas contra *E. maxima*, *E. acervulina* y *E. tenella* con cortes histológicos de tejido cecal proveniente de aves infectadas con *E. tenella*, Castelló (2009) determino una inmunoreacción positiva ligeramente mayor a la tinción de fondo, tanto para las IgY del SC como para el control sérico positivo, esto en comparación a las muestras de sueros negativos, por lo cual Castelló (2009) sugirió que esta reactividad posiblemente estuvo asociada al reconocimiento de algunos estadios sexuales de la coccidia (macrogametocito y oocisto inmaduro). Con base a ello, Castelló (2009) sugirió que las IgYs del SC pudieran estar reconociendo proteínas presentes en estadios posteriores del ciclo de desarrollo de *E. tenella* más allá de las fases asexuales de multiplicación (Constantinoiu et al, 2008). Sin

embargo, aún no existe ningún tipo de investigación que determine exactamente cómo por medio de este reconocimiento u otro mecanismo inmunomediado, el SC con base a IgY policlonales contra *Eimeria* sp protege a las aves contra un desafío patógeno con ooquistes de *Eimeria* sp (Lee et al, 2009a,b; Juárez.Estrada et al., 2021b), Tampoco se ha verificado si las aves que reciben profiláctica o terapéuticamente este producto en alimento, agua de bebida o *per os* son capaces de desarrollar algún tipo de inmunidad específica contra *Eimeria* sp de forma complementaria a la protección inmune pasiva suministrada, antes, durante y después del desafío con cepas heterólogas de *Eimeria* sp de alta patogenicidad (Ziomko et al., 2005). Debido a que no existe un estudio publicado que contribuya a explicar los mecanismos principales de como estas IgYs ejercen su efecto protector a nivel de tracto digestivo, se requiere de una aproximación novedosa que considere la relación de protección inmune innata o adaptativa a nivel intestinal ante una infección severa con *Eimeria* sp.

1.6 Vacunación

Desde que Louis Pasteur en Francia sentó las bases de la vacunación moderna vacunando gallinas contra el cólera aviar, no se ha creado un método de prevención de patógenos más exitoso que el uso de vacunas. Esta práctica tiene mayor relevancia cuando no es posible establecer métodos de contención y cercos sanitarios, así como cuando los métodos terapéuticos son poco eficientes (Rappuoli *et al*, 2002). El fundamento de la vacunación es la exposición controlada de los individuos a formas no patógenas o de patogenicidad reducida de un agente infeccioso que permite desarrollar inmunidad protectora ante una posible exposición futura a formas más patógenas de la enfermedad (Rappuoli *et al*, 2002). Las vacunas veterinarias disponibles de forma comercial consisten regularmente en un extracto o parte de un patógeno muerto (vacunas inactivas), o bien, un agente patógeno completo al cual se le ha reducido o eliminado su patogenicidad (vacunas atenuadas). Fundamentalmente, se busca que las vacunas estén compuestas por componentes antigénicos naturales del patógeno (nativos) y que éstos a su vez sean inocuos para el huésped, se trata de lograr una replicación del tipo de inmunidad desencadenada bajo condiciones de infección natural, pero sin los efectos patológicos de la misma (Richie, 2006; Shirley et al., 2007; Brun et al., 2011). De forma general este ha sido un enfoque exitoso, sin embargo, muchas veces el nivel o tipo de inmunidad desencadenada por este tipo de inmunógenos no siempre es la óptima (Finlay y McFadden, 2006). Una limitante de las vacunas tradicionales, tanto inactivadas como atenuadas, es que parte del material presente en la vacuna puede no ser inmunogénico o bien puede desarrollar efectos secundarios

nocivos para el huésped, ya que pueden contener componentes del patógeno que disminuyen o abaten la respuesta inmune del mismo, provocan fiebre o bien pueden favorecer de algún modo una infección exacerbada e incluso favorecer la replicación del mismo agente patógeno o de otro tipo de agentes oportunistas facultativos (Hornef et al., 2002; Hilleman 2004).

1.6.1 Vacunación contra la coccidiosis aviar

La gran diversidad biológica entre las especies de *Eimeria* ayuda al diagnóstico e identificación del parásito, sin embargo, dificulta el desarrollo de vacunas, debido a que existe una gran variabilidad antigénica entre las diferentes especies, además, existe documentada poca o nula inmunidad cruzada entre las mismas, por lo cual, en una vacuna contra coccidiosis aviar es necesario incluir todas las especies de *Eimeria*. Adicionalmente, la memoria inmunológica se pierde si el huésped no mantiene un contacto constante con el parásito (para inmunidad), aún con estas dificultades, científicamente se mantiene la expectativa de poder desarrollar una vacuna efectiva, ya que las aves que sobreviven a una infección con *Eimeria* desarrollan un estado de inmunoprotección estable, duradero y eficaz. La primer vacuna contra *Eimeria* sp aviar (DM®; Dorn and Mitchell Inc. U.S.A.) fue introducida al mercado en 1952, esta contenía solo oocistos vivos de *E. tenella* directos de campo (Williams, 2002a,b). Posteriormente se le agregaron tres especies más de *Eimeria* y la vacuna se comercializo en U.S.A., como Coxine® y en Europa como Cocci Vac® (Williams, 2002a,b). La capacidad de las vacunas con ooquistes vivos de campo para inducir respuestas protectoras fuertes ha contribuido a que Cocci Vac® y otros productos similares como Immucox® (Vetech Laboratories, Guelph, Canada) (Danforth, 1998) o Nobilis Cox ATM® (MSD, New Jersey, USA) (Juarez et al, 2003), permanezcan en el mercado actual. La aplicación óptima de vacunas con coccidias vivas virulentas debe efectuarse de forma uniforme y completa por medio de una mínima exposición en todo el grupo de aves (Shirley et al, 2005), ya que cualquier exposición irregular puede incrementar la replicación incontrolada del parásito y aumentar el riesgo de una presentación clínica en las aves sub-expuestas afectando los parámetros productivos de la parvada. Por lo cual se han investigado diferentes sistemas de administración y estrategias de dosificación (Danforth, 1998; Chapman et al, 2002; Dávila et al, 2003; Juárez et al, 2007; Jenkins et al, 2012). El uso de coccidias atenuadas ofrece un tipo de vacunación más seguro, la atenuación a través de la selección de cepas de *Eimeria* precoces que muestran una capacidad reproductiva reducida y baja patogenicidad se ha convertido actualmente en la opción preferida (Jeffers,

1975; McDonald y Blallingall, 1983; McDonald et al., 1987; Kawasoe et al., 2005; Jorgensen et al., 2006). Los parásitos obtenidos por selección con base a la precocidad de su ciclo de prepatencia se caracterizan por generaciones más rápidas debido a la reducción o pérdida completa de una o más fases de su multiplicación asexual (Jeffers, 1975; McDonald y Blallingall, 1983). Aunque el proceso de atenuación reduce la tasa de eliminación de ooquistes entre 70 y 95% (comparado con la cepa parental no atenuada) (Shirley et al, 2005) la inmunidad análoga a la cepa parental virulenta se mantiene (Shirley y Millard, 1986; McDonald et al, 1986; Jorgensen et al, 2006), sin embargo, recientemente se ha probado que la inmunogenicidad puede variar entre dos cepas de la misma especie (Kawazoe et al, 2005; Constantinoiu et al, 2011). Dentro de las estrategias de vacunación efectiva se han evaluado también cepas de *Eimeria* sp atenuadas tolerantes a la presencia de antibióticos ionóforos con la finalidad de proteger específicamente a los pollitos jóvenes precisamente cuando son más susceptibles a este patógeno (1-21 días) (Lillehoj, 1988). Un objetivo de la vacunación en campo es inducir una protección completa utilizando la vacuna atenuada junto con el antibiótico ionóforo, el cual impide el ingreso a las granjas de cepas virulentas de campo susceptibles a este fármaco mientras la inmunidad producida por las cepas atenuadas se desarrolla durante este periodo crítico de madurez inmunológica (Li et al, 2004, 2005). Aunque es una estrategia novedosa, aún debe evaluarse exhaustivamente con la finalidad de verificar el grado de seguridad brindado en comparación a las vacunas vivas virulentas, pero que son aún susceptibles a la mayoría de agentes anticoccidiales. Los requerimientos de prevención de la coccidiosis en las aves reproductoras pesadas, gallinas de reemplazo criadas en piso y el pollo de engorda son diferentes y reflejan el valor individual de las aves y el tiempo requerido para su crianza y desarrollo. Las vacunas vivas salvajes y atenuadas se han introducido rápidamente al mercado, estas vacunas incluyen formulaciones ajustadas para cubrir el perfil epidemiológico de cada sector de la industria avícola, por ejemplo, la formulación con 4 a 8 especies/cepas cubre las necesidades de protección en las aves reproductoras pesadas/pollonas, y de 3 a 5 especies/cepas en el pollo de engorda (Shirley et al, 2007). La inclusión de dos cepas de *E. maxima* en algunas vacunas comerciales (Paracox[®], Nobilis Cox ATM[®]) ayuda a solventar la variabilidad antigénica de esta especie y amplía su espectro protector (Rose y Hesketh, 1976; Long y Millard, 1979; Martin et al, 1997; Juárez et al, 2007). Esta amplia diversidad antigénica en *E. maxima* ha conducido al desarrollo de alternativas regionales en otras partes del mundo (China, Australia, etc.) aunque no en México. Aunque las vacunas comerciales de coccidia en México involucran aproximadamente 7 diferentes líneas de ooquistes vivos y han

resultado ser relativamente exitosas, incluyendo las que utilizan métodos de administración masivos como la aplicación *in ovo* (Inovocox[®], Embrex, USA) (Lee et al, 2010), el costo de su producción y venta resultan ser caros, adicionalmente, el porcentaje de esporulación de los ooquistes vacunales muestra amplia variabilidad entre lotes, la viabilidad de los oocistos se ve también comprometida debido a que los ooquistes vacunales tienen que estar suspendidos en medio líquido por lo cual su vida de anaquel es relativamente corta, lo cual causa una caída en su infectividad, por lo cual la efectividad para inducir una adecuada respuesta inmune post-vacunal se encuentra limitada a solo unos cuantos meses de almacenamiento. A nivel de granja es necesario que las condiciones de la cama favorezcan la esporulación de los ooquistes vacunales y que las aves puedan ingerirlos. Hasta ahora no se sabe cuánto dura la memoria inmunológica adquirida mediante este tipo de vacunas, aunque existen evidencias de que esta se pierde si el animal no tiene contacto constante con el parásito durante 3-4 semanas, por lo cual, a pesar de su eficacia, es evidente que las vacunas formuladas con parásitos vivos presentan aún serios problemas. Para prevenir eficientemente los brotes clínicos ocasionados por *Eimeria* se requiere el desarrollo de un inmunógeno que sea efectivo, económicamente viable y que no tenga la serie de desventajas enumeradas anteriormente para las vacunas vivas. Aunque en las tres especies de *Eimeria* más estudiadas se ha mostrado que algunas estructuras antigénicas se conservan a lo largo de todo el ciclo de vida del parásito (Reid et al, 2014; Liu et al, 2017), las implicaciones de transcriptómica y proteómica para el desarrollo potencial de candidatos vacunales efectivos de tercera generación aún se encuentra en investigación (Belli et al, 2009, Blake et al, 2017, 2020a, 2021b; Liu et al, 2017, 2020; Venkatas y Adeleke, 2019).

1.6.2 Vacunas subunitarias contra coccidia

La idea de fabricar vacunas subunitarias contra coccidia se generó en los años 70's con la descripción del complejo apical. El complejo apical es la estructura especializada que utilizan los zoitos de los miembros del *phylum* Apicomplexa para adherirse, formar la MJ, desplazarse sobre la célula huésped y generar la PV. Inicialmente se aislaron proteínas específicas del complejo apical y se emplearon para inmunizar a las aves, este tipo de inmunógenos conocidos como vacunas subunitarias tenían la finalidad de que los anticuerpos producidos impidieran un correcto funcionamiento de este complejo durante la invasión, sin embargo, los resultados mostraron que la fuerza del ciclo de vida coccidial no es tan fácil de vencer y que el conocimiento del tipo de inmunidad 100% efectiva contra coccidia aún no estaba vigente. Una nueva propuesta para el diseño de vacunas

subunitarias efectivas es utilizar solo uno o unos cuantos componentes antigénicos del agente patógeno que sean altamente efectivos para generar una respuesta inmune de ADCC que es el tipo de inmunidad buscada (Dalloul y Lillehoj, 2006). Las vacunas subunitarias se basan en el hecho de que solo uno o algunos pocos antígenos o fracciones del patógeno son suficientes para inducir una respuesta protectora (Brun *et al*, 2011). En las vacunas tradicionales pueden estar presentes toxinas o moléculas inmunomoduladoras propias del patógeno que este utiliza para atenuar o controlar la respuesta inmune del huésped (Frölich *et al.*, 2012). Las vacunas subunitarias, a diferencia de las vacunas tradicionales, tienen la ventaja de que están desprovistas de una mezcla compleja de compuestos del patógeno que podrían inducir una respuesta adversa (Hornef *et al.*, 2002; Hilleman 2004). Durante mucho tiempo se abandono el enfoque de desarrollar vacunas subunitarias, soslayando el hecho de considerar si en los intentos realizados (Danforth, 1983) se había elegido bien a las proteínas de las fases parasitarias de *Eimeria* usadas para elaborar estas vacunas. Wallach *et al* (1995) selecciono a los macrogametos como base para la generación de una nueva vacuna subunitaria, usando cromatografía de afinidad aislaron proteínas sintetizadas por el parásito para generar la pared de los ooquistes y las emplearon como antígenos. Esta vacuna se ha utilizado ya en más de 500 millones de pollos y se ha verificado que los anticuerpos producen una disminución significativa en la eliminación de los ooquistes (Sharman *et al.*, 2010). Los anticuerpos generados alteran la formación de la pared del ooquiste y se provoca así el fracaso en el desarrollo del cigoto. El éxito en la aplicación directa ha sido parcial, reduce la producción de ooquistes entre el 58 y 98% (Wallach *et al*, 2008), sin embargo, la inmunidad generada es más de tipo humoral que celular, los creadores propusieron hacer de este aparente defecto una virtud y sugirieron entonces inmunizar a las madres con la finalidad de beneficiar a la progenie, ya que como la inmunidad producida por la vacuna no era completa los pollitos nacían con anticuerpos maternos que los protegían parcialmente en el periodo que son más susceptibles a la enfermedad mientras generaban su propia inmunidad sin experimentar un proceso clínico de coccidiosis (Ziomko *et al.*, 2005). Esta es una estrategia de inmunización novedosa y prometedora, sin embargo, aún requiere evaluarse en diferentes sistemas de producción para saber cuánto tiempo se mantiene de manera eficaz esta inmunidad conferida por los anticuerpos maternos específicos. Además de generar una vacuna recombinante efectiva con base a los antígenos principales que contiene esta vacuna (Gam56, Gam82 y Gam230) (Xu *et al.*, 2013b, Wiedmer *et al.*, 2017), ya que el costo de su fabricación a partir de subunidades nativas es extremadamente caro, tardado y difícil. Esto constituye una buena

perspectiva para el estudio de antígenos recombinantes tipo linfocitos B. Uno de los objetivos ideales de la inmunización contra *Eimeria* es poder desencadenar el mecanismo de ADCC con una vacuna y un método que de manera sincronizada genere una respuesta celular y humoral al mismo tiempo, y que evite los problemas de introducir a las granjas parásitos vivos o de especies que no existen allí previamente (Juárez et al., 2007). Por lo cual se ha propuesto el uso de antígenos específicos que sean capaces de estimular los dos tipos de presentación de antígeno (MHC-I, MHC-II). Estos antígenos propuestos regularmente son proteínas que se han aislado a partir de Sz, Mz, Macrogamonte y cuerpos formadores de la pared del ooquiste I y II, o bien, antígenos sintéticos obtenidos por medio de biología molecular (Song et al, 2015; Blake et al., 2017). La respuesta inmune celular inducida por estos antígenos es mediada por LT CD4+ y LT CD8+, que después de la inmunización inducen activación celular que es cuantificable por IFN- γ (Juárez et al, 1999; Zhang et al, 2012, 2016). Su uso parece muy adecuado para la activación celular, pero en la realidad solo se consigue una reducción de lesiones intestinales menor al 50%, o incluso no las reducen (Shi et al, 2014). Los resultados obtenidos con este tipo de vacunas que activan la respuesta inmune celular deben ser mejorados antes de utilizarlas en las granjas de pollo de engorda, ya que si las aves vacunadas se infectan con *Eimeria* las pérdidas pueden ser catastróficas. Una posible solución para mejorar la inducción de una adecuada protección inmune en las aves vacunadas puede ser la unión de los antígenos a adyuvantes que sean capaces de estimular no solo la respuesta inmune celular, sino que también induzcan la respuesta humoral (Song et al., 2015).

1.6.3 Vacunación génica en el *phylum Apicomplexa* (*Eimeria* sp)

En años recientes se ha utilizado ampliamente la inmunización con ADN proveniente de diversos agentes patógenos que afectan al hombre, a las aves y diferentes animales de producción y compañía (Song et al, 2001; Cong et al, 2014). Los plásmidos son cadenas circulares de ADN que no se integran al genoma del huésped, sin embargo, pueden inducir la síntesis de proteínas de manera independiente a los mecanismos de síntesis proteica del hospedador. Los plásmidos que se han utilizado en la inmunización experimental contra miembros del *phylum Apicomplexa* son fracciones de ADN recombinante que se crean en el laboratorio utilizando secuencias específicas de ADN de alguna fracción antigénica identificada (ejem. *By reverse engineering, in silico analyses*) o bien de un péptido del parásito (Talaat y Stemke-Hale, 2005; Costa et al., 2014; González-Mora et al., 2021). La idea es que los vectores de ADN parasitario se introduzcan a las células del huésped para

que estas sinteticen proteínas del parásito, las cuales al ser procesadas y reconocidas como extrañas (MHC-I) desencadenen la respuesta inmune celular y humoral (Tang et al, 1992). La gran ventaja de las vacunas con base a plásmidos, y en general de las vacunas que utilizan secuencias recombinantes de ADN, es que las células transfectadas sintetizan proteínas del parásito, que además de liberarlas al espacio intercelular donde pueden ser procesadas por las CPA profesionales en un contexto de MHC-II, estas mismas células transfectadas también pueden presentar estos péptidos ligados al MHC-I, así, las moléculas expulsadas al exterior de la célula huésped desencadenan la síntesis de anticuerpos por medio de la activación de las CPA, mientras que las moléculas presentadas en el contexto de MHC-I desencadenan la citotoxicidad celular mediada directamente por LT CD8+ e incluso por LT NK (Davidson et al., 2008; Frölich et al., 2012). La combinación de la presencia de anticuerpos específicos y la activación de las poblaciones celulares citotóxicas dispara el mecanismo de ADCC que determina, en gran medida, el éxito o fracaso de este tipo de vacunas, de forma general se ha observado que la protección conferida por estas vacunas es del 68% (Song et al, 2001). Sin embargo, aún presentan algunos problemas técnicos importantes, por ejemplo, las células transfectadas no sobreviven más de un mes, el porcentaje de transfección puede ser bajo, no todas las células transfectadas inducen inmunidad, se han descrito algunos casos de autoinmunidad en individuos vacunados; otro problema que no es técnico pero quizá el más importante, es el relacionado a determinar si el consumidor aceptaría un pollo genéticamente modificado, ya que como consecuencia de esta metodología de vacunación se obtienen pollos que transportan en sus células secuencias de ADN producidas a partir del material genético de un agente extraño como *Eimeria* sp, por lo cual se puede considerar que son OGMs. Bajo este contexto se exploró la posibilidad de introducir secuencias de ADN propias de los animales que van a recibir la vacuna, por lo cual se propuso inyectar un antígeno del parásito para generar una respuesta inmune humoral (LT CD4+ Th1) e introducir un plásmido que codificará la expresión de los genes de algunas de las citocinas implicadas en la respuesta inmune celular (Song et al, 2015). Durante años el equipo de la Doctora Hyun Lillehoj mapeo el ADN del pollo hasta encontrar secuencias de tipo ortólogo (la mayoría de ellas) que codifican las citocinas más importantes en la respuesta inmune frente a *Eimeria* (*Proinflam*: IFN- γ IL-1 β , IL-17, TNF-LF, IL-6, IL-8, IL-18; *T-cell dif*: IL-2; *Tcell reg*: IL-4, IL-10; *Anti-Inflam*: TGF- β ; *T-cell regul*: IL-12/IL-15). Con la finalidad de que las aves desarrollarán un estado protector frente a *Eimeria* desde la primera semana de vida, estos investigadores propusieron la vacunación *in ovo* con una proteína recombinante de *E. tenella* (EtMIC2) (Ding et al, 2005), las aves

vacunadas mediante la administración simultánea de antígenos y plásmidos, mostraron una disminución en la eliminación de ooquistes del 66%, además de exhibir mejores índices productivos que los controles positivos, como trabajo experimental es impecable, sin embargo, en la práctica, este método tiene un gran costo económico y los resultados aún no justifican el precio de la vacuna. Adicionalmente, la mayor parte de los inmunógenos recombinantes diseñados hasta ahora contra la coccidiosis aviar no han logrado aún los perfiles de inducción inmunoprotectores análogos a los generados con cepas vacunales de *Eimeria* sp virulentas o atenuadas (Crane et al, 1991; Shirley et al, 2005; Shi et al, 2014, Shivaramaiah et al., 2010; Blake et al., 2017). Las estrategias para la producción de vacunas recombinantes efectivas que no requieran de pasajes del parásito *in vivo* aún permanecen evasivas, esto se magnifica por el hecho de no conocer aún el antígeno o los antígenos específicos que induzcan una respuesta inmune protectora completa (esterilizante) análoga a la producida por las cepas vacunales vivas o por proteínas de los esporozoitos completos administrados de forma Sc (Murray y Galuska et al. 1987; Juárez-Estrada et al., 2021a). Un desafío particular en este campo es que el genoma de protozoarios como *Eimeria* (Novaes et al., 2012; Reid et al., 2014; Blake et al., 2015), y otros del tipo metazoario e incluso de algunos MO complejos cuentan con miles de genes que generación tras generación pueden recombinarse entre sí, además una gran proporción en la expresión de sus proteínas estructurales y esenciales para la invasión a las células huésped son genéticamente polimórficas (Blake et al., 2015), por lo cual, los organismos con este tipo de genoma representan un gran desafío ante la enorme cantidad probable de mezclas complejas de antígenos inmunorreactivos e inmunoprotectores potenciales. La dificultad de identificar los antígenos inmunogénicos y protectores relevantes dentro de esta gran cantidad de mezclas ha impedido el progreso hacia el desarrollo de vacunas con diseño de ingeniería genética tipo ADN recombinante, subunitarias y vectorizadas que sean efectivas contra las especies de parásitos importantes Apicomplexa como *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Neospora*, *Babesia*, *Cyclospora*, *Leishmania*, *Theileria*, *Cryptosporidium*, *Trypanosoma* y por supuesto *Eimeria*. Un factor clave que ha limitado la identificación de candidatos vacunales putativos efectivos ha sido la dificultad técnica de diferenciar apropiadamente entre los genes que codifican las moléculas inmunogénicas que estimulan solo la respuesta inmune pero no son inmunoprotectoras y aquellos genes que codifican las moléculas inmunogénicas que si inducen una respuesta inmune protectora (Melby et al, 2001; Crowe et al, 2006; Cong et al, 2014, Song et al, 2015, Zhai et al, 2016; Blake et al, 2015, 2017). Se debe considerar también que muchos ensayos de proteómica, microarreglos, inserciones, análisis *in silico* y

bioinformática que buscan identificar antígenos inmunoprotectores en este tipo de parásitos regularmente no incluyen como criterio de selección la protección inmune *in vivo* (Prudencio, et al., 2009; Denisova et al., 2009). Al analizar una mezcla de muestras de candidatos antigénicos de un protozoario (*Leishmania major*) con la finalidad de identificar la fracción capaz de estimular una respuesta inmune protectora completa (esterilizante) Stober et al (2006) no lograron identificar de manera efectiva los antígenos protectores, esto aún en presencia de antígenos exacerbatorios. Sin embargo, estudios recientes han mostrado niveles de protección parcial prometedores contra *Eimeria* sp y otros protozoarios como *Toxoplasma* sp, y *Plasmodium* sp, utilizando en forma conjunta algunos adyuvantes inmunológicos junto a antígenos recombinantes específicos de inmunidad humoral (IL-2, IFN γ , MAbs agonistas anti CD40 de pollo), fracciones de bacterias (flagelina) y vehículos dendríticos y exosomas sanguíneos periféricos de inmunidad celular (Kim et al, 1989; Bhogal et al, 1992; Wu et al, 2004; Ding et al, 2004; Dalloul et al, 2005; Del Cacho et al, 2011, 2012, 2016; Shah et al, 2010, Cong et al, 2014; Song et al, 2015, Chou et al, 2016), lo que constituye una nueva perspectiva para poder incrementar y eficientizar la inmunidad contra este tipo de protozoarios. Después de analizar los resultados de los estudios de inmunoprolifaxis de Lee et al (2009a,b) y Xu et al (2013a) donde utilizaron inmunoglobulinas policlonales IgY anti-*Eimeria* sp provenientes de la yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas *in vivo*, adicional a lo observado por diferentes investigadores utilizando anticuerpos monoclonales, fracciones recombinantes scFv anti-*E. tenella* y fragmentos conservados de los cuerpos formadores de la pared de los gametocitos I y II (Wallach et al., 1995, 2008; Ziomko et al., 2005; Sasai et al., 2008; Krücken et al., 2008; Abi-Ghanem et al., 2008; Belli et al., 2009; Khalafalla y Dauschies, 2010a; Wiedmer et al, 2017; Rafiqi et al., 2019), es evidente que existen numerosos componentes de un complejo antigénico en las diferentes especies de *Eimeria* que son capaces de estimular respuestas inmunes celulares específicas por parte de LT y LB hacia los diferentes estadios de vida de *Eimeria*, lo que muestra una reacción cruzada entre estructuras del mismo parásito, entre especies e incluso contra otros géneros del mismo orden (Lillehoj y Trout, 1996; Prowse, 1991; Tomley, 1994; Breed et al., 1999; Michael, 2002; Constantinoiu et al, 2003. 2008, 2011; Matsubayashi et al, 2005; Krücken et al, 2008, Liu et al, 2017, Liu et al., 2020a). Sin embargo, la naturaleza especie-específica de la inmunidad adquirida a través de la infección natural con *Eimeria* sugiere que tal reactividad antigénica cruzada no siempre resulta ser efectivamente protectora. Hasta la fecha se han investigado diferentes antígenos derivados de estructuras de los diferentes estadios de vida de los protozoarios del *phylum* Apicomplexa como

candidatos vacunales obtenidos a través de ingeniería genética (Blake et al, 2017). Este tipo de inmunógenos han empleado proteínas basadas en antígenos de superficie o de órganos internos del esporozoito y merozoitos asociados a la invasión como las micronemas, roptrias, y gránulos densos (proteínas refráctiles), debido principalmente a que estas dos fases del ciclo de vida de *Eimeria* sp constituyen los principales zoitos móviles e invasivos de *Eimeria* sp (McDonald et al., 1988; Blake et al., 2017). En el caso de *E. tenella* se han evaluado vacunas producidas a través de la inserción de genes codificantes de proteínas que son capaces de estimular una respuesta inmune específica, para lo cual se han utilizado secuencias de proteínas de ADN recombinante inserto en plásmidos, proteínas *per se* y en vectores subunitarios. Los genes codificantes de *E. tenella* ya evaluados incluyen el antígeno de membrana apical I (AMA-I) (Pastor-Fernandez et al., 2018), proteína mapeada inmune- 1 (IMP-1) (Yin et al., 2013; Kundu et al., 2017), proteína micronemal 1 (MIC1) (Sathish et al., 2012; Chen et al., 2015), proteína micronemal 2 (MIC2) (Ding et al., 2005; Dalloul et al., 2005; Sathish et al., 2012; Sun et al., 2014; Liu et al, 2020b), proteína micronemal 3 (MIC3) (Lai et al., 2011; Li et al., 2020; Chen et al., 2021), profilin (3-1E) (Jang et al., 2011; Tang et al., 2018; Li et al., 2020), proteína similar a romboide (Liu et al., 2013), SO7 (Kopko et al., 2000; Klotz et al., 2007; Song et al., 2015; Rafiqi et al., 2018), TA4/SAG1 (Xu et al., 2008; Song et al., 2017; Huang et al., 2021), gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Tian et al., 2017), antígeno 14-3-3 (Liu et al., 2018), antígeno de superficie 16, antígeno de superficie 22 (SAG 16, SAG 22) (Zhao et al., 2021a) y antígeno del gametocito 22 (EtGAM22) (Rafiqi et al., 2019). Estos antígenos de *Eimeria* han sido identificados como candidatos vacunales potenciales basándose en las interacciones que muestran durante la invasión y replicación del parásito en las células huésped, además de considerar su inmunogenicidad e inmunoprotección (Del Cacho et al, 2012; 2016; Song et al, 2015; Blake et al., 2017; Venkatas y Adeleke, 2019), sin embargo, un hecho es que actualmente ninguna de estas vacunas ha llegado al mercado (Blake et al, 2017). Estudios recientes se han enfocado a la evaluación de nuevos antígenos identificados en *E. tenella* como EF-1/2, UCE, GAPDH, SAG1/10/16/22, MIC2/3/5/7, Gam22/230, 3-1E, EF-1 α con resultados variables (Venkatas y Adeleke, 2019; Liu et al., 2019; Li et al, 2020). Debido a que ya se ha descrito el genoma completo de *E. tenella* (Novaes et al., 2012; Reid et al, 2014), algunos autores con base a secuencias operativas han identificado algunas proteínas de función desconocida o anotadas como hipotéticas conservadas, estas han sido recombinadas en vectores *ad hoc* y evaluadas *in vivo* mostrando protección parcial en pruebas de inmunización/desafío (Zhai et al., 2016; Zhao et al., 2021b). Sin embargo, debido a que actualmente son pocos los

antígenos protectores efectivos de *E. tenella* que se han identificados, y como aún no existe una vacuna 100% efectiva y escalable a producción industrial que sea apta para su aplicación masiva en la avicultura comercial, es urgente identificar nuevos antígenos inmunodominantes e inmunoprotectores de *E. tenella* para el óptimo desarrollo de vacunas anticoccidiales de tercera generación. Se ha observado que la identificación de genes inmunoprotectores por medio de la inmunización de bibliotecas de expresión (ELI) es una herramienta valiosa para el desarrollo de nuevas vacunas (Talaat y Stemke-Hale, 2005; Whitlock et al., 2011; Yang et al., 2017), una técnica similar como lo es *Phage display* ofrece una oportunidad para lograr la consecución de este mismo objetivo, el uso de *Phage display* para este fin aun no se encuentra descrito en ninguna parte.

1.6.4 Vacunas subunitarias basadas en epítomos recombinantes

Un desarrollo adicional a las vacunas subunitarias son las vacunas basadas en epítomos, los cuales representan pequeños segmentos del antígeno (Geysen *et al*, 1986; Adda et al., 1999, 2002; Sette y Fikes, 2003). Un epítomo o determinante antigénico puede consistir de unos pocos aminoácidos, es la porción de una macromolécula o dominio que es reconocido por el sistema inmunitario, específicamente la secuencia específica a la que se unen las regiones variables y de reconocimiento de los anticuerpos (CDR), receptores de células B o células T (MHC y TCR). Los epítomos se dividen en conformacionales y lineales, esta división se ha hecho con base a sus estructuras e interacción con los parátomos de las inmunoglobulinas. Un epítomo conformacional está compuesto de secciones discontinuas de una secuencia específica de aminoácidos del antígeno. Estos epítomos interactúan con el parátomo basado en la forma y superficie tridimensional o en la estructura terciaria del antígeno. En cambio, la interacción de los epítomos lineales con el parátomo está basado principalmente en su conformación primaria (Adda et al., 2002; Abbas et al., 2012). Un principio básico en el desarrollo de vacunas basadas en epítomos es que, en ciertos casos, la respuesta inmune inducida por el inmunógeno de forma natural no es la óptima y esta puede mejorarse con la adición de adyuvantes (Pourfajar et al., 2019). Una opción novedosa es agregar componentes que participan en la inducción de la respuesta inmune como IL-2, IFNY (Song et al, 2015), además de adyuvantes novedosos como el anti CD40 que por vía parenteral inducen *homing* inmunológico hacia mucosas (Shivaramaiah et al., 2010; Chen et al., 2012; Chou et al, 2016). Un fago inmunorreactivo puede ser una vacuna de epítomo recombinante *per se* (Paschle, 2006; Hess y Jewell, 2019; Pourfajar et al., 2019).

1.7 Mecanismos de patogenicidad: Epítopos de antígenos críticos, identificación y caracterización

Un factor crítico para el desarrollo de vacunas subunitarias es, precisamente, la identificación de epítopos inmunoprotectores y los genes que los codifican, ya que en la práctica existe dificultad para identificarlos, producirlos y purificarlos. Un reto constante es determinar si después de un arduo trabajo un inmunógeno con base a epítopos es apto para utilizarse como vacuna. Es decir, los epítopos deben ser altamente reactivos e inducir una respuesta inmunodominante (ejem. El antígeno SAPA de 12 aa constituye una unidad en *tandem* en el extremo C- terminal de TcTS, es un Ag inmunodominante durante la infección con *Trypanosoma cruzi*) (Tonelli, et al., 2013) pero también inmunoprotectora (ejem. GAM 56, GAM 82 y GAM 230 de *E. maxima*) (Sharman et al., 2010; Jun et al., 2012; Xu et al., 2013b). Parece ser que las respuestas inmunes naturales no reconocen todos los epítopos potenciales, se ha observado que se enfocan a unos pocos epítopos (o en algunos casos a uno solo) (discriminación inmunológica) (Prudencio et al., 2010; Costa et al., 2014). Además, no todas las respuestas inmunes generadas contra los Ags de un patógeno conducen a una protección posterior o a la completa eliminación del patógeno (inmunidad esterilizante), por lo cual es importante conocer cuáles son los epítopos- clave que potencialmente podrían generar una resistencia al 100% contra un desafío con el patógeno de campo (*wild-type*). Los anticuerpos son una línea de defensa muy efectiva en la prevención de agentes infecciosos. Los Abs neutralizantes, tienen la capacidad de interceptar al agente infeccioso antes de que se unan a su célula blanco y de esta forma lo inactivan (Davidson et al., 2008; Gadde et al., 2015). Estos anticuerpos van dirigidos contra un epítipo específico, el cual es una región vulnerable del patógeno, importante para sus funciones de adhesión, invasión y multiplicación en la célula huésped. Si se pudieran identificar, seleccionar y escalar la producción de este epítipo o epítopos como inmunógeno, este desencadenaría una respuesta inmune similar a la generada bajo condiciones naturales donde regularmente se generan este tipo de anticuerpos neutralizantes. Este tipo de inmunógeno tendría que ser una vacuna basada principalmente en epítopos reconocidos por células B maduras o células T CD8+, y su implementación requiere de la capacidad de rastrear e identificar el anticuerpo complementario o la fracción TCR estimulada al contacto con el epítipo correspondiente (Adda et al., 2002; Turunen et al., 2009); esta estrategia basada en un enfoque de inmunología molecular reversa, subyace indirectamente en el principio inmunológico de la selección clonal y la maduración inmunológica de los parátomos de anticuerpos por afinidad y constituye el fundamento para el diseño racional de una vacuna basada en epítopos- clave

(Adda et al, 2002; Sette y Fikes, 2003; Davidson et al., 2008). Los agentes patógenos son el resultado de un largo historial de coevolución con los receptores membranales de activación e inhibición de la regulación inmune celular de sus huéspedes. De esta forma, los patógenos han desarrollado diferentes mecanismos de regulación genómica que permiten la evasión inmune facilitando su enmascaramiento, replicación y permanencia en el huésped (Barclay y Hatherley, 2008; Frölich et al., 2012). Muchos de estos Ags se han seleccionado para poder ocultarse del sistema de reconocimiento inmune del huésped (ejemp. *Babesia* expresa moléculas en la superficie del eritrocito invadido que favorecen la unión de los Abs del huésped por la fracción Fc ocultando de esta forma su presencia; *Plasmodium* induce la formación de complejos de rosetas intravasculares, *Trypanosoma* infecta de forma crónica a través de la mediación inmune del TNF- β , al igual que *Toxoplasma* que mediante la manipulación de NF- $\kappa\beta$ inhibe temporalmente la apoptosis) (Frölich et al., 2012; Tonelli et al, 2013). Es probable que aquellas estructuras del patógeno (Ags) que poseen funciones vitales y críticas durante la patogenia y supervivencia sean las que están bajo una mayor presión de selección con la finalidad de reducir su inmunogenicidad y facilitar así el proceso de invasión y replicación del agente patógeno. Es factible también que aquellos Ags ocultos al sistema inmune de los huéspedes y que son vitales para la invasión y replicación de estos agentes patógenos (ejem. CD200R del virus del sarcoma de Kaposi), puedan ser reconocidos por el sistema inmune de especies que no son huéspedes naturales del patógeno y que se encuentran filogenéticamente distantes a este, esta especie de clado (TAXA) diferente reaccionaría a ellos generando un reconocimiento de epítomos- clave que muestren una respuesta inmune celular y humoral de mayor magnitud y amplitud (Talebi y Mulcahy, 1995; Talebi, 2001).

1.7.1 Bibliotecas combinatorias de péptidos desplegados aleatoriamente en bacteriófagos de tipo filamentoso M13

Una estrategia para la identificación de antígenos y epítomos inmunodominantes (potencialmente inmunoprotectores) durante la interacción huésped - patógeno, es utilizar anticuerpos generados contra los agentes patógenos en un huésped diferente al natural, y poder efectuar así el tamizaje de bibliotecas combinatorias de bacteriófagos que exhiben en su superficie péptidos aleatoriamente codificados con oligonucleótidos degenerados sintéticos que se encuentran fusionados a una proteína de su superficie (M13= gen III u VIII), la cual puede ser reconocida por un ligando (en este caso inmunoglobulinas generada contra el patógeno en cuestión) (Matthews et al., 2002). El despliegue de péptidos en bacteriófagos

(fagos) filamentosos (principalmente de tipo M13), conocido en inglés como “*Phage display*” (Ph D) - fue creado tempranamente por George P. Smith en 1985 (Acreedor al premio Nobel por esta invención en 2018), mostrando que es posible fusionar genes que codifican pequeños péptidos al gen III o al gen VIII, los cuales codifican para proteínas de superficie sin perder la viabilidad del fago (Smith, 1985). Una característica fundamental de este sistema es la conexión entre el genotipo y el fenotipo. Es decir, la secuencia de aminoácidos presente en el péptido de fusión a la proteína III u VIII de la superficie del fago esta codificado en el genoma del mismo fago, esto permite que colecciones enormes de péptidos puedan sean tamizados y amplificados por un proceso de selección *in vivo* llamado *biopanning* o *in vitro* conocido como *panning* (Arap, 2005; Turunen et al., 2009; Tonelli et al, 2013). Actualmente de manera comercial están disponibles bibliotecas combinatorias de despliegue de péptidos en fagos filamentosos (New Engalnd BioLabs®), las cuales pueden ser tamizadas para la identificación de ligandos específicos a receptores o moléculas blanco (<https://www.neb.com/applications/protein-analysis-and-tools/phage-display>). Algunos de los ligandos específicos más comunes que se pueden utilizar para este tamizaje son anticuerpos monoclonales, policlonales y de suero de convalescientes. Las bibliotecas de Ph D consisten en fagos que despliegan en su proteína de cubierta III u VIII péptidos de 6, 7, 8, 10 ó 12 aminoácidos, los cuales se generan al azar por medio de un método combinatorio secuencial usando oligonucleótidos sintéticos degenerados (New England BioLabs®), obteniendo colecciones de péptidos con todas las posibles combinaciones de los 20 aminoácidos. La cantidad de péptidos diferentes que se puede alcanzar es del orden de 20^{12} (4,096 billones) o 20^7 (1,280 millones), aunque usualmente para efectos prácticos de tamizaje las bibliotecas permiten el despliegue de 1×10^9 diferentes péptidos, cada uno con 100 clonas idénticas en la biblioteca, lo cual permite tamizar por ensayo una biblioteca total de al menos 1×10^{11} fagos. Algunas bibliotecas combinatorias de péptidos de siete residuos cuentan con una combinación de cisteínas en las terminales amino-carboxil de los extremos de su cadena peptídica, lo cual facilita la unión entre ambas cisteínas por puentes disulfuro, de esta forma se establece un plegamiento tridimensional del péptido generando una estructura secundaria en forma de bucle (*loop*). Esta biblioteca permite identificar epítomos de tipo B conformacionales (Barbas et al., 2000).

1.7.2 Estrategia para la obtención de mimótopos inmunogénicos

En los últimos años se han efectuado diversos estudios evaluando el uso de anticuerpos generados en conejos contra virus, MO's y parásitos de importancia en el área veterinaria,

con la finalidad de seleccionar y caracterizar las clonas de bibliotecas combinatorias de péptidos desplegados en fagos inmunorreactivos a estos anticuerpos heterólogos (las clonas de fagos positivos se conocen como mimotopos o fagotopos, una vez que los Abs generados contra los mismos prueban su inmunorreactividad específica a los Ags nativos se denominan inmunotopos). Al mismo tiempo, se ha evaluado la capacidad antigénica y protectora de estas clonas seleccionadas ante el desafío con estos patógenos (Pande *et al*, 2010). Es evidente que es posible seleccionar péptidos con capacidad inmunoprotectora contra patógenos virales o incluso patógenos de mayor complejidad como parásitos (Morales *et al*, 2008; Prudencio *et al*, 2010; Gazarian *et al*, 2011; Villa Mancera *et al*, 2011; González-Mora *et al*, 2021). Aunque existe evidencia que al utilizar anticuerpos provenientes de conejo esta estrategia funciona muy bien para el virus de pseudorabia (PRV) en ratones (Gazarian *et al*. 2011), queda aún por explorar el empleo de anticuerpos generados en una especie (conejo) más distante filogenéticamente a la del huésped original (ave doméstica) en el caso de un parásito más complejo del *Phyllum* Apicomplexa como *Eimeria* sp.

1.7.3 Importancia de generar mimotopos vacunales en parásitos del *phyllum* Apicomplexa

Los mimotopos son péptidos sintéticos que tienen una secuencia conformacional o inmunoequivalente al epítipo natural y mimetizan así la función inmunogénica e inmunoprotectora de este (Geysen *et al*, 1986; Matthews *et al.*, 2002; Adda *et al.*, 2002). Algunos epítipos del patógeno frecuentemente funcionan como receptores a ligandos celulares o a componentes del mismo parásito que median el proceso de infección (ejem. 54 residuos de TgRON2 interactúan con TgAMA1 durante el proceso de adhesión de los taquizoitos de *T. goondi* a su célula huésped) (Lamarque *et al*, 2011). Estos epítipos pueden cambiar su estructura mediante mutaciones o variaciones sin perder su función (ejem. variación mediada en una familia de moléculas de superficie llamada PfEMP1 codificada por 60 genes *var* de *P. falciparum*) (Frölich *et al.*, 2012). Una de las principales estrategias de algunos agentes patógenos para poder escapar del sistema inmune del huésped, se basa en el mimetismo, el cual consiste en modificar la estructura física del epítipo, pero sin modificar su función, la cual es vital para el parásito (Tonelli *et al.*, 2013). Una gran cantidad de miembros del *Phyllum* Apicomplexa generan variantes de sus epítipos de manera continua o bien presentan mutaciones (*drift*), así, tenemos que existe una amplia familia de genes de antígenos de superficie (GPI: SAGs en *Plasmodium*, *Toxoplasma goondi* y *Eimeria* sp) o de interacción parásito- huésped que varían entre especies del mismo género e incluso entre

células del mismo linaje (ejem. PfAMA1). Por lo tanto, para enfrentar estas estrategias de evasión del patógeno, es importante considerar que los inmunógenos vacunales contra este tipo de parásitos deberán tener la misma escala de variación estructural del epítopo ya sea actual o una predicha a futuro, conservando al mismo tiempo la función inmunogénica del epítopo en forma de mimotopo, la obtención de péptidos miméticos a través de *Phage display* constituye una interesante estrategia en el hallazgo de mimotopos que puedan funcionar como inmunógenos intangibles a pesar de la probable recombinación presente o futura del epítopo original, de hecho una de las aparentes debilidades de la técnica de Ph D, con relación a la proporción afinidad/avidez del anticuerpo hacia su epítopo en la selección de mimotopos parcialmente semejantes al epítopo original, en este contexto se vuelve una de sus más grandes fortalezas, esto al mostrar características de recombinación prospectiva futura del epítopo, ya que se ha observado que un mismo Ab monoclonal puede llegar a seleccionar mimótupos que expresan una amplia secuencia peptídica divergente o heterogénea que miméticamente muestran una inmunorreactividad similar al mimotopo de mayor repetición dentro de la selección efectuada y que al mismo tiempo muestra una secuencia de residuos parcialmente semejantes al epítopo original (Davies et al. 1999; Matthews et al., 2002). Si bien debido al procedimiento de recuperación de fagos inmunorreactivos en Ph D, técnicamente es poco probable obtener un mimotopo 100% idéntico al epítopo debido a la elusión ácida utilizada al momento de recuperar los fagos de mayor afinidad hacia el ligando, lo cual se hace principalmente por medio de la disrupción de los enlaces entre el péptido recombinante y el parátopo de la inmunoglobulina unida a la placa o esferas de Sefarosa (no covalentes), esto permite únicamente la obtención de mimotopos parcialmente similares al epítopo, ya que para la obtención de un mimotopo 100% análogo al epítopo se requiere una metodología de mayor intervención para la separación del fago de su ligando (Ig), donde se debe utilizar una metodología con base a proteólisis peptídica, con los riesgos que esto conlleva en la posible modificación del péptido-mimotopo reconocido volviendo inservible al fagotopo recuperado (Greenfield, 2012).

1.7.4 Perspectiva en la identificación y selección de mimotopos inmunogénicos

En el presente estudio se propone la metodología de Ph D para la búsqueda de mimotopos inmunodominantes e inmunoprotectores. Para la obtención de los anticuerpos (homólogos y heterólogos) utilizados en esta metodología, como inmunógeno blanco se propuso el uso de la fase asexual infectiva inicial (esporozoito) de *E. tenella* (McDonald et al., 1988). La identificación de mimotopos del Sz de *E. tenella* por medio del escrutinio de bibliotecas de

péptidos aleatoriamente desplegados en fagos filamentosos (M13) y sus rondas de “*panning*” para identificar y seleccionar clonas candidatas para el diseño de una vacuna subunitaria efectiva es una propuesta novedosa y original (Arap, 2005; Paschke, 2006; Pande 2010; Costa et al., 2014, 2019). Esto debido a que los estudios en *Eimeria* sp., utilizando *Phage display* son escasos y han tenido otro tipo de enfoques (Abi-Ghanem et al, 2008; Ma et al., 2019; Chen et al., 2021), un estudio hecho por Da Silva et al (2002) utilizó como blanco Szs vivos de *E. tenella* tamizando una biblioteca aleatorizada de Ph D y encontró un péptido (PW2) con acción análoga a la mostrada por péptidos antimicrobianos sobre la capa pelúcida de los esporozoitos. Ma et al (2019) con una estrategia similar verifico que dos péptidos seleccionados por Ph D eran mimotopos de EtRON2, y al unirse a EtAMA1 sobre la superficie del Sz de *E. tenella* eran capaces de inhibir la invasión de estos a las células blanco, es evidente que en esta estrategia estos péptidos pueden funcionar como bloqueadores de proteínas clave para la invasión de los protozoarios del *phyllum* Apicomplexa (Keiser et al., 2003; Ma et al., 2019; Chen et al., 2021). Por otra parte, Krücken et al (2008) utilizaron un anticuerpo monoclonal que tamizaron en una biblioteca cADN de *E. tenella* logrando identificar una proteína anti-GAM 56. Abi-Ghanem et al (2008) selecciono en una biblioteca la fracción scFv de un anticuerpo putativo contra el esporozoito de *E. tenella*, de forma similar Zhao et al (2010) utilizando fracciones variables de la cadena pesada y ligera (VH y VL) de una biblioteca de anticuerpos aviares determino paratopos reactivos que podrían tener aplicaciones en diagnóstico e incluso terapéutico en las infecciones por *E. acervulina*. En el presente estudio se evalúa si los mimotopos seleccionados con anticuerpos heterólogos (IgGs de conejo) anti- esporozoito de *E. tenella* se conservan, o bien detectan epitopos iguales o diferentes en la fase asexual consecutiva del ciclo de vida del parásito (merozoitos 2ª generación), utilizando además Abs homólogos (IgYs de ave) contra las dos fases asexuales del parásito, y verificando si esto se relaciona con la habilidad de inducir respuestas inmunes protectoras en los huéspedes naturales por parte de los mimotopos identificados y seleccionados como vacunas subunitarias experimentales en un modelo de inmunización/desafío *in vivo*. Una vacuna subunitaria con base a mimótopos es una idea novedosa porque evita el uso de cualquier fracción inmunogénica natural del patógeno y se basa en el principio de selección artificial en un campo combinatorio del epítipo, realizando así la selección con base a inmunología molecular reversa que determina la generación de clonas de células plasmáticas productoras de anticuerpos con una mayor complementariedad hacia el epítipo, lo cual tiene la finalidad de obtener una colección de nuevas variantes que conserven la reactividad antigénica original. El presente estudio

muestra impacto tanto en ciencia básica (identificación y mapeo de epítomos inmunodominantes durante la interacción patógeno- huésped), como en ciencia aplicada (aislamiento, selección, diseño y generación de vacunas subunitarias con base a péptidos recombinantes mimótopos del esporozoito de *E. tenella* en vectores de tipo fago filamentoso que han mostrado un efecto adyuvante *per se*). El presente estudio explora el uso de anticuerpos heterólogos (conejo) y homólogos (gallina doméstica) como herramientas para la identificación y acceso a antígenos inmunodominantes, y la selección de mimótopos verdaderos (efectivamente corresponden a epítomos del parásito en la interacción parátopo-mimotopo, y no a la Fc del ligando). Un aspecto innovador es el uso de dos diferentes bibliotecas combinatorias de *Phage display* como fuente de péptidos lineales y conformacionales. Este enfoque tiene un gran potencial para la identificación de mimótopos que pueden ser utilizados para el diseño y generación de vacunas de tercera generación con aplicación en el control de la principal enfermedad parasitaria que afecta a la industria avícola de México y el mundo.

1.8 Justificación

Los antígenos de *Eimeria tenella* utilizados por medio de ingeniería genética para elaborar vacunas de proteínas recombinantes, vectorizadas subunitarias y de ADN plasmídico no han logrado obtener resultados óptimos de inmunoprotección, queda aún pendiente la identificación de epítomos tipo B altamente inmunogénicos e inmunoprotectores de *E. tenella*. La tecnología de *Phage display* es una herramienta óptima para la identificación, selección, y diseño de un inmunógeno con base a péptidos recombinantes efectivo contra *E. tenella*.

1.9 Hipótesis de Investigación

El uso de anticuerpos policlonales heterólogos generados contra el esporozoito de *E. tenella* para la selección de péptidos recombinantes desplegados en bibliotecas combinatorias de *Phage display* permitirá la identificación de epítomos inmunodominantes del esporozoito con potencial inmunoprotector

1.10 Objetivo General

Identificación y caracterización de péptidos recombinantes inmunodominantes mimótopos del esporozoito de *E. tenella* mediante el tamizado de bibliotecas combinatorias de *Phage display* y su evaluación como inmunógenos inmunoprotectores.

1.10.1 Objetivos Particulares

- Obtener y caracterizar IgGs de conejos *New Zealand White* e IgYs de aves SPF *Leghorn White* contra el esporozoito de *E. tenella*
- Aislar e identificar mimotopos inmunodominantes por el tamizado de dos bibliotecas de *Phage display* (c7c lin, 12mer) con anticuerpos heterólogos *versus* el esporozoito de *E. tenella*.
- Caracterizar genética y antigénicamente mimotopos recombinantes seleccionados de las 2 bibliotecas de *Phage display* (c7c lin, 12mer).
- Evaluar la capacidad inmunoprotectora de los mimotopos seleccionados.

1.10.2 Metas

- Aislamiento, purificación y propagación de una cepa local de *E. tenella*.
- Obtener y caracterizar sueros hiperinmunes de aves SPF *Leghorn White* infectadas experimentalmente con diferentes dosis de ooquistes esporulados de *E. tenella*
- Producir una vacuna experimental de esporozoitos completos inactivados e inmunizar conejos *New Zealand White* y aves SPF *Leghorn White* con la finalidad de obtener antisueros específicos
- Obtención y caracterización de antisueros específicos contra esporozoitos completos inactivados de *E. tenella* en conejos *New Zealand White* y aves SPF *Leghorn White* inmunizados subcutáneamente.
- Seleccionar y caracterizar clonas de fagos M13 a partir de dos diferentes bibliotecas combinatorias de péptidos (*Phage display*) utilizando anticuerpos purificados *versus E. tenella*
- Producir en conejos *New Zealand White* anticuerpos específicos contra las clonas candidatas seleccionadas y evaluar su reactogenicidad contra antígenos nativos de dos fases zoito asexuales de *E. tenella*
- Determinar la capacidad de inmunoprotección de las clonas candidatas de los inmunótopos del esporozoito de *E. tenella* en aves SPF *Leghorn White* (*Gallus gallus*), en pruebas de inmunización/desafío.

2.0 MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio se obtuvo material biológico (ooquistes purificados de *Eimeria tenella*) a partir de un caso clínico de campo de coccidiosis cecal. Se visitó una granja de pollo de engorda donde se analizaron los sacos ciegos de 6 pollos de engorda de 42 días sospechosos a coccidiosis cecal. Las muestras se procesaron en el laboratorio, todas fueron positivas a *Eimeria* sp. A partir de tres muestras se purificaron los ooquistes de acuerdo con la metodología planteada en estudios previos.

La cepa de *E. tenella* se purificó con la finalidad de utilizarla en ensayos de laboratorio y pruebas de inmunización pasiva/activa-desafío.

A partir de la cepa purificada de *E. tenella* se aislaron y purificaron los esporozoítos para caracterizar los polipéptidos que los conforman y caracterizar así sus propiedades inmunológicas.

Se efectuó un bioensayo *in vivo* de inmunoterapia pasiva para determinar la relevancia de la protección de Abs específicos de la yema de huevo seleccionados por epítomos tipo B de *Eimeria* sp a través de un programa de inmunización previo.

Se montaron técnicas de laboratorio para evaluar el grado de interacción específica antígeno- anticuerpo (ELISA indirecta y *Western blot*). La implementación y ejecución óptima de estas pruebas fue necesaria para poder efectuar el análisis de la respuesta humoral contra el esporozoíto de *E. tenella* y posteriormente hacia péptidos recombinantes mimotopos de epítomos del esporozoíto de *E. tenella*.

Los esporozoítos completos inactivados se utilizaron para elaborar una vacuna experimental con base a un adyuvante novedoso de nanopartículas y aceite vegetal (Montanide®) en un programa de inmunización que tuvo el objetivo de obtener anticuerpos- *versus* los Szs de *E. tenella* en conejos *New Zealand* y de manera análoga en aves *SPF Leghorn*.

Los anticuerpos reactivos al esporozoíto de *E. tenella* fueron clave para la óptima caracterización de los antígenos solubles provenientes de la primera etapa invasiva del parásito (esporozoíto), lo cual posteriormente contribuyó a ampliar el análisis de reconocimiento a otra fase asexual de replicación de *E. tenella* (Mzs de 2ª generación).

Se efectuó el aislamiento y purificación de merozoítos de 2ª generación de *E. tenella*.

Los anticuerpos anti- esporozoíto obtenidos en el programa de inmunización con esporozoítos completos inactivados en conejos se purificaron por cromatografía de afinidad utilizando proteína G.

Las IgGs de conejo purificadas ayudaron a identificar por medio del tamizado de dos diferentes bibliotecas aleatorias de *Phage display* los péptidos moleculares más antigénicos

e inmunogénicos del esporozoíto, una vez obtenidos e identificados se consideraron como mimotopos, esta estrategia se consideró como el eje principal del presente estudio.

Obtenidos los mimotopos más inmunogénicos expresados en los fagos M13 de cada biblioteca de PhD se efectuaron pruebas de inmunización/desafío utilizando ooquistes esporulados de una cepa de campo de *E. tenella*.

2.1 Cepa patógena de *Eimeria tenella*

2.1.1 Aislamiento de la cepa de *E. tenella* patógena de campo

El criterio para la selección de la cepa de *E. tenella* se basó principalmente en que los pollos de engorda de la granja comercial de donde se obtuvo la cepa patógena se hubieran infectado de forma natural, la historia clínica inmediata mostrará diarreas acuosas a sanguinolentas acompañadas al final del ciclo de engorda de mortalidades diarias de 0.5 a 2.5%, que los registros reportarán afectación negativa en GDP y CA, además de la condición explícita de que las aves no hubieran sido vacunadas previamente contra *Eimeria* sp ni hubieran recibido tratamiento terapéutico anticoccidicida. Los ooquistes de *Eimeria* sp., se obtuvieron a partir del contenido cecal de pollos de engorda con las características estipuladas previamente, esto se efectuó de acuerdo a la metodología descrita por Juárez *et al* (2002). Los ooquistes se esporularon por medio de aireación continua (oxigenador estándar utilizado en los contenedores para ciprínidos) en una solución de dicromato de potasio al 2.5% dentro de un contenedor de *unicell* diseñado *ex professo* (*dampers* de entrada y *dampers* de exhaucio para ventilación pasiva), después de 96 horas de esporulación, se verificó el porcentaje de esporulación y los ooquistes se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 6%, se lavaron con agua estéril, se resuspendieron en dicromato de potasio al 2.5% y se conservaron a 4°C hasta su utilización (Anexo número 1).

2.1.2 Purificación de la cepa salvaje de *E. tenella*

Los ooquistes sospechosos a *E. tenella* se identificaron de acuerdo con los rangos de medidas descritos por Haug *et al* (2008). La identificación positiva de *E. tenella* se verificó por medio de la caracterización de lesiones en su replicación específica en el tejido cecal de acuerdo a lo descrito por Juárez *et al* (2002) para ooquistes provenientes del tejido cecal de aves domésticas. La cepa de *E. tenella* se purificó a partir del aislamiento de *Eimeria* sp del caso clínico anteriormente descrito, este procedimiento se efectuó por medio del método de placas de agar con base a dilución mínima (100 ooquistes por portaobjeto) de acuerdo con la metodología descrita por Stephan *et al* (1997), y Khalafalla y Dauschies (2010b). La

purificación se efectuó a partir de una sola ave positiva de acuerdo con las modificaciones descritas por Marco A. Juárez- Estrada en su tesis de Maestría (1998) relativas a dilución de los ooquistes a seleccionar para inocular a las aves-no inmunes (5/5), porcentaje de gel utilizado y método de aislamiento físico de un solo ooquiste puro compatible con las características morfológicas de *E. tenella* (obtención con pipeta Pasteur).

Se obtuvieron huevos fértiles *SPF Leghorn White* con un proveedor ubicado en la ciudad de Tehuacán, Puebla (Aves Libres de Patógenos Específicos, [ALPES], Lab. IASA, México); los huevos fértiles se incubaron y eclosionaron en la F.M.V.Z.-U.N.A.M. Los pollitos *SPF Leghorn White* de un día de edad obtenidos se mantuvieron en una unidad convencional de aislamiento previamente lavada y desinfectada (Unidad ubicada en circuito exterior Cuemanco s/n, barrio 18, Xochimilco, Cd. de México), estos pollitos se inocularon con un solo ooquiste, a los siete días post-inoculación se procedió a aplicar eutanasia a todas las aves del lote (n=10), se verificó su replicación directamente a partir de un raspado individual a partir de la mucosa de uno de los sacos ciegos de cada ave, cuando el frotis de raspado era positivo a la presencia de ooquistes compatibles con *E. tenella* ambos sacos ciegos con todo y contenido se cortaron en pequeñas piezas anatómicas, estos se procesaron de acuerdo a la metodología descrita previamente por Juárez et al (2002), brevemente, se lava el glicocálix y el resto de contenido cecal con solución PBS 1X estéril con penicilina-estreptomicina, posteriormente el tejido se muele en una licuadora convencional de aspas metálicas previamente desinfectada con formalina al 10%, en una proporción de 1:10 con dicromato de potasio al 2.5%, posteriormente se le agrega bicarbonato de sodio (1%), 2 horas después de la reacción, los detritus celulares gruesos se separan por medio de su cribado en una coladera fina (0.7 mm), la suspensión obtenida se centrifuga a 2000 x g durante 10 minutos a 4°C., después el *pellet* se suspende y mezcla vigorosamente con solución salina saturada, esta suspensión se deja reposar al menos 15 minutos, después se decanta cuidadosamente toda la capa superior y se procede a lavarla en una proporción 1:10 (solución PBS 1X), la pastilla se centrifuga nuevamente (2000 x g a 4°C por 10 minutos) tres ocasiones cambiando el PBS 1X en cada una de ellas, al final la pastilla se suspende a una dilución 1:20 de dicromato de potasio al 2.0% dentro de un frasco estéril de boca ancha parcialmente cerrado con papel aluminio, después se efectuó su esporulación por aireación activa, el frasco fue colocado en el interior de un contenedor de unicel calibrado a 29°C, después de 96 horas se verificó el porcentaje de esporulación directamente por medio de un microscopio compuesto (400X), el criterio es que >85% de esporulación los ooquistes obtenidos se retiraban y suspendían en una solución de dicromato de potasio al 2.5% (p/v).

2.1.3 Propagación de los ooquistes esporulados de *E. tenella*

Una vez obtenido el inóculo-maestro a partir de un solo pollito, se asignaron cinco pollitos *SPF Leghorn White* a una jaula de tela de alambre metálica (40 x 30 x 25 cm), desde el día de edad hasta el final de la fase de infección-replicación de la cepa (periodo de patencia), bajo estrictas medidas de bioseguridad (aislamiento, limpieza y desinfección amoniacal) (Tomley, 1997). Antes de la inoculación y de forma directa se colectó una muestra de heces de los pollitos con la finalidad de verificar que se encontraban libres de ooquistes de cualquier especie de *Eimeria*. A la semana de edad, la cepa de *Eimeria tenella* se inoculó *per os* directamente dentro del divertículo esofágico a cada pollito de acuerdo con la metodología descrita por Juárez et al (2002) con 5×10^3 ooquistes esporulados de *E. tenella*. Alrededor de 12 horas antes del ciclo de prepatencia predeterminado para *E. tenella* (168 horas o 7 días exactos) y doce horas después de ese periodo el total de heces de cada pollito se colectó por un periodo máximo de 24 horas, los ooquistes se procesaron de acuerdo con la metodología descrita por Ryley et al (1976). Los ooquistes después de su flotación y lavado se centrifugaron a 2000 x g por 10 minutos (4°C), se mezclaron con una solución de dicromato de potasio al 2.5%. Los ooquistes esporulados se lavaron con PBS 1X y se concentraron por medio de centrifugación. Se obtuvieron los ooquistes totales a partir de la inoculación de 5 aves *SPF Leghorn White* con la cepa de *E. tenella*.

2.1.4 Limpieza y desinfección de los ooquistes de *E. tenella*

Se estableció un protocolo para limpieza y desinfección de ooquistes, el cual se modificó con la finalidad de tener menor menoscabo en el rendimiento total de ooquistes esporulados, estos ooquistes se utilizaron para la obtención de los esporoblastos y posteriormente de los esporozoitos por medio de su incubación y digestión química. El protocolo para la limpieza de ooquistes esporulados de *E. tenella* se encuentra descrito en el anexo número 1.

2.2 Obtención de esporoblastos y esporozoitos de *E. tenella*

2.2.1 Obtención de esporoblastos de *E. tenella*

Para obtener los esporoblastos se efectuó la ruptura de los ooquistes esporulados de acuerdo a la metodología descrita por varios autores. Se evaluó el protocolo de obtención de esporoblastos utilizado en el laboratorio del Dr. John R. Barta del Ontario Veterinary College de la Universidad de Guelph (sitio de estancia de investigación previa).

Adicionalmente con base a una búsqueda hemerográfica se encontraron dos estudios de investigación en los cuales se obtienen resultados satisfactorios con el uso variado de vortex de velocidad fija (1000; 2000 y 3000 rpm) perlas de vidrio de diferente Φ : 0,5, 1, 2 y 3 mm., y tiempos relativos de ruptura de 30 seg a 5 min (Cha et al., 2014; You, 2014)., con base a estos resultados se efectuaron varias pruebas utilizando un vortex de velocidad regulable (VORTEXER, Heathrow Scientific, Illinois, USA) y perlas de vidrio de 1 mm Φ . Para contar con un protocolo óptimo se efectuaron diferentes ensayos variando las proporciones de perlas de vidrio (p/v), cantidad de ooquistes, tiempo total de ruptura y tipo de tubo empleado (Eppendorf™ 1.5 y 2 mL). En el anexo número 2 se describe el protocolo de ruptura *ad hoc*.

2.2.2 Purificación de los esporoblastos de *E. tenella*

La purificación de esporoblastos se efectuó con base al protocolo que se utiliza en el laboratorio del Dr. John R. Barta. Esta se realiza por medio de un tamizado de los ooquistes rotos con un filtro BHP de 10 μm Φ (BHP, Tlalnepantla de Baz, Edo. De México). Con base a los resultados obtenidos se decidió modificar este procedimiento optando por lo propuesto por Dulski y Turner (1988) con base a gradientes continuos de Percoll isotónico. Después de la ruptura de los ooquistes la muestra de esporoblastos se centrifugó a 2000 rpm 10' a 4°C, el *pellet* se aforo c.b.p., a 1 mL de PBS 1X; después se sujetó a purificación por medio de un gradiente continuo de Percoll isotónico al 50%, después de lavar el *pellet* obtenido con el Percoll isotónico al 50%, al menos cuatro ocasiones y previo al último lavado los esporoblastos se cuantificaron con el hemocitometro de Neubauer. El *pellet* de esporoblastos se suspendió a una concentración de 0.2×10^7 esporoblastos/mL en 10 mL de PBS 1 X (pH 7.4) estéril, el tubo se mantuvo a 4°C hasta el día siguiente. Es recomendable no almacenar los esporoblastos por más de 2-3 días. Con base a las pruebas preliminares se observó que la viabilidad de los esporozoitos disminuye dramáticamente si este almacenaje se prolonga más allá de 4-5 días, lo recomendable es esterilizar y romper los ooquistes en un día y al siguiente efectuar la purificación de los Szs como se describe en el anexo número 3.

2.2.3 Obtención y purificación de los esporozoitos de *E. tenella*

La obtención y purificación de los esporozoitos a partir de los esporocistos de *E. tenella* purificados previamente se describe en el anexo número 3.

2.2.4 Obtención de antígenos solubles a partir de esporozoitos de *E. tenella*

Para obtener los polipéptidos (antígenos) solubles de esporozoitos de *E. tenella* se estableció primariamente un protocolo utilizando Buffer de Lisis, el cual contenía PBS 1X + inhibidor de proteasas (Roche®) + Triton X-100 al 1% (Sambrook y Rusell, 2001).

Otro protocolo que se evaluó para obtener los péptidos solubles de los esporozoitos fue por medio de disrupción celular directa, el cual se efectuó concentrando los esporozoitos en un mL de PBS 1X + inhibidor de proteasas (Roche®), posteriormente el contenido del tubo se congelo y descongelo por 5 ciclos a través de su inmersión directa en Nitrógeno (N₂). Después de ambos procesos se realizó la centrifugación de las muestras a 2000 x g, 18` a 4°C, el *pellet* obtenido se resuspendió en una solución de PBS 1X + inhibidor de proteasas (Roche®) y se congelo a -70°C. El SN y *pellets* obtenidos se analizaron por medio de las técnicas de cuantificación de proteína con el reactivo de Bradford, electroforesis de proteínas bajo condiciones reductoras (SDS) en gel de acrilamida- bis acrilamida al 12% teñido con CBB; y las técnicas de interacción antígeno- anticuerpo de ELISA indirecta y WB.

En el anexo número 4 se describen los puntos críticos a verificar durante el proceso de obtención de los antígenos solubles provenientes de los esporozoitos de *E. tenella*.

2.3 Aislamiento de merozoitos de segunda generación de *E. tenella*

La propuesta inicial del trabajo comienza con el componente infeccioso primario del parásito: el esporozoito, el cual se ha descrito como la fase asexual más inmunogénica del parásito (McDonald et al., 1988). Sin embargo, debido a que se requería como complemento para las pruebas de caracterización antígeno-anticuerpo la segunda fase asexual más importante del parásito (Constantinoiu et al., 2011), se decidió incluir un antígeno de esta fase asexual de *E. tenella*. Con base a diversas publicaciones se adecuó una técnica de aislamiento y purificación de merozoitos de segunda generación. Los esporozoitos, al ser pocos, al inicio de la infección generan una aparente baja respuesta humoral, o bien son difíciles de obtener y purificar (Constantinoiu *et al*, 2007). Inicialmente se decidió trabajar solo con esporozoitos debido a que son la fase infectante del parásito, basándose precisamente en el evento inicial de infección primaria, aún, cuando literatura especializada reciente se ha enfocado más al análisis de la respuesta sérica con fases de replicación asexual (merozoitos de 1^a, 2^a y 3^a generación [Tomley, 1994a; Constantinoiu *et al*, 2007, 2008, 2011]) y sexual, cuerpos formadores de la pared de los gametocitos [Sharman et al., 2010; Jun et al., 2012; Wiedmer et al., 2017]) del parásito, estas caracterizaciones humorales han sido posibles debido a una mayor tasa de replicación de estas fases posteriores al esporozoito.

2.3.1 Obtención de merozoitos de segunda generación de *E. tenella*

Se infectaron cuatro aves híbridas (*Rhode Island Red x Hampshire x Plymouth Rock Barred*) con 5×10^5 ooquistes esporulados de *E. tenella* cada una. Se sacrificaron y los cuatro pares de sacos ciegos se removieron a las 112 h (5 días) post- inoculación. Se lavaron tres veces con PBS 1X frío a un pH de 7.4 con 2000 unidades de penicilina- 1 g estreptomocina (50 mL). Posteriormente la mucosa cecal de cada uno de los seis sacos ciegos se raspo con la hoja de un bisturí y se obtuvieron aproximadamente 35 mL de mucosa en PBS 1X.

El contenido obtenido se ajustó a 25 mL por centrifugación a $800 \times g$ $4^{\circ}C$ 10'. Se suspendió en 10 volúmenes (250 mL) de una solución de digestión que estaba compuesta de ácido taurocólico (0.5% y tripsina de páncreas de cerdo (0.25%) más hialuronidasa (0.1%) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), estos reactivos se disolvieron previamente en PBS 1X y el pH se ajustó a 7.4. La muestra se sometió a digestión durante 33 minutos a $41^{\circ}C$ con vigilancia continua en el microscopio observando la liberación de los merozoitos, la digestión se detuvo para evitar el aumento de liberación de células epiteliales y/o la digestión y destrucción de los merozoitos liberados. Después de detener el proceso de digestión el contenido se filtró a través de 8 capas de gasa de algodón, esto con la finalidad de remover tejido conectivo y vellosidades intestinales (Liu et al, 2009). El contenido filtrado (200 mL) se centrifugo a $2000 \times g$ $4^{\circ}C$ 10', después se centrifugo dos veces más utilizando PBS 1X frío estéril. Al final la pastilla se concentró en 35 mL de PBS 1X frío estéril. Los merozoitos obtenidos se contaron con la cámara de Neu Bauer (Juárez et al., 2002).

2.3.2 Purificación de merozoitos de segunda generación de *E. tenella*

Los 35 mL con los merozoitos de segunda generación de *E. tenella* se dividieron en dos tubos con 17.5 mL cada uno; a estos 17.5 mL se les agrego 7.5 mL de Percoll al 100% en un solo tubo de 50 mL (FALCON) para hacer una solución de Percoll al 30%, la cual se depositó sobre 25 mL de Percoll isotónico al 50%, después se centrifugo a $1,700 \times g$ $4^{\circ}C$ 15'. Los merozoitos se recuperaron del gradiente nuboso del Percoll al 50% y se suspendieron en 10 volúmenes de PBS 1X frío estéril, se centrifugo a $2,500 \times g$ $4^{\circ}C$ 10'. La deposición de los merozoitos se lavó centrifugándolos tres veces a $2,500 \times g$ $4^{\circ}C$ 10' con PBS 1X frío estéril (Geysen et al, 1991). Después del último lavado se suspendieron en PBS 1X frío estéril con inhibidor de proteasas (Roche®) y se guardaron a $-20^{\circ}C$ hasta su uso.

2.3.3 Obtención de antígenos solubles a partir de merozoitos de segunda generación de *E. tenella*

Los merozoitos suspendidos en PBS 1X frío estéril con inhibidor de proteasas (Roche®) se descongelaron y sujetaron a 5 ciclos de congelación- descongelación en N₂, se centrifugaron a 800 x g 4°C 18°. El *pellet* y SN del antígeno de merozoitos de segunda generación de *E. tenella* se colectaron por separado y se guardaron a -20°C hasta su utilización. El contenido de proteína en µg/µL de cada uno de los dos componentes previamente se verifico a través de la técnica de Bradford de acuerdo con las instrucciones del fabricante del reactivo.

2.3.4 Cuantificación de antígeno de esporozoitos y merozoitos de segunda generación por la técnica de Bradford

Se preparo una curva estándar de cuantificación con albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 0 a 5 µg/µl en agua destilada, se colocaron 10 µl de cada dilución por duplicado en una placa (Maxisorb, Nunc 96, fondo plano), se colocaron 10 µl de cada antígeno en otros dos pozos de la placa considerando diferentes diluciones de este (1:5, 1:10, 1:20, 1:40 etc.). Se diluyo 1 mL de colorante Bio-protein assay (BioRad, No. de catálogo #5000006) en 4 mL de agua destilada en un tubo protegido de la luz, se depositaron 190 µL de esta solución en cada pozo con las muestras y las diluciones de BSA colocadas previamente en cada pozo, se dejó reposar la placa cubriéndola de la luz por 5-10 minutos, después se efectuó una lectura de absorbancia a 590 nm con un espectrofotómetro (Epoch™ Bio-Tek, Winooski, VT, USA). Con base a la construcción de la curva se determinó el contenido de proteína de cada muestra evaluada, esta se expresó en µg/µL.

2.4 Obtención de anticuerpos séricos policlonales positivos a *E. tenella*

Un aspecto determinante para el éxito en los programas de inmunización es el esquema y cantidad de ooquistes esporulados iniciales que se utilizan en la primo- inmunización (Long et al., 1986; Tomley, 1997; Lillehoj, 1988; Suprihati y Yunus, 2018; Soutter et al., 2021). La cantidad inicial de ooquistes determinan el grado de invasión y saturación de las fases invasivas subsecuentes al esporozoito (*crowding- effect*) (Williams, 1973; Williams, 2001; Johnston et al., 2001), lo que influye en el nivel de agresión y gravedad del daño tisular producido, y su posible efecto negativo sobre el GALT, lo cual puede repercutir negativamente en la generación de inmunidad y protección ante un desafío con cepas de campo (Davis et al., 1978). Se ha descrito que el fenotipo particular de *E. maxima* explica el escape inmunológico observado, el cual se encuentra influido por el genotipo del parásito y

el huésped (Barta et al., 1998; Allen et al, 2002; Blake et al, 2005); sin embargo, con *E. tenella* no es posible atribuir la inapropiada generación de inmunidad observada únicamente a la variabilidad antigénica entre cepas (Juárez et al, 2007). Es posible que esta falta de respuesta protectora se deba más a un efecto de saturación primaria del tejido sano por las fases asexuales y sexuales infectivas subsecuentes a la fase de invasión inicial (esporozoito), lo cual de acuerdo con Williams (2001) es posible correlacionar directamente con la cantidad inicial de ooquistes empleados en la primo- inmunización. Debido a que el impacto de la dosis inicial de inmunización de *E. tenella* sobre la inmunidad humoral y la cantidad de ooquistes producidos (stock de laboratorio) se encuentra pobremente documentada, en el presente estudio se analizó la respuesta inmune humoral y la cronobiología de inmuno- dominancia de dos fases asexuales de *E. tenella* cuando se emplean dos diferentes dosis de ooquistes para la primo- inmunización. En México no existen proveedores comerciales de Abs específicos contra los diferentes componentes de *E. tenella*, por lo cual con la finalidad de obtener anticuerpos séricos policlonales específicos a *E. tenella* para utilizar como reactivos en las subsecuentes pruebas de análisis de interacción antígeno-anticuerpo se diseñaron dos protocolos de inmunización de aves *in vivo* con cantidades progresivas de ooquistes esporulados (5×10^3 ; 1×10^4 ooq. /ave).

2.4.1 Animales y alojamiento

Se adquirieron veintisiete aves reproductoras de un día de edad provenientes de una cruce selectiva de las razas *Hampshire* x *Rhode Island Red* x *Plymouth Rock Barred* en la ciudad de Cuautla, Morelos, México. Se mantuvieron en una criadora de piso firme durante las tres primeras semanas de edad, después se trasladaron a jaulas elevadas, se proporcionó alimento estándar de acuerdo a cada etapa (crianza y desarrollo, Agribrand Purina México S. de R.L. de C.V.) sin anticoccidiano, se les proporciono agua potable *ad libitum*.

2.4.2 Parásito

Se utilizó el aislamiento de la cepa patógena de *E. tenella* previamente ya descrita.

2.4.3 Diseño experimental

Se implementaron dos programas de inmunización, el desafío inicial de las aves en jaula contemplo una dosis única de ooquistes esporulados de *E. tenella*. A las 8 semanas de edad, en el programa A (n=9) cada ave recibió *per os* directo a ingluvies una dosis de 5×10^3 ooquistes esporulados de *E. tenella* (5K). Cuatro semanas después cada ave recibió un

desafío con 1×10^5 ooquistes, en la semana 16 se les desafío nuevamente a todas las aves de este grupo con 1×10^6 ooquistes/ave. En el programa B (n=9), a las 8 semanas de edad, las aves se primo- inmunizaron con una dosis de 1×10^4 ooquistes esporulados (10K). En la semana 12 de edad se les administraron 1×10^5 ooquistes/ave. Cuatro semanas después se les inoculo con 1×10^6 ooquistes esporulados/ave (Figura 2). Después de cada inoculación y durante todo el periodo de prepatencia se registró cualquier signo clínico sugestivo a coccidiosis cecal. Un grupo de 9 aves no inmunizadas ni infectadas se mantuvo bajo las mismas condiciones de alojamiento que las aves experimentales a lo largo de la duración de la prueba en una batería de jaulas colocada en una unidad de aislamiento adyacente.

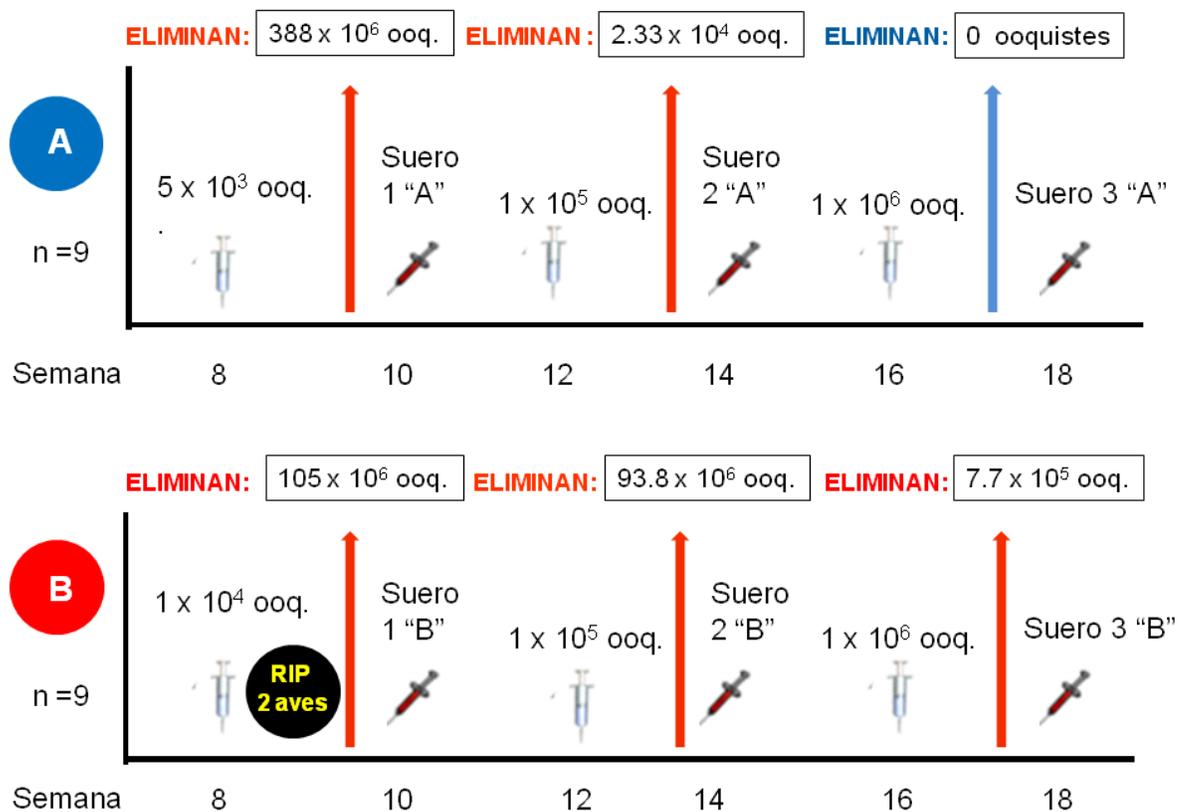


Figura 2.- Protocolo de inmunización en aves híbridas *Rhode Island red* x *Hampshire* x *Plymouth Rock Barred* iniciando con 5,000 (A) y 10,000 (B) ooquistes esporulados de *E. tenella*/ave. n=9

2.4.4 Recolección de ooquistes y suero sanguíneo

Después de cada inmunización y desafío (refuerzo), del día 5 al 9 se recolectaron las heces de las aves de ambos tratamientos y de las aves testigo (Juárez et al., 2002). Se contabilizo

el total de oocistos por ave de cada grupo experimental de acuerdo con la metodología implementada por Juárez *et al* (2002) utilizando la cámara de McMaster (Long y Rowell, 1958). Las aves testigo fueron constatadas para verificar su eliminación de OPGH a lo largo de todo el experimento. Todas las aves de todos los grupos se sangraron individualmente dos semanas después de cada inmunización. La muestra sanguínea se dejó coagular a temperatura ambiente 2 horas, después se refrigeró toda la noche, al día siguiente el suero se recolectó y se centrifugó a $2000 \times g$ 5' a 4°C. El suero se almacenó a -20°C hasta su uso.

2.4.5 Preparación de antígenos de esporozoitos y merozoitos de *E. tenella*

Los antígenos solubles de SzS y MzS de segunda generación de *E. tenella* se obtuvieron de acuerdo a la metodología descrita previamente en el presente estudio (2.2.4 y 2.3.3).

2.4.6 SDS-PAGE, Western blot

La separación de 20 µg de antígenos solubles de esporozoitos y merozoitos de segunda generación de *E. tenella* y un testigo con base a 10 µg de BSA se efectuó en una matriz combinada de gel duodecil sulfato de sodio (SDS) acril- bisacrilamida al 12%. La electroforesis se efectuó bajo condiciones reductoras de acuerdo con la metodología ya descrita previamente. Los polipéptidos separados en la matriz de gel fueron teñidos con CBB o electro- transferidos a una membrana de PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La identificación y caracterización de antígenos específicos de Sz y Mz se efectuó después de 15 días de cada inmunización utilizando en forma de *pool* seis de los anti- sueros de las aves inmunizadas con cada programa de inmunización y de las aves testigos no inmunizadas por grupo de tratamiento (n=6). Para el análisis particularizado de la respuesta inmune humoral por ave, se incluyeron en forma individual por *immunoblot* los mismos tres antisueros posteriores a la tercer inmunización (3A) de cada una de tres aves inmunizadas primariamente con 5K utilizados previamente para su análisis en la prueba de ELISA. Todas las muestras se diluyeron 1:100. En la prueba se utilizó como anticuerpo secundario un conjugado IgG de cabra anti- IgY de pollo marcado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Philadelphia, PA, USA) a una dilución de 1:1500. Las membranas se visualizaron por medio de una reacción con 3,3'-diaminobencidina (10 mg/5mL) (DAB tablets, SigmaFast™, SIGMA, USA). Las bandas predominantes en los dos ciclos de vida de *E. tenella* identificadas en las membranas de transferencia de WB fueron evaluadas por dos observadores independientes con la finalidad de identificar peculiaridades y consensar su masa molecular más probable con base al M de las proteínas testigo.

2.4.7 ELISA

La reactividad de los anticuerpos séricos contra los antígenos solubles de las dos primeras fases asexuales de *E. tenella* se evaluó por medio de la técnica indirecta de ELISA, la cual se realizó de acuerdo con lo descrito previamente por Constantinoiu *et al* (2007). Los sueros de todas las aves inmunizadas y sin inmunizar se analizaron individualmente. Como control positivo se usaron sueros obtenidos previamente de 4 aves *SPF Leghorn White* vacunadas subcutáneamente 4 ocasiones con intervalos de 2 semanas con una vacuna compuesta por 100 µg de esporozoitos completos de *E. tenella* homogeneizados en un adyuvante con base a nanopartículas y aceite vegetal de acuerdo con la metodología descrita previamente por Juárez-Estrada *et al* (2021a). El control negativo en cada placa incluyó un pool de suero de referencia tomado aleatoriamente a partir de 6 aves testigo no inmunizadas.

Para analizar de forma particular la respuesta inmune humoral por ave (haplotipo particular de MHC-II de receptores LB), a partir de los resultados del mejor protocolo de inmunización evaluado (programa "A") se efectuaron ensayos de ELISA indirecta recolectando individualmente tres antisueros tomados al azar a partir de aves de este grupo, los sueros se recolectaron 2 semanas después de la tercer inmunización del grupo primo-inmunizado con 5K (tres antisueros identificados como 3A). Todas las muestras se analizaron por duplicado (1:100). Con la finalidad de identificar probables valores atípicos todas las muestras se analizaron en dos eventos independientes.

2.4.8 Parámetros para evaluar el grado de inmunidad adquirida

Para determinar la mejor respuesta de inmunidad (aves resistentes) al desafío con la cepa patógena de *E. tenella*, se efectuó la observación patognomónica de signos clínicos de coccidiosis y el grado de su severidad a lo largo del periodo de prepatencia y patencia. Para comparar las diferencias en la eliminación de OPGH entre grupos, en cada periodo post-inmunización-desafío se registró y analizó la eliminación total de OPGH/ave. La respuesta de los anticuerpos policlonales hacia ambos zoitos asexuales de *E. tenella* posteriores a cada PI-desafío fue comparada entre grupos. La pollona de reemplazo fue la unidad experimental. Todos los datos fueron recopilados y analizados por medio de un módulo de modelo lineal general de ANDEVA. Se verificó previamente la distribución normal y la homogeneidad de la varianza de los datos con la prueba UNIVARIADA del software SAS/STAT 9.2 (SAS/STAT 9.2. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) y la prueba de Hartley respectivamente (Gill, 1978). Cuando se determinó alguna diferencia entre las medias de los grupos se efectuó *post hoc* una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey a una significancia para alfa de p

<0.05. En las membranas PVDF electro transferidas se determinó la probable reactividad inespecífica hacia el BSA y la inmunodominancia de los anticuerpos de cada grupo experimental sobre ambas fases asexuales de *E. tenella* con base a la intensidad colorimétrica de las bandas identificadas. El grado de reconocimiento en cada carril electroforético de cada zoito asexual de *E. tenella* analizado y su relación con su respectivo peso molecular del M fueron analizados por dos observadores independientes. Se efectuaron tres ensayos de *Western blot* con la finalidad de discriminar singularidades.

2.5 Metodología de evaluación de la respuesta inmune humoral generada contra el protozooario Apicomplexa aviar *Eimeria tenella*

2.5.1 Titulación del antígeno de esporozoitos por medio de la técnica de ELISA indirecta

Se sensibilizó una placa (Maxisorb, Nunc 96) con el sobrenadante o el *pellet* del antígeno de esporozoitos obtenidos de 5 ciclos de congelamiento-descongelamiento, o el SN de esporozoitos tratados con buffer de lisis, se utilizaron diluciones dobles seriadas a partir de la dilución 1:2 ó 1:10 del antígeno (20 µL de muestra en 180 µL de buffer de carbonatos) en buffer de carbonatos 1X (carbonato de sodio 0.1 M, bicarbonato de sodio 0.1 M, pH 9.6), colocando 100 µL de ésta dilución por pozo, la cual se dejó incubando a 4°C toda la noche. Se lavo la placa (300µl/pozo) cuatro veces con buffer de lavado 1X por 5 minutos cada una con agitación oscilatoria continua (300 rpm). La placa se bloqueó por una hora a 37°C colocando en cada pozo 100 µL de buffer de bloqueo (cloruro de sodio 0.125 M, 25 mM tris-HCl pH 7.9, Tween- 20 0.1%, leche descremada al 5%). La placa se lavó (300µl/pozo) cuatro veces con buffer de lavado 1X por 5 minutos c/una con agitación oscilatoria continua (300 rpm). El suero de referencia de ave contra *E. tenella* se diluyo en buffer de bloqueo en dos diluciones (1:10 y 1:100), se colocaron 100 µL/pozo y la placa se incubo por 1 hora a 37°C. La placa se lavó nuevamente y se incubo con el segundo anticuerpo (IgG de cabra anti-IgY de ave) acoplado a HRP diluido en buffer de bloqueo (1:1000) 1 hora a 37°C. La placa se lavó nuevamente y se colocaron 100 µl/pozo de solución reveladora (Por placa, se mezclan 5 mL del ácido cítrico 0.1M y 5 mL de citrato de sodio 0.1M, se agregan 200 µl de una solución de 5 µg de OPD más 20 µL de peróxido de hidrogeno al 30%), se dejan aproximadamente 5 minutos con agitación a 150 rpm y la reacción enzimática colorimétrica se detiene colocando 50 µL/pozo de solución de frenado (ácido sulfúrico 2N). La placa se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro (Epoch™ Bio-Tek, Winooski, VT, USA). La calidad del revelado se evaluó

con la prueba de máxima densidad óptica (MDO), se colocaron 100 µL de la solución reveladora en una columna de la placa por duplicado, después se agregaron a cada uno de los dos pozos de la fila A 100 µL de la solución del segundo anticuerpo a una dilución 1:1000, inmediatamente se efectuaron diluciones dobles seriadas a partir del primero hasta el octavo pozo (Sambrook y Russell, 2001), los 100 µL sobrantes del último pozo se eliminaron de acuerdo a la normatividad vigente para el manejo de residuos químicos-biológicos peligrosos (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002).

2.5.2 Titulación con ELISA indirecta del suero hiperinmune de gallinas (*Gallus gallus*) contra el antígeno de esporozoitos de *E. tenella*

La medición de la reactividad del suero hiperinmune se efectuó sensibilizando una placa (Maxisorb, Nunc) con el antígeno contenido en el SN proveniente de 5 ciclos de congelamiento-descongelamiento de esporozoitos de *E. tenella*. Inicialmente el antígeno se diluyó 1/64 en buffer de carbonatos 1X colocando 100 µL de esta dilución en cada pozo de la placa, se dejó incubando a 4°C toda la noche. Pasado el tiempo de incubación la placa se lavó cuatro veces con buffer de lavado 1X (300µl/pozo), entre lavado y lavado la placa se mantuvo 5 minutos en agitación oscilatoria continua (300 rpm). Los pozos se bloquearon por 1 hora a 37°C colocando en cada pozo 110 µL de buffer de bloqueo (cloruro de sodio 0.125 M, 25 mM tris-HCl pH 7.9, Tween- 20 0.1%, leche descremada al 5%). Posteriormente la placa se lavó 4 veces con buffer de lavado 1X (300µl/pozo), entre cada lavado la placa se mantuvo 5 minutos en agitación continua (300 rpm). Dos diferentes antisueros de gallinas inmunizadas con dos diferentes dosis iniciales de *E. tenella* (Programa A= 5,000 ooquistes/ave; Programa. B= 10,000 ooquistes/ave) y dos refuerzos inmunológicos posteriores con altas cantidades de ooquistes homólogos se diluyeron en buffer de bloqueo (1:5 a 1:640), como control negativo se probaron las mismas diluciones de suero de ave, pero en este caso el antisuero era específico contra el virus de la Diarrea Viral Bovina (Anti herpe virus), se colocaron 100 µL/pozo y la placa se incubó 1 h a 37°C. La placa se lavó nuevamente y se incubó con el segundo Ab (IgG de cabra anti-IgY de ave) acoplado a HRP diluido en buffer de bloqueo (1:1000) 1 hora a 37°C. La placa se volvió a lavar y se colocaron 100 µl/pozo de solución reveladora, se esperaron 10 minutos e inmediatamente se detuvo la reacción con 100 µL por pozo de solución de frenado (H₂SO₄ 2N), la placa se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro. La calidad del revelado se evaluó con la prueba de MDO de acuerdo con lo descrito en el subcapítulo anterior (2.5.1).

2.5.3 Titulación mediante ELISA indirecta del antígeno de merozoitos de *E. tenella* de segunda generación

Se sensibilizó una placa (Maxisorb, Nunc 96) con SN y *pellet* del antígeno de merozoitos de segunda generación utilizando diluciones dobles seriadas hasta 1:1,280 a partir de la dilución 1:10 del antígeno (20 µL muestra en 180 µL buffer de carbonatos) en buffer de carbonatos 1X. El procedimiento ELISA fue similar al descrito en el subcapítulo 2.5.2.

2.5.4 Titulación del suero hiperinmune de ave contra el antígeno de merozoitos de segunda generación de *E. tenella* mediante ELISA indirecta

Se probó la reactividad del suero hiperinmune que se empleó como referencia contra el antígeno del merozoito, se sensibilizó una placa (Maxisorb, Nunc) con 1 µg constante del SN de merozoitos de *E. tenella* (clave Mz15), el antígeno se diluyó a 1 µg/pozo en buffer de carbonatos 1X. El procedimiento ELISA fue similar al descrito en el subcapítulo 2.5.1.

2.5.5 Caracterización de polipéptidos en los sobrenadantes de antígenos de esporozoitos y merozoitos de segunda generación de *E. tenella* por medio de *Western blotting*

Se preparó un gel de SDS- acrilamida- bis acrilamida al 12% y se colocaron en cada pozo 20 µg del antígeno de Sz y Mz previamente desnaturalizados a 94°C por 10 min en buffer de carga de proteínas (1x). Se elaboraron dos geles idénticos, uno para teñir con CBB y el otro para transferir a una membrana de PVDF. En un pozo del gel se depositaron 10 µL del marcador de peso molecular de proteínas (M) (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder Cat. 26616, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) y un control negativo de BSA (10 µg/pozo). El gel se sometió a electroforesis vertical submarina con una corriente de anodo a catodo de 60-70 V, 110 mA y 80 watts durante 2:30-3:00 horas, o bien hasta el momento que el indicador o banda de color del marcador de menor peso molecular se encontraba por salir del campo visual del gel. Al finalizar la corrida electroforética, se activó por un minuto en metanol absoluto una membrana PVDF. Posteriormente la membrana se retiró e hidrató con agua destilada hasta el momento de efectuar la electro- transferencia semihúmeda de proteínas a partir del SDS-PAGE, la membrana activada se conservaba a 4°C hasta su uso. El SDS-PAGE se retiró y cortó a la medida de los canales de corrida con el antígeno de interés, esto con la finalidad de teñir el antígeno repetido/espejo de Sz y Mz de segunda generación de *E. tenella* en solución CBB durante 24 horas, después el gel se destiñó y el patrón de las proteínas teñidas se comparó con el patrón de proteínas

identificadas con el anticuerpo primario bajo la reacción enzimática generada con el Ab secundario en WB. Los filtros se humedecieron con buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 %, pH 8.3, buffer submarino usado para transferencia semi-húmeda) y se colocaron en el dispositivo de electro- transferencia, primero un filtro grueso, se humedeció con buffer de transferencia, se colocó el filtro fino y este se embebió con el mismo buffer, encima se depositó la membrana de PVDF activada y encima de la membrana se colocó el SDS-PAGE, este se cubrió con un filtro fino y uno grueso previamente humedecidos con buffer de transferencia, se retiraron las burbujas aplanando los filtros superiores con un rodillo *ex professo*, se cerró el aparato asegurando el contacto de los conductores eléctricos y se aplicó una corriente eléctrica directa de anodo a catodo de 80 V, 110 mA y 80 Watts de carga durante 1:30 h. Al término de la transferencia eléctrica se retiró la membrana PVDF del dispositivo y se bloqueó inmediatamente colocándola en un recipiente con 30 a 50 ml de buffer de bloqueo (buffer de lavado 1X más leche descremada al 5%), se incubo por 60 minutos en agitación o bien O/N a 4°C. Después cada membrana se colocó en un contenedor individual y se lavó por cinco periodos de 5 minutos cada uno con buffer de lavado 1X (1.25 M NaCl, 250 mM de Tris-HCl pH 7.9, Tween 20 1%) y un periodo adicional de 5 minutos con PBS 1X (Fosfato de sodio monobásico 0.1 M, fosfato de sodio dibásico anhidro, cloruro de sodio 0.15 M) en agitación continua a 300 rpm. Se retiro el exceso de buffer y se agregó el antisuero de ave a una dilución apropiada (1:100, 1:200). Se incubo a 37°C por 1 h en agitación constante, al término de la incubación, cada membrana se lavó por cinco periodos de 5 minutos con buffer de lavado 1X en agitación a 300 rpm. Las membranas se incubaron con el 2º anticuerpo anti IgY de ave acoplado a HRP en una dilución 1:1500 en buffer de bloqueo 1x por 1 h a 37 °C. Después se lavó por cinco periodos de 5 minutos con buffer de lavado 1X en agitación a 300 rpm. Se retiro el exceso de buffer y la membrana PVDF se colocó en la solución reveladora preparada con 9 ml de agua destilada, 1 ml de Opti 4CN y 0.2 ml del sustrato (Opti-4CN™ Substrate Kit 170-8235, BIORAD® Hercules, CA, USA) a temperatura ambiente y agitación constante (210 rpm) por 5 min o hasta que comenzaba a revelarse (Sambrook y Russell, 2001). Cuando se observaron bandas la membrana se retiró de la solución reveladora y se enjuago con abundante agua destilada, la membrana se colocó entre dos hojas de papel Bond A4 90g y bajo presión se dejó secar O/N, después la imagen de cada membrana se fotodocumento con una cámara Canon EOS Rebel SL1 (Canon Inc. Tokyo, Japan).

2.6 Evaluación del probable uso de anticuerpos policlonales versus *Eimeria* sp, como reactivo-ligando para el tamizaje de dos bibliotecas aleatorias de Phage display

Diferentes investigaciones han probado exitosamente el uso de inmunoglobulinas Y obtenidas de la yema de huevo en el control de diversas enfermedades infecciosas que afectan a las aves domésticas (Xu et al, 2011, Gadde et al, 2015). Lo cual muestra que la estimulación de receptores tipo “B” ofrece una posibilidad para prevenir y controlar las enfermedades en la gallina doméstica (Dalloul y Lillehoj, 2006; Wallach, 2010; Wiedmer et al, 2017). Este mismo tipo de inmunidad es la que se genera al administrar mimótopos inmunogénicos seleccionados con *Phage display* (Prudencio et al., 2010; Gazarian et al, 2011). Recientemente se ha documentado la utilidad del uso oral de IgYs de la yema de huevos de gallinas pre-inmunizadas contra *Eimeria* sp, sobre la protección contra infecciones por coccidia. Lee et al (2009a) utilizó profilácticamente un liofilizado de IgYs específicas obtenido de la yema de huevo de gallinas pre- inmunizadas contra tres especies de *Eimeria* sp (Supracox®, SC), los resultados mostraron que la profilaxis oral con estas inmunoglobulinas multivalentes en pollos jóvenes confiere protección significativa contra un desafío con *E. acervulina*. En otra investigación, los mismos autores hicieron hincapié sobre la eficacia del mismo producto de IgYs sobre la infección experimental con *E. maxima* y *E. tenella* (Lee et al, 2009b). Recientemente, al utilizar en el alimento de pollos de engorda profilácticamente un liofilizado hiperinmune de IgYs multivalentes provenientes de la yema de huevos de gallinas inmunizadas con cinco especies de *Eimeria*, Xu et al (2013a) mostraron protección significativa contra la infección experimental con *E. tenella*. Lo cual determina que el uso de IgYs en la gallina doméstica de forma pasiva protege contra las infecciones con *E. tenella*. Sin embargo, a la fecha no existe información acerca del uso terapéutico *per os* o a través del agua de bebida de IgYs provenientes de la yema de huevos de aves previamente inmunizadas con *Eimeria* sp durante el periodo activo de infección con *E. tenella* (inmunidad pasiva). Por lo cual para verificar el grado de protección con este tipo de producto (SC), se evaluó el grado de protección *in vivo* cuando este se administra a aves *SPF Leghorn* y estas son infectadas experimentalmente con un inóculo tipo *crowded dose* (3×10^4 ooquistes esporulados/ave) de una cepa heteróloga de *E. tenella*.

Inmunoprotección con anticuerpos policlonales IgY provenientes de la yema de gallinas domésticas inmunizadas contra *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* administradas a aves *SPF Leghorn White* infectadas con una cepa salvaje de *E. tenella*
En México existía en el mercado de suplementos médico-avícolas (hasta el inicio del

presente estudio) un producto con base a una suspensión líquida de IgYs provenientes de las yemas de huevos de aves hiperinmunizadas previamente por vía oral con ooquistes esporulados de *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* (SC) (Morales y Lucio, 2012). Con base a los objetivos del presente estudio se pensó que era factible que la suspensión comercial de inmunoglobulinas Y pudiera utilizarse para el tamizaje de bibliotecas de Ph D con la finalidad de poder identificar mimotopos inmunogénicos e inmunoprotectores de alguna de las fases infectivas de *E. tenella*. Sin embargo, no existen investigaciones previas que determinen la caracterización de funcionalidad de estas mismas IgYs desde el punto de vista biológico, molecular o de inmunoprotección terapéutica *in vivo* contra cepas heterólogas mexicanas como nuestra cepa de *E. tenella* en estudio (Los estudios previos de Lee et al., 2009a,b con el producto SC fueron efectuados en el laboratorio de la Dra. Lillehoj en Beltsville, MD, USA, utilizando cepas norteamericanas). En un estudio previo de tesis de Maestría en Ciencias llevado a cabo en México (Castelló, 2009) con este mismo producto (SC) no se logró efectuar la caracterización inmunológica de estas IgYs en laboratorio (ELISA y *Western blot*). Por lo que para poder utilizar estas inmunoglobulinas como herramienta para el tamizado en Ph D se requería previamente verificar si efectivamente la protección que ofrece este producto (antígenos tipo B) es estadísticamente válida cuando las aves se enfrentan a una infección con una cantidad de ooquistes de una cepa patógena de *E. tenella* local mexicana más allá del umbral de dosis para saturación (*crowded dose*) (Williams, 2001), si fuera así, se procedería a caracterizar esta suspensión con un enfoque de reconocimiento inmunológico molecular (ELISA, SDS-PAGE, WB) lo suficientemente apropiado para estudios de caracterización posterior, esto con la finalidad de poder utilizar estos anticuerpos como ligandos para la identificación y selección de fagotopos a través de Ph D (evaluación de probables mimotopos verdaderos del esporozoito de *E. tenella* identificados y seleccionados por Ph D).

2.6.1 Infección con *E. tenella* para evaluar el grado de protección de anticuerpos policlonales IgY vs *Eimeria* sp terapeúticamente administrados a aves SPF

Se determinó el grado de protección en aves *SPF Leghorn White* por medio de inmunidad pasiva oral con un producto comercial (SC) compuesto por inmunoglobulinas Y policlonales provenientes de aves inmunizadas previamente con *Eimeria* sp., a través de la infección con una alta cantidad de ooquistes esporulados de una cepa heteróloga de *E. tenella*. Para lo cual durante el periodo de prepatencia del desafío el producto (SC) se administró *per os* en agua de bebida (Debido a que la fecha de caducidad del compuesto estaba en el límite se

decidió probar una dosis con una concentración 2x a la recomendada por el proveedor). Esta prueba contribuyó a evaluar además el diseño experimental del modelo de infección-desafío a utilizar posteriormente durante las pruebas de potencia con los inmunógenos generados con los mimótopos del esporozoito de *E. tenella*. Esta prueba fue muy valiosa ya que además de permitir constatar la efectividad que tiene la inmunidad humoral pasiva (Abs de antígenos tipo “B”) a través de la inmunoterapia utilizando las IgYs del producto (SC) administradas directamente al ingluvies de las aves una vez cada 24 horas durante los 7 días del periodo de prepatencia, facilitó la adquisición de experiencia en la evaluación específica del grado de patogenicidad de la cepa de *E. tenella* utilizada a la dosis de infección empleada (3×10^6 ooquistes/ave) en la estirpe de las aves a utilizar en el estudio.

2.6.2 Animales experimentales

Se adquirieron 64 huevos fértiles *SPF* (ALPES, S.A. de C.V. Tehuacán, Puebla, México) que fueron incubados y eclosionados en el Dep. de Med. y Zoot. de Aves de la F.M.V.Z.-U.N.A.M. Después de su nacimiento todos los pollitos de un día de edad fueron alojados durante cuatro semanas en un corral libre de *Eimeria* sp, posteriormente se trasladaron y alojaron 8 semanas en jaulas con piso de criba metálica. Se proporcionó un calendario de iluminación, temperatura, humedad, agua potable de bebida y alimento *ad libitum* libre de drogas anticoccidianas de acuerdo a la edad y estirpe de las aves.

2.6.3 Parásitos

Se utilizó una cepa salvaje de *E. tenella* aislada de un brote clínico en una granja comercial de Querétaro, México. La separación de ooquistes de las heces, esporulación y condiciones de almacenaje están descritos por doquier (Ryley et al., 1976; Long et al., 1976). La metodología para preparar dosis infectantes y cuantificar ooquistes en heces y tejido cecal ha sido previamente ya descrita (Long y Rowell, 1958, 1975; Tomley, 1997; Juárez et al., 2002). Para contar con ooquistes frescos (≤ 4 semanas después de su esporulación) los parásitos se propagaron cada 2–3 meses en aves *SPF Leghorn* de 3–4 semanas de edad.

2.6.4 Antisuero e IgYs policlonales de la yema de huevo versus *E. tenella*

El suero inmune de referencia para usar en las pruebas de ELISA y *Western blotting* se obtuvo a partir de nueve aves híbridas de 8 semanas de edad (*Hampshire* \times *Rhode Island Red* \times *Plymouth Rock Barred*) alojadas en jaulas convencionales libres de *Eimeria* sp. Las aves fueron inoculadas directamente en ingluvies con 5×10^3 ooquistes esporulados de *E.*

tenella. Las aves recibieron dos refuerzos de ooquistes vía oral con intervalos de cuatro semanas. El grupo control negativo de aves no-inmunizadas (n=4) se mantuvo bajo las mismas condiciones en una unidad adyacente libre de *Eimeria* sp., las aves recibieron directamente en ingluvies PBS estéril cada fecha de inmunización/refuerzo. Dos semanas después de la última inmunización todas las gallinas fueron sangradas a partir de la vena radial del ala. La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente (22–24°C) 1 ¼ hora, después permaneció O/N a 4°C, después el suero fue separado y centrifugado a 2000 x g 5 minutos, se alicuotaron en tubos de 1000 µL y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Las inmunoglobulinas de yema de huevos de aves inmunizadas contra *E. tenella* se obtuvieron de cuatro pollonas *SPF Leghorn White* de 12 semanas de edad que fueron criadas en jaula con piso de criba metálica dentro de una unidad libre de *Eimeria* sp., se les inyectó subcutáneamente con una vacuna formulada con 100 µg de esporozoitos purificados inactivados mezclados con adyuvante con base a nanopartículas IMS 1313 N VG PR (Seppic Montanide™, Puteaux, France) (50:50) (EtSz-IMS1313) (Juárez-Estrada et al., 2021a). Todas las aves recibieron un refuerzo vía Sc con el mismo tipo de inmunógeno tres ocasiones con intervalos de dos semanas. Dos aves *SPF Leghorn White* de la misma edad se mantuvieron bajo las mismas condiciones en una unidad adyacente y fueron inyectadas Sc con PBS estéril. Se obtuvieron muestras de sangre de todas las aves de la *Vena cutanea ulnaris* dos semanas después de cada inmunización. El suero fue obtenido por coagulación de las muestras (1 ¼ hora a temperatura ambiente y después a 4°C O/N, al día siguiente se separó y centrifugo a 2000 x g por 5 minutos), se alicuoto en tubos de 1000 µL y se almaceno a -20°C hasta su uso. Algunos huevos de cada gallina *SPF Leghorn White* se recolectaron en este mismo periodo con la finalidad de obtener IgYs a partir de las yemas.

2.6.5 IgYs policlonales de yema versus *Eimeria* sp., para el ensayo de inmunoterapia

Se utilizó una suspensión de IgYs provenientes de la yema de huevos de gallinas inmunizadas contra *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* (Supracox™, SC) (Investigación Aplicada, Sociedad Anónima de Capital Variable [IASA], Puebla, México) para inmunoterapia en aves infectadas con una dosis de sobresaturación de ooquistes esporulados de *E. tenella*. La suspensión SC se preparó con yemas de huevos de aves *SPF Leghorn White* que fueron hiperinmunizadas oralmente con ooquistes vivos de *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*. El programa de inmunización consistió en infectar oralmente a las aves con 6,000 ooquistes esporulados de las tres especies de *Eimeria* ya referidas (Los fabricantes no indican si los 6000 fueron de cada especie o la proporcionalidad de cada una dentro de la mezcla del

inoculo). Este esquema de inmunización inicio a los 60 días de edad de las gallinas y continuó con refuerzos orales cada 4 semanas a lo largo del periodo de ovoposición. Las IgYs se obtuvieron al remover los componentes lipídicos de la yema con solventes, a lo que se continuó con una precipitación de proteínas, posteriormente estas se purificaron. Las IgYs obtenidas se sometieron a una aspersion en seco (*spray-dried*) y después se suspendieron en agua estéril y conservadores (Avid AL, Unisyn Technologies, Tustin, CA, USA). La concentración de proteína en el SC se cuantificó con la técnica de Bradford (BioRad, Hercules, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante del reactivo.

2.6.6 Anticuerpos IgY de yema versus el esporozoito de *E. tenella*

Las inmunoglobulinas IgY provenientes de la yema de huevos de gallinas inmunizadas con el esporozoito completo inactivado de *E. tenella* fueron aisladas de acuerdo con la metodología descrita por Akita y Nakai (1993). Inicialmente la yema se separó de la albúmina, la yema se mezcló con agua destilada estéril fría (v/v, 1:10). El pH de la mezcla se ajustó a 5.1 añadiendo 0.1 mol l⁻¹ HCl, se incubo a 4°C O/N. El SN acuoso con la mayor cantidad de IgYs se obtuvo al centrifugar la mezcla a 10,000 x g a 4°C 25 min, esta fracción se filtró a través de un filtro de papel Whatman no. 1. Con la finalidad de precipitar y purificar las IgYs de este sobrenadante filtrado se efectuaron dos precipitaciones con sales. En la primera se añadió sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄] a un 35% de saturación, la mezcla se agito una hora a 4°C. El precipitado se colecto al centrifugar esta mezcla a 10,000 x g a 4°C 25 min, y se resuspendió con agua desionizada (~1,500 µL). En la segunda precipitación, el (NH₄)₂SO₄ se añadió a un 20% de saturación, la mezcla se agito una hora a 4°C. El precipitado se colecto nuevamente por centrifugación a 10,000 x g a 4°C por 25 minutos y se resuspendió en PBS 1X (0.01 M, pH 7.4). Finalmente, esta suspensión se dializo contra más PBS 1X estéril, se le añadió Gentamicina y se congelo a -20°C hasta el momento de utilizarla.

2.6.7 Aislamiento y purificación de esporozoitos y merozoitos de *E. tenella*

La obtención y purificación de las dos fases asexuales de *E. tenella*, se efectuó de acuerdo con lo descrito previamente (2.2 y 2.3).

2.6.8 Preparación de la suspensión de Ags de esporozoitos y merozoitos *E. tenella*

La obtención de antígenos solubles del esporozoito y merozoito de segunda generación de *E. tenella* se efectuó de acuerdo con lo descrito previamente (2.2.4 y 2.3.3).

2.6.9 SDS-PAGE y análisis de pureza de los Abs IgY de la yema de huevo del SC

La calidad y pureza de las inmunoglobulinas IgY contenidas en la suspensión comercial SC se determinaron por medio de electroforesis en un gel de acril-bisacrilamida (SDS-PAGE). La electroforesis SDS-PAGE se efectuó bajo condiciones reductoras y desnaturalizantes utilizando un gel concentrador al 7% y un gel separador al 12% en un recipiente para electroforesis (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). La visualización de bandas se efectuó al teñir el gel con CBB y aclarar posteriormente el gel durante 24 horas con solución desteñidora. La pureza de los anticuerpos en la solución se evaluó a partir de una imagen digital (Canon EOS Rebel SL1, Canon Inc. Tokyo, Japan) de las dos cadenas de IgYs en el gel SDS-PAGE fijado entre dos capas de celofán dulce, la pureza se calculó al sustraer el fondo y medir el área de densidad de ambas bandas, se consideró como contaminante cualquier banda de mayor contraste al fondo lúcido que no estuviera delimitada dentro del área estipulada para las dos bandas ya referidas (cadena pesada ~68 kDa y ligera ~27 kDa). El porcentaje de no-pureza se determinó con base al diferencial del área que ocupaban las bandas no-coincidentes a lo largo del área cuadrada total del carril, el diferencial de estas bandas con el área total del carril sustrayendo el fondo y el área de densidad de las dos cadenas de IgY se consideró como porcentaje de pureza, esta medición se ratificó por medio del análisis del gel midiendo la densidad después de la sustracción del fondo usando la herramienta de análisis de gel Image J.JS ImJoy, (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>). La actividad inmunológica de las inmunoglobulinas se evaluó con ELISA y *Western blot*. La actividad biológica se determinó con el ensayo de protección a través de inmunidad pasiva oral utilizando dos diferentes concentraciones de IgYs.

2.6.10 ELISA

Los sueros obtenidos en los esquemas de inmunización oral (5,000 ooquistes esporulados de *E. tenella/ave*) y subcutánea (100 µg de esporozoitos completos inactivados de *E. tenella/ave*) se evaluaron con una prueba de ELISA indirecta su inmunorreactividad hacia los SN de Sz y Mz de *E. tenella*. La prueba se efectuó esencialmente como lo describe Constantinoiu et al. (2007) utilizando como antígenos los dos mismos ciclos de vida de *E. tenella*. Brevemente, se sensibilizó una placa (MaxiSorb, Nunc, Roskilde, Denmark) con 1 µg/pozo de cada antígeno de Sz o Mz en 100 µL de buffer de carbonatos (0.1 M de bicarbonato de sodio y 0.1 M de carbonato de sodio, pH 9.6) a 4°C O/N. Los pozos del control negativo se incubaron solamente con 100 µL del buffer de carbonatos. Después de lavar la placa cuatro veces por medio de agitación con una solución salina (120 mM NaCl, 25

mM Tris-HCl, pH 7.9) con 1% de Tween 20 (SST), los sitios de unión no específicos se bloquearon agregando 110 μ L de leche descremada al 5% en SST (SSLT) e incubando la placa 1 hora a 37°C. Después de lavar la placa cuatro veces con SST, se agregó por duplicado a los pozos de prueba el antisuero diluido en SSLT (1:10 y 1:100) y se incubaron 1 hora a 37°C. En cada placa se incluyó un control positivo y negativo. Después de su incubación, las placas se lavaron cuatro veces con STT y posteriormente se incubaron con su respectivo anticuerpo secundario anti-pollo conjugado con HRP diluido 1:1000 en SSLT. Después de una hora de incubación a 37°C, las placas se lavaron cuatro veces y la reacción enzimática se evidenció al añadir 100 μ L del cromógeno OPD, a una concentración de 5 μ g/10 mL en buffer de citratos (0.1 M ácido cítrico, 0.1 M citrato de sodio p.H. 4.5, y 20 μ L de H₂O₂ al 30%), la reacción se desarrolló en condiciones de oscuridad durante un periodo de 10 min en agitación moderada. La absorbancia producida por la hidrólisis del sustrato se leyó a 450 nm. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Las IgYs del SC y las inmunoglobulinas policlonales de la yema de huevo contra el esporozoito de *E. tenella* se diluyeron (1:100) y ambas muestras se detectaron con un anticuerpo secundario anti-pollo conjugado con HRP. Cuando fue requerido se incluyeron controles positivos y negativos. Los pozos se llenaron con 100 μ L del anticuerpo secundario diluido 1:6000 en SSLT. Después de una hora de incubación a 37°C, las placas se lavaron 4 veces y la reacción enzimática se desarrolló añadiendo 100 μ L del cromógeno TMB SS supersensible (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine liquid substrate system, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA), a una concentración de 10 μ g/10 mL en buffer de citratos, por 10 min bajo oscuridad en agitación. La reacción enzimática se detuvo al añadir 100 μ L de solución de paro (2N H₂SO₄). La absorbancia se leyó a 450 nm. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Las muestras se analizaron en 3 eventos distintos con la finalidad de identificar valores atípicos.

2.6.11 SDS-PAGE y *Wester blot*

Dos geles de SDS-PAGE al 12% fueron utilizados para separar las fracciones polipeptídicas de cada etapa asexual zoito de *E. tenella* descritas anteriormente (20 μ g/canal). Uno de los geles fue teñido con CBB y de acuerdo con lo descrito por Constantinoiu et al. (2008) su gel espejo se electro transfirió a una membrana de PVDF. La membrana se probó con el suero anti- *E. tenella* (1:100), las IgYs del producto SC (1:25), y los anticuerpos IgY de yema específicos contra el esporozoito de *E. tenella* (1:25). Se utilizó un anticuerpo secundario de conejo anti-pollo conjugado con HRP diluido 1:1500 (v/v). Las bandas en la membrana se visualizaron con DAB (10 mg/5 ml) (SigmaFast™, Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA). Las

bandas predominantes en las membranas de transferencia de WB fueron identificadas y evaluadas por dos observadores independientes con la finalidad de detectar peculiaridades y consensar con base al M testigo su masa molecular experimental específica.

2.6.12 Diseño experimental

Sesenta y cuatro aves *SPF Leghorn White* de un día de edad fueron criadas juntas, a los 28 días de edad las aves se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos de tratamiento con cuatro repeticiones cada uno (n=4 aves/réplica). Las aves del grupo uno no recibieron SC (IgYs) se les administro únicamente 2 mL de PBS 1X estéril y fungieron como el grupo testigo no-tratado no-infectado. Las aves en el grupo dos se suplementaron una vez al día *per os* de acuerdo con la dosificación recomendada por el fabricante (2 mL= 60 mg/ave) durante el periodo de prepatencia de *E. tenella* (7 d). Las aves en el tercer grupo recibieron diariamente *per os* durante el mismo periodo de prepatencia el doble de la dosis del complejo de inmunoglobulinas IgY policlonales recomendada por el fabricante (4 mL= 120 mg/ave). Las aves en el cuarto grupo fueron el grupo testigo positivo a la infección, se les administro únicamente 2 mL de PBS estéril 1X/ave, este grupo se infectó. La tabla 2 muestra los detalles del diseño experimental por grupo.

Tabla 2. Diseño experimental de infección y grupos

Grupo	Número de pollos	Suplemento	Dosis Diaria (mg/ave)	Días de terapia oral	Edad de infección (i)	Dosis de ooquistes por ave**
1	16	-	-	0	-	-
2	16	IgY* en SC	60	7	86	3 x 10 ⁴
3	16	IgY* en SC	120	7	86	3 x 10 ⁴
4	16	-	-	0	86	3 x 10 ⁴

* Suspensión para administrar en agua de bebida de anticuerpos IgY de yema de gallinas inmunizadas con *Eimeria* sp (Supracox™ SC; I.A.S.A., Puebla, México)

** Ooquistes esporulados de una cepa salvaje de campo de *E. tenella*

A los 86 días de edad, todas las aves se pesaron, las aves de los grupos 2, 3 y 4 se desafiaron oralmente con 3 x 10⁴ ooquistes esporulados de *E. tenella*/ave. Durante el periodo de prepatencia se registró diariamente en cada grupo la signología clínica y la mortalidad sugestiva a coccidiosis, a cada ave muerta se le efectuó la necropsia sistemática. Las heces

de las aves en cada grupo de tratamiento se colectaron de forma separada del día 5 al 7 PI. El consumo de alimento por ave durante el periodo prepatente fue registrado diariamente. Al día 7 PI, todas las aves de todos los grupos se pesaron, se sangraron del ala y se les aplicó eutanasia de acuerdo con la NOM 033-ZOO-2010 (Norma oficial mexicana).

2.6.13 Desafío-Infeción

La dosis se seleccionó con base a la caracterización de la cepa hecha previamente, esta dosis considera al menos una calificación en la severidad de las lesiones de +3 a +4 en la escala de Johnson y Reid (1970) en aves sin protección anticoccidiana, y una diferencia significativa de ganancia de peso corporal $\geq 30-35\%$ con relación al grupo testigo negativo no-tratado no-desafiado (Danforth, 1998; Shivaramaiah et al., 2010). La dosis empleada está considerada para que de manera superlativa supere en todo caso el peor escenario de infección que potencialmente podría presentarse de manera imprevista en las granjas comerciales de pollo de engorda (Wallach, 1997). Previo a la fecha de la infección, durante una semana se examinaron microscópicamente por flotación en solución de cloruro de sodio saturada ($> 5 M$) cinco muestras aleatorias de heces de cada uno de los grupos con la finalidad de verificar que se encontraban libres de cualquier tipo de infección por coccidia (Juárez, 1998). Los ooquistes esporulados de *E. tenella* utilizados como inóculo se suspendieron en PBS 1X estéril, la dosis se ajustó a 2 mL de inóculo/ave.

2.6.14 Parámetros para evaluar la eficacia de la inmunoterapia

La eficacia de la inmunidad pasiva con las IgYs hiperinmunes a *Eimeria* sp (SC) administradas *per os* durante la prepatencia de la infección experimental severa con *E. tenella* se evaluó con base a la tasa de viabilidad, ganancia de peso corporal (GPC), calificación de la severidad de las lesiones, conversión alimenticia g:g (CA), porcentaje de hematocrito (HCT), cantidad de ooquistes por gramo de heces (OPGH), ooquistes por gramo de tejido de sacos ciegos (OPGT) e índice anticoccidiano (IAC). La tasa de supervivencia se estimó dividiendo el número de aves sobrevivientes entre el número de aves iniciales $\times 100$. El peso corporal (g) se midió al día 86 de edad (antes de la infección) y al día 93 (7 días PI). La ganancia relativa de peso (GRP) se calculó como sigue: (ganancia promedio de peso corporal en las aves de los grupos tratados o no-tratado infectado) / (la ganancia promedio de peso corporal de las aves en el grupo control no-tratado no-infectado) $\times 100\%$. Al día 7 PI, las lesiones cecales en ambos sacos ciegos de las aves infectadas fueron calificadas de acuerdo a una escala (0= ausencia lesión, 1= leve 2= moderada, 3= severa, 4= muy severa o

muerte) en una modalidad de doble ciego por dos observadores calificados independientes (J.E.M.-A., & S.G.F.-D.) que siguieron el método descrito por McManus et al (1968) perfeccionado por Johnson y Reid (1970). Se ha mostrado que con base al tamaño del grupo experimental de tratamiento y la variabilidad dentro de las aves, una diferencia de ≥ 0.6 en la media de lesiones entre los grupos de tratamiento es estadísticamente significativa (Karkhanis et al., 1991). Se determinó el índice protectivo con base a la calificación de la severidad de lesiones (IPSL), este índice ayuda a determinar el grado de protección con base a la reducción de lesiones observadas en el grupo tratado e infectado en comparación a las lesiones registradas en el grupo testigo no-tratado infectado: $[1 - (IC/NIC)] \times 100\%$, donde IC= Promedio de la calificación de lesiones en el grupo tratado e infectado y NIC= Promedio de la calificación de lesiones en el grupo no-tratado infectado, donde la cepa y dosis de desafío es la misma para ambos grupos. Una reducción en la calificación de lesiones de 65% o más se considera protectivo (Danforth, 1998). La CA se expresó como la proporción en gramos de alimento consumido por gramos de peso corporal ganado durante el periodo de prepatencia/ave. Al día 7 PI, cada una de las aves incluyendo las del grupo control no-tratado no-desafiado fueron sangradas, la proporción de HCT se determinó a partir de cada una de las muestras. Para el conteo de OPGH, las aves de cada grupo (16 aves/grupo) fueron colocadas en jaulas de piso metálico cribado (4 aves por jaula), las heces de cada jaula se recolectaron entre el día 5 y 7 PI. Las heces se resuspendieron en 2 litros de dicromato de potasio al 2.5%. Los OPGH se determinaron de acuerdo con lo descrito por Long y Rowell (1958). Los OPGT se cuantificaron de forma análoga a lo descrito por Juárez et al (2002). El porcentaje de protección basado en la disminución de la eliminación de ooquistes (DEO) se determinó con base a la metodología planteada originalmente por Rose y Mocket (1983), se calcula de la siguiente forma: $(\text{Número de ooquistes en las aves testigo no tratadas e infectadas} - \text{Número de ooquistes de las aves que fueron tratadas e infectadas}) / (\text{Número de ooquistes en las aves testigo no tratadas e infectadas}) \times 100\%$. Una reducción en el porcentaje de ooquistes eliminados del 65% o más es considerado protectivo (Danforth, 1998). El índice anticoccidiano (IAC) es un criterio sintético utilizado para evaluar el efecto protectivo de un tratamiento con drogas químicas o antibióticos poliésteres ionóforos contra coccidia, el IAC determina el efecto del desafío sobre los principales parámetros protectivos en evaluación, actualmente se utiliza también para evaluar el efecto protector inducido por inmunógenos (en el caso del presente proyecto los mimótopos del esporozoito de *E. tenella* de las clonas candidatas obtenidas por medio de Ph D) o bien la suspensión SC (Anticuerpos policlonales IgYs provenientes de aves inmunizadas contra

Eimeria sp). Se calcula como sigue: (Porcentaje relativo de sobrevivencia + porcentaje relativo de ganancia corporal) – (índice de lesiones + índice de ooquistes) (McManus et al., 1968). El criterio determina que los grupos se encuentran protegidos ante el desafío cuando su IAC es de 160 o mayor, parcialmente protegidos cuando su IAC es de 120 a 160; y sin protección cuando su IAC es menor a 120.

2.6.15 Estudio histológico

El grado de afección a los tejidos de los sacos ciegos de las aves sacrificadas se evaluó a través de un estudio histológico. Después de calificar las lesiones macroscópicas cada uno de los dos sacos ciegos se diseccionaron por la parte media, se obtuvo una pieza anatómica de 20 milímetros de longitud cortada a lo largo de la línea de inserción de la serosa mesentérica, el órgano se extendió por el lado de la mucosa cecal, sin tocar la mucosa, los dos extremos de la pieza anatómica se fijaron a una pieza de cartoncillo blanco (hoja de 65 g) por medio de una grapa metálica fijada en cada extremo del órgano de forma transversal, la pieza completa se introdujo a un frasco con cuello de botella ancho (12 cm) con formalina buferada al 10%, después de 72 horas de fijado el órgano este se cortó y proceso por medio de su inmersión en parafina, los bloques se cortaron en secciones seriadas de un grosor de 4- μ m los cuales se montaron en una laminilla y fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Las laminillas se estudiaron en un microscopio compuesto, la descripción comparativa entre grupos se efectuó de acuerdo con la comparación de la respuesta celular inflamatoria, celular y reparativa por parte de cada huésped, la descripción se efectuó con la asistencia de un especialista en patología veterinaria adscrito al Dep. de Med. y Zoot. de Aves (S.G F.-D). Por grupo de tratamiento y muestra a nivel de mucosa, submucosa, muscular y serosa se determinó el grado (Ausente, Leve, Moderado, Grave) de inflamación, necrosis, atrofia de vellosidad, hemorragia, edema, fase parasitaria de endodiogenésis, formación de la pared del ooquiste (cuerpos formadores de la pared del ooquiste tipo I y II), fases del parásito viables o degenerados, fibrosis, presencia de bacterias y su magnitud.

2.6.16 Análisis estadístico.

Todos los datos fueron sujetos a un análisis de varianza (ANDEVA) utilizando un modelo lineal general (GLM) para variables de tipo continuo empleando el software SAS (SAS/STAT 9.2 software, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). La distribución normal de residuales y la homogeneidad de varianza de los datos se probaron por medio de un procedimiento univariado (SAS) y la prueba de Bartley respectivamente (Gill, 1978). Las aves sujetas a

eutanasia para la observación de lesiones, la contabilización de los ooquistes y la proporción HCT (cuatro por réplica) constituyeron la unidad experimental. El número de ooquistes contabilizados se transformó por medio de la raíz cúbica de la enumeración aritmética. Los datos se expresan como media aritmética \pm DE (desviación estándar). Para el resto de las variables de respuesta experimentales, cada jaula fue considerada como unidad experimental (cuatro por tratamiento) los datos se expresaron como media aritmética \pm ESM (error estándar de las medias). Cuando el ANDEVA denoto diferencia se efectuó un procedimiento comparativo de medias *pos hoc* por medio de la discriminación de la diferencia mínima significativa la cual se verifico por medio de la ecuación de la prueba de Tukey con un nivel de significancia para alfa de 5% (Gill, 1978). La diferencia en la proporción de mortalidad entre grupos se analizó con la prueba χ^2 ($p \leq 0.05$) considerando al menos cuatro grados de libertad.

2.7 Inmunización de conejos New Zealand White y aves SPF Leghorn White con esporozoítos de *E. tenella*

Los patógenos tienen una larga historia coevolutiva con sus huéspedes, dentro de sus diversos mecanismos de sobrevivencia estos han tenido que ocultar antigénicamente aquellas proteínas que son vitales para su supervivencia, replicación e invasión al huésped. Es factible que estas proteínas sean altamente antigénicas en especies que son distantes filogenéticamente (Diferentes haplotipos MHC-I, MHC-II, BCR y TCR). En el presente estudio se diseñó una estrategia para identificar epítomos básicos utilizados por el parásito a través de su principal ciclo de vida involucrado en la invasión celular primaria (esporozoíto), no exclusivamente en aves, se utilizó también un sistema inmunológico diferente como el del conejo, con la posibilidad de poder identificar este tipo de componentes clave en la invasión primaria. El esporozoito es la fase asexual de *E. tenella* que representa dentro de su ciclo de vida la llave de entrada del parásito al organismo del ave, el esporozoito en la luz del intestino además de invadir a los enterocitos de las vellosidades intestinales es capaz de invadir activamente a LT CD8 + y macrófagos, posteriormente dentro de estas células migra, invade y se multiplica en las células de las criptas de Lieberkuhn (Lillehoj, 1998). La hipótesis principal es que al generar anticuerpos heterólogos contra los determinantes antigénicos más inmunogénicos de esta fase parasitaria es posible identificar epítomos lineales y conformacionales inmunodominantes y posiblemente inmunoprotectores, los cuales como candidatos naturales a través de ingeniería genética podrían ayudar a generar inmunógenos

recombinantes, subunitarios o de ADN que actúen cortando la infección desde el principio (esporozoito) de estos parásitos del *Phyllum Apicomplexa*.

2.7.1 Inmunización con esporozoitos inactivados completos de *E. tenella* en conejos (*Oryctolagus cuniculus*) y gallinas (*Gallus gallus*) SPF Leghorn White

Para obtener suero hiperinmune *versus* los Szs de *E. tenella* se implementó un programa de inmunización con cuatro inmunizaciones en intervalos de dos semanas c/una, estas se aplicaron Sc los días 0, 14, 28 y 42 en dos conejos *New Zealand White* con un inmunógeno elaborado con 5.3×10^6 de esporozoitos completos inactivados de *E. tenella* (SzEt) emulsionados en un adyuvante formulado con base a nanopartículas y aceite vegetal (IMS1313 VG N, Seppic Montanide™, Puteaux,, France) (EtSz-IMS1313) se aplicaron 100 µg/1mL//conejo. Los esporozoitos purificados a partir de ooquistes de *E. tenella* se prepararon la semana previa a la inmunización y el inoculo se obtuvo (homogeneización de SzEt con el adyuvante) el mismo día de la inmunización. El inoculo se concentro en 500 µL, a los cuales se le agregaron 500 µL del adyuvante IMS1313 VG N Montanide™ para hacer un volumen total de 1000 µL, los cuales se administraron de forma Sc en cada conejo de acuerdo al calendario de inmunización descrito en la tabla 3.

Tabla 3. Protocolo de inmunización con esporozoitos inactivados completos de *E. tenella*

CALENDARIO DE INMUNIZACIÓN		
Día	Semana	Abtividad
0	0	Sangrado e inmunización con vacuna EtSz-IMS1313
14	2	Sangrado e inmunización con vacuna EtSz-IMS1313
28	4	Sangrado e inmunización con vacuna EtSz-IMS1313
42	6	Sangrado e inmunización con vacuna EtSz-IMS1313
49	7	Sangrado a blanco en conejos, radial del ala en aves

Antes de cada inmunización se efectuó la obtención de la muestra de pre-inmunización (suero preinmune). Siete días después de la última inmunización, al día 49, se efectuó un sangrado a blanco de ambas unidades experimentales. En el mismo periodo se aplicó el mismo protocolo de inmunización a dos aves *SPF Leghorn White* de 86 días de edad, con la salvedad de que al final en lugar de efectuar el sangrado en blanco este únicamente se

efectúo por la vena radial del ala de cada una de ellas y se obtuvo la mayor cantidad de sangre posible sin comprometer su bienestar o confort morfo-fisiológico.

2.7.2 Purificación, cuantificación y caracterización de las IgGs de conejo

Las IgGs en el suero de ambos conejos se purificaron por medio de cromatografía de afinidad, se utilizó una columna armada *in situ* con proteína G recombinante suspendida en sefarosa (Protein G Shepharose 4 FF, P3296-1mL, GE Healthcare). El procedimiento se efectúo de acuerdo con lo descrito en el protocolo del anexo número 5.

2.7.3 Titulación de las IgGs purificadas del suero hiperinmune de conejo contra el esporozoito y merozoito de segunda generación de *E. tenella* por ELISA indirecta

Se sensibilizo una placa (Maxisorb, Nunc) con 1 µg/pozo del antígeno de esporozoitos y 1 µg/pozo del antígeno de los merozoitos de segunda generación de *E. tenella*, cada antígeno se diluyo en 100 µL de buffer de carbonatos 1X colocando esta dilución por duplicado, se dejó incubar toda la noche a 4°C. Pasado el tiempo de incubación la placa se lavó 4 veces con buffer de lavado 1X (300µl/pozo) por 5 min con agitación oscilatoria (300 rpm). La placa se bloqueó por 1 hora a 37° C colocando en cada pozo 110 µL del buffer de bloqueo (cloruro de sodio 0.125 M, 25 mM tris-HCl pH 7.9, Tween- 20 0.1% más leche descremada al 5%). La placa se lavó 4 veces con buffer de lavado 1X (300µl/pozo) por 5 min con agitación oscilatoria (300 rpm). Las diferentes fracciones de IgG purificadas del suero de conejo contra el esporozoito de *E. tenella* obtenidas por cromatografía y un pool de estas se diluyeron de forma doble seriada en buffer de bloqueo iniciando con 30 µg finalizando en 0.23 µg, se colocaron 100 µL/pozo de cada dilución por duplicado y la placa se incubo 1 h a 37°C. La placa se lavó nuevamente y se incubo con el segundo Ab acoplado a HRP (IgG de cabra anti-IgG de conejo, SIGMA-ALDRICH® A3687) diluido en buffer de bloqueo (1:2000) por una hora a 37 °C. La placa se lavó y se colocaron 100 µl/pozo de solución reveladora, se esperaron 10 minutos e inmediatamente la placa se leyo a 450 nm en un espectrofotómetro (Epoch™ Bio-Tek). Se incluyo un control positivo que consistió en una mezcla de los sueros de los dos conejos utilizados en el programa de inmunización a partir de los cuales fueron purificadas las inmunoglobulinas en estudio, esta mezcla del suero original se utilizó diluida v:v de forma doble seriada a lo largo de cada columna (A 1:10- H1:1,280), se inició con una dilución 1:10. Cada una de las diluciones de las muestras se realizó por duplicado, los valores obtenidos son el promedio de ambas lecturas. La calidad del revelado se evalúo con la prueba de MDO (1:2 hasta 1:256) (Sambrook y Russell, 2001).

2.8 Identificación y amplificación de péptidos recombinantes específicos de epítomos del esporozoito de *E. tenella* bioseleccionados por dos diferentes bibliotecas de Phage display

Para identificar mimótopos de epítomos inmunodominantes del esporozoito de *E. tenella* se utilizó el método de *Phage display*. Esta metodología permite la presentación de péptidos cortos repetidos que son expresados aleatoriamente en la superficie de la proteína III de fagos filamentosos (n=5/fago M13) que forman parte de las dos diferentes bibliotecas utilizadas en el presente estudio. Los péptidos expresados en la proteína III del fago pudieron ser reconocidos por anticuerpos IgG de los sueros hiperinmunes de conejo que fueron inmunizados previamente con los esporozoitos completos de *E. tenella*. Se utilizó el protocolo provisto por el proveedor (*New England BioLabs*®, Ipswich, MA, USA) con adecuaciones efectuadas por el doctorante (F.M.V.Z.-U.N.A.M.). Se identificaron y seleccionaron 20 clonas expresadas en fagos de una biblioteca conformacional de 7 aminoácidos flanqueados por residuos de cisteína (c7c lin *New England BioLabs*®) y 20 clonas de una biblioteca de 12 residuos lineales (12 mer lin *New England BioLabs*®).

2.8.1 Tamizaje de péptidos desplegados al azar en dos diferentes bibliotecas de fagos M13 utilizando como ligandos anticuerpos IgG de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) versus el esporozoito completo de *E. tenella*

- El proceso se realizó en esterilidad (campana de flujo laminar o área circunscrita alrededor de mechero gas LP).
- Se realizaron alícuotas de todas las soluciones con la finalidad de evitar contaminación del stock original.
- Se usaron puntas con filtro cada vez que se manejaban los fagos directos.
- Se utilizaron pipetas exclusivas para el manejo de fagos desinfectadas con etanol al 70% en cada paso.
- Se efectuaron crecimientos de células ER2738 (400 µl) en 2 tubos con 5 mL de LB (Luria-Bertani broth) + 5 µL de tetraciclina suspendida en alcohol al 90%, dos veces a la semana.
- Todos los eluidos y el amplificado debidamente identificado e indicando a que ronda de tamizaje pertenecía y en qué fecha se obtuvo se conservaron a 4°C.

2.8.1.1 Primer Tamizaje

- Se tamizaron dos bibliotecas (c7c y 12 mer *New England BioLabs*® Inc). Se sensibilizaron dos pozos de una placa Maxisorb™ con IgGs purificadas provenientes del suero

hiperinmune de conejo a una concentración de 20 µg/pozo en un volumen de 100 µL (PBS 1X) (Concentración obtenida por espectrofotometría a 280 nm, con el coeficiente de extinción Lambert-Beer para IgG de conejo). La placa se cubrió con *parafilm* (utilizado para tapar temporalmente el contenido del pozo durante el proceso). NOTA: Una concentración inicial de IgG aceptable puede ser de 40 µg/µL en un volumen total de 500 µL. La placa se incubó O/N en agitación (5 rpm) a 4°C, en cámara húmeda.

(DIA 1). Al día siguiente las IgGs no unidas a la placa Maxisorb™ se recuperaron en microtubos y se mantuvieron a -20°C hasta terminar la selección. Cada pozo se lavó con 200 µL de PBS-Tween al 0.1% por dos minutos a temperatura ambiente, la solución de lavado se retiró con la ayuda de una punta inclinando la placa. El paso de lavado se debe repetir 5 veces intercambiando la punta, una punta para eliminar (se conserva para ingresar al pozo únicamente) y otra punta para agregar la solución de lavado (se conserva para tomar del stock PBS-Tween 0.1% únicamente). La placa se bloqueó con 350 µL de PBS-BSA al 1% durante una hora a 4°C dentro del contenedor húmedo. Después se retiró la solución de bloqueo con una punta limpia y se repitieron 5 lavados. Se prepararon las 2 bibliotecas: Se utilizaron 90 µl de PBS-Tween al 0.1% + 10 µL de cada una de las bibliotecas (pipetas y puntas separadas para cada biblioteca). Se colocaron los 100 µl en cada pozo previamente tratado (eliminando las burbujas que se llegan a formar con la punta) y la placa se incubó una hora a temperatura ambiente en agitación a 30 rpm (Orbitador E-15). Se recuperaron los 100 µL de la biblioteca diluida 1/10 en microtubos de 500 µL (funciona como control en otras pruebas de tamizaje o bioensayos, se utiliza para corroborar el título usado realmente). Se lavaron los pozos con PBS-Tween al 0.5%, en este paso del procedimiento se hicieron 10 lavados. Para no contaminar el stock el buffer de elución (glicina 0.2M, BSA 1mg/mL, pH 2.2) se coloca en dos tubos de 15 mL/cada uno, se utilizan por separado para la biblioteca c7c y para la biblioteca 12mer. Se agregaron 100 µL del buffer de elución frío (4°C) a cada pozo (son recomendables aliquotas de máximo 150 µL del buffer para evitar contaminar el stock), se incuban 10 min a temperatura ambiente en agitación a 40 rpm. Se retiró el buffer de elución del pozo con una punta de 10 µL y se neutralizó inmediatamente en un tubo de 0.5 mL con 10 µL de buffer Tris (1M pH 9.0), se mezcla con micropipeta y el pH se mide inmediatamente con tira reactiva, si se requería se agregaban otros 10 µL de buffer Tris (1M pH 9.0) c.b.p. con la finalidad de ajustar a pH 7.0, al final se calculó el volumen remanente aproximado, ya que se requieren 10 µL para cada muestreo en la tira reactiva de pH, usualmente se muestrea 2 a 3 veces. Se tomaron 4 µL del eluido (El resto se almacenó temporalmente a 4°C), se efectuó una dilución de 1×10^{-2} , 1×10^{-3} y 1×10^{-4} en c.b.p., 400 µl

de PBS 1X. Utilizando tubos de ensaye estéril con tapa metálica se agregan 100 μL de cada una de las diluciones a ~ 3 mL del medio Top agar (medio T Φ) previamente atemperado a 48°C + 200 μl de células *E. coli* ER2738 frescas (crecidas previamente O/N) se mezcla en vortex gentilmente e inmediatamente se vierten sobre placas de agar LB-Xgal-IPTG efectuando movimientos oscilatorios para cubrir homogéneamente toda la superficie, se espera a que solidifiquen las placas (~ 15 minutos) y se incuban de 12-18 horas a 37°C . Las placas de agar LB-Xgal-IPTG se extraen de la estufa bacteriológica y se identifican las ufp color azul, se cuantifican por cada dilución y se calcula el título del eluido (ufp/mL), si este se encuentra entre 1×10^4 a 1×10^6 /mL, y no se observan colonias blancas (contaminantes), se procede a amplificar el eluido, de no ser así, se debe repetir todo el proceso desde el principio. Una opción es usar el eluido directo para titulación (10 μL eluido directo) *

Para la amplificación se utiliza un matraz estéril de 250 mL (tapón permeable), se depositan 20 ml del medio 2xYT + 400 μL de células *E. coli* ER2738 (O/N) y se agregan 70 μL del eluido almacenado a 4°C que mostró un título previo dentro del rango (1×10^4 - 1×10^6 /mL), se incuban por 4.5 horas a 37°C en agitación a 220 rpm (Shaker incubator/LABTECH®). Después de la incubación se toma todo el volumen en un tubo CLP™ de 50 mL y las células se centrifugan a 4,000 rpm por 30 minutos, se conserva el SN. Al sobrenadante se le agrega un $\frac{1}{4}$ del volumen de la solución (5 mL) de PEG 20%- NaCl 2.5 M, se homogeneiza gentilmente y se incuba en agitación (5 rpm) a 4°C (O/N).

Al finalizar la incubación para la precipitación del fago con PEG 20%- NaCl 2.5 M, los 25 mL que se colocaron en los tubos CLP™ estériles de 50 mL, se centrifugan a 10,000 rpm por 12 min. El SN se elimina y la pastilla se re- suspende con 1000 μL de PBS-T al 0.1% por tubo. El precipitado re- suspendido se recolecta en un tubo de 1.5 ml (aprox. 1 mL). Este volumen se re- precipita nuevamente con $\frac{1}{4}$ de PEG-NaCl del volumen de la suspensión y se deja incubar una hora en agitación dentro del refrigerador a 4°C . Se agita gentilmente en vortex y se centrifuga a 14,000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se retira con vacío por aspiración y la pastilla aparente se resuspende con 200 μL de PBS 1X. El fago se encuentra en el sobrenadante, el cual se pasa a un nuevo tubo que se identifica como eluido amplificado del primer *panning*, este se titula con la finalidad de ajustar el nuevo título (2×10^{11} fagos/pozo) que se utilizará en el segundo tamizaje.

Para titular el fago se requiere realizar hasta 6 diluciones 1/100 seriadas (no es recomendable hacer diluciones altas directamente), colocando 4 μl del eluido amplificado en 397 μl de PBS estéril, se transfieren 4 μl a las siguientes cinco diluciones por vez. Obteniendo las diluciones 1×10^{-2} , 1×10^{-4} , 1×10^{-6} , 1×10^{-8} , 1×10^{-10} y 1×10^{-11} (para esta

última dilución se efectúa únicamente una dilución 1/10 seriada a partir de la previa). Las placas de LB-Xgal-IPTG se titularon utilizando las dos últimas diluciones por cada biblioteca (cuatro placas en total): A 200 µl de bacterias ER2738 se les agregan 100 µl por cada dilución (4 tubos). Se dejan incubando 5 minutos a temperatura ambiente, después a cada tubo se le agregan ~3 mL de top agar (medio TΦ, previamente atemperado a 48°C) por dilución y se vierten sobre las placas LB. Se dejan gelificar y posteriormente se incuban a 37°C O/N (16-18 horas), posteriormente las ufp azules calvas en las placas se contabilizan y de esta manera se obtiene el título del amplificado (Tabla 4).

Tabla 4. Ejemplo de títulos de fagos m13 en los eluidos y amplificados de cada biblioteca*

	C7c		12mer	
	eluido	eluido Ampl	eluido	eluido Ampl
1r (ufp/mL)	(1.07 x 10 ⁵)	(1.79 x 10 ¹⁴)	(2.14 x 10 ⁵)	(2.88 x 10 ¹¹)

*(M13 titer protocol, M13 amplification protocol. *New England BioLabs*® Inc).

2.8.1.2 Segundo Tamizaje

Se sensibilizo un pozo de la placa con 10 µg de las IgG purificadas del suero hiperimmune en 100 µl de PBS 1X, se dejó en agitación a 4°C O/N en cámara húmeda. Al día siguiente se lavó el pozo 5 veces con 200 µl de PBS-T 0.1%, después de cada lavado se incubo por 2 minutos (no agitar), se bloquearon con 300 µl de PBS-BSA 1% y se incubaron a 4°C una hora. Se retiro la solución de la placa y se lavó con 200 µl de PBS-T 0.1% 5 veces, se incubo 2 minutos después de cada lavado.

Para el segundo tamizaje se utilizó un título de fagos igual a la ronda uno, se verifico el título de los fagos amplificados y éste se ajustó a un título de 10¹⁰ - 10¹²/pozo de la placa.

Se agito la placa a temperatura ambiente a 40 rpm por 1 hora, la placa se lavó 10 veces con PBS-T 0.5% y se incubo 2 minutos después de cada lavado. Se aplicaron 100 µL del buffer de elusión, se agito a 60 rpm por 15 minutos, se recolecto el eluido y se neutralizo con 10 µl de buffer Tris (1M pH 9.0) c.b.p., a pH 7.0. Se verifico el título del eluido para constatar que estuviera en rango.

Se amplificó el eluido (con títulos limítrofes a 1 x 10³ ufp se usan 90 µL, con títulos cercanos a 1 x 10⁶ ufp se utilizan preferentemente 70 µL) en 20 mL de medio 2xYT y 400 µL de células ER2738 crecidas previamente O/N, se deja incubo por 4 ½ h a 37°C a 220 rpm y se centrifuga a 4,000 rpm, 4°C por 30 minutos. El centrifugado se precipita con ¼ (5 mL) de PEG-NaCl por O/N. Al día siguiente se centrifuga a 10,000 rpm, 12 min a 4°C para recuperar

el fago precipitado y el SN se elimina por medio de vacío. El *pellet* se resuspende en 1 mL de PBS-T 0.1%. Se re-precipita con ¼ de PEG-NaCl, se agregan 250 µL, se incuba una hora en hielo o bien a 4°C (se puede observar visualmente el precipitado, si este es visible se detiene el proceso para evitar caída del título). Se agita en vortex y se centrifuga a 14,000 rpm por 10 min. El SN se retira con vacío y la pastilla se resuspende con 100- 250 µL de PBS 1X. (De acuerdo al tamaño de la pastilla). El fago se encuentra en el SN, el cual se pasa a un tubo nuevo. Se titula utilizando 3 diluciones colocando 3 µL del eluido amplificado en 297 µL de PBS 1X estéril, de esta primera dilución se transfieren subsecuentemente 3 µL a las siguientes dos diluciones. Se obtendrán las diluciones 10², 10⁴ y 10⁶.

Se titulan las placas de LB-Xgal-IPTG, se usan las tres diluciones:

10 µL eluido directo y 10 µL del eluido 10².

Se titulan las placas de LB-Xgal-IPTG, utilizando:

- 10 µL de cada dilución + 200 µL de bacterias ER2738
- 1 µL de cada dilución + 200 µL de bacterias ER2738.

Se dejan incubando 5 min a temperatura ambiente, se agregan 3 mL de top agar por cada una de las diluciones y se vierten sobre las placas. Se dejan gelificar y después se incuban a 37°C O/N, posteriormente las ufc en cada placa se contaron y se obtuvo el título del eluido y del amplificado (M13 titer protocol, M13 amplification protocol. *New England BioLabs*® Inc.).

El amplificado se tituló con base al título anterior:

	C7c		12mer	
	eluido	eluido Ampl	eluido	eluido Ampl
2r (ufp/mL)	(1.5 x 10 ⁶)	(1.73 x 10 ¹³)	(5.0 x 10 ⁵)	(1.31 x 10 ¹³)

2.8.1.3 Tercer Tamizaje

Se sensibilizaron dos pozos de la placa con 5 µg de IgGs y se incubaron a 4°C O/N en agitación a 5 rpm en cámara húmeda. Se realizan 5 lavados a los pozos con 200 µL de PBS-T al 0.1%, de dos minutos cada uno, sin agitación. Cada pozo se bloqueó con 350 µL de albúmina al 1% (TBS-BSA 1%) y se dejaron incubando 1 hora a 4°C. Se realizó el conteo del título de las bibliotecas c7c y 12mer (eluidos y amplificados de la segunda ronda del panning), Se cuentan las colonias azules y se saca el título:

Biblioteca c7c: 1.73 x 10¹³ ufp/mL (Se ajusta para que quede entre 10¹⁰ y 10¹²)

Biblioteca 12c: 1.31 x 10¹³ ufp/mL

La tercera ronda se llevó a cabo con un título de 2×10^{11} ufp/100 μ L/pozo, por lo que en este caso se colocan:

Biblioteca c7c: 11.56 μ L (12 μ L)

Biblioteca 12c: 15.27 μ L (16 μ L)

Se agregaron c.b.p., 100 μ L (de PBS-T 0.1%)

Se debe eliminar la albúmina de los pozos con ayuda de una pipeta y se realizan 5 lavados con 200 μ L de PBS-Tween 0.1%, de dos min cada uno, sin agitación. Se colocan 100 μ L de los eluidos amplificados de la 2ª ronda con PBS-Tween 0.1%. Con la finalidad de evitar contaminación cada biblioteca se maneja con puntas con filtro diferentes. Se deja incubando 1 hora en agitación (30 rpm) a temperatura ambiente. Mientras se colocan las cajas petri de LX-Xgal-IPTG a 37°C. Se realizan 10 lavados con 200 μ L de PBS-Tween 0.5%, durante dos min cada uno, sin agitación. Se colocan 100 μ L de glicina-HCL pH 2.2.y se incuban 10 minutos en agitación (70 rpm) a temperatura ambiente. Se tomo el eluido y se transvaso a un tubo nuevo de 1.5 mL (se rotula como eluido de la tercera ronda). Se colocó poco a poco el TRIS-HCl pH 9.1 en el eluido de la tercera ronda hasta neutralizar el pH. Se midió con tiras de pH (volumen usado de 10 μ L). Se realizaron 3 diluciones 1/1000 seriadas de los eluidos:

- Primer dilución: 1 mL de medio LB + 1 μ L del eluido de la tercer ronda.
- Segunda dilución: 1 mL de medio LB + 1 μ L de la primer dilución.
- Tercer dilución: 1 mL de medio LB + 1 μ L de la segunda dilución.

Se tituló solo con la segunda dilución (1×10^6)

- 50 μ L de la segunda dilución + 200 μ L de bacterias ER2738.
- 20 μ L de la segunda dilución + 200 μ L de bacterias ER2738.
- 10 μ L de la segunda dilución + 200 μ L de bacterias ER2738.

Se dejaron incubando 5 minutos a temperatura ambiente (para infección), cada una de las diluciones se colocó en tubos de 15 mL, a los que previamente se colocaron 3 a 4 mL de top agar (a 48°C). Se homogenizó muy bien e inmediatamente se vertieron sobre las placas petri de agar LB-Xgal-IPTG. Se distribuyeron sobre la superficie de la placa y se dejaron polimerizar, se dejaron incubar a 37°C O/N (con el agar en la parte superior).

El eluido se tituló, después se efectúo la selección de clonas individuales:

	C7c		12mer	
	eluido	eluido Ampl*	eluido	eluido Ampl*
2ª (ufp/mL)	(2.0×10^6)	-----	(3.6×10^5)	-----

*En este panning ya no se amplifican los fagos.

2.8.1.4 Selección de clonas individuales

En un matraz estéril de 250 mL se diluyeron las células 1/1000, colocando 100 mL de medio 2xYT con 100 μ L de células ER2738, crecidas O/N. Se colocó cada clona previamente seleccionada (ufc azul) del eluido de la tercera ronda que se tituló en una placa LB-Xgal-IPTG en tubos de 15 mL con 3 mL del medio 2xYT con células ER2738 diluidas 1/1000. Se incubaron en agitación a 230 rpm a 37°C por 4.5 horas. Se colocó cada tubo en forma inclinada para obtener una mayor superficie de aeración. De cada tubo se tomaron 2 mL para la recuperación del fago y 1 mL para la obtención de ADN.

NOTA. Opcionalmente se puede realizar un cuarto tamizaje (no recomendable), en el estudio solo se efectuó la amplificación de todas las clonas seleccionadas en el tercer tamizaje de ambas bibliotecas con el protocolo correspondiente para utilizarlas como control en los bioensayos de evaluación de los mimotopos seleccionados (M13 amplification protocol. *New England BioLabs*® Inc.).

2.8.1.5 Amplificación de los fagotopos seleccionados

Las condiciones controladas de amplificación consistieron en la selección de una sola calva azul recuperada de las diluciones 1×10^3 y 1×10^4 del tercer eluido efectuadas en agar LB+IPTG+Xgal a partir de cada una de las dos bibliotecas y que fueron sembradas en forma de césped con un cultivo de *E. coli* K12 ER2738 <18 hrs. Cada una de las 20 calvas se sembró en un tubo con 3 mL de medio 2XYT más una dilución 1:1000 del medio a utilizar (3 mL de medio líquido 2XYT) de un cultivo de *E. coli* K12 ER2738 crecida O/N, se incubaron en agitación a 230 rpm, 4.5 horas a 37°C. Después, a partir de cada tubo se centrifugaron 2 mL de cada clona a $11,000 \times g$ 10 min a 4°C, el SN se recuperó en un tubo nuevo con $\frac{1}{4}$ de PEG-NaCl (500 μ L), se agitó en vortex y se incubó O/N a 4°C. Se centrifugó a $14,000 \times g$ por 10 min a 4°C, el sobrenadante se eliminó con vacío, se centrifugó nuevamente el tubo $11,000 \times g$ por 2 minutos para eliminar el resto del SN, la pastilla se resuspendió en 200 μ L de PBS 1X (de acuerdo a tamaño de la pastilla) y se centrifugó a $11,000 \times g$ 2 minutos para eliminar el resto del SN. La pastilla se suspendió en 100 μ L de PBS 1X (con azida de sodio al 0.02%), se centrifugó $11,000 \times g$ por 2 min y se recolectó el SN (allí se encuentra el fago).

NOTA. Se apartan 40 μ L. Se efectúan 3 diluciones colocando 1 μ L del fago en 999 μ L de medio LB. Se debe transferir 1 μ L a las siguientes dos diluciones. Se tienen las diluciones 10^3 , 10^6 y 10^9 . Se titula con 10 μ L de la tercera dilución en LB-Xgal-IPTG. Se espera obtener títulos de 1×10^9 a 1×10^{13} , si no se obtienen, se debe repetir todo el proceso.

2.8.1.6 Purificación del ADN de cada clona del fagotopo seleccionado

Un mL del amplificado de las ufp previamente preparadas se centrifugo a 11,000 x g 10 min a 4°C, el SN se transfirió a un tubo nuevo. Se precipito con ¼ PEG-NaCl v/v (250 µL) y se incubo 20 minutos a -20°C (se cuidó que no se congelará, mezclando por inversión el tubo cada 5 min). Se centrifugo a 14,000 x g por 10 min a 4°C, el sobrenadante se eliminó, se centrifugo a 11,000 x g por 2 min para eliminar el resto del SN. La pastilla se suspendió con 100 µL de NaI 4 M, se precipito con 250 µL de etanol absoluto frio y se incubo 10 min a -20°C. El tubo se centrifugo a 14,000 x g 10 min a 4°C, el SN se eliminó y la pastilla se lavó con 400 µL de etanol al 70% frio, mezclando gentilmente por inversión. Se centrifugo a 11,000 x g 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante. Se seco al vacío en máquina *Speedvac* por 15 min y la pastilla se re- suspendio en 25 µL de agua inyectable. La integridad del ADN se verifico en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

2.8.1.7 Secuenciación del ADN de cada fagotopo

Se realizo una variante de PCR llamada “PCR de secuenciación Sanger”. Se utilizo el *Primer R* correspondiente a la proteína III del fago M13: 5´-HOCCC TCA TAG TTA GCG TAA CG -3´, (1 pmol/µL). Al terminar la PCR de secuencia es necesario eliminar los restos de reactivos para que no interfieran en la lectura de los nucleótidos. Para ello las muestras se sujetaron a cromatografía, cada muestra se pasó a través de columnas de Sephadex G50 previamente equilibradas, se centrifugaron 4 min a 2,700 x g, a continuación, se secaron en una centrifuga (*Speedvac*) aproximadamente 40 min a temperatura ambiental y velocidad máxima. Finalmente, las muestras se resguardaron de la luz y posteriormente se procesaron en un secuenciador automático (Instituto de Biología- U.N.A.M.).

2.8.1.8 Análisis de las secuencias de cada clona seleccionada

Todas las secuencias se analizaron con el programa Clone manager 9.2 utilizando como referencia de búsqueda la secuencia de la proteína III de M13. Una vez conocida la secuencia, se utilizó la herramienta básica Protein:Protein para búsqueda de alineamientos locales (BLAST por siglas en inglés) en las bases de datos del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI) y del ensamble del genoma de *E. tenella* (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Eimeria/tenella/genome/assemblies/>) para conocer que porción de las proteínas de *E. tenella* podrían coincidir con alta homología por apareamiento de las secuencias de los residuos expresados en cada una de las clonas seleccionadas a partir del tercer tamizaje de ambas bibliotecas de péptidos expresados en los fagos M13.

2.8.2 Caracterización con ELISA indirecta de las clonas seleccionadas en el tercer tamizaje

Se sensibilizó una placa (Maxisorb, Nunc) con 1×10^9 de cada clona a evaluar en buffer de carbonatos 1X (carbonato de sodio 0.1 M, bicarbonato de sodio 0.1 M, pH 9.6), colocando 100 μ L de esta dilución por pozo y se dejó incubar a 4°C O/N. Pasado el tiempo de incubación la placa se lavó 4 veces (300 μ L/pozo) 5 minutos, con buffer de lavado 1X (cloruro de sodio 0.125 M, 25 mM tris-HCl pH 7.9, Tween- 20 0.1%). La placa se bloqueó por 1 hora a 37°C colocando en cada pozo 110 μ L de buffer de bloqueo (leche descremada al 5%, en buffer de lavado 1X). La placa se lavó (300 μ L/pozo) por 5 minutos, 4 veces con buffer de lavado 1X y el suero de conejo contra el esporozoito de *E. tenella* se diluyó en buffer de bloqueo (1:100), se colocaron 100 μ L/pozo y la placa se incubó por 1 hora a 37°C. Se lavó nuevamente la placa y se incubó con el 2° anticuerpo (anti-IgG de conejo) acoplado a HRP diluido en buffer de bloqueo (1:1500) por 1 h a 37 °C. La placa se lavó nuevamente y se colocaron 100 μ L/pozo de solución reveladora (Se prepara previamente por placa de 96 pozos, 5 mL citrato de sodio 0.1M pH 4.5 más 5 mL de ácido cítrico 0.1M pH 4.5; se agregan 200 μ L de una solución de 5 μ g de OPD más 20 μ L de H₂O₂ al 30%). La placa se cubrió de la luz y se colocó en agitación lenta ~ 10 minutos, la reacción se detuvo con 100 μ L de solución de frenado (2N H₂SO₄)/pozo. La placa se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro. La calidad del revelado se evaluó con MDO colocando 100 μ L de la solución reveladora en 8 columnas de la placa por duplicado. Se agregaron 100 μ L de la solución del 2° anticuerpo a una dilución de 1:1500 en cada uno de los dos pozos superiores de la placa (A) y se realizaron diluciones dobles seriadas con un volumen de 100 μ L de transferencia, el último volumen se eliminó de acuerdo con la normatividad RPBI (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002).

2.8.3 Selección de clonas candidatas

El criterio para seleccionar las clonas candidatas a caracterizar toma en cuenta los siguientes aspectos, i) magnitud de inmunorreactividad particular en ELISA indirecta de cada fagotopo de secuencia única seleccionado con los anticuerpos purificados de los conejos que se inmunizaron previamente con la vacuna EtSz-IM1313; ii) la repetibilidad de una misma secuencia de residuos en el mayor número de clonas de las 20 remitidas de cada biblioteca para su secuenciación; iii) el grado de homología que mostraron las clonas candidatas hacia las proteínas de *E. tenella* obtenidas a través de un BLAST Protein:Protein en la base de datos del NCBI (2017) utilizando específicamente el *taxid* 5802 de *E. tenella*. Con base a la información obtenida en las pruebas de ELISA indirecta donde se utilizó como

revelador TMB SS, se seleccionaron 4 de las clonas para caracterizarlas, esto a partir de las 40 remitidas originalmente a secuenciar (Dos de Ph D 12 mer y dos de Ph D c7c).

2.8.4 Inmunización de conejos (*Oryctolagus cuniculus*) *New Zealand White* con cada clona candidata

Los fagotopos seleccionados con base al criterio anteriormente descrito se caracterizaron inmunológicamente con la finalidad de determinar si los anticuerpos IgG de conejo generados contra una clona en particular reconocían un antígeno polipeptídico nativo en cualquiera de los dos estadios asexuales zoitos de *E. tenella* evaluados. El proceso de caracterización se inició con la inmunización de un conejo *New Zealand White* por cada clona candidata seleccionada.

Las clonas de los fagos 1 (CNTGSPYEC) y 7 (CSISLTHC) de la biblioteca c7c, y las clonas de los fagos 15 (HFAYWWNGVRGP) y 18 (AGHTTQFNSKTT) de la biblioteca 12 mer, se amplificaron en *E. coli* ER2738 con la finalidad de obtener suficiente cantidad de fagotopos para purificarlos y poder así formular el inmunógeno que se utilizó para el programa de inmunización. Además de la inmunización de los conejos *New Zealand White* con cada una de las clonas candidatas, se incluyeron dos conejos inmunizados con el fago M13 *wild type*.

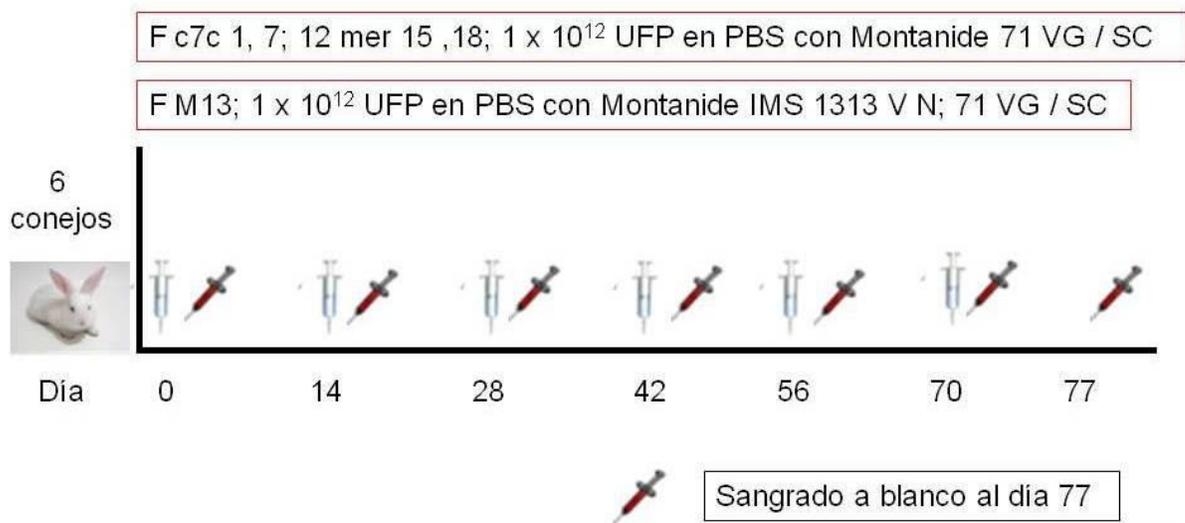


Figura 3. Esquema de inmunización en conejos *New Zealand White* de 1.5 meses de edad con las cuatro clonas candidatas seleccionadas y el fago M13 *wild type*.

Cada conejo se inoculó vía Sc en 2 zonas diferentes, cada inóculo contenía 1×10^{12} fagos/conejo. Cada inmunógeno se preparó con la clona candidata (1×10^{12} fagos)

resuspendida en 300 μ L de PBS 1X + 700 μ L del adyuvante Montanide 71 VG/SC (Seppic Montanide™, France) (30:70) (v:v, fago:adyuvante), el fago M13 *wt* en las dos primeras inmunizaciones se suspendió en 500 μ L de PBS 1X + 500 μ L del adyuvante IMS1313 N VG PR (Seppic Montanide™, Puteaux, France) (50:50), en el resto de las inmunizaciones se utilizó como adyuvante Montanide 71 VG/SC. Se realizaron 6 inoculaciones, al día 0, 14, 28, 42, 56 y 70, el día cero se obtuvo el suero preinmune, posteriormente los conejos se sangraron los días señalados en el esquema de inmunización (Figura 3). El sangrado a blanco se efectuó al día 77 PI (Lee et al. 2009c).

Las clonas candidatas se caracterizaron con la finalidad de determinar si los anticuerpos generados contra cada clona eran significativamente reactivos y diferentes a la inmunorreacción de los anticuerpos contra el fago sin péptido (M13 *wt*), contribuyendo a identificar biológicamente a las clonas como mimótopos verdaderos de un epítipo específico del esporozoito de *E. tenella*. Los anticuerpos policlonales de conejo anti-clona obtenidos en la inmunización con las clonas candidatas se verificaron en su reactividad hacia los SNs solubles del Sz y Mz a través de ELISA indirecta. Posteriormente se efectuó un *Western blott* para determinar si existía reactividad de los antiseros anti-clona con péptidos nativos específicos de esporozoitos de *E. tenella*, se evaluó también la probable inmunorreactividad cruzada hacia el Mz nativo de *E. tenella*, el cual, aunque no se utilizó para la inmunización diversas publicaciones previas determinan la presencia de antígenos compartidos entre ambas fases del ciclo asexual de vida de este parásito.

2.8.5 Caracterización del antisuero versus las clonas candidatas mediante ELISA indirecta

Se sensibilizó una placa (Maxisorb, Nunc) con 2×10^{11} de cada clona candidata, como controles se colocaron 1 μ g de Ag de esporozoitos y 1 μ g de Ag de merozoitos de segunda generación de *E. tenella* en 100 μ l de buffer de carbonatos 1X/pozo, se dejaron incubando a 4°C O/N. Pasado el tiempo de incubación, la placa se lavó (300 μ l/pozo) por 5 minutos, 4 veces con buffer de lavado 1X. Posteriormente la placa se bloqueó por 1 hora a 37°C colocando en cada pozo 110 μ L de buffer de bloqueo 1X (BSA 2%, Tritón X100 0.2% en buffer de lavado 1X). La placa se lavó con buffer de lavado (300 μ l/pozo) 4 veces, por 5 minutos en cada ocasión. El suero original anti-esporozoito de *E. tenella* de ambos conejos inmunizados se diluyó en buffer de bloqueo 1:10 y 1:100, y se colocaron 100 μ L/pozo contra cada clona candidata y contra cada SN de ambos antígenos de *E. tenella*. La placa se incubó por 1 hora a 37°C. La placa se lavó nuevamente y se incubó con el 2° anticuerpo

(anti-IgG de conejo) acoplado a HRP diluido en buffer de bloqueo (1:1500), la placa se incubo 1 hora a 37 °C. Después, la placa se lavó nuevamente y se colocaron 100 µl/pozo de solución reveladora, se esperaron ~5 minutos e inmediatamente la reacción se detuvo con 100 µl de solución de frenado (2N H₂SO₄)/pozo, la placa se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro. La calidad del revelado se evaluó con la prueba de MDO.

2.8.6 Caracterización *Western blot* de los antígenos nativos del esporozoito y el merozoito de segunda generación de *E. tenella* con cada suero de conejo anticlona

Se prepararon por clona dos geles de acril- bis acrilamida al 12% (Uno para tinción selectiva de los polipéptidos con CBB y el otro para electro transferencia en membranas de PVDF para WB), se colocaron por pozo 20 µg del antígeno del esporozoito y 20 µg del merozoito de segunda generación de *E. tenella* previamente desnaturalizados a 94°C por 10 min en buffer de carga desnaturalizante de proteínas 1x. En otro pozo adyacente se depositó el M de proteínas, y en otro pozo un control con 10 µg de BSA. Se aplico electroforesis al gel a 66 V durante 2:50 hrs. Mientras tanto, se activó la membrana PVDF sumergiéndola 1 minuto en metanol absoluto. Posteriormente la membrana escurrida se hidrato en agua destilada y se almaceno en refrigeración a 4°C hasta el momento de ser utilizada.

Una vez efectuada la electroforesis del gel, el gel espejo se cortó para teñir el antígeno repetido del Sz y Mz de *E. tenella* en solución CBB, se dejó en tinción 24 horas para después desteñirlo con solución desteñidora otras 24 horas y poder comparar el gel del perfil electroforético con el resultado de reconocimiento en el *Western blot*.

Los filtros de la cámara de electro transferencia se humedecieron con buffer de transferencia submarino (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 %, pH 8.3) y se colocaron en el dispositivo de electro transferencia, el gel se colocó sobre la membrana y se cubrió con más filtros humedecidos con buffer de transferencia, se retiraron las burbujas malas (Tatiana Gazarian, citada por el T. Pablo Pintor*) aplanando gentilmente los filtros con el mini-rodillo y se aplico corriente directa a 80 V, 100mA y 80 watts durante 1:30 h. La membrana PVDF electro transferida se retiro del dispositivo y se bloqueo colocándola en un recipiente con 8 ml de buffer de bloqueo (buffer de lavado 1X + leche descremada al 5%) y se incubo por 60 min en agitación a 37°C u O.N. Después se lavo 5 veces, 5 min c/vez con buffer de lavado 1X (1.25 M NaCl, 250 mM de Tris-HCl pH 7.9, Tween 20 1%). Se retiro el exceso de buffer y se agrego el antisuero de conejo *versus* EtSz-IMS1313 a una dilución 1:50 ó 1:100 (Se evaluó la mejor dilución donde las bandas se visualizan legibles y con poco trasfondo). Se incubo a 37°C por 1 h en agitación constante, después la membrana se lavo cinco veces, 5

minutos c/vez con buffer de lavado 1X. Se retiro el exceso de buffer y se incubo con el 2º anticuerpo IgG cabra anti-IgG de conejo acoplado a HRP en una dilución 1:2000 en buffer de bloqueo 1x por 1 h a 37 °C, después se lavo por cinco periodos de 5 min/c uno con buffer de lavado 1X. Se retiro el exceso de buffer y la membrana de PVDF se coloco en la solución reveladora (5 ml de agua destilada, una pastilla de Opti 4CN, 0.2 ml de sustrato y una pastilla de Urea (los reactivos Opti 4CN y el sustrato, son parte del kit de BIORAD® almacenado a -20°C) a temperatura ambiente y agitación constante por 5 minutos máximo. La membrana se retiro de la solución reveladora, se enjuago con agua bidestilada abundante y se deajo secar en prensa de papel Bond de 30 g por 10 minutos (Sambrook, 2001). Las bandas predominantes en los dos ciclos de vida de *E. tenella* identificadas en las membranas de transferencia de WB fueron evaluadas por dos observadores independientes con la finalidad de identificar peculiaridades y consensar con base al M testigo su masa experimental molecular aproximada.

2.9 Evaluación de mimótopos del esporozoito de *E. tenella* como inmunógenos individuales contra una infección severa con *E. tenella* en aves SPF Leghorn White

Inmunoprotección en aves SPF Leghorn White con inmunógenos individuales de las clonas F.1 y F.7 de la biblioteca de Ph D c7c; F.15 y F.18 de la biblioteca de Ph D 12 mer, frente a un desafío con una dosis de sobresaturación (*crowded-dose*) de ooquistes esporulados de *E. tenella*.

Con base a los resultados de caracterización de inmunogenicidad e inmunodominancia de las clonas candidatas de ambas bibliotecas de Ph D efectuadas con ELISA indirecta y WB utilizando como antígenos el esporozoito y merozoito de *E. tenella*, se seleccionaron 4 clonas (F.1 [CNTGSPYEC] y F.7 [CSISLTHC] de la biblioteca Ph D c7c, y F.15 [HFAYWWNGVRGP] y F.18 [AGHTTQFNSKTT] de la biblioteca Ph D 12) para preparar inmunógenos individuales, los cuales se utilizaron para inmunizar vía parenteral a 4 grupos de aves SPF Leghorn que después fueron desafiadas con la cepa homóloga de *E. tenella*.

2.9.1 Animales experimentales y parásitos

Para la prueba de inmunización y desafío se utilizaron 170 huevos fértiles *SPF Leghorn White* (Donación de Laboratorios AVIMEX, S.A. de C.V. Cd. de México, México), éstos fueron incubados y eclosionados en el Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la F.M.V.Z.- U.N.A.M. Después de su nacimiento los pollitos *SPF Leghorn White* de un día de

edad fueron individualmente pesados y se asignaron aleatoriamente a 16 corrales individuales de piso cribado (10 aves por jaula) colocados en una criadora en batería regulada ambientalmente de manera automática colocada en una unidad con ambiente controlado libre de patógenos-específicos (Tomley. 1997). Todas las aves se sujetaron al mismo calendario de iluminación, temperatura y humedad. Las aves recibieron alimento estándar de crecimiento sin anticoccidiano y agua *ad libitum*. La cepa salvaje de *E. tenella* usada en el presente estudio fue originalmente aislada de aves con signología clínica de coccidiosis cecal en una granja comercial. La cepa de *E. tenella* purificada fue esporulada y almacenada en 2.5% de dicromato de potasio a 4°C. Los métodos para la replicación del parásito, preparación de las dosis infectantes de desafío y cuantificación de la cantidad de ooquistes por gramo de heces y tejido cecal se efectuaron conforme a lo descrito previamente por Long y Rowell (1958) y Juárez et al. (2002). Con la finalidad de mantener su viabilidad y patogenicidad, los parásitos se propagaron en aves *SPF Leghorn* de 3 semanas de edad bajo métodos convencionales cada 1-2 meses (Tomley, 1997). Los ooquistes para preparar las dosis de desafío, los inmunógenos a partir de esporozoítos completos o los SN de proteínas de las dos fases asexuales del parásito empleadas se utilizaron dentro de un periodo menor a 30 días después de su esporulación (Tomley, 1997).

2.9.2 Aislamiento y purificación de las dos fases asexuales de *E. tenella* (esporozoitos y merozoitos de segunda generación)

La obtención y purificación de esporozoitos y merozoitos de segunda generación de *E. tenella* se efectuó de acuerdo con lo descrito previamente en el presente estudio (2.2 y 2.3).

2.9.3 Vacuna experimental de esporozoítos completos inactivados de *E. tenella*

Los esporozoitos completos de *E. tenella* fueron previamente inactivados por congelación a -70°C durante un periodo de 60 días, se descongelaron y resuspendieron en PBS estéril, se centrifugaron por 10 minutos a 2,000 x g, 4 °C. El botón se resuspendió en PBS estéril, su viabilidad se determinó por medio de evaluación visual de la motilidad a 41°C, esta fue nula. Posteriormente se contaron con la cámara de Neubauer de acuerdo a lo descrito previamente por Juárez et al (2002). La densidad de los esporozoitos completos se ajustó a 1.06×10^4 esporozoitos/ μ L de PBS. El inmunógeno se preparó emulsionando (50:50) los esporozoitos (5.3×10^6 esporozoitos/0.5 mL de PBS) en 0.5 mL del adyuvante IMS 1313 NV G PR (Montanide™, Seppic, Puteaux, Francia) (1 mL=1 dosis) de acuerdo a las

instrucciones del fabricante, la vacuna experimental se evaluó a través de una prueba de potencia en aves *SPF Leghorn White* (Juárez-Estrada et al., 2021a).

2.9.4 Preparación de los antígenos de esporozoítos y merozoítos de *E. tenella*

La obtención de antígenos solubles del Sz y Mz de segunda generación de *E. tenella* se efectuó de acuerdo con lo descrito previamente en el presente estudio (2.2 y 2.3).

2.9.5 ELISA

La prueba de ELISA indirecta simple determinó la inmunorreactividad del suero obtenido de aves No inmunizadas No desafiadas (NIND), aves No inmunizadas Desafiadas (NID), aves inmunizadas con cada una de las 4 clonas de fagotopos del esporozoíto de *E. tenella*, aves inmunizadas con la clona M13 wt y aves inmunizadas con la vacuna experimental EtSz-IMS1313 de *E. tenella* descrita ya previamente por Juárez-Estrada et al (2021a), se utilizaron como antígeno-diana los SNs de esporozoíto y merozoíto de segunda generación de *E. tenella*, esencialmente como lo describe Constantinoiu et al. (2007). La técnica se efectuó de acuerdo con lo descrito previamente en el presente estudio (2.5.2 y 2.5.3).

2.9.6 Cuantificación de ooquistes y muestras serológicas

A partir del día 5 y hasta el día 7 PD se efectuó la recolección total de ooquistes en heces (Juárez et al., 2002). La eliminación total de ooquistes se determinó con base a la suma de la cantidad de OPGH eliminados por ave en cada grupo. La eliminación de OPGH de las aves NIND se evaluó cada 5 días a lo largo de todo el estudio, la presencia de OPGH fue negativa. El suero preinmune de las aves se obtuvo al día 3 de edad, se tomaron tres lotes de sangre de 3 aves cada uno a partir de las aves NIND. Al día 21 de edad se sangraron cinco aves de cada repetición para obtener dos *pools* sanguíneos por grupo de tratamiento.

2.9.7 Diseño experimental

La finalidad del estudio fue analizar el grado de inmunogenicidad e inmunoprotección de cada una de las clonas candidatas de mimotopos del esporozoíto de *E. tenella* en comparación a la vacuna experimental análoga a la utilizada previamente para inmunizar a los conejos que produjeron los anticuerpos *versus* el esporozoíto de *E. tenella* (Juárez-Estrada et al., 2021a) y que fueron utilizados originalmente para el tamizaje de las 2 bibliotecas de fagos (capítulo 2.8). En esta prueba se incluyó un grupo control de pollitos *SPF Leghorn White* inmunizados con un inmunógeno preparado con el fago M13 mp19 wt,

un grupo control de aves *SPF Leghorn* inmunizadas con una vacuna experimental elaborada con esporozoitos completos inactivados de *E. tenella* (regularmente se utiliza como control un grupo medicado con Salinomicina a 60 ppm, pero aquí por ser un estudio de evaluación inmunológica se utilizó un inmunógeno de esporozoitos completos inactivados de *E. tenella* emulsionados 50:50 (v/v) en un adyuvante con base a nanopartículas [IMS 1313 NV G PR Sepic Montanide®] (Juárez-Estrada et al., 2021a), un grupo de aves NID (control +), y un grupo de aves NIND (control -). Los inmunógenos de prueba se evaluaron bajo el modelo de prueba de potencia descrito por Song *et al* (2015), con adecuaciones hechas de acuerdo al diseño experimental propuesto previamente por Juárez et al (2007).

DISEÑO EXPERIMENTAL (8) Grupos experimentales:

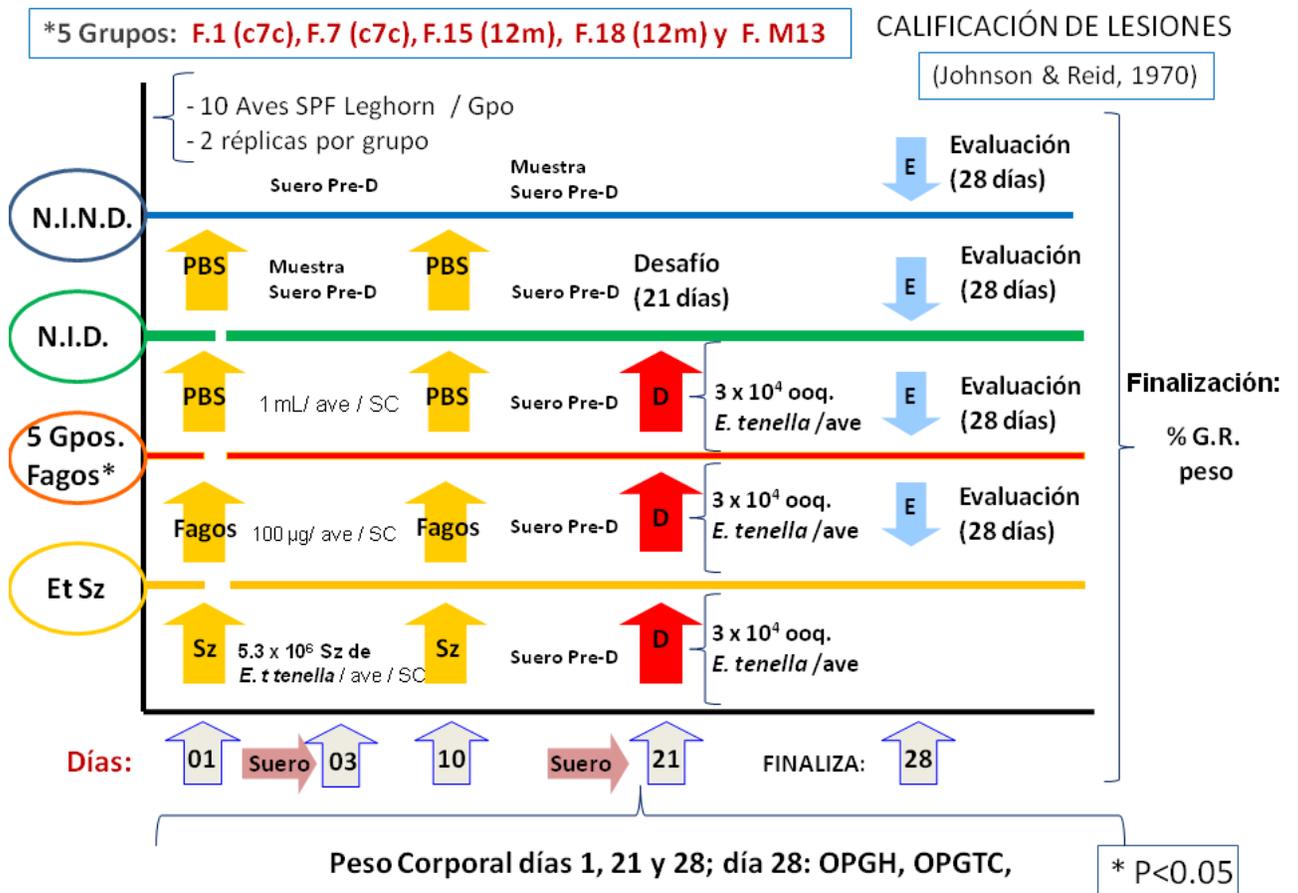


Figura 4. Prueba de potencia en aves *SPF Leghorn White* desafiadas oralmente con 3×10^4 ooquistes esporulados de *E. tenella*/ave al día 21 de edad. La inmunización previa se efectuó al día 1 y 10 de edad con cada uno de cuatro fagos de clonas candidatas (F.1 y F.7 de Ph D c7c, y F.15 y F.18 de la Ph D 12), un fago M13 mp19 wt y una vacuna de esporozoitos

completos inactivados (EtSz) aplicados vía subcutánea, se incluyó un grupo no inmunizado desafiado (NID) y un grupo no inmunizado no desafiado (NIND).

De acuerdo a lo descrito en la figura 4, cada grupo de tratamiento constó de 10 aves *SPF Leghorn White* con una repetición (total=20 aves/grupo), los grupos de tratamiento se inmunizaron con 100 µg de cada fago purificado (IDEM grupo control fago MP13 wt), cada suspensión de fago se ajustó a 300 µL con PBS estéril, el cual se homogeneizó durante 8 minutos con 700 µL del adyuvante Montanide 71 VG (Sepic Montanide®) (30:70) (wt.:wt., fagotopo:adyuvante). El grupo de la vacuna experimental EtSz-IMS1313 se formuló con 5.3×10^6 Sz/dosis/ave (equivalente a 100 µg), la suspensión de la vacuna se ajustó a 500 µL con PBS 1X estéril, el cual se homogeneizó durante 5 minutos con 500 µL del adyuvante de nanopartículas Montanide IMS 1313 NV G PR (Sepic Montanide®) (50:50).

Cada inmunógeno se administró Sc en el tercio medio posterior del cuello de cada pollito al día 1, al día 10 de edad se efectuó un refuerzo con la misma cantidad del inmunógeno por la misma vía (Se decidió este calendario con base a lo propuesto en México por el Dr. Benjamín Lucio Martínez para la inmunización vs VENC velogénico en áreas de alta incidencia, comunicación personal*). Al día 21 de edad cada ave de los grupos inmunizados con los 4 diferentes fagotopos y controles (M13 wt y grupo NID) recibió un desafío *per os* con 3×10^4 ooquistes esporulados de la cepa homóloga de *E. tenella*. La mortalidad se registró diariamente durante todo el periodo de prepatencia.

2.9.8 Parámetros utilizados para evaluar la inmunoprotección

La eficacia de la inmunización con los péptidos recombinantes en fagos, mimotopos del esporozoíto de *E. tenella* se evaluó con base a su respuesta inmune humoral, tasa de sobrevivencia, ganancia de peso, índice de disminución en la eliminación de ooquistes, calificación de la severidad de las lesiones e índice anticoccidial. La tasa de viabilidad se estimó con base al número de aves sobrevivientes por grupo al día 7 PD dividida entre el número de aves iniciales del mismo grupo x 100. La ganancia de peso corporal promedio (g) se evaluó al día 21 de edad (antes del desafío) y la tasa de ganancia de peso corporal relativa (%) se determinó al día 28 de edad (7 d PD). La ganancia de peso corporal se calculó de la siguiente forma: el peso corporal al día 28 menos el peso corporal al día 21. La ganancia de peso corporal relativa se determinó de la siguiente manera: (La ganancia de peso corporal promedio en las aves inmunizadas o del grupo NID) / (La ganancia de peso corporal promedio de las aves del grupo NIND) x 100%.

A partir de cada muestra de heces se efectuó el conteo de OPGH utilizando la técnica de conteo de McMaster de acuerdo con Long y Rowell (1958) y Juárez et al. (2002). La tasa de disminución en la eliminación de ooquistes (%) (DEO) se determinó de la siguiente manera: (cantidad de ooquistes del grupo NID menos cantidad de ooquistes de las aves inmunizadas) / el número de ooquistes del grupo NID x 100%. Una reducción porcentual en la eliminación de ooquistes del 65% o más se considera como un efecto protectorio (Danforth. 1998).

A los 7 días PD se efectuó la eutanasia de todas las aves desafiadas, se realizó una disección de ambos sacos ciegos, se evaluó y califico la severidad de las lesiones ocasionadas por *E. tenella* de acuerdo con una escala de 0 (normal) a 4 (severa), en una modalidad doble ciego efectuada por dos observadores independientes de acuerdo con el método descrito por Johnson & Reid (1970). En consenso general se considera que las lesiones menores a +2 clínicamente son más benignas y las aves muestran mejor pronóstico o recuperación con menor afectación clínica que con una calificación >+2. Se determino el índice protectorio en la severidad de lesiones (IPSL) de la siguiente forma: $[1 - (ID/NID)] \times 100\%$, donde ID= calificación promedio de las lesiones en grupos inmunizados/desafiados, NID= calificación promedio de lesiones en grupo no inmunizado/desafiado. Una reducción en la severidad de lesiones del 65% o más se considera protectora (Danforth. 1998).

Después de la calificación de lesiones, ambos sacos ciegos se procesaron para determinar la cantidad de ooquistes por gramo de tejido cecal (OPGTC) (Juárez et al., 2002). Se calculo el índice de protección anticoccidiana (IAC) el cual sintetiza un criterio de protección anticoccidiana alcanzado en cada grupo en evaluación, este índice se ha utilizado regularmente para evaluar los efectos protectivos de una droga o antibiótico ionóforo anticoccidial y se calcula de la siguiente manera: (porcentaje de viabilidad + porcentaje de la ganancia de peso corporal relativa) – (índice promedio de lesiones + índice promedio de ooquistes) (McManus et al. 1968).

2.9.9 Análisis estadístico

Los datos se recopilaron y analizaron por medio de un GLM (ANDEVA) (Gill, 1978), con diferencia significativa detectada, el escrutinio se complementó con un análisis *post hoc* con la prueba múltiple de comparación de medias Tukey. Las diferencias entre las medias de los grupos se consideraron estadísticamente significativas si los valores de P eran menores a 0.05. Todos los datos se expresaron como media \pm DE de todas las aves por grupo. La diferencia en proporción de mortalidad entre grupos se analizó con la prueba de χ^2 , previo al análisis los datos se transformaron a la raíz cuadrada de la proporción ($p \leq 0.05$).

2.9.10 Declaración bioética de los estudios realizados con animales vivos

La cantidad y tipo de animales utilizados en el presente estudio fue aprobado por el comité interno de posgrado para el alojamiento y cuidado de los animales de experimentación (CICUA) de la F.M.V.Z.- U.N.A.M. a través del comité de estudios de Doctorado en Ciencias de la Salud y la Producción Animal de la F.M.V.Z.-U.N.A.M. con el acta aprobatoria ID: 1239522578/2018-1 (Aplicable para capítulos 2.6, 2.9 y 2.10 del presente estudio), todos los estudios fueron realizados acorde a la NOM-062-ZOO-1999 y NOM-033-SAG/ZOO-2014.

2.10 Evaluación inmunoprotectiva de dos mezclas de 3 clonas de péptidos recombinantes mimótopos del esporozoito de *E. tenella* frente cada una frente a un desafío con una alta dosis de ooquistes esporulados de *E. tenella*

Inmunoprotección de aves *SPF Leghorn White* inmunizadas con 2 inmunógenos mixtos compuestos cada uno de 3 clonas de fagotopos de la biblioteca Ph D c7c, y 3 clonas de fagotopos de la biblioteca Ph D 12 mer, frente a un desafío con *E. tenella*.

Se efectuó una segunda prueba de potencia utilizando como inmunógenos en forma mezclada a tres de las clonas más inmunorreactivas seleccionadas por cada una de las bibliotecas de Ph D. Con base a los resultados obtenidos en la prueba previa donde se utilizaron 4 clonas como inmunógenos individuales se efectuaron algunas modificaciones:

- 1.- Se probó la inmunogenicidad de seis clonas candidatas en aves *SPF Leghorn* en forma de dos mezclas de 3 clonas por biblioteca (3 clonas de Ph D c7c y 3 clonas de Ph D 12mer)
- 2.- Se ajustó la dosis a $\mu\text{g}/\text{ave}$ en lugar de continuar con dosis de $\mu\text{g}/\text{ave}$.
- 3.- Se consideró una inmunización adicional al primer estudio de potencia, por lo cual se empleó un programa de refuerzo (booster) con aplicación de dos dosis de cada inmunógeno posterior a la primer inmunización.
- 4.- Se utilizó una vía parenteral diferente al primer estudio realizando la administración de cada inmunógeno por vía intramuscular profunda en el músculo *Pectoralis profundus*.
- 5.- Se evaluó la capacidad inmunoprotectora de las clonas seleccionadas en aves *SPF Leghorn White* frente a un desafío con 1×10^4 ooquistes/ave de *E. tenella*.

2.10.1 Animales experimentales y parásitos

Para la prueba de inmunización y desafío se utilizaron 150 huevos fértiles *SPF Leghorn White* (Donados por Laboratorios AVIMEX, S.A. de C.V. Cd. de México, México), éstos

fueron incubados y eclosionaron 145 pollitos. Al día de edad se pesaron todos los pollitos nacidos, se descartaron los muy pesados o débiles (13 pollitos) y se asignaron aleatoriamente 11 pollitos a 12 jaulas individuales de piso cribado dispuestos en una criadora de batería regulada ambientalmente de forma automática, la cual fue instalada en una unidad libre de patógenos-específicos con ambiente controlado. Todas las aves estuvieron bajo el mismo calendario de iluminación, temperatura y humedad. Las aves recibieron alimento estándar de crecimiento sin anticoccidiano y agua *ad libitum*. La cepa de *Eimeria* usada en el presente estudio fue aislada originalmente de aves con signología clínica de coccidiosis cecal en una granja comercial de Querétaro, México. Los métodos para la replicación del parásito, preparación de dosis infectantes para el desafío y la cuantificación de OPGH y OPGTC se efectuaron con base a lo descrito previamente por Long y Rowell (1958) y Juárez et al. (2002). Para mantener la viabilidad, los parásitos se propagaron en aves *SPF Leghorn White* de tres semanas de edad bajo métodos convencionales cada 1-2 meses, los ooquistes para preparar las dosis, los inmunógenos a partir de esporozoítos completos inactivados o los SN de proteínas de las dos fases asexuales de *E. tenella* requeridas se utilizaron dentro de un periodo menor a 30 días después de su esporulación.

2.10.2 Aislamiento y purificación de las dos fases asexuales de *E. tenella*

La obtención y purificación de Szs y merozoítos de segunda generación de *E. tenella* se efectuó de acuerdo con lo descrito previamente en el presente estudio (capítulos 2.2 y 2.3).

2.10.3 Vacuna de esporozoítos completos inactivados de *E. tenella*

Los esporozoítos de *E. tenella* fueron previamente inactivados por congelación a -70°C durante un periodo de 60 días, se descongelaron y resuspendieron en PBS estéril, se centrifugaron 10 min a $2,000 \times g$, 4°C . El botón se suspendió en PBS estéril, su viabilidad se determinó por evaluación visual de su motilidad a 41°C , esta fue nula. Después se contaron con la cámara de Neubauer (Juárez et al., 2002). La densidad de los Szs completos se ajustó a 1.06×10^3 Szs/ μL de PBS. El inmunógeno se preparó emulsionando los esporozoítos (5.3×10^5 Szs/0.5 mL de PBS) en 0.5 mL de IMS 1313 NV G PR (Montanide™, Seppic, Puteaux, France) (1 mL = 1 dosis) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.10.4 Antígenos de esporozoítos y merozoítos de *E. tenella*

La obtención de antígenos solubles del esporozoito y merozoito de segunda generación de *E. tenella* se efectuó de acuerdo con lo descrito previamente (subcapítulos 2.2.4 y 2.3.3).

2.10.5 ELISA

La prueba de ELISA indirecta determinó la inmunorreactividad del suero obtenido de las aves NIND, aves NID, aves inmunizadas con 2 mezclas de fagotopos, aves inmunizadas con el fago M13 *wt* y aves inmunizadas con el inmunógeno de esporozoitos completos inactivados de *E. tenella*, utilizando como antígeno los SN de Sz y merozoito de segunda generación de *E. tenella* de acuerdo con la técnica estandarizada por Constantinoiu et al. (2007). La técnica se efectuó de acuerdo con lo descrito previamente (subcapítulos 2.5.2 y 2.5.3).

2.10.6 Cuantificación de ooquistes y muestras serológicas

A partir del día 5 y hasta el 10 PD se efectuó la recolección total de ooquistes en heces (Juárez et al. 2002). La eliminación total de ooquistes se determinó con base a la suma de la cantidad de OPGH eliminados por ave en cada grupo. Se evaluó la eliminación de OPGH de las aves NIND cada 5 días a lo largo de todo el estudio. El suero preinmune de las aves se obtuvo al día tres de edad, se tomaron tres lotes de sangre de tres aves cada uno a partir de las aves NIND. Al día 21 de edad se obtuvieron dos *pools* de suero predesafío (5 aves/*pool*) de cada grupo de tratamiento. Al día 34 de edad se obtuvieron dos *pools* de suero de convalecencia (3 aves/*pool*) de cada grupo de tratamiento.

2.10.7 Diseño experimental

La finalidad del estudio fue analizar el grado de inmunogenicidad e inmunoprotección de dos inmunógenos elaborados con dos diferentes mezclas de clonas de mimotopos del esporozoito de *E. tenella* en comparación al grado de protección de una vacuna experimental elaborada con esporozoitos completos de *E. tenella* suspendidos en un adyuvante fabricado con base a nanopartículas y aceite vegetal, la elaboración de la vacuna de esporozoitos completos y el adyuvante fue análoga a la elaboración de la vacuna utilizada previamente para generar los anticuerpos empleados para el tamizaje de las bibliotecas 12 mer y cyclic 7 cistein mer (Juárez-Estrada et al., 2021a).

Con la finalidad de generar los dos inmunógenos mixtos se seleccionaron tres clonas candidatas por cada biblioteca de Ph D esta selección se efectuó con base al número de repeticiones de las clonas originalmente seleccionadas en el tamizaje de Ph D, su reactividad antigénica hacia el suero anti-esporozoito de *E. tenella* y su coincidencia bioinformática con genes del parásito, los dos inmunógenos mixtos se elaboraron con 50% de 1.5×10^{12} UFP y 50% del adyuvante IMS 1313 NV G PR (Montanide™, Seppic, Puteaux, France) (v/v) utilizando en cada inmunógeno de la biblioteca Ph D c7c= Las clonas 1:

CNTGSPYEC, clona 6: CMSTGLSSC y clona 10': CAKLCLNNC, relacionadas con *Epidermal growth factor like repeats of Et Micronemal 4* (EtMIC4), *Thrombospondin type-I repeats of EtMIC4*, y *Sintetaza asparaginil-tARN, putative* de *E. tenella* respectivamente; y de la biblioteca Ph D 12 mer= las clonas 11: PNSAFWAGSER, clona 15: HFAYWWNGVRGP, y clona 18: AGHTTQFNSKTT, relacionadas con *Ankyrin repeat-cont., protein putative, Equisetina sintetaza/rel.*, y *Cullin homog, putative* de *E. tenella* respectivamente) en un volumen final de 1 mL/ave.

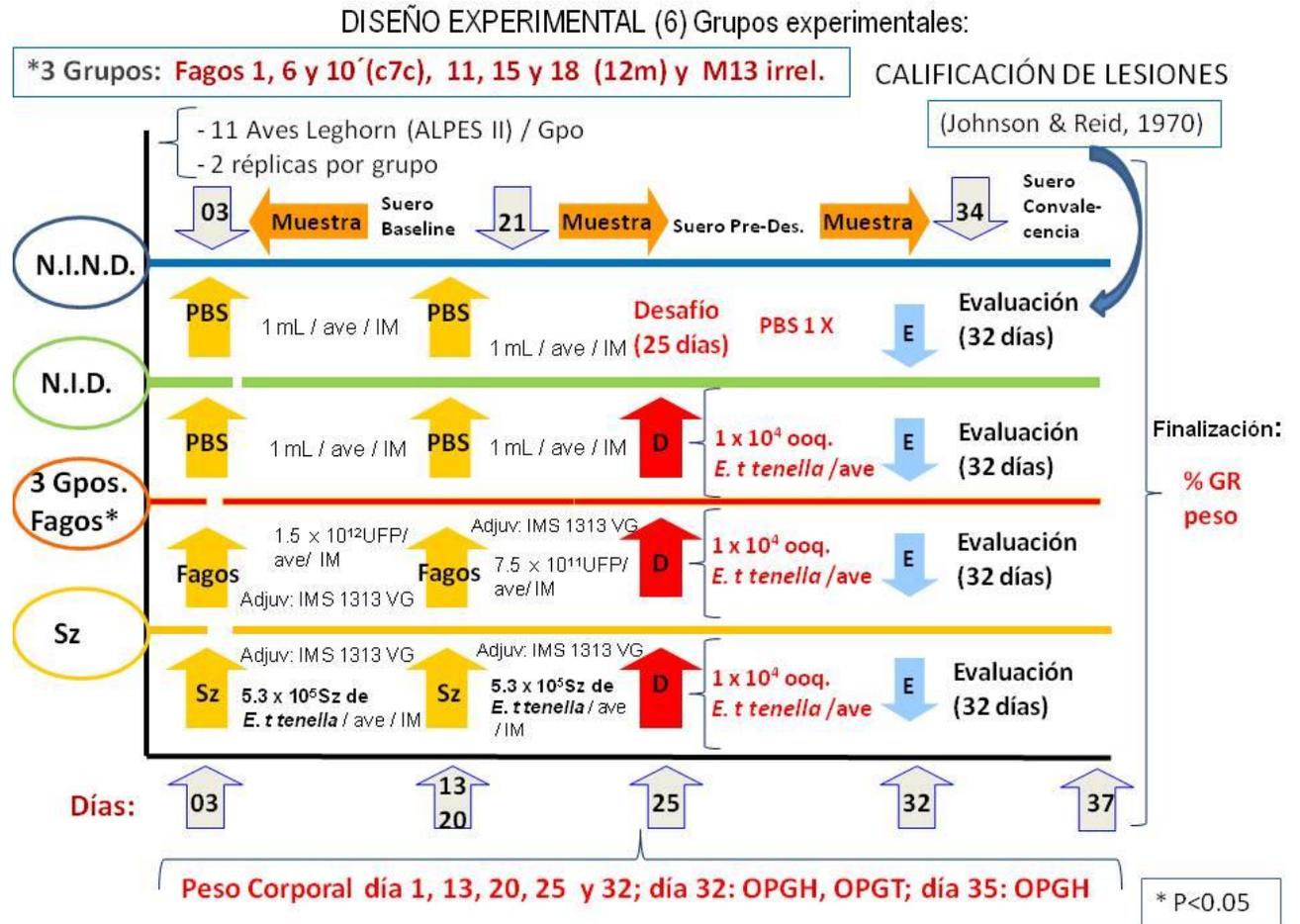


Figura 5. Prueba de potencia en aves *SPF Leghorn White* inmunizadas al día 3, 13 y 20 de edad con seis fagos de clonas candidatas (F.1, F.6, y F.10' de Ph D c7c, y F.11, F.15 y F.18 de la Ph D 12), un fago M13 mp19 wt y una vacuna de esporozoitos completos, las aves fueron desafiadas con 1×10^4 ooquistes esporulados de *E. tenella*/ave al día 25 de edad, se incluyó un grupo testigo no inmunizado desafiado (NID) y un grupo testigo no inmunizado no desafiado (NIND).

En esta prueba se incluyeron como grupos control pollitos *SPF Leghorn White* inmunizados con un inmunógeno preparado con el fago M13 mp19 *wild type*, un grupo control de pollitos *SPF Leghorn* inmunizados con una vacuna de esporozoitos completos inactivados de *E. tenella* emulsionados 50:50 (v/v) en un adyuvante de nanopartículas y aceite vegetal (IMS 1313 N VG Montanide™, Seppic, Paris, Francia), un grupo de aves NID (control +), y un grupo de aves NIND (control -) (Figura 5).

De acuerdo a lo descrito en la figura 5, cada grupo constó de 11 aves *SPF Leghorn White*, cada tratamiento tuvo una repetición. Los grupos experimentales se primó inmunizaron con la mezcla de clonas de cada una de las bibliotecas de Ph D vía intramuscular (IM) (*Pectoralis profundus*) con tres dosis, la primera a los tres días de edad (Dosis = 1.5×10^{12} UFP/ave) con dos refuerzos (*booster*) por ave por grupo a los 13 y 20 días de edad por la misma vía (IM) y con la misma composición de fagos (Dosis= 0.75×10^{12} UFP/ave), con el mismo esquema de inmunización se inmunizó a las aves *SPF Leghorn White* del grupo del fago M13 *wt* irrelevante (control negativo) emulsionado 50:50 (v/v) con el adyuvante IMS 1313 NV G PR (Sepic Montanide®) y otro grupo control de 11 aves SPF con una vacuna elaborada con 5.3×10^5 esporozoitos completos inactivados de *E. tenella*/ave emulsionados 50:50 (v/v) con el adyuvante IMS 1313 NV G PR (Sepic Montanide®), se incluyó una repetición por cada grupo (n=22). Se incluyó un grupo control (+) NID y otro grupo control (-) NIND con una repetición de 11 aves por grupo, ambos grupos recibieron una inyección intramuscular con PBS 1X estéril en cada fecha de inmunización de los grupos experimentales. Los inmunógenos de prueba se evaluaron bajo el modelo de prueba de potencia descrito por Song *et al* (2015), con adecuaciones hechas previamente por Juárez *et al* (2007). Al día 25 de edad cada una de las aves de los grupos inmunizados y controles (M13 y grupo NID) recibió *per os* a ingluvies un inóculo de 1×10^4 ooquistes esporulados de la cepa homóloga de *E. tenella*. La mortalidad se registró diariamente durante todo el periodo de prepatencia.

2.10.8 Parámetros usados para evaluar el nivel de inmunoprotección

La eficacia de la inmunización con la mezcla de fagotopos del esporozoíto de *E. tenella* se evaluó con base a su respuesta inmune humoral, tasa de sobrevivencia, ganancia de peso, índice de decremento en la eliminación de ooquistes, calificación de la severidad de las lesiones e índice anticoccidial. La tasa de viabilidad se estimó con base al número de aves sobrevivientes por grupo al día 7 PD dividida entre el número de aves iniciales del mismo grupo x 100.

La ganancia de peso corporal promedio (g) se evaluó al día 25 de edad (antes del desafío) y la tasa de ganancia de peso corporal relativa (%) se determinó al día 32 de edad (7 d PD). La ganancia de peso corporal se calculó de la siguiente forma: el peso corporal al día 32 menos el peso corporal al día 25. La ganancia de peso corporal relativa se determinó de la siguiente manera: (La ganancia de peso corporal promedio en las aves inmunizadas o del grupo NID) / (La ganancia de peso corporal promedio de las aves del grupo NIND) x 100%. A partir de cada muestra de heces se efectuó el conteo de OPGH utilizando la técnica de conteo de McMaster de acuerdo con lo descrito por Juárez et al. (2002). La tasa de disminución en la eliminación de ooquistes (%) (DEO) se determinó de la siguiente manera: (la cantidad de ooquistes del grupo NID menos la cantidad de ooquistes de las aves inmunizadas) / el número de ooquistes del grupo NID x 100%. Una reducción porcentual en la eliminación de ooquistes del 65% o más se considera como un efecto protectorio (Danforth. 1998).

A los 7 días PD se efectuó la eutanasia de la mitad de las aves desafiadas por grupo (la otra mitad permaneció hasta el día 10 PD valorando la eliminación total de ooquistes en heces por grupo), se realizó una disección de ambos sacos ciegos, se evaluó y califico la severidad de las lesiones producidas por *E. tenella* de acuerdo a una escala de 0 (normal) a 4 (severa), en una modalidad de doble ciego efectuada por dos observadores independientes siguiendo el método descrito por Johnson & Reid (1970). Se determino el índice protectorio en la severidad de lesiones (IPSL) de la siguiente forma: = $[1 - (ID/NID)] \times 100\%$, donde ID= calificación promedio de las lesiones en los grupos inmunizados/desafiados, NID= calificación promedio de las lesiones en el grupo no inmunizado/desafiado. Una reducción en la calificación de la severidad de las lesiones del 65% o más se considera protectora (Danforth. 1998). Después de la calificación de lesiones, ambos sacos ciegos se procesaron para determinar la cantidad de ooquistes por gramo de tejido cecal (OPGTC) de acuerdo con lo descrito previamente por Juárez et al. (2002). Con todos los datos registrados se efectuó el cálculo del índice de protección anticoccidiana (IAC) (McManus et al. 1968).

2.10.9 Análisis estadístico

Todos los datos se evaluaron por medio del análisis de varianza (ANDEVA) utilizando un modelo lineal general (GLM) empleando el software SAS (SAS/STAT 9.2 software, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). La distribución normal de residuales y la homogeneidad de varianza de los datos se verificaron por medio de un procedimiento univariado (SAS) y la prueba de Bartley respectivamente (Gill, 1978). El peso individual, la observación de lesiones

y la contabilización de los ooquistes para cada ave constituyeron la unidad experimental. Los datos se expresan como media aritmética \pm DE (desviación estándar). Para el resto de las variables de respuesta, cada jaula fue considerada como unidad experimental (n=11) los datos se expresaron como media aritmética \pm ESM (error estándar de las medias). Cuando el ANDEVA arrojó diferencia entre las medias los datos se sujetaron a un análisis comparativo por medio de la discriminación de la diferencia mínima significativa, la cual se verificó por medio de la prueba de Tukey ($P < 0.05$) (Gill, 1978). La diferencia en proporción de mortalidad entre los grupos se analizó con la prueba χ^2 ($p \leq 0.05$).

3.0 RESULTADOS

3.1 Cepa patógena de *E. tenella*

3.1.1 Aislamiento de la cepa de *E. tenella*

La cepa de *E. tenella* utilizada en el presente estudio se obtuvo a partir del contenido de sacos ciegos de pollos de engorda con signología clínica de coccidiosis cecal provenientes de una granja del estado mexicano de Querétaro. Se obtuvieron ooquistes a partir del tejido cecal a través de la re-inoculación de este aislamiento utilizando 3×10^4 ooquistes esporulados en 24 aves *SPF Leghorn White* de 21 días de edad. Con la metodología descrita previamente por Juárez et al. (2002) se obtuvieron 4.89×10^7 de ooquistes esporulados totales a partir del tejido cecal.

3.1.2 Purificación de la cepa de *E. tenella*

La cepa de *E. tenella* denominada QRO-15 se purificó por medio de la metodología descrita por Stephan et al (1997) y Khalafalla & Dauschies (2010b). Los ooquistes obtenidos se conservaron en refrigeración a 4°C en dicromato de potasio ($\text{Cr}_2\text{K}_2\text{O}_7$) al 2.5% hasta su utilización.

3.1.3 Propagación de los ooquistes esporulados de la cepa de *E. tenella*

De cinco aves *SPF Leghorn White* inoculadas con 5×10^3 se obtuvo un total de 4×10^7 de ooquistes esporulados, los cuales fueron procesados de acuerdo con la metodología planteada previamente por Juárez et al (2002). Cuando se requirió disponer nuevamente de material biológico infectante para obtener esporozoitos o formular un inóculo de desafío, se efectuó c.b.p. la propagación de ooquistes utilizando siempre ooquistes del último lote obtenido, el periodo máximo para poder utilizar los ooquistes se estableció dentro de un lapso no mayor a 4 semanas después de su esporulación (Tomley, 1997), pasado este tiempo una muestra de ooquistes previamente purificados se desinfectaban y se usaban para obtener un nuevo lote de acuerdo a la metodología descrita previamente por Juárez et al (2002).

A partir de los ooquistes purificados y propagados originalmente en las 5 aves *SPF Leghorn White* se inocularon 12 gallinas híbridas (9 machos 3 hembras) de 47 días de edad, con una dosis de 1×10^4 ooquistes recién esporulados por ave. Al día 6 del periodo de prepatencia murieron 3 aves (25% de mortalidad), lo cual indica el grado de patogenicidad de la cepa QRO-15 aislada originalmente. Se evaluó la curva de eliminación de OPGH en las doce

gallinas híbridas desafiadas con 1×10^4 ooquistes recién salidos del proceso de esporulación/ave (Tabla 5).

Tabla 5.- Curva de eliminación de ooquistes por gramo de heces durante el periodo de prepatencia en doce aves desafiadas con 1×10^4 ooquistes esporulados de *E. tenella*

Periodo prepatencia	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9
Ooquistes totales	2.14×10^6	193.5×10^6	49.5×10^6	19.8×10^6

En las muestras de tejido cecal de las 3 aves muertas el día 6 del periodo de prepatencia se contabilizó un total de 49.8×10^6 ooquistes. Los ooquistes obtenidos de las 9 aves sobrevivientes fueron filtrados, limpiados y esporulados de acuerdo a lo planteado por Juárez et al (2002). La muestra mostró 77.8% de esporulación, después se sujeto a un proceso de limpieza por tamizado, centrifugación y desinfección por cloración, al final se contabilizo un total de 205.2×10^6 ooquistes mostrando una merma en todo el proceso de 21.9%. Los ooquistes se almacenaron a 4°C hasta utilizarlos para obtener esporozoitos purificados.

3.1.4 Limpieza y desinfección de ooquistes de *E. tenella*

Con la finalidad de disminuir la merma de ooquistes esporulados íntegros en el rendimiento total, se evaluó la metodología del anexo núm. 1 (Ryley et al., 1976). Se obtuvo el total de ooquistes de heces de *E. tenella* a partir de 12 aves (híbridas) de 83 días de edad inoculadas con 5×10^3 ooquistes esporulados/ave. Al día 6, 7 y 8 del periodo de prepatencia se recolectaron 2,000 mL de heces suspendidas en $\text{Cr}_2\text{K}_2\text{O}_7$ al 2.5% (Juárez et al., 2002), se molieron en licuadora (Sumbeam™) y se colaron con cribado plástico, se centrifugaron y después la pastilla se sujetó a flotación con SSS, después de centrifugar a $2,000 \times g$ 10' a 4°C, se obtuvo el total del SN, este se re-suspendió en dH_2O estéril en una proporción 1:10, se homogeneizó y centrifugo a $2,000 \times g$ 10' a 4°C, los ooquistes del *pellet* se concentraron en dos tubos CLP™ (50 mL), esta muestra fue la 1ª extracción, se contabilizo el total de ooquistes obtenidos, después el *pellet* original del tubo con SSS se lavó una vez con dH_2O estéril en proporción 1:10 agitando en vortex 5 minutos a $3000 \times g$, se volvió a centrifugar y la pastilla se resuspendió en SSS, después se centrifugo a $2,000 \times g$ 10' a 4°C, el SN se volvió a re-suspender en dH_2O estéril en una proporción 1:8, se centrifugo nuevamente y los ooquistes de la pastilla se contabilizaron, se volvió a lavar el *pellet* del tubo de la segunda extracción con SSS y se procesó de la manera descrita anteriormente, así se obtuvo una tercera extracción, los ooquistes se contabilizaron (Tabla 6).

Tabla 6.- Porcentaje de recuperación de ooquistes totales de *E. tenella* durante el proceso de obtención de ooquistes esporulados

1ª Extracción	2ª Extracción	3ª Extracción
9.42 x 10 ⁸ ooquistes (79.4% recuperación)	2.22 x 10 ⁸ ooquistes (18.7% recuperación)	2,22 x 10 ⁷ ooquistes (1.87 % recuperación)
Total =		1.18 x 10 ⁹ ooquistes

En la tercer extracción se tomó una muestra de la parte superior, media e inferior (Tabla 7). Este fraccionamiento se realizó debido a que en la muestra de la 2ª extracción algunos ooquistes se observaron con alteraciones de la pared del ooquiste y deformidad.

Tabla 7.- Fraccionamiento de la tercera extracción de ooquistes en solución salina saturada a partir del *pellet* obtenido en el lavado de la segunda extracción

Parte SUPERIOR	Parte MEDIA	Parte INFERIOR
12.9 x 10 ⁶ ooquistes	5.04 x 10 ⁶ ooquistes	4.23 x 10 ⁶ ooquistes

En la observación microscópica de las muestras de la tercer extracción, se observó gran cantidad de ooquistes con pared dañada y deformidad del ooquiste, por lo cual en la técnica de limpieza y desinfección de ooquistes se implementó la re-suspensión de los ooquistes en SSS en mayor cantidad de tubos CLP™ (8/50 mL), además de no efectuar más de dos extracciones con el protocolo del anexo 1. Los ooquistes de las tres extracciones (320 mL) se juntaron en un vaso de precipitado (500 mL Kimble-KIMAX®) se esporularon a 29°C, a las 68 horas había 93.2% de esporulación (175 mL), con tasa de evaporación de 2.13 mL/hora, la muestra se centrifugó y re-suspendió en 45 mL de Cr₂K₂O₇ al 2.5%. La pérdida de ooquistes a partir del conteo original hecho después del lavado y antes de la esporulación con relación al conteo después de esta fue de 46.8% (Inicio= 1.18 x 10⁹ ooquistes; final= 6.31 x 10⁸ ooquistes esporulados).

3.2 Obtención de esporoblastos y esporozoitos de *E. tenella*

3.2.1 Obtención de esporoblastos de *E. tenella*

Para obtener los esporoblastos se efectuó la ruptura de los ooquistes esporulados, como no es una técnica de rutina en el laboratorio receptor se evaluó un aparato nuevo

homogeneizador de tejidos (Benchtop homogeneizer Fast Prep 24™ 5G) el cual utiliza perlas de vidrio grandes, las cuales giran en el interior de un contenedor que tiene una barra de plástico homogeneizadora. A partir de una muestra de ooquistes de la cepa de *E. tenella* obtenida de 10 pollitos *SPF Leghorn White*, se desinfectaron 7.68×10^6 ooquistes esporulados, después de aforar esta cantidad de ooquistes en 2 mL de PBS 1X, se colocaron en el interior del contenedor y se homogeneizaron durante 2 minutos, después se observaron al microscopio y no se pudo observar la presencia de ooquistes rotos, se decidió agregar 3 g de perlas de vidrio de 1 mm Θ (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis MO. USA) a la misma muestra, después de 3 minutos de homogenización se observó una muestra en el microscopio, se observaron algunos esporoblastos libres, sin embargo, como aún había muchos ooquistes sin romper se sujetaron a otros 3 minutos de homogenización con las perlas de 1 mm Θ , al término de este lapso se observó en el microscopio y se verificó un gran daño a los esporoblastos, se observaron incluso esporozoitos libres y ooquistes sin romper, se decidió no utilizar más este aparato.

Se realizó una prueba con un nuevo agitador de velocidad regulable (VORTEXER, Heathrow Scientific, Illinois, USA) utilizando la misma cantidad de ooquistes (7.68×10^6 ooquistes esporulados) utilizada en la primer prueba con el homogeneizador. Debido a la carencia del aparato desintegrador, los viales especiales y el tipo de perlas específicas utilizadas en el protocolo original de ruptura y agitación de ooquistes de *Eimeria* sp., para obtener esporoblastos provisto por el Dr. John R. Barta, y con base a los descrito por Cha et al (2014) y You (2014), se decidió ajustar el *pellet* de 7.68×10^6 ooquistes a 450 μ L de PBS 1X, a los cuales posteriormente se le agregaron otros 450 μ L de PBS 1X (total= 900 μ L) los que se colocaron en un vial de 2 mL con 1.3 g de perlas de vidrio de 1 mm Θ , se agitaron en el vortex a 3000 rpm durante un minuto, se observó una muestra en el microscopio, ésta mostraba ya ooquistes rotos, por lo cual se depositó lo que se pudo extraer en un vial y después se lavó el contenido restante agregando PBS 1X estéril, se homogeneizó continuamente en un agitador, se repitió el lavado durante al menos 8 ocasiones, la muestra se centrifugo a 2000 rpm 10' a 4°C, el *pellet* se aforo c.b.p., a 1 mL de PBS 1X estéril se contaron los esporoblastos con el hemocitometro de Neubauer, se contabilizo un total de 4.69×10^6 esporoblastos (15.52% de recuperación) se observó que faltaron muchos ooquistes por romper, la muestra se centrifugo nuevamente a 2,500 rpm 10' a 4°C, se eliminó el sobrenadante, al *pellet* se le agregaron 300 μ L de buffer de lisis preparado con PBS 1X estéril al cual se le agrego Triton X100 al 1% y la parte proporcional de una pastilla de inhibidor de proteasas (ROCHE), el vial se guardó a -20°C.

Se tomaron los dos viales, el de esporoblastos obtenidos con el homogeneizador y el obtenido con el vortex de velocidad regulable, ambas muestras se sometieron a un proceso de congelamiento- descongelmiento, el vial se sumergió dentro de N₂ líquido alternando con descongelmiento a temperatura ambiente en 5 ocasiones, después de observar en el microscopio que los esporoblastos se encontraban íntegros y no se observó un solo esporozoito, se siguió efectuando el mismo proceso, después de 12 ciclos más, se determinó que el Triton X100 al 1% complicaba el procedimiento, esto debido a que la espuma generada ocasionaba que se fuera perdiendo volumen conforme se hacía el procedimiento, se decidió detener el proceso. Al final de 17 ciclos solo se pudieron observar al microscopio (100X) en 20 campos analizados 1 a 5 esporoblastos vacíos. Se centrifugaron las muestras a 2,400 rpm 10' a 4°C, los *pellets* y los SNs se guardaron por separado.

Tabla 8.- Cuantificación del contenido de proteína en las muestras de esporoblastos utilizando el reactivo de Bradford

	Pellet	Pellet		
	HOMOGENEIZADOR	VORTEXER	SN HOMOG	SN VORTEXER
Total µg/µL	2.06	1.72	3.74	9.00

Se preparo un gel de acril-bisacrilamida al 12%, se procedió a aplicar electroforesis a las dos muestras previamente desnaturalizadas, se observaron 5 bandas en la muestra del *pellet* de los esporoblastos obtenidos por medio del homogeneizador (Figura 6). Se observaron apenas bandas en el carril 4, las bandas del SN del vortex del carril 3 aunque menos evidentes muestran correspondencia con el peso en kDa con las del carril 4, al igual que las del *pellet* del mismo origen ubicado en el carril 5. Con base a estos resultados se decidió estandarizar el procedimiento ya sea por buffer de lisis o bien por congelamiento- descongelmiento, pero a partir de los esporozoitos no de los esporoblastos.

3.2.2 Purificación de los esporoblastos obtenidos

Se esterilizaron con hipoclorito de sodio 26.8×10^6 ooquistes esporulados totales provenientes de tejido cecal, el *pellet* se suspendió por duplicado en 1.3 mL de PBS 1 X, se agregaron a un vial de 2 mL con 1.3 g de perlas de vidrio de 1 mm Θ , se agitaron en vortex a 2000 rpm 2 min, seguidos de 20 seg a 3000 rpm y se finalizó con 40 seg a 2000 rpm, se efectuaron 8 lavados con PBS 1 X (pH 7.4), la muestra original de 2.6 mL aumento a 12.5 mL, esta muestra se pasó a través de un filtro BHP de 10 µm (BHP, Tlalnepantla de Baz,

Edo. De México) con la finalidad de remover los cascarones de los ooquistes y ooquistes no rotos.

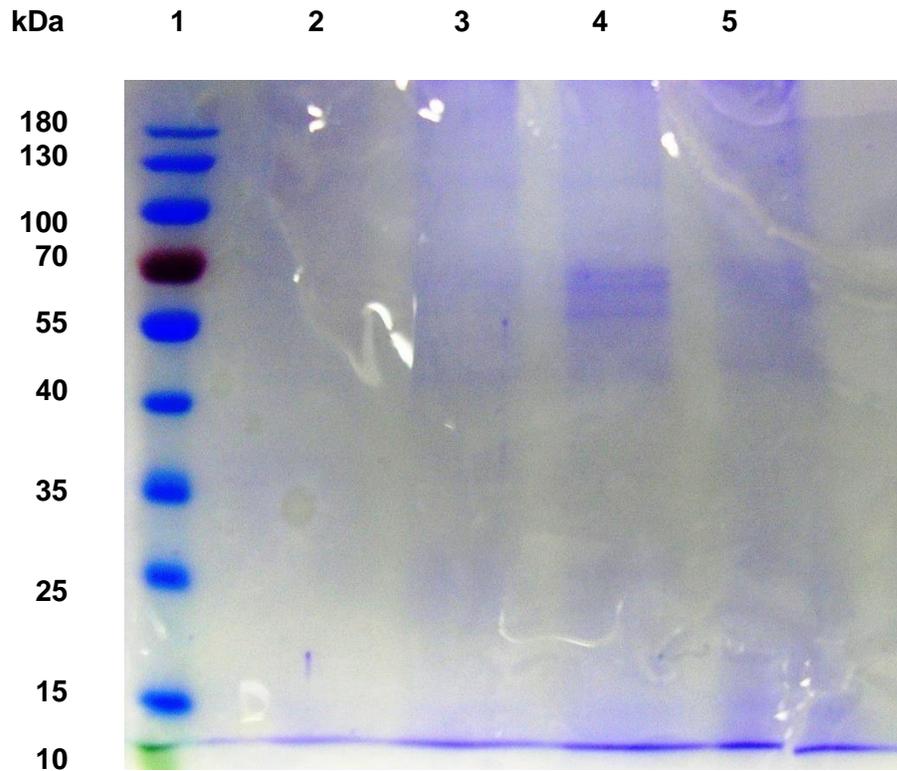


Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de muestras de ooquistes con dos diferentes procedimientos de ruptura. Carril 1.- Marcador molecular, el rojo corresponde a 70 kDa, el verde a 10 kDa; Carril 2. SN muestra del homogeneizador; Carril 3.- SN muestra del Vortex; Carril 4.- *Pellet* muestra del homogeneizador; Carril 5.- *Pellet* muestra del Vortex

Los esporoblastos se recolectaron en un vaso de precipitado inmerso en hielo *frappe*. El filtro se lavó c.b.p. 50 mL de PBS 1 X (pH 7.4) estéril, el filtrado se centrifugó en dos tubos FALCON de 50 mL a 2,500 rpm 10' a 4°C. El *pellet* de esporoblastos se resuspendió en 15-25 mL de PBS 1 X (pH 7.4) estéril y se guardó en refrigeración a 4°C. Con base a la realización de varias pruebas se observó que había una merma muy grande de esporoblastos obtenidos con el procedimiento de ruptura de los ooquistes y posteriormente de los esporoblastos cuantificados al final del procedimiento de filtrado.

3.2.3 Obtención y purificación de los esporozoitos de *E. tenella*

Los esporoblastos obtenidos en la prueba de filtrado suspendidos en 15-25 mL de PBS 1 X (pH 7.4) estéril se procesaron de acuerdo con el protocolo descrito en el anexo número 3, los

esporozoitos obtenidos se identificaron como *pellet* Esp13 y SN Esp13, cada uno de ellos se re- suspendió en 500 μ L de buffer de lisis y fueron cuantificados.

Tabla 9.- Cuantificación de proteína en muestras de *pellets* y sobrenadantes de esporozoitos de *E. tenella* utilizando el reactivo de Bradford

	Esp13 (<i>pellet</i>)	SN Esp13
μg/μL	3.22	7.65

Debido a las lecturas obtenidas se procedió a centrifugar el contenido de Esp13 a 12,000 rpm 5´ a 4°C, el sobrenadante se alícuoto en 4 viales de 100 μ L cada uno y un vial adicional de 80 μ L. El *pellet* se suspendió en 250 μ L de buffer de lisis. Este sobrenadante se identificó como SNP-13; se efectuaron 5 ciclos de congelamiento- descongelamiento.

Tabla 10.- Cuantificación de proteína en muestras específicas de esporozoitos de *E. tenella* utilizando el reactivo de Bradford

	P13 (<i>pellet</i>)	SNP-13
μg/μL	2.37	2.70

En el SDS-PAGE efectuado se observaron bandas tenues en el carril 5 que corresponde a Esp13 junto con el carril 7 que corresponde a P13, las dos bandas de IgY purificadas (Supracox®) muestran la cadena pesada (~65 kDa) y ligera (~27 kDa,) de IgYs provenientes de la yema de gallinas inmunizadas contra *Eimeria* sp (Figura 7).

Se efectuó una prueba de ELISA utilizando el antígeno soluble Esp13, se empleó una dilución inicial de 1:10 (20 μ L de muestra en 180 μ L de buffer de carbonatos) en la fila 1, se tomaron 100 μ L de este primer pozo-fila 1A y se pasaron al pozo- fila 1B, así sucesivamente hasta la dilución doble seriada de 1:256 en el pozo 1H, los 100 μ L sobrantes se desecharon, en la columna 2 se efectuó lo mismo para considerar el duplicado, en las columnas 3 y 4 se efectuó lo mismo, únicamente se consideró una dilución de 1:10 de anticuerpo primario (IgYs policlonales de yema *versus Eimeria* sp) para las columnas 1 y 2; y una dilución de los anticuerpos primarios de 1:100 para las columnas 3 y 4. No se obtuvieron resultados positivos.

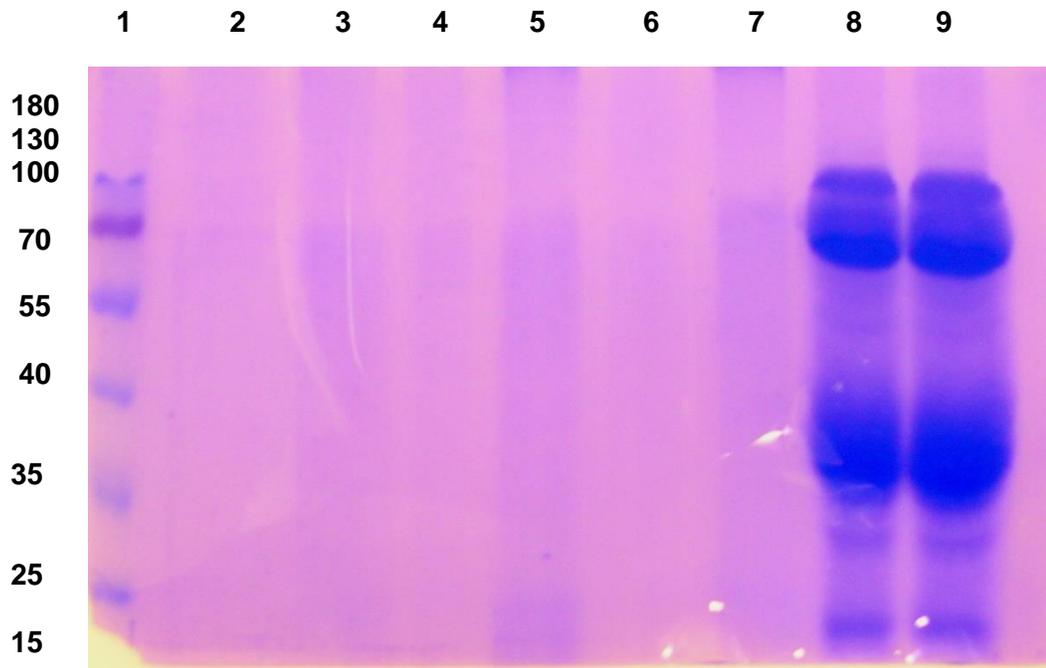


Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de muestras de esporozoitos de *E. tenella* e inmunoglobulinas Y purificadas. Carril 1.- Marcador molecular; Carril 2. SN3; Carril 3. SN16; Carril 4. Vacío; Carril 5. Esp13; Carril 6 SNP-13; Carril 7. P13; Carril 8. IgY Supracox®; Carril 9. IgY Supracox®.

En el análisis de los puntos críticos del proceso se determinó:

1.- Efectuar un procesamiento por etapas, utilizando 25 a 50 x 10⁶ ooquistes esporulados por procedimiento, sin hacerlo en forma continua o masiva, ya que esto deteriora el rendimiento por falta puntual de atención a detalles como las proporciones apropiadas de soluto-solvente, velocidad de centrifugación, tasa de sedimentación y los procesos delicados como son ruptura de los ooquistes, purificación de los esporoblastos y el proceso de digestión química para la obtención de los esporozoitos, su purificación y la obtención de antígenos solubles por medio de procedimientos de congelamiento-descongelamiento y/o sonicación.

2.- La ruptura de los ooquistes fue drástica, esta consistió en 1 minuto a 3,000 rpm + 1 minuto a 2,000 rpm, debe aplicarse menos tiempo.

3.- En el filtrado hubo la presencia continua de un bagazo color naranja (contaminante de la suspensión proveniente de la esporulación) que no se pudo eliminar y que es posible haya atrapado la mayor cantidad de esporoblastos impidiendo su paso fluido a través del filtro.

En un conteo de esporoblastos del contenido retenido en el filtro se cuantificaron 4.73 x 10⁶ esporoblastos, mientras que en el filtrado (20 mL) se cuantificaron 7.4 x 10⁶ esporoblastos.

Esto indica que el mayor problema en el bajo rendimiento final de esporoblastos se encuentra en el tiempo prolongado de ruptura de los ooquistes con las perlas de vidrio, lo cual ocasiona que se rompan los esporoblastos liberando a los esporozoitos, lo cual provoca que estos se pierdan en todos los procesos posteriores de lavado y digestión química.

Al purificar los esporoblastos por medio de gradientes de Percoll de acuerdo con lo descrito previamente por Dulkins y Turner (1988), primero se utilizó un gradiente continuo de 50% de Percoll. Para la obtención del *pellet* de los esporozoitos posterior a la digestión química con tripsina y ácido araquidónico de los esporoblastos, se utilizó un gradiente continuo de Percoll de 60 %. La muestra de esporoblastos del retenido (8 mL) dio un conteo total de 3.76×10^6 esporoblastos, al centrifugar a 2,500 rpm 10' a 4°C para concentrarlos se obtuvo una pastilla muy grande (debido a la presencia de una gran cantidad de detritus), el *pellet* se re-suspendió en 3 tubos de 2 mL con Percoll (GE) al 50%, se centrifugo a 10,000 rpm 1' a 23°C. Se obtuvieron 3 fases: superior, medio e inferior (Tabla 11).

Tabla 11.- Cantidad de esporoblastos por mL en cada una de tres fases de separación por medio de Percoll al 50%.

SUPERIOR	MEDIO	INFERIOR
7,500	34,000	760,000

Se tomo la parte inferior y se suspendió en 11 mL de PBS 1X estéril, se centrifugo a 1,700 rpm 10' a 4°C, el *pellet* se re-suspendió en 8 mL de PBS 1X estéril, se lavó 2 veces y previo a la última centrifugación se contabilizo un total de 1.36×10^6 esporoblastos, mostrando un 36.2% de recuperación, inferior al 87% que obtuvieron Dulkins y Turner (1988).

Se volvió a verificar el conteo de esporoblastos del filtrado, se contabilizo un total de 7.6×10^6 esporoblastos, se sometieron a digestión química en 50 mL de fluido de desenquistamiento en agitación a 42°C, después de 3 horas como no se observó ningún esporozoito se decidió detener el proceso.

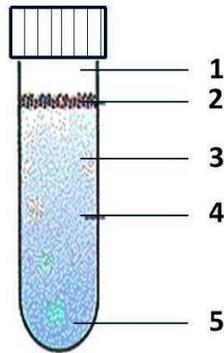
Procesamiento de una muestra con un contenido total de 6.0×10^7 ooquistes esporulados obtenidos a partir de 12 aves híbridas comerciales.

Los ooquistes se desinfectaron de acuerdo al protocolo ya descrito utilizando hipoclorito de sodio al 6%, los oocistos se suspendieron en un volumen de 25 mL de PBS 1X estéril, después de centrifugar este tubo, la pastilla de ooquistes se re-suspendió en 1.2 mL de PBS 1X estéril, esta muestra se depositó en un tubo de 2 mL que contenía 1.4 g de perlas de

vidrio de 1 mm Θ , se agitaron por 1:10 minutos a 2000 rpm. El contenido se lavo varias veces agregando PBS 1X estéril, se obtuvo una muestra de 40 mL, la cual se pasó a través del filtro BHP de 10 μm ; el filtrado se colocó en tres tubos de 37.5 mL c/u se centrifugaron a 2,400 rpm 10' a 4°C; las pastillas se suspendieron con 10 mL de PBS 1X estéril, los esporoblastos se cuantificaron (vol. 13 mL), se obtuvo un total de 57.2×10^6 esporoblastos, estos se aforaron a un volumen de 100 mL del fluido de desenguistamiento, después de 190 minutos de agitación a 42°C se detuvo el proceso, se agregó un vial de inhibidor de tripsina con la misma concentración de inactivación específica de la enzima, después se procedió a lavar con PBS 1X estéril tres ocasiones, previa a la última centrifugación se contaron los esporozoitos, se contabilizó un total de 58.8×10^6 esporozoitos, a partir de la misma muestra se contabilizo la cantidad de esporoblastos, se contó un total de 47.25×10^6 esporoblastos y 4.2×10^6 ooquistes esporulados. Logrando una recuperación de 12.25%. Con un faltante de material biológico (esporozoitos) proveniente de 36.63×10^6 de los ooquistes esporulados originalmente incluidos en la muestra procesada y que se perdieron durante el procedimiento. Se determino que esta pérdida posiblemente se debió a una falta en la ruptura de los ooquistes, muchos esporoblastos quedan también atrapados en mallas de detritus al momento de pasar la muestra por el filtro BHP de 10 μm , parte del material biológico también se pierde cuando se desechan algunos SNs después de los ciclos de lavado- centrifugado debido a la re- suspensión de parte del *pellet*, es recomendable contar los ooquistes después del proceso de lavado para ajustar exactamente los puntos críticos donde se tiene una merma del material biológico. Los esporozoitos obtenidos se suspendieron en PBS 1X estéril + inhibidor de proteasas (cOplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche-CORO MSDS) y se alíquotaron en tres tubos de 300 μL c/uno.

Para efectuar la purificación de esporozoitos por medio de la construcción de un gradiente discontinuo de Percoll al 50%, utilizando como base una solución de 90% de Percoll isotónico, se tomo la muestra contenida en el vial núm. 3, se contaron 4.5×10^6 de esporozoitos, la muestra se centrifugo y suspendió en PBS 1X + inhibidor de proteasas.* Se depositaron 1,200 μL de percoll isotónico (90%) en un vial de 2 mL, después se agregaron gentilmente 800 μL de esporozoitos en PBS 1X + inhibidor de proteasas, por lo cual quedaron 2/5 partes de la muestra de 800 μL en la parte superior del tubo y 3/5 partes de los 1,200 μL de percoll isotónico (90%) en la parte inferior, el tubo se centrifugo a $18,000 \times g$ 20' a 4°C, se tomaron los 5 gradientes formados de la parte superior hacia el fondo del tubo.

Cada una de las fracciones obtenidas e interfases entre las mismas se separaron en tubos de 0.5 mL y cada una de las fracciones se analizó en el microscopio:



Fracción 1.- 400x= Tres esporoblastos x campo, c/4 campos. Tres esporozoitos x campo.

Fracción 2.- Abundantes ooquistes completos y cascarones de ooquistes, abundante presencia de esporocistos, detritus y se observaron también hasta 3 esporozoitos x campo.

Fracción 3.- 400X= Se observaron 5 a 6 esporocistos x campo

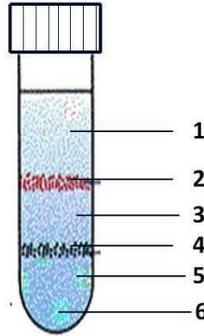
Fracción 4.- 400X= Se observaron 10 a 15 esporocistos x campo, pocos esporozoitos

Fracción 5.- En el *pellet* se observa una gran cantidad de esporoblastos, sin embargo, morfológicamente se observaron algunos deformes.

Se tomo la fracción 1 y 2, se lavaron 4 veces con PBS 1X centrifugando c/vez 1,000 x g 10' a 4°C, en la última centrifugación la pastilla se suspendió en PBS 1X + inhibidor proteasas.

* El procedimiento se tiene que hacer inmediatamente después de los lavados posteriores a la digestión química para evitar cualquier alteración de la membrana de los esporozoitos que provoque una modificación en la isotonicidad de los mismos.

Para verificar la metodología de separación de esporozoitos a través de un gradiente discontinuo del 60% de Percoll , se tomó la muestra anterior de las fracciones 1 y 2. Se colocaron 600 µL de ambas fracciones (1 y 2) en la parte superior de un tubo, en la parte media 600 µL de Percoll al 45% (Percoll al 90% isotónico diluido en la mitad de PBS 1X), en la parte del fondo del tubo se colocaron 600 µL de Percoll al 90%. El tubo de 2 mL se centrifugo a 18,000 x g 20' a 4°C, después de la centrifugación se tomaron 6 fracciones del tubo. Se juntaron las fracciones 1, 3, 4, 5 y 6, se lavaron 4 veces, se centrifugaron a 1,000 x g 10' a 4°C. Al microscopio (400X) se observaron ooquistes completos, algunos esporoblastos y muy pocos esporozoitos, los cuales se apreciaron edematizados, sin apreciación evidente del núcleo o del cuerpo refráctil posterior o anterior, mostraron además puntilleo muy abundante en el citoplasma.



Fracción 1.- 400X= Se observaron 3 ooquistes, 3 esporozoitos y un esporocisto

Fracción 2.- Cascarones, 3 esporozoitos, abundantes ooquistes, escasos esporocistos

Fracción 3.- Abundantes esporoblastos (8), 1 ooquiste, 2 esporozoitos, escasos cascarones

Fracción 4.- Abundantes esporoblastos, 3 esporozoitos, ooquistes escasos

Fracción 5.- Un esporozoito, un esporoblasto

Fracción 6.- Tres esporoblastos, un esporozoito, hasta 2 ooquistes

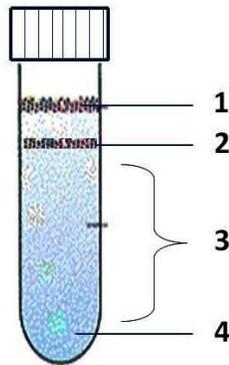
Aislamiento de esporoblastos usando 1.8×10^7 ooquistes esporulados (clave= 18 nov)

Para verificar que efecto tiene la concentración de ooquistes sobre una proporción volumétrica similar de perlas de vidrio, de forma análoga a lo que se ha efectuando previamente, debido a que diversos investigadores mencionan colocar 5×10^7 ooquistes esporulados en $900 \mu\text{L} + 3.3 \text{ g}$ de perlas de vidrio de $250 \mu\text{m} \Theta$, indicando que la cantidad de ooquistes sea lo más gruesa posible pero sin serlo tanto (Kopko *et al*, 2000), mientras que otros mencionan únicamente que la cantidad volumétrica de muestra de ooquistes a romper debe ser equivalente a la cantidad volumétrica de perlas de vidrio de $1 \text{ mm} \Theta$ (You, 2014). Para el procedimiento se usaron 1.8×10^7 de ooquistes suspendidos en 1 mL de PBS 1 X estéril, los ooquistes se colocaron en un vial con 0.7 g de perlas de vidrio ($1 \text{ mm} \Theta$), se procedió a la agitación, observando:

- 1:30 min a 2000 rpm. 100X= 8 ooquistes por campo aún sin romper, esporoblastos libres
- 2:30 min a 2000 rpm. 100X= 3 ooquistes por campo, esporoblastos libres y un esporozoito, por lo cual se decidió no dar más tiempo de agitación.

La muestra se lavo (volumen: 10 mL), se cuantificaron 4.64×10^7 esporoblastos totales, con recuperación de 64.4% . La muestra de 10 mL se centrifugo a 2000 rpm $20'$ a 4°C .

El *pellet* se re- suspendió para efectuar un gradiente continuo de Percoll al 50% , se completó la pastilla a $1,900 \mu\text{L}$ con percoll al 50% en dos viales de 2 mL c/u. Ambos tubos se centrifugaron a $10,000 \times g$ $3'$ a 4°C , se obtuvieron cuatro fracciones con dos fases principales y un *pellet*.



Fracción 1.- 400X= Se observó abundante cantidad de detritus, cáscaras de ooquistes, ooquistes esporulados, pocos esporozoitos

Fracción 2.- Pocos ooquistes, detritus de cáscaras de ooquistes, uno a dos esporozoitos

Fracción 3.- Pocos ooquistes, detritus escasos

Fracción 4.- Esporoblastos libres más basura pesada, uno que otro ooquiste completo

La fracción 4 se suspendió en PBS 1X estéril c.b.p., 10 mL, se centrifugo a 2000 rpm 10´ a 4°C, se re- suspendió nuevamente en 10 mL de PBS 1X estéril y se contabilizo un total de 36×10^6 esporocistos, con recuperación del 50%. Debido a que se centrifugaron con percoll al 50% y se dio un tiempo mayor (3´) a lo recomendado (1´), se observó la presencia abundante de detritus en el *pellet* junto con los esporoblastos, por lo cual para eliminar los detritus se decidió probar filtrando toda la fracción 4 con el filtro BHP (10 μ m), los 10 mL se pasaron a través del filtro junto con 30 mL de PBS 1X estéril, los 40 mL obtenidos se centrifugaron a 2000 rpm 10´ a 4°C. Se obtuvo un total de 14.28×10^6 esporocistos, con recuperación total final de 19.44%. Se verificó el grado de limpieza de la muestra que provenía de 1.8×10^7 ooquistes esporulados clorados:

100 X= Se observaron detritus, cascarones de ooquistes, esporoblastos abundantes, un esporozoito (no debería haber, ya que aún no se sujeta a una prueba de digestión química)

400 X= Se observaron 4-8 esporoblastos por campo, pocos detritus.

Se les agregó PBS 1X estéril c.b.p., 10 mL. Los esporoblastos, se refrigeraron a 4°C hasta su desenquistamiento.

Aislamiento de esporoblastos utilizando 5.37×10^7 ooquistes esporulados (clave= 19 nov)

Se tomaron 10 mL de la muestra de ooquistes proveniente de las aves híbridas, iniciando nuevamente con la esterilización de los ooquistes con hipoclorito al 6%, se centrifugaron para lavar con dH_2O , después de 3 lavados el *pellet* se suspendió en 25 mL de PBS 1X, se conto un total de 5.37×10^7 ooquistes esporulados. La muestra se centrifugo a 2,500 rpm $10'$ a $4^\circ C$, los 5.37×10^7 ooquistes esporulados se re-suspendieron en 1.4 mL de PBS 1X estéril a los cuales se agregaron 1.4 g de perlas de vidrio, se agitaron en el Vortexer durante 2:30 minutos a 2000 rpm, se observó una muestra en el microscopio a 400X, no se observaron ooquistes completos, se determino la presencia de abundantes cascarones de ooquistes aglomerados, esporoblastos y de hasta 4-6 esporozoitos libres (contraindicado) por campo (400X), la muestra mostró un total de 3.8×10^7 esporoblastos, se esperaba a obtener del 100% hipotético la cantidad de 21.48×10^7 esporoblastos, el porcentaje de recuperación post-ruptura fue de 17.7% (menor al obtenido por Dulsky y Turner, 1988; quienes obtuvieron el 50.6% de esporocistos a partir del 100% hipotético esperado). Los 3.8×10^7 esporoblastos obtenidos se resuspendieron en 10 mL de PBS 1X estéril y se pasaron a través del filtro BHP de $10 \mu m$, se obtuvieron 50 mL, se centrifugaron y suspendieron en 10 mL de PBS 1X estéril, se contabilizó un total de 2.88×10^7 esporoblastos, con un 13.4% de recuperación total (menor al 44% obtenido por Dulsky y Turner, 1988; al utilizar Percoll al 50%).

Aislamiento de esporozoitos utilizando dos fuentes de esporoblastos (claves= 18 y 19 nov)

Las dos muestras obtenidas (18 nov= 14.2×10^6 esporoblastos y 19 nov= 28.8×10^6 esporoblastos) se sometieron a digestión química. Al preparar el fluido de desenquistamiento descrito en el protocolo usado en el laboratorio del Dr. John R. Barta, con base al protocolo descrito por Dulkins y Turner (1988) se decidió agregar $MgCl_2$ a una concentración final de 10 mM. Con el ajuste de 5.0×10^7 esporoblastos/100 mL del fluido de desenquistamiento, la muestra del 18 nov se afora a un volumen total de 28 mL del fluido conteniendo $MgCl_2$ a una concentración final de 10 mM y la muestra del 19 nov se suspendió en 56 mL; se pusieron en agitación temperizada a $42^\circ C$ a 175 rpm (Environ-Shaker, Lab-Line®), se monitoreo el proceso de liberación de los esporozoitos cada 30 minutos (400X), observando que a las 2:00 horas no había esporozoitos, estos se comenzaron a observar en una proporción de esporozoitos:esporoblastos 30:70 hasta las 2:30 horas de incubación/agitación, después de 3:00 horas se observó una proporción 50:50, por lo cual para evitar daño a los esporozoitos,

se detuvo la digestión a las 3:10 horas de incubación. Se re- suspendieron en PBS 1 X y los esporozoitos se centrifugaron y re- suspendieron dos veces, antes de la tercera ocasión se contaron ambas muestras.

Clave 18 nov= 4.4×10^6 esporozoitos; 6×10^6 esporoblastos.

Clave 19 nov= 3.45×10^6 esporozoitos; 13.2×10^6 esporoblastos.

Los esporozoitos de la clave 18 nov se observaron completos, con mayor integridad que los esporozoitos de la muestra 19 nov, aunque también se observaron edematizados y con un puntilleo muy aparente. Se logro ver algunos esporozoitos con movimiento, aún cuando las muestras se tuvieron que contar 48 horas después de estar a -20°C .

En la morfología de los esporozoitos de la clave 19 nov, a 400x se observaron esporozoitos hinchados, sin cuerpo refráctil aparente, algunos muy grandes, también se observaron esporozoitos deformes. Ambas muestras se centrifugaron a $1000 \times \text{g}$; el *pellet* se suspendió en buffer de lisis, se agitaron en el vortex tres ciclos de 1 minuto a 2000 rpm, se centrifugaron a $12,000 \times \text{g}$ 5' a 4°C ; se obtienen los SN (300 μL) y los *pellets* se resuspendieron en buffer de lisis (200 μL) ambos se almacenaron a -20°C hasta su cuantificación proteica y evaluación con SDS-PAGE al 12%.

Un punto que se evaluó en este último procedimiento, fue que después de los procesos de lavado a 1000 rpm 10' a 4°C , se re- suspendieron al final en PBS 1X con inhibidor de proteasas, al descongelar y centrifugar ambas muestras (18 nov y 19 nov) a $1000 \times \text{g}$, se retuvieron los SN, y al observarlos al microscopio se observó que existía una gran cantidad de esporozoitos incluso algunos de la muestra 18 nov mostraron movimiento, concluyendo que en este procedimiento final al eliminar anteriormente este SN se eliminaba una gran cantidad de esporozoitos, por lo cual se procedió a juntar ambas muestra y centrifugarlas a 10,000 rpm 5' a 4°C , después se observo que la mayor parte de los esporozoitos estaban en el *pellet*, mientras que en el SN solo se detectó un esporozoito en 10 campos (400X). El *pellet* se re- suspendió en PBS 1X estéril con inhibidor de proteasas y después se procesaron por medio de congelamiento- descongelamiento con N_2 líquido.

Con la finalidad de obtener esporozoitos y proteínas solubles se efectuaron varios procesos de estandarización. Se utilizó el protocolo para obtener esporozoitos que se describe en el anexo 2. Se procesaron 3 nuevos lotes de ooquistes provenientes de heces de aves inoculadas con *E. tenella*. Los ooquistes del primer proceso provenían de una extracción estándar, en la segunda se utilizaron ooquistes provenientes de un proceso de congelación accidental y la tercera se efectuó con ooquistes por flotación en SSS estándar (Tabla 12).

Tabla 12.- Rendimiento porcentual de esporozoitos obtenidos en tres lotes de ooquistes de diferente origen.

Ooquistes muestra	Esporoblastos después de ruptura	Esporoblastos después de filtrado o Percol 50%	Esporozoitos después de la digestión
60 x 10 ⁶ ooquistes esporulados	Tubo de 2 mL: 1,2 mL muestra en 1.4 g de perlas, 1:10 min a 2,000 rpm	57.2 x 10 ⁶ esporoblastos (23.8% recuperación con Filtro de 10 µm)	3:00 hrs= 58.8 x 10 ⁶ esporozoitos (12.5% recuperación) CLAVE: Sz 1/2
116 x 10 ⁶ ooquistes esporulados (CONGELADOS)	Tubo 1.5 mL: 1,0 mL muestra en 0.7 g de perlas, PRUEBAS= 1:10 a 1:20 min a 2,000 rpm. 2ª ruptura: 1:27 min*	230 x 10 ⁶ esporocistos. (49.6% Recuperación) * Percoll isotónico 50%: 2 viales: 96 x 10 ⁶ esporocistos (20.7% recuperación)	2:30 hrs= 14 x 10 ⁶ esporozoitos (1.50% recuperación) Sz con alteraciones morfológicas (puntilleo, f. gancho) CLAVE: Sz 06
120 x 10 ⁶ ooquistes esporulados (cepa rescatada)	Tubo 1.5 mL: 1,0 mL muestra en 0.7 g de perlas, PRUEBAS= 1:20 a 1:25 min a 2,000 rpm. 2ª ruptura: 1:10 min*	248 x 10 ⁶ SB (51.6% Recuperación) + 36 x 10 ⁶ * Percoll isotónico 50%: 6 viales: 163.2 x 10 ⁶ esporocistos (34% recuperación)	1:56 hrs= 136 x 10 ⁶ esporozoitos (14.2% recuperación) CLAVE: Sz 27

El porcentaje de recuperación de esporozoitos purificados de acuerdo con Dulski y Turner (1988) debe ser del 39% a partir del conteo original de los ooquistes sujetos a ruptura. Sin embargo, en el presente estudio el mejor resultado obtenido fue de 14.2% de recuperación total (Tabla 12).

Con la finalidad de igualar los parámetros de recuperación planteados por Dulski y Turner (1988), en cuatro ocasiones y como parte de la estandarización se desarrolló la técnica

exactamente como la indican sin lograr obtener las cantidades de recuperación de esporozoitos indicados, por lo cual se implementó una adecuación del procedimiento general abandonando definitivamente como parte del proceso la recuperación de ooquistes esporulados no rotos y eliminación de cascarones en el primer procedimiento de ruptura por medio de la flotación de ooquistes en Sucrosa 1M, reactivo utilizado por Dulski y Turner (1988) (en cuatro ensayos se logró una media de tan solo 15% de recuperación de ooquistes no rotos en el primer proceso). La técnica se adecuó al implementar una segunda ruptura de ooquistes pero a partir del lavado en PBS 1X estéril (1:10) y centrifugación del sobrenadante del primer gradiente de Percoll al 50% de tipo isotónico (Dulski y Turner, [1988] no emplearon este tipo de Percoll) utilizado inicialmente para purificar los esporoblastos, este procedimiento de dos ciclos de purificación a partir de la recuperación del SN del Percoll al 50% se siguió utilizando en todos los procedimientos posteriores ya que se obtuvo de 25 a 26.5% de esporoblastos adicionales al efectuar una segunda ruptura de ooquistes después de la primera purificación de esporoblastos con Percoll isotónico al 50%.

3.2.4 Obtención de antígenos solubles a partir de esporozoitos de *E. tenella*

Los SN y *pellets* obtenidos se cuantificaron con el reactivo de Bradford, después de determinar sus valores se analizaron por electroforesis en gel de acril- bisacrilamida al 12% y 15% bajo condiciones reductoras (SDS-PAGE), los geles fueron teñidos con CBB; se analizó la interacción antígeno-anticuerpo con la prueba de E.L.I.S.A., y se caracterizó el perfil de polipéptidos en cada suspensión por medio de *Western blot*. Se determinó que 100 µg de proteína proveniente de los polipéptidos solubles equivalen a 5,306,000 de esporozoitos de *E. tenella* (valor muy cercano a lo determinado por Fiona Tomley (1997) quién indicó que 5×10^6 esporozoitos de *E. tenella* son equivalentes a 100 µg de proteína).

3.3 Merzoitos de segunda generación de *E. tenella*

3.3.1 Obtención de merzoitos de segunda generación de *E. tenella*

La implementación del protocolo para el aislamiento de merzoitos de segunda generación de *E. tenella* se basó en lo descrito inicialmente por Shirley et al (1995) investigadores que a su vez se basan en lo descrito por Stotish et al (1975) y un método descrito por N. Smith para el aislamiento de merzoitos de segunda generación, el cual fue recreado a su vez por el mismo Shirley et al (1995) para la descripción de la técnica de aislamiento de merzoitos. Las adecuaciones descritas en el presente estudio se efectuaron con base a lo descrito por Xie et al (1990) y Liu et al (2009).

3.3.2 Purificación de merozoitos de segunda generación de *E. tenella*

El grado de purificación de los merozoitos obtenidos es un aspecto importante a considerar, debido a que la columna DE-52 que es la recomendada para lograr un buen grado de pureza de los merozoitos no se pudo obtener debido a que se encuentra descontinuada en México, la técnica para purificar los merozoitos empleada en el presente estudio se basó en la utilización de gradientes discontinuos de Percoll, técnica originalmente descrita por Geysen *et al* (1991); la técnica desarrollada aquí fue exitosa. Después de su purificación se obtuvo un total de 1.23×10^{10} de merozoitos de segunda generación de *E. tenella*.

3.3.3 Obtención de antígenos solubles a partir de merozoitos de *E. tenella*

Con base a la prueba de Bradford, en la repetición de tres ensayos se determinó que 100 µg de proteína de Mz purificados equivalen aproximadamente a 7,584,120 de merozoitos de segunda generación de la cepa QRO-15 de *E. tenella*.

3.3.4 Cuantificación de antígeno de esporozoitos y merozoitos de segunda generación por la técnica de Bradford

En el SN de esporozoitos purificados se cuantificó un rendimiento promedio de 1 µL= 1.20 µg de proteína; mientras que en el SN de merozoitos purificados se obtuvo en promedio 1 µL= 20.92 µg de proteína. Con ambos sobrenadantes se trabajó el resto del estudio.

3.4. Determinación de la dosis óptima de inmunización usada para obtener la mayor cantidad de ooquistes (stock experimental), mayor título y mejor reactividad de anticuerpos séricos policlonales positivos a *E. tenella*

3.4.1 Signos clínicos y mortalidad

Las aves primo-inmunizadas con 10,000 ooquistes/ave (10K) mostraron mayor signología clínica de coccidiosis clínica severa durante el periodo de prepatencia que las aves desafiadas con 5,000 ooquistes/ave (5K). Los primeros signos se observaron al día 5 post-inoculación (PI), las aves del grupo 10K se observaron con las plumas erizadas, decaimiento, depresión y heces sanguinolentas, al día 6 del periodo de prepatencia murieron dos aves (22.2% de mortalidad), ambos sacos ciegos de ambas aves fueron procesados de acuerdo a la metodología descrita por Juárez *et al* (2002), se contabilizó un promedio de 1.66×10^7 ooquistes/ave.

Posteriormente, después del último desafío tres de las aves de este grupo murieron por complicaciones atribuidas a disbacteriosis severa; las únicas cuatro aves sobrevivientes mostraron una fuerte afectación en la retención y absorción de agua, después de la primo-inmunización se observó diariamente la presencia de heces acuosas. Las aves primo-inmunizadas con 5K mostraron durante el periodo de prepatencia signología clínica moderada sugestiva a coccidiosis, las aves exhibieron plumas erizadas, decaimiento, depresión y heces sanguinolentas, sin embargo, ninguna de las aves murió y se recuperaron en un periodo menor a 10 días después de la aparición de pródromos. El grupo testigo negativo durante el periodo de evaluación no mostró ningún signo de coccidiosis u otra enfermedad aviar.

3.4.2 Eliminación de ooquistes

La eliminación de ooquistes en las aves inmunizadas primariamente con la dosis de 5,000 ooquistes a las 8 semanas de edad fue significativamente ($P < 0.05$) más alta (1.3×10^8 ooquistes/ave) que la cantidad de ooquistes eliminados por el grupo inmunizado con 10,000 ooquistes (0.35×10^8 ooquistes/ave) (Figura 8). Sin embargo, a las 17 semanas de edad, después de los dos desafíos subsecuentes a la inmunización inicial se observó nula eliminación de ooquistes en las aves del grupo 5K, mientras que el grupo 10K continuó eliminando ooquistes en esta misma fecha ($P < 0.05$) (2.78×10^5 ooquistes/ave) (Figura 8).

3.4.3 Cinética temporal de la respuesta sérica de anticuerpos

La dinámica de la respuesta de anticuerpos hacia los antígenos de SzS y MzS se comparó entre los grupos primo-inmunizados con las dos diferentes concentraciones de ooquistes esporulados y el grupo testigo negativo (Figura 9). Las aves inmunizadas produjeron anticuerpos que muestran reactividad positiva hacia ambos tipos de antígenos, sin embargo, dos semanas después de la inmunización primaria ambos grupos muestran mayor reactividad sérica contra el antígeno del merozoito que hacia el esporozoito (Figura 9). Peculiarmente en esta fecha, el título de anticuerpos del grupo 10K contra el antígeno Sz no fue distinto al título del grupo testigo negativo. La respuesta inmune del grupo 5K hacia ambos antígenos fue más rápida y consistente ($P < 0.05$) que la mostrada por el grupo 10K. El título sérico en el grupo 5K se incrementa aún más dos semanas después del primer desafío, este título de anticuerpos del grupo 5K no aumento después del segundo desafío observándose (10 semanas después de la primera inmunización primaria) una meseta en la respuesta sérica principalmente hacia al antígeno del Mz.

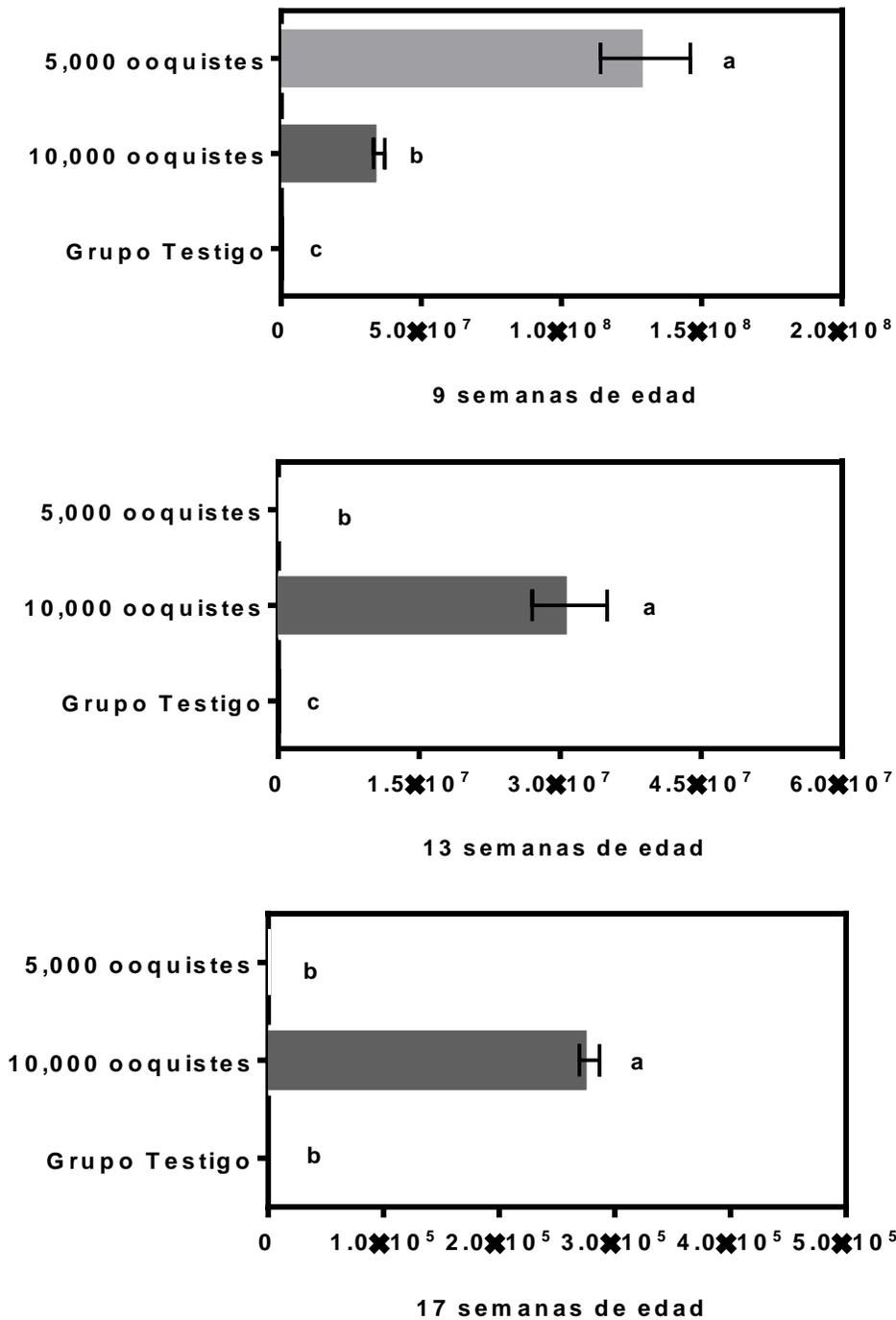


Figura 8. Excreción de ooquistes en heces por ave después de la inmunización primaria con una dosis individual de 5,000 ó 10,000 ooquistes esporulados. Ambos grupos recibieron posteriormente dos desafíos con la cepa homóloga de *Eimeria tenella*. Las barras representan la media de eliminación de ooquistes ± DE. Letras distintas (a,b,c) en cada barra indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre los grupos.

En el grupo 10K se observó un patrón de reactividad sérica de incremento paulatino y con un nivel menor ($P < 0.05$) a los títulos séricos mostrados por las aves del grupo 5K, no se pudo constatar ningún tipo de pico o meseta sérica en el grupo 10K (Figura 9). El suero de las aves testigo NIND mantenidas bajo condiciones libres de *Eimeria* sp., no mostró ningún tipo de reactividad hacia los antígenos de *E. tenella* a lo largo de todo el estudio (Figura 9).

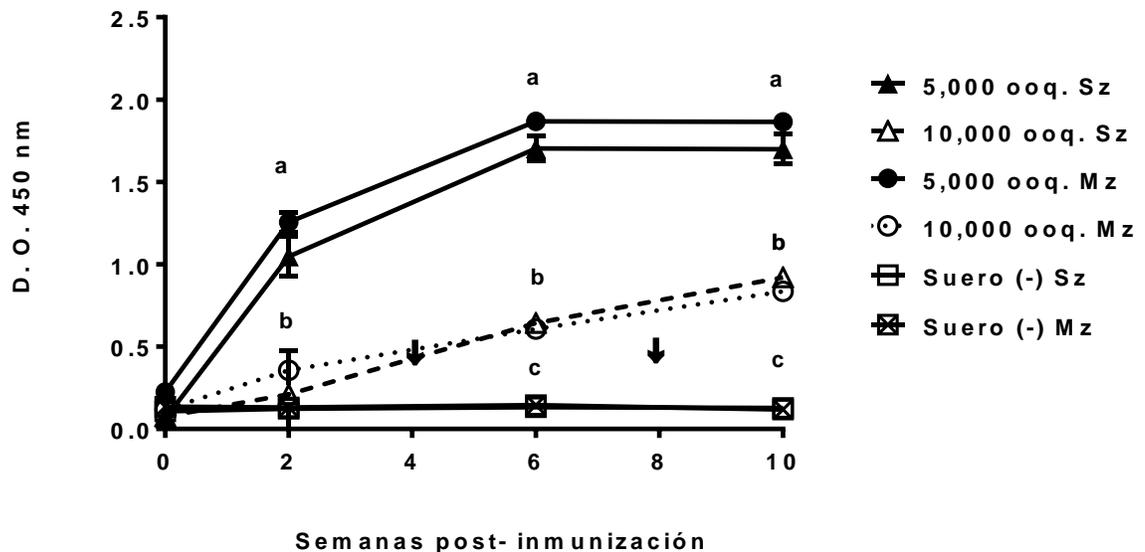


Figura 9. Dinámica de reactividad sérica en una prueba de ELISA indirecta hacia antígenos del esporozoito (Sz) y merozoito (Mz) con suero (1:100) de aves inmunizadas oralmente con 5,000 o 10,000 ooquistes de *E. tenella*. Se muestra la reacción hacia ambos antígenos de aves no inmunizadas. Las fechas de desafío se muestran con punta de flecha hacia abajo (\downarrow). Las figuras muestran las medias \pm DE de la densidad óptica (O.D.) de los sueros colectados en cada grupo en las fechas indicadas. Las figuras con letra minúscula diferente (a.b.c) en cada fecha de evaluación después de la primo-inmunización son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) (entre cada estadio zoito asexual de *E. tenella* y entre cada grupo).

3.4.4 SDS-PAGE de dos estadios asexuales del ciclo de vida de *E. tenella*

En la figura 10 se pueden observar los patrones de polipéptidos de ambos SNs de los estadios asexuales de *E. tenella* separados en SDS-PAGE al 12%. Aunque se observa un patrón complejo de proteínas se detectaron diferencias conspicuas entre esporozoitos y merozoitos, principalmente por debajo de los 50 kDa. Algunas proteínas de alto peso molecular aparentemente se encuentran compartidas entre ambos estadios difiriendo únicamente en su cantidad ($>Mz$), Se contabilizó un total de 29 polipéptidos en el

esporozoito, los cuales se observaron como bandas bien definidas teñidas con CBB, sus pesos moleculares fueron de 230, 185, 150, 120, 105, 103, 90, 82, 70, 65, 58, 56, 53, 46, 42, 40, 39.5, 38, 37.5, 35.5, 34.5, 30, 24, 23, 18, 17, 16, 13 y 12 kDa. En los merozoitos se identificaron 28 bandas, sus pesos moleculares fueron de 230, 185, 150, 120, 105, 103, 90, 82, 70, 65, 62, 60, 58, 56, 53, 46, 40, 38, 37.5, 35.5, 34.5, 31, 26, 23, 18, 16, 13 y 12 kDa.

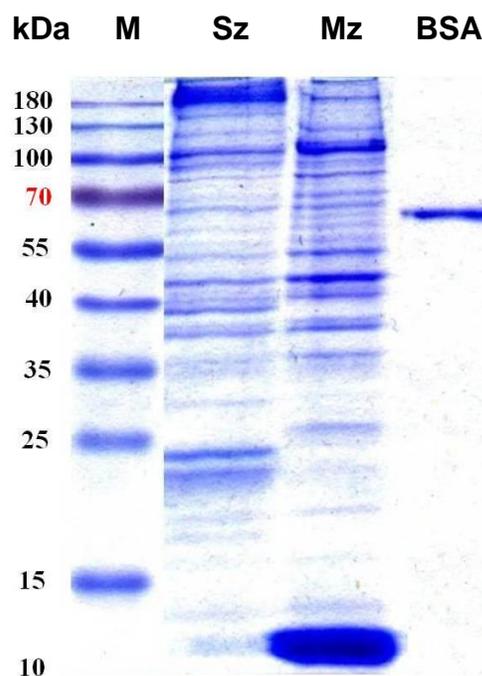


Figura 10. Polipéptidos del esporozoito (Sz) y segunda generación del merozoito (Mz) de una cepa salvaje de *E. tenella* definida en un gel de SDS-PAGE al 12% teñido con azul brillante de Coomasie (M= peso molecular estándar; BSA= Albúmina sérica bovina).

3.4.5 Reconocimiento antigénico de los antisueros de aves inmunizadas y desafiadas

Se utilizó WB para evaluar la respuesta inmune específica hacia los antígenos del esporozoito y merozoito de cada grupo inmunizado en los programas 5K y 10K (Figura 11). La principal diferencia observada entre ambos grupos fue la alta reactividad exhibida por el antisuero del grupo 5K consistente con la fuerte inmunoreactividad en OD mostrada por este mismo grupo en la prueba de ELISA indirecta (Figura 9). Otra notable diferencia es que el antisuero del grupo 5K reconoce varios antígenos de alto peso molecular que aparentemente son comunes entre Sz y Mz. Inmediatamente después del primer desafío el antisuero del grupo 5K incrementa el reconocimiento de antígenos de alto peso molecular en ambos estadios del parásito, sin embargo, esta reactividad correlativamente no se observa con mayor incremento después del segundo desafío (Figura 11A).

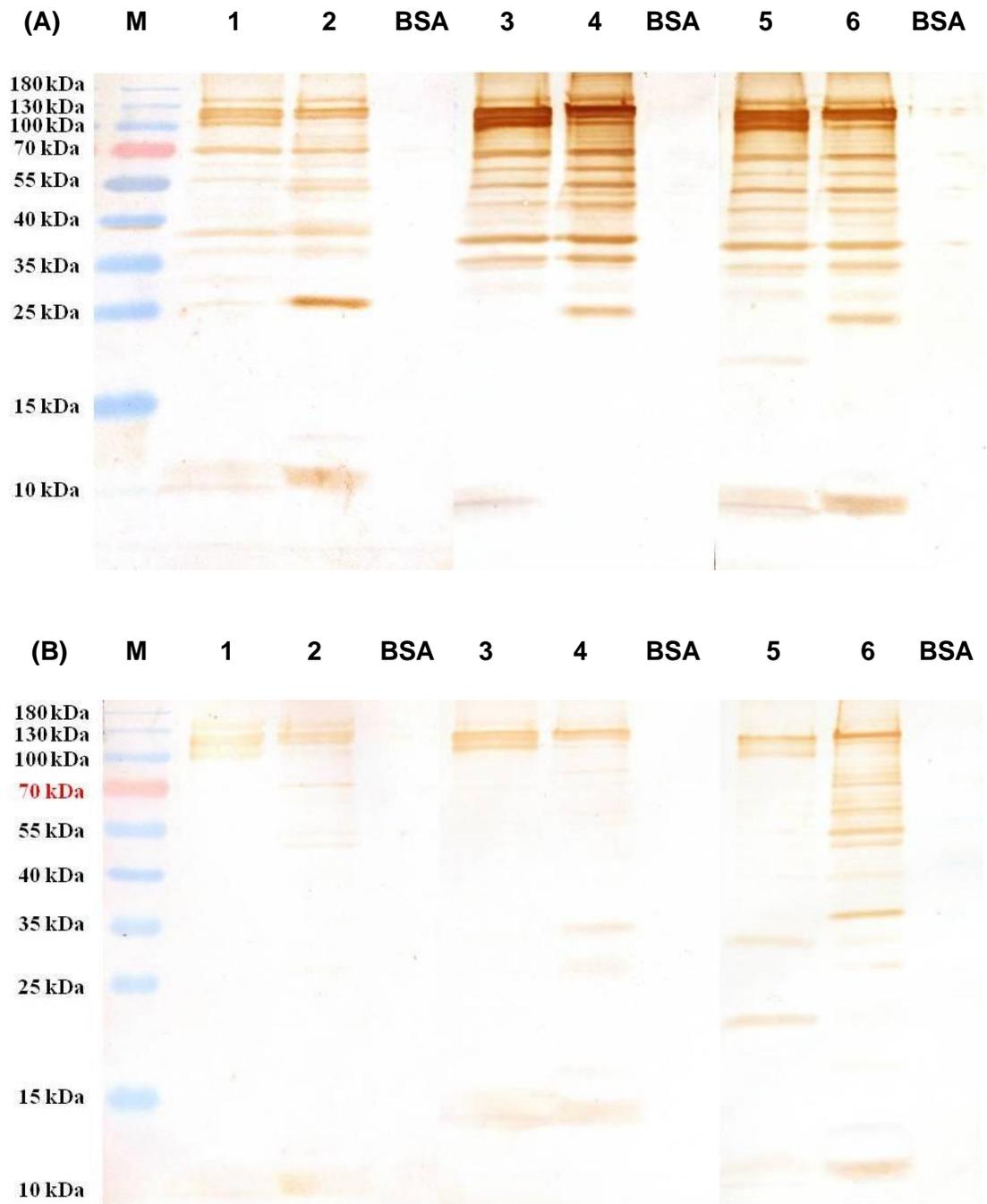


Figura 11. Proteínas del esporozoito y merozoito de *E. tenella* reconocidas en inmunoblots con una mezcla de suero de aves inmunizadas primariamente con 5,000 (A), y 10,000 (B) ooquistes esporulados/ave. Las líneas 1, 3 y 5 corresponden a esporozoito; las líneas 2, 4 y 6 al merozoito, ambos sobrenadantes fueron probados con antisueros de ambos programas de inmunización (2 semanas post-inmunización (PI): líneas 1, 2; seis semanas PI: líneas 3, 4; 10 semanas PI: líneas 5, 6). El antisuero en pool fue utilizado en las membranas de PVDF

a una dilución 1:100, n=6. El suero de las aves testigo no inmunizadas no mostró ningún tipo de reactividad hacia ambos estadios zoitos asexuales de *E. tenella* (datos no mostrados) (M= peso molecular estándar; BSA= Albúmina sérica bovina).

Ambos antígenos de los zoitos asexuales de *E. tenella* fueron reconocidos con casi el mismo grado de reactividad (intensidad). Se identificaron 14 bandas de polipéptidos en el antígeno del esporozoito con pesos moleculares de 230, 150, 120, 115, 105, 70, 65, 56, 38, 36, 31, 26, 12 y 10 kDa; en el merozoito se identificaron 16 bandas, con peso molecular de 230, 150, 120, 115, 82, 70, 65, 56, 53, 46, 38, 36, 31, 26, 13 y 12 kDa, la banda única más intensamente reconocida en el merozoito mostró un peso molecular de 26 kDa (Figura 11A). Después del evento de maduración inmunológica por afinidad de los idiotipos de las IgYs, los antisueros obtenidos después del segundo y tercer desafío (refuerzo) del grupo 5K identificaron consistentemente 15 polipéptidos inmunodominantes en ambos antígenos zoitos asexuales de *E. tenella*. Los anticuerpos policlonales de este grupo de inmunización después del segundo desafío reconocieron tres polipéptidos traslapados en el esporozoito (120, 115 y 105 kDa), y dos acoplados de determinantes antigénicos superpuestos en el antígeno del merozoito (120 y 115 kDa) (Figura. 11A). En contraste, los antisueros del grupo 10K mostraron un pobre patrón de reconocimiento, se observó una ligera mayor reactividad en el merozoito inmediatamente después del primer desafío, el cual fue un poco más fuerte y claro después del segundo desafío, se debe puntualizar que el reconocimiento de polipéptidos en el esporozoito fue muy escaso durante las tres evaluaciones realizadas (Figura 11B). Los patrones de reacción de este grupo (10K) difieren significativamente cuando cada uno de los antisueros obtenidos (n=6) fueron evaluados en *Western blot*. El antisuero recolectado dos semanas después de la primer inmunización apenas reacciona con ambos antígenos zoitos asexuales de *E. tenella*. En el merozoito se identificaron tenuemente pocos polipéptidos de alto peso molecular (>110 kDa) y uno solo de bajo peso (12 kDa). Se observó un patrón un poco más claro de reconocimiento de polipéptidos en el esporozoito y merozoito hasta después de la tercera inmunización (Figura. 11, Línea B5 y B6). Se reconocieron 12 polipéptidos en el merozoito, mostraron pesos moleculares de 120, 115, 82, 70, 62, 56, 53, 39, 36, 31, 26-27 y 12 kDa, mientras que el antisuero 3B identificó en el antígeno del Sz únicamente cinco bandas de polipéptidos preponderantes, sus pesos moleculares fueron de 115, 105, 31, 23 y 12 kDa (Figura 11, línea B5).

3.4.6 Análisis serológico de tres pollonas primo-inmunizadas con 5,000 ooquistes de *E. tenella* cada una

Dos semanas después del segundo desafío, la respuesta inmune de tres antisueros del grupo 5K seleccionados al azar fueron analizados individualmente con la prueba de ELISA indirecta (Figura 12) y *Western blot* (Figura 13).

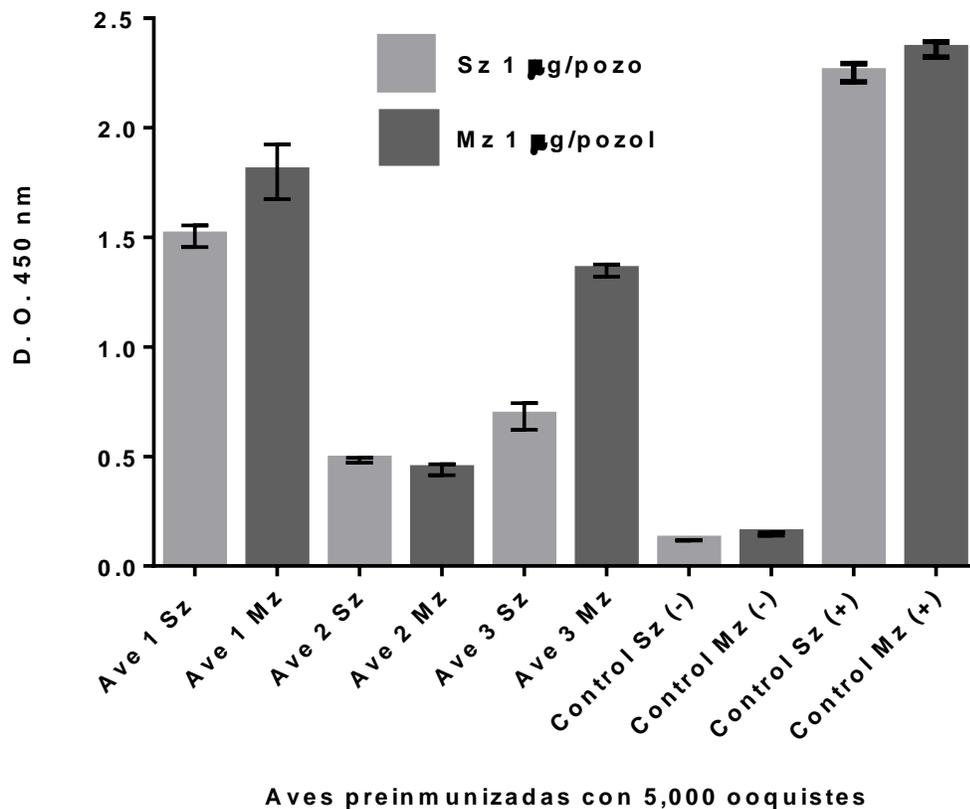


Figura 12. Reactividad hacia los antígenos de esporozoitos (Sz) y merozoitos (Mz) de tres antisueros individuales de aves de 18 semanas de edad inmunizadas primariamente con 5,000 ooquistes de *E. tenella*/ave y desafiadas subsecuentemente en dos ocasiones. Todos los antisueros de aves inmunizadas y de referencia se diluyeron 1:100. Se muestran las medias y DE de la densidad óptica de tres ensayos experimentales realizados, los tres sueros en cada prueba fueron evaluados por duplicado.

La reactividad en absorbancia fue idiosincrática, se observó una amplia variación de la respuesta humoral de cada ave hacia ambos antígenos. La prueba de ELISA mostró que los títulos de los anticuerpos de cada una de las aves del grupo 5K fueron más altos que el título del grupo testigo no inmunizado. La reactividad del antisuero del ave uno fue la más alta, y el

ave dos mostró el título más bajo (Figura. 12). La reactividad OD del antisuero uno y tres fue mayor hacia el SN del merozoito que hacia el esporozoito, esta tendencia, aunque más ligera también se observó en el antisuero positivo de referencia (Figura 12). Adicionalmente se observó que la reactividad del antisuero de cada ave del grupo 5K fue menor a la reactividad del antisuero positivo de referencia (Figura 12).

3.4.7 Western blot de tres antisueros de pollonas primo-inmunizadas con 5,000 ooquistes de *E. tenella* cada una

En WB los sueros analizados individualmente de las 3 pollonas del grupo 5K mostraron una identificación antigénica heterogénea. El antisuero del ave uno reconoce un amplio rango de polipéptidos en el Sz y Mz del SDS-PAGE original, mientras que únicamente una pequeña fracción de estos mismos polipéptidos fue reconocida por los antisueros de las aves dos y tres (Figura 13). Esto se relaciona subjetivamente con el grado de absorbancia observado con los sueros de estas mismas aves en la prueba de ELISA indirecta, donde el antisuero del ave número uno presentó el mayor nivel de absorbancia hacia ambos antígenos, el tres mostró menos reacción y el dos exhibió la menor inmunoreactividad (Figura 12). El ave uno reconoce 14 bandas bien definidas en el esporozoito y 21 en el merozoito, el antisuero del ave dos reconoce 10 bandas en el esporozoito y 13 bandas en el merozoito, el ave tres reconoce nítidamente 8 bandas en el esporozoito y 17 bandas en el merozoito (Figura 13). Las tres aves muestran mayor reconocimiento hacia el merozoito que hacia el esporozoito. En el antígeno del esporozoito y merozoito las tres aves reconocen de manera común cinco polipéptidos con peso de 110 kDa, 105 kDa, 67 kDa, 56 kDa y 53 kDa. Las bandas de mayor preponderancia reconocidas por el antisuero del ave uno en ambos antígenos zoitos asexuales de *E. tenella* fueron de 100 kDa a 127 kDa. La banda de mayor reactividad reconocida por el ave tres fue de 110 kDa. Las aves uno y dos reconocen bandas similares en el esporozoito y merozoito de 127 kDa, 82 kDa, 70 kDa y 26 kDa, y únicamente en el merozoito ambas aves reconocen bandas con un peso de 13 kDa, 12 kDa y 11 kDa (Figura 13). En el Mz las tres aves reconocen una misma banda inmunodominante de 26 kDa, en el ave dos esta banda fue la de mayor preponderancia (alta intensidad), mientras que una banda del mismo peso molecular reconocida en el esporozoito, aunque de forma más tenue se detectó únicamente con el antisuero de esta misma ave (número dos), esta banda no se observó en los *immunoblots* de las otras dos aves (Figura 13). Las aves uno y tres reconocen fuertemente un polipéptido en el merozoito con peso de 36 kDa, el cual no se observó en el ave número dos. El antisuero del ave dos y tres son los únicos que revelan la

presencia de una banda en el Sz con un peso ~10 kDa, sin embargo, el ave tres lo reconoce con mayor intensidad que el ave dos, esta banda no se observó con el antisuero del ave uno (Figura 13). Un gran número de antígenos reconocidos por las tres aves, especialmente aquellos > 50 kDa parecen ser comunes a ambos ciclos de vida del parásito.

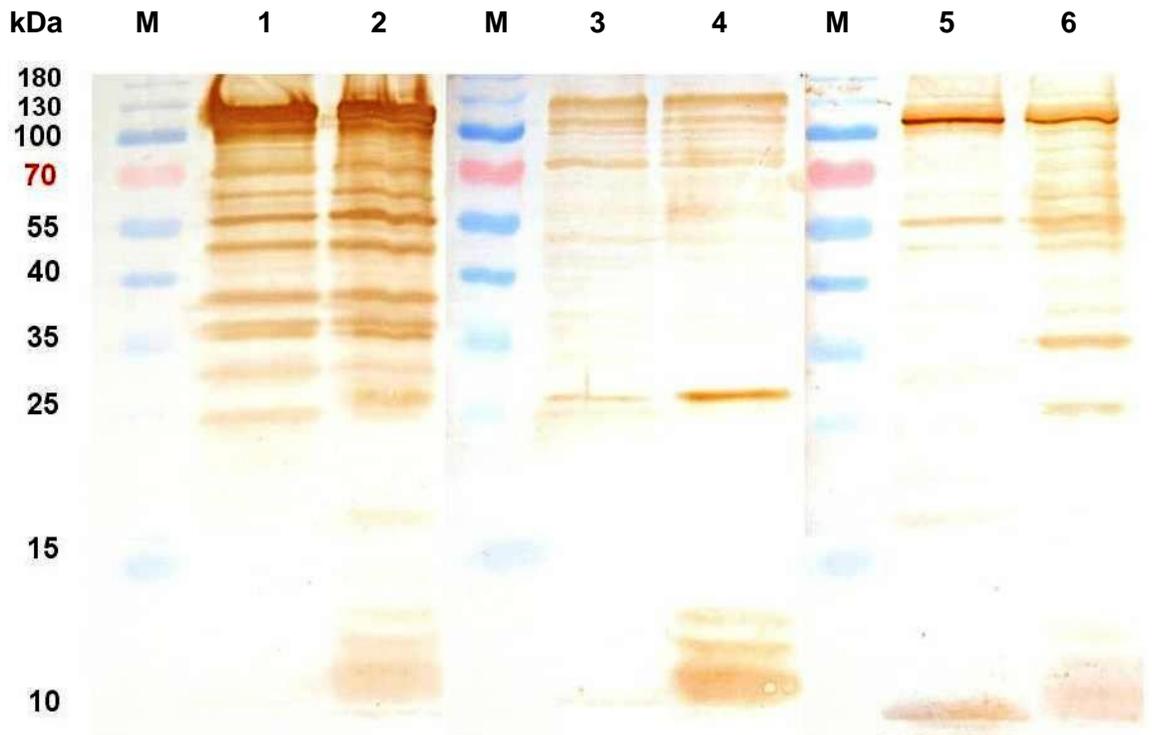


Figura 13. Inmunotransferencias de esporozoitos y merozoitos de segunda generación de *E. tenella* probados con tres sueros individuales de pollonas inmunizadas primariamente con 5,000 ooquistes de *E. tenella*/ave. La línea 1, 3 y 5 corresponden al esporozoito; la línea 2, 4 y 6 al merozoito. Las inmunotransferencias corresponden a la pollona 1 (línea 1 y 2), pollona 2 (línea 3 y 4) y pollona 3 (líneas 5 y 6). El antisuero utilizado en las membranas de PVDF se diluyó 1:100. El suero de aves testigo no inmunizadas no mostró ningún tipo de reactividad hacia ambos antígenos (datos no mostrados) (M= marcador de peso molecular estándar).

3.5 Evaluación inmunológica de los esporozoitos de *E. tenella*

3.5.1 Titulación del antígeno de esporozoitos mediante ELISA indirecta

En la figura 14 se observa que la respuesta de los anticuerpos del antisuero de referencia *versus E. tenella* diluido 1/10 obtienen un valor de absorbancia de 1.088 a una dilución 1/8

del SN de esporozoitos de *E. tenella* procesados por congelamiento-descongelamiento (Clave= Sz 1/2). En la máxima dilución del Ag probada (1/1,024) se observó un valor >0.4 (OD), en la dilución 1/100 del antisuero se registraron valores inferiores a esta densidad óptica (<0.4 OD) desde la menor hasta la mayor dilución del antígeno (1/1,024) (Figura 14).

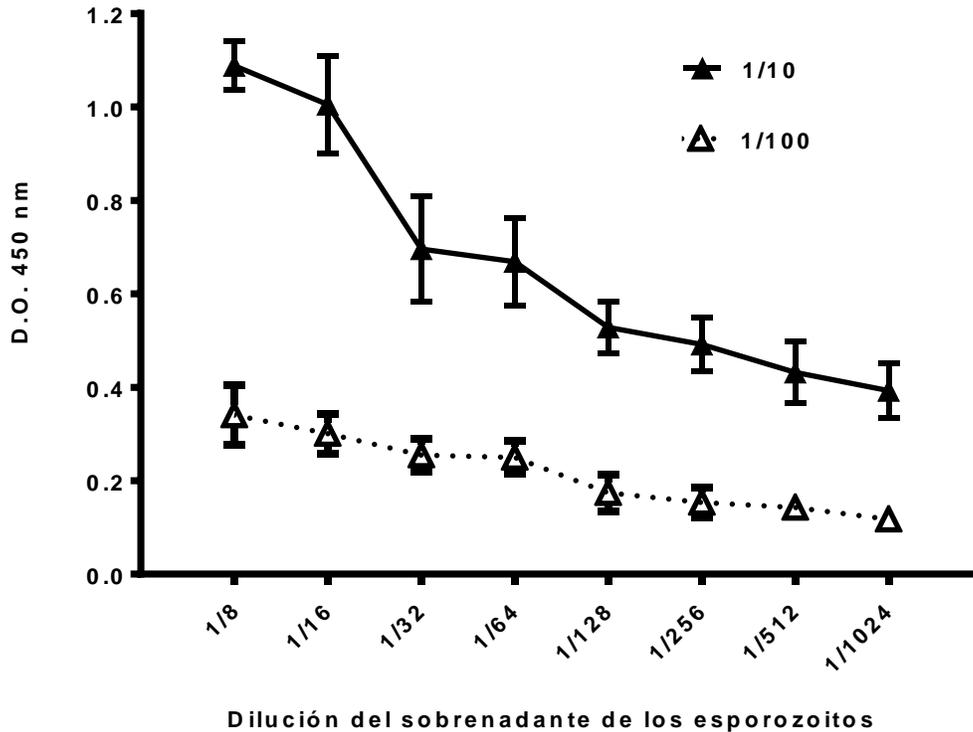


Figura 14. ELISA indirecta del antisuero de gallina *versus E. tenella* (suero referencia 3 “B”) a diferentes diluciones del sobrenadante de esporozoitos de *E. tenella* (20 μ L) sujetos a congelación-descongelación. Se muestra media \pm DE de la densidad óptica del antígeno del sobrenadante de esporozoitos evaluado a dos diluciones (1:10 y 1:100) por duplicado.

En la figura 15, la respuesta de los anticuerpos del antisuero de referencia *versus E. tenella* diluido 1/10 y 1/100 hacia el SN de esporozoitos de *E. tenella* procesados con buffer de lisis, muestra valores de absorbancia muy bajos desde la menor dilución del antígeno hasta la mayor dilución de este (1/1,024). Aunque en la dilución 1/10 del suero las tres últimas diluciones del Ag del Sz muestra una respuesta que se incrementa paulatinamente por arriba de 0.09 de DO, únicamente en la dilución 1/1,024 del antígeno es cuando la respuesta supera el >0.17 de DO, la dilución 1:100 muestra esta misma tendencia de incremento en la reactividad conforme el antígeno se diluye (Figura. 15).

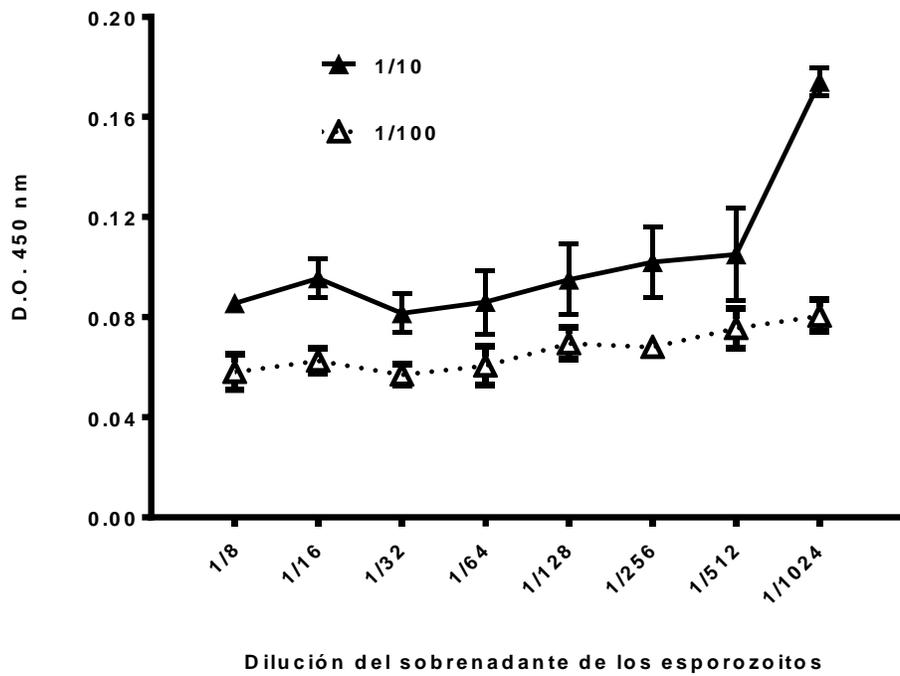


Figura 15. Reactividad en una prueba de ELISA indirecta del antisuero de referencia de gallina *versus E. tenella* (3 "B") a diferentes diluciones de un sobrenadante de antígenos de esporozoitos de *E. tenella* (20 μ L) tratados con buffer de lisis. Se muestra la media y la DE de la densidad óptica del antígeno del esporozoito evaluado por duplicado.

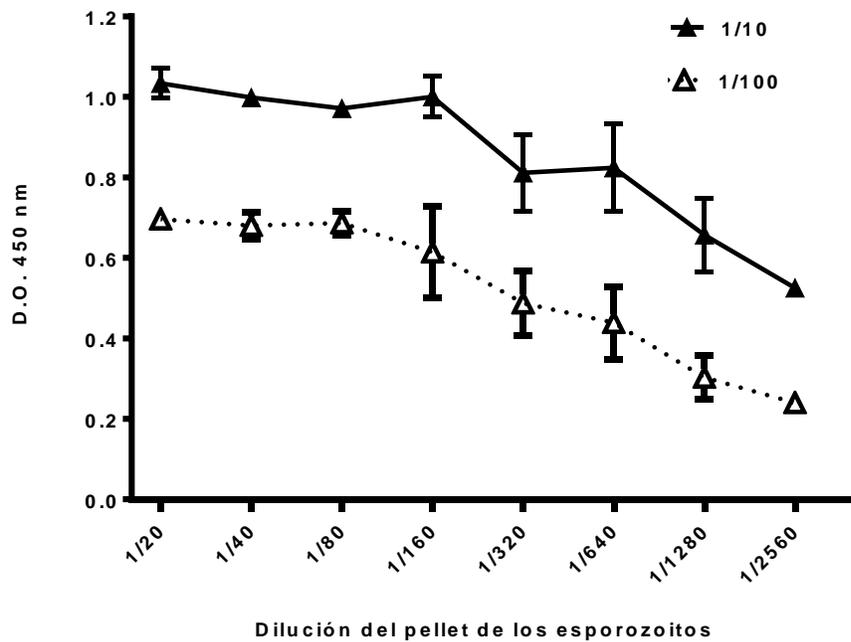


Figura 16. Respuesta del antisuero de referencia de gallina *versus E. tenella* (3 “B”) a diferentes diluciones de los antígenos del *pellet* de esporozoitos de *E. tenella* (20 μ L) sujetos a 5 ciclos de congelación-descongelación en una prueba de ELISA indirecta. Se muestra la media y la DE de la densidad óptica del antígeno del *pellet* evaluado por duplicado.

Al evaluar el *pellet* de los Szcs de *E. tenella* procesados congelamiento-descongelamiento (Clave= Sz 1/2), se observó que los Abs del antisuero de referencia *versus E. tenella* muestran un patrón de reactividad similar al que muestra el SN de esporozoitos de *E. tenella* del mismo origen (Clave= Sz 1/2), sin embargo, de manera general presentan valores menores (OD) con relación a los observados en el SN (Figura 16).

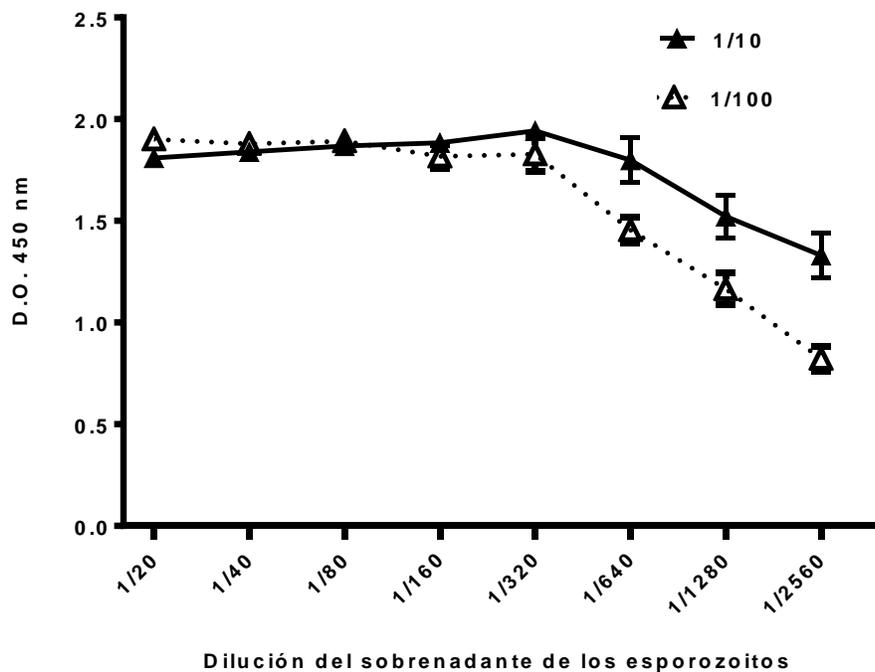


Figura 17. ELISA indirecta de la reactividad del antisuero de referencia de gallina *versus E. tenella* (2 “A”) a diferentes diluciones de los antígenos de esporozoitos de *E. tenella* (20 μ L) sujetos a 5 ciclos de congelación-descongelación (Clave= Sz 27). Se muestra la media y la DE de la densidad óptica del antígeno del esporozoito que se evaluó por duplicado.

En la figura 17, la respuesta del antisuero de referencia *versus E. tenella* (1/10 y 1/100) hacia el SN del Ag de esporozoitos de *E. tenella* procesados por congelamiento-descongelamiento (Clave= Sz 27), muestra que desde la dilución inicial del Ag (1:20) hasta la quinta dilución (1:320) son indistinguibles entre sí, ambas diluciones del antisuero muestran valores de OD

mayores a 1.8. A partir de la dilución 1/640 del Ag se observa un declive en la reactividad hacia ambas diluciones del antisuero, la dilución 1:100 muestra mayor caída en su inmunoreactividad a partir de esta dilución, sin embargo, aún a la mayor dilución del Ag (1:2,560) en esta mayor dilución del suero (1:100) aún se observa un valor mayor a 0.8 (OD) (Figura 17). En la figura 18 se observa la optimización de inmunoreactividad por μ gramo del SN del antígeno del esporozoito de *E. tenella* (Clave= Sz 01) para obtener la mejor lectura de OD, la mejor lectura (<1.8 DO) se logró a \sim 1 μ gramo (SN), por lo cual en las pruebas de ELISA indirecta del presente estudio se decidió utilizar esta cantidad de antígeno SN/pozo.

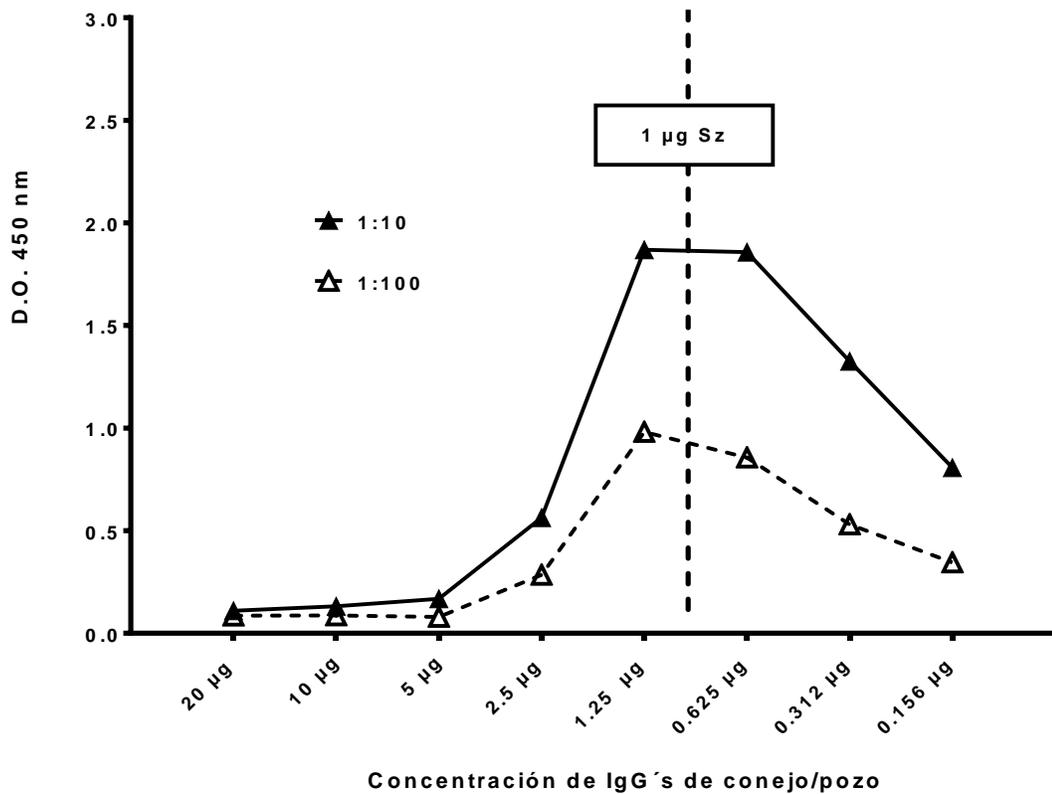


Figura 18. ELISA indirecta de un antisuero de conejos hiperinmunizados *versus* el esporozoito de *E. tenella* con una dilución decreciente en μ gramos de un SN del antígeno del esporozoito de *E. tenella* (clave= Sz 01). Se muestra el promedio en dos diluciones (1:10 y 1:100) de la densidad óptica por duplicado.

3.5.2 Titulación con ELISA indirecta del suero hiperinmune de gallinas (*Gallus gallus*) contra el antígeno del esporozoito de *E. tenella*

En la figura 19 el antisuero A de las gallinas *versus E. tenella* muestra mayores valores de inmunoreactividad que el antisuero B. A partir de la dilución 1:160 el antisuero A comienza a

declinar por abajo de 1.5 (OD), sin embargo, a la máxima dilución probada (1:640) la inmunorreactividad aún se mantiene arriba de 1.0 de OD. El antisuero B comienza a declinar de forma lineal inmediatamente después de la primer dilución, en la dilución 1/40 muestra un valor inferior a 1.0 (OD) y en la máxima dilución probada (1:640) muestra valores inferiores a 0.3 (OD). El antisuero negativo muestra baja reactividad, fue diferente a los dos antisueros de las aves inmunizadas con *E. tenella* (Figura 19)

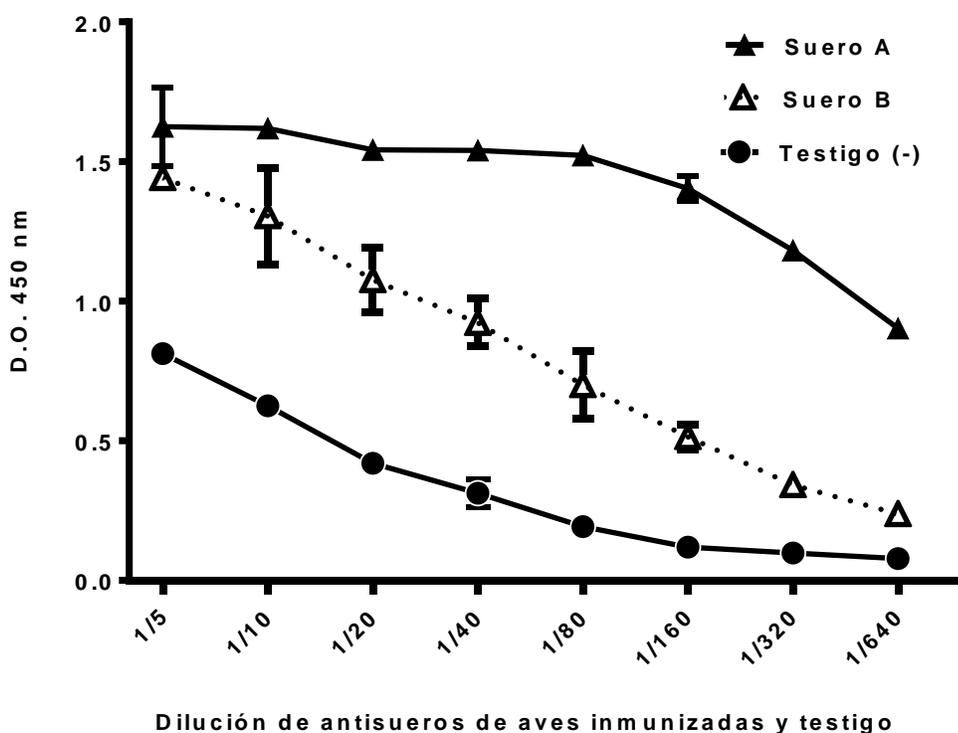


Figura 19. ELISA indirecta de dos antisueros de gallinas hiperinmunizadas *versus E. tenella* (antisuero A y B) hacia diluciones de un SN de antígenos del esporozoito de *E. tenella* (1/64 por pozo) sujetos a 5 ciclos de congelación-descongelación (Clave= Sz 1/2). Se muestra media aritmética \pm DE de la densidad óptica de los antisueros evaluados por duplicado.

3.5.3 Titulación con ELISA indirecta del antígeno de merozoitos de segunda generación de *E. tenella*

La inmunorreactividad del antisuero 2 "A" de las gallinas *versus E. tenella* fue alta y constante a lo largo de todas las diluciones del SN y *pellet* del merozoito de segunda generación de *E. tenella*. El valor de absorbancia a lo largo de todas las diluciones evaluadas se mantiene > 2.2 OD, el valor de OD en la más alta dilución (1:2,560) en ambos antígenos

no es diferente a la dilución inicial de los mismos. El antígeno irrelevante no mostró ningún tipo de reactividad hacia el antisuero 2 “A” (Figura 20)

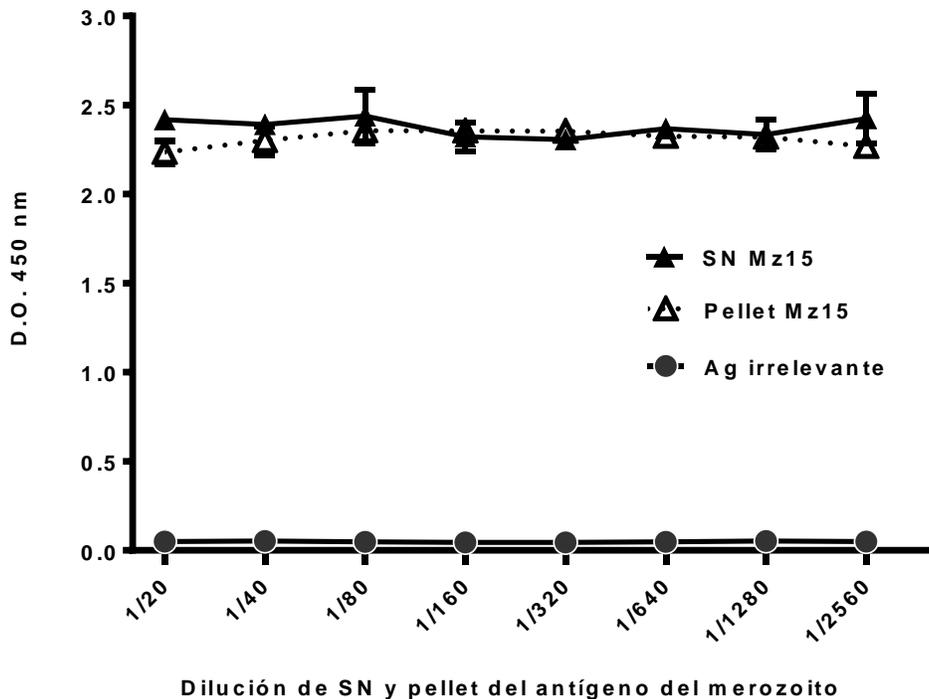


Figura 20. ELISA indirecta del SN y *pellet* del merozoito de segunda generación de *E. tenella* (Mz15= 10 µL/pozo) hacia el antisuero después de la segunda inmunización del programa “A” (1:10) contra *E. tenella*, se incorporó como testigo negativo un SN de antígeno irrelevante del virus de la Rinotraqueítis viral bovina (Herpesvirus). Se muestra la media aritmética ± DE de la densidad óptica de los antisueros evaluados por duplicado.

La respuesta inmune del antisuero A hacia el SN del Sz con 1 µg/pozo fue ligeramente menor en OD que con 1 µg/pz del SN del Mz de segunda generación de *E. tenella* (Figura 21). La respuesta del antisuero A en las dos diluciones probadas con ambos antígenos fue muy similar, solo se observó una leve caída del valor OD en la dilución 1:100 con el SN del antígeno del merozoito (Figura 21). Los valores OD del antisuero B hacia ambos antígenos fueron más bajos e irregulares que el resto de los antisueros usados para evaluar la reactividad del SN de merozoitos. Si bien con este antisuero (B) se mantiene una aparente reactividad mayor hacia el Mz que hacia el Sz, la dilución 1:100 de este antisuero mostró una menor respuesta que la dilución 1:10 en ambos Ags (Figura 21). El antisuero de las aves inmunizadas subcutáneamente con 5.3×10^6 esporozoitos completos mostró la mayor respuesta de todos los antisueros probados hacia este antígeno (Sz), la reactividad fue

similar en ambas diluciones evaluadas. El valor de absorbancia de este antisuero (*versus* Sz) hacia el SN del Mz en una dilución 1:10 aunque ligeramente fue similar a los valores de ambas diluciones *versus* el SN del Sz, sin embargo, la respuesta de la dilución 1:100 de este antisuero (B) fue menor y con mayor DE lo cual indica una mayor variación (Figura 21),

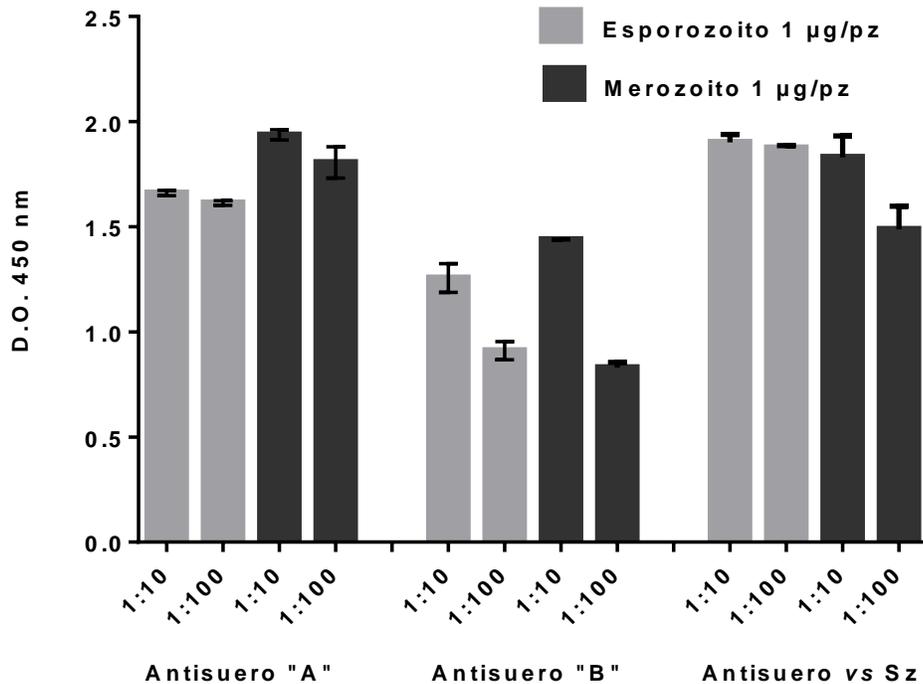


Figura 21. ELISA indirecta del SN de esporozoitos (clave Sz20= 1 µg/pz) y merozoitos de *E. tenella* (clave Mz15= 1 µg/pz) hacia el antisuero de gallinas inmunizadas primariamente *per* os con 5,000 (Programa "A") ó 10,000 (Programa "B") ooquistes esporulados de *E. tenella*, y un antisuero de aves *SPF Leghorn White* inmunizadas cuatro ocasiones con 100 µg vía Sc de esporozoitos purificados inactivados de *E. tenella*. Se muestra la media ± DE (barras) de la densidad óptica de los antisueros evaluados por cuadruplicado.

3.5.4 Titulación con ELISA del suero hiperinmune de ave contra el antígeno de merozoitos de segunda generación de *E. tenella*

La respuesta del antisuero A *versus* *E. tenella*, hacia el SN de merozoitos de segunda generación de *E. tenella* mantiene un valor >1.5 de OD hasta la dilución 1/80, posteriormente en la máxima dilución evaluada (1:1,280) cae a 0.9 de OD (Figura 22). Mientras que el antisuero B muestra un patrón de menor reactividad, muestra solo un valor >1.5 de OD a una dilución baja del antisuero B (1/20), en tanto que el valor a la máxima dilución utilizada (1:1,280) fue de solo 0.17 OD (Figura 22).

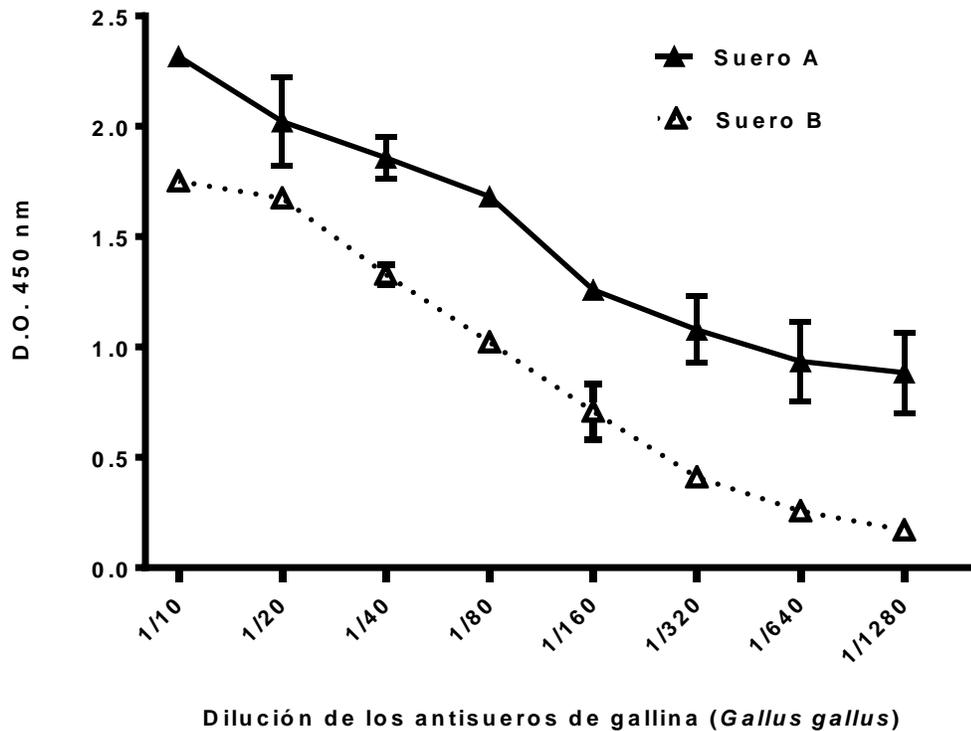


Figura 22. Inmunorreactividad en una prueba de ELISA indirecta de la dilución de dos antisueros de gallinas hiperinmunizadas *versus E. tenella* (Antisero A y B) contra un SN de antígeno de merozoitos de segunda generación de *E. tenella* (1 µg/pozo) sujeto a 5 ciclos de congelación-descongelación (Clave= Mz15). Se muestra la media ± DE de la densidad óptica de los antisueros evaluados por duplicado.

La respuesta del antisero A *versus E. tenella* hacia el *pellet* re-suspendido de merozoitos de segunda generación de *E. tenella* mantiene un valor >1.5 de OD hasta la dilución 1/160, después declina rápidamente para mostrar una OD de 0.8 a la máxima dilución evaluada (1:1,280) (Figura 23). En tanto que el antisero B muestra un patrón de mucho menor reactividad, mantiene un valor >1.5 de OD únicamente en la dilución 1/10, después declina rápidamente y muestra tan solo un valor ~0.09 de DO a la máxima dilución evaluada (1:1,280) (Figura 23).

3.5.5 Caracterización por *Western blotting* de polipéptidos en antígenos de esporozoitos y merozoitos de segunda generación de *E. tenella*

En el análisis de las fracciones de los polipéptidos en los SN de esporozoitos y merozoitos del SDS-PAGE se observó un patrón similar de bandas, con algunas diferencias en los

polipéptidos de bajo peso molecular, por arriba de los 50 kDa ambas fases parasitarias comparten la mayor parte de antígenos revelados tanto en las pruebas de electroforesis como en las de inmunoreactividad a antisueros *versus E. tenella* (Figuras 24, 25, 26 y 27).

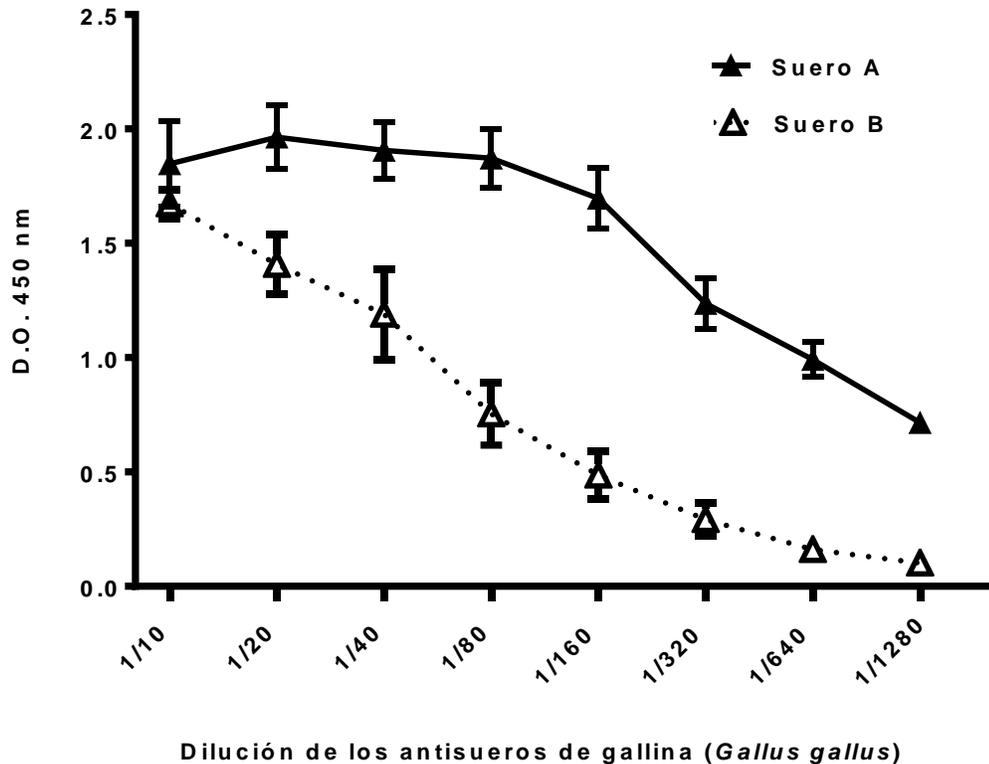


Figura 23. Reactogenicidad en una prueba de ELISA indirecta de dos antisueros de gallinas hiperinmunizadas *versus E. tenella* (Antisuero A y B) contra el *pellet* resuspendido en PBS 1X de antígenos del merozoito de segunda generación de *E. tenella* (1:2000/pozo) (Clave= Pellet Mz15). Se muestra la media \pm DE de la densidad óptica de los antisueros evaluados por duplicado.

Se identificaron bandas inmunodominantes en el SN de esporozoitos 1/2, las más evidentes de 118 y 112 kDa; una fracción muy recurrente de 82 kDa. En el sobrenadante de esporoblastos se detectaron únicamente tres bandas de 26-27 kDa, 12 kDa y 8-10 kDa, el ooquiste completo no presentó ningún tipo de reacción al antisuero (Figura 27). Fue evidente también la preponderancia de una banda de 50-53 kDa, otra de 26-27 kDa, 31 kDa y una en el rango \sim 36 kDa (Figura 27).

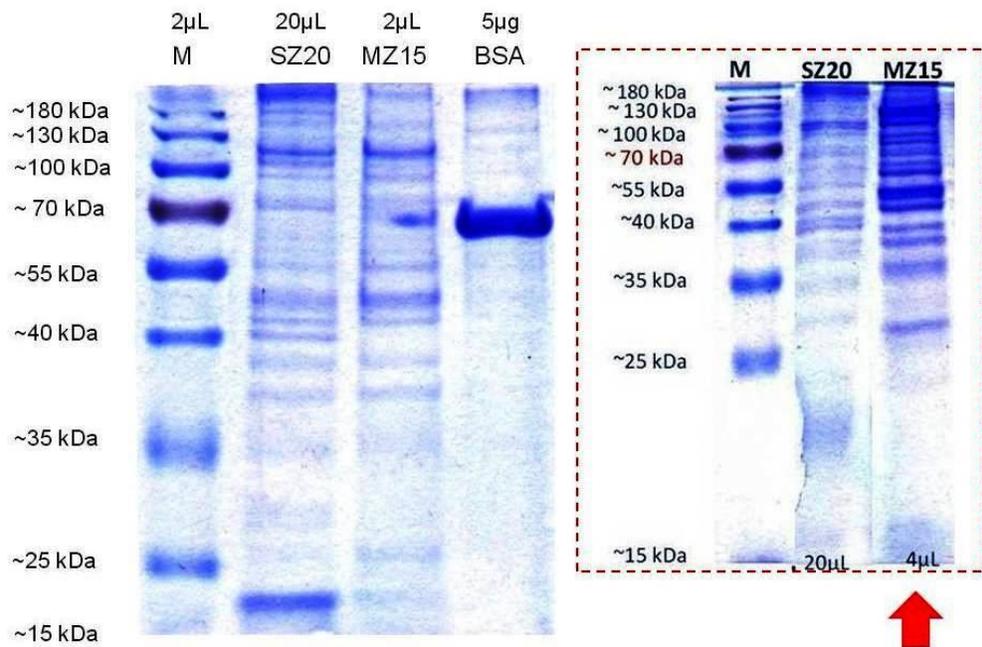


Figura 24. Electroforesis SDS-PAGE (12%) teñido con azul brillante de *Coomassie* con dos diferentes concentraciones de polipéptidos de esporozoitos y merozoitos.

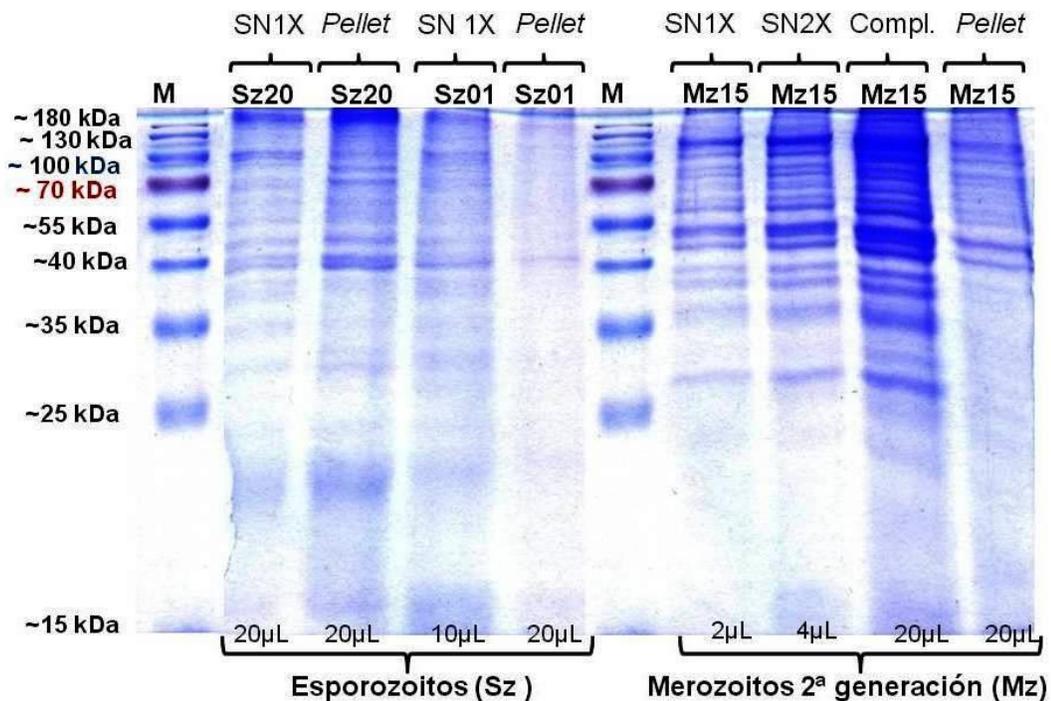


Figura 25. Electroforesis con diferentes concentraciones de fracciones solubles y *pellets* de esporozoitos y merozoitos de segunda generación de *E. tenella* evaluados en gel de acril-bisacrilamida (15%) teñido con azul brillante de *Coomassie*.

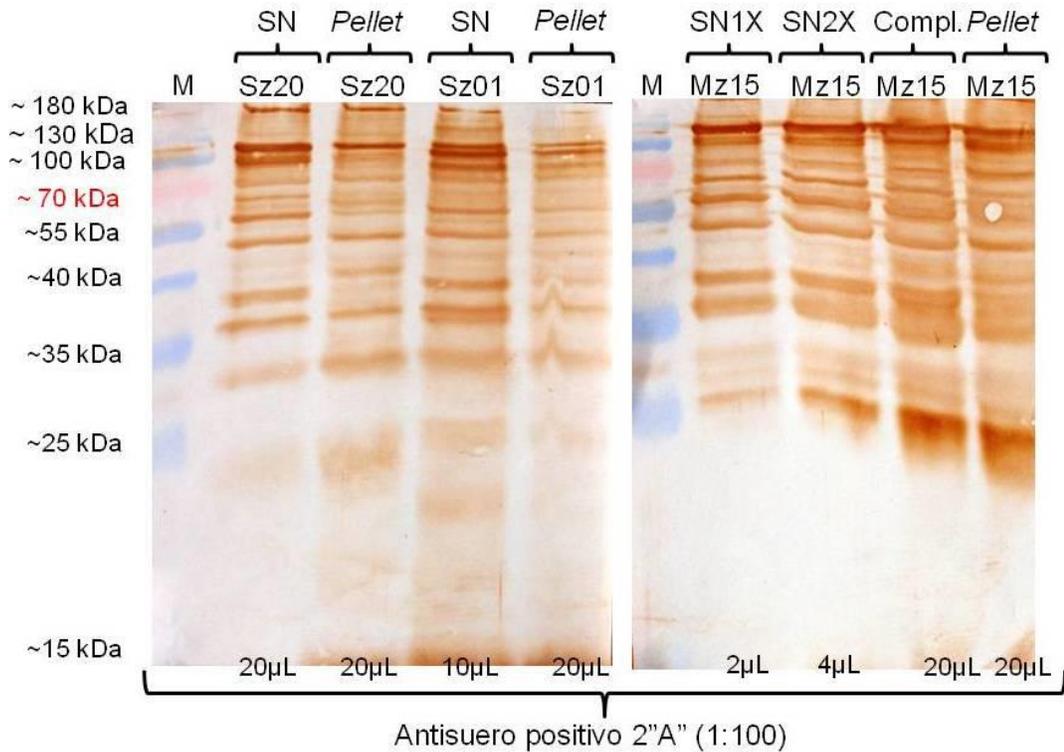


Figura 26. *Western blot* de fracciones solubles de esporozoitos y merozoitos a diferentes concentraciones identificadas con el antisuero 2 "A" en una membrana de PVDF.

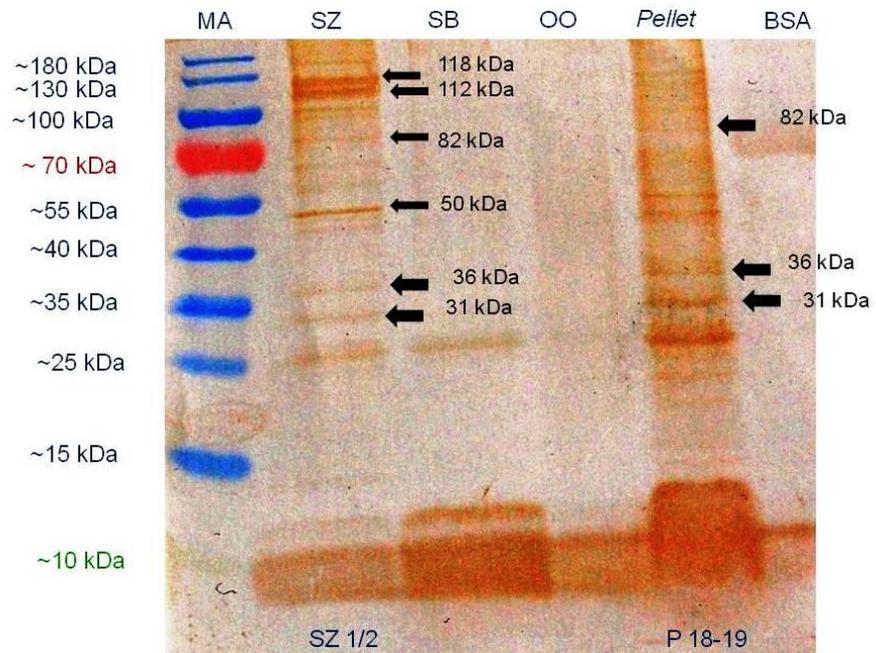


Figura 27. *Western blot* de esporozoitos (Sz), pellet de esporozoitos (Pellet), ooquistes esporulados (OO) y esporoblastos (SB) de *E. tenella* utilizando anticuerpos policlonales

versus *E. tenella* (antisuero 1:100) de aves inmunizadas con el programa B (inmunización inicial *per os* con 10,000 ooquistes esporulados). Se incluyó un testigo de BSA.

3.6 Inmunoprotección con anticuerpos policlonales IgY provenientes de la yema de gallinas inmunizadas con *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* administradas a aves SPF Leghorn White infectadas severamente con una cepa salvaje de *E. tenella*

3.6.1 Antisuero contra ooquistes orales de *E. tenella*

La cinética de anticuerpos observada en la prueba ELISA indirecta hacia ambas fases asexuales de *E. tenella* después de la inmunización con 5,000 ooquistes esporulados *per os* a cada gallina híbrida se incrementa paulatinamente con el tiempo (Figura 28).

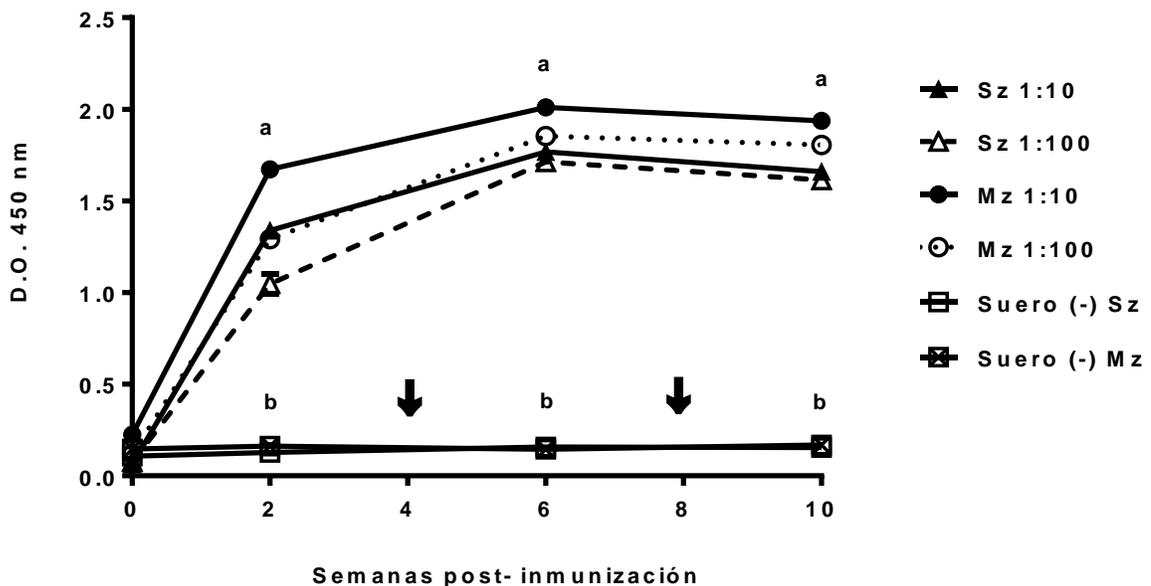


Figura 28. Dinámica de la reactividad de anticuerpos hacia los sobrenadantes de antígenos del esporozoito (Sz) y merozoito (Mz) de *E. tenella* de aves inmunizadas oralmente con *E. tenella*. Se muestran diluciones 1:10 (línea continua) y 1:100 (línea punteada) de cada suero. Las flechas indican los refuerzos inmunológicos con intervalo de 4 semanas c/uno. Los sueros de las gallinas no inmunizadas (-) no mostraron ninguna reactividad hacia ambos antígenos. Cada fecha PI muestra la media del antisuero en unidades de absorbancia (OD) \pm la desviación estándar (D.E.). En la gráfica, los marcadores caracterológicos que no comparten una literal idéntica son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

La respuesta humoral hacia los antígenos de esporozoitos y merozoitos fue de similar intensidad y muestra el mismo perfil a lo largo del tiempo PI. Desde el principio se observa que ambos títulos (Sz y Mz) en las aves inmunizadas fueron diferentes a los títulos de las aves no inmunizadas ($P < 0.05$). El título de las aves inmunizadas hacia ambos antígenos (Sz y Mz) se detecta elevado inmediatamente 2 semanas después de la primer inmunización, el pico de anticuerpos se observó 2 semanas después del primer refuerzo inmunológico. Después los Abs comenzaron a declinar ligeramente hacia las 10 semanas PI, y el segundo refuerzo no mostró ningún tipo de efecto sobre el nivel de títulos séricos (Figura 28).

3.6.2 Antisuero contra esporozoitos completos de *E. tenella*

La cinética de la respuesta humoral de las aves *SPF Leghorn White* inmunizadas vía subcutánea con esporozoitos completos inactivados de *E. tenella* fue similar para ambos antígenos zoitos asexuales de *E. tenella* (Figura 29).

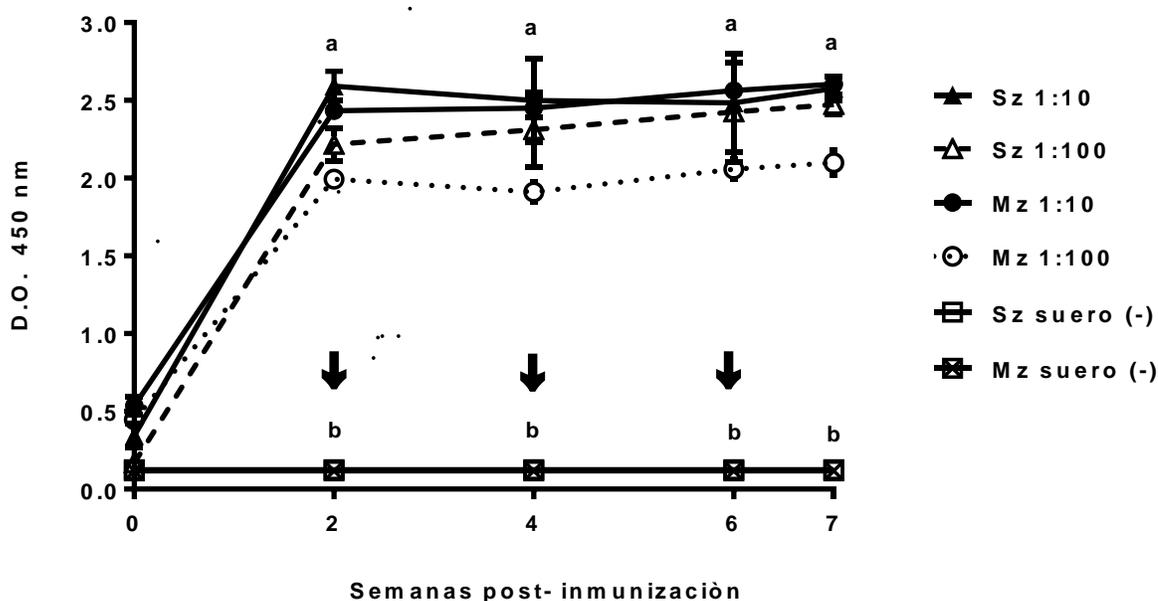


Figura 29. Dinámica de reactividad de anticuerpos hacia el antígeno del esporozoito (Sz) y merozoito (Mz) de *E. tenella* de aves *SPF Leghorn White* inmunizadas subcutáneamente con esporozoitos completos de *E. tenella*. Dilución 1:10 (línea continua) y 1:100 (línea punteada) de cada antisuero. Las flechas indican las tres inmunizaciones de refuerzo en intervalos de dos semanas. Los sueros de las aves no inmunizadas (-) no mostraron reactividad. Cada fecha muestra la media del antisuero en unidades de

absorbancia (OD) \pm la desviación estándar (DE). De acuerdo con la prueba Tukey, los puntos caracterológicos que no comparten misma literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

Dos semanas después de la primer inmunización se alcanza el pico sérico contra ambos antígenos, los niveles de Abs permanecen en meseta hasta las 6-7 semanas PI. Desde el pico sérico hasta finalizar la prueba de inmunización la reactividad del antisuero (1:100) hacia el Ag del esporozoito fue ligeramente mayor que hacia el Mz (Figura 29).

3.6.3 SDS-PAGE de los anticuerpos IgY de Supracox[®]

El contenido proteico promedio de la suspensión hiperinmune de SC fue de 30 mg/mL. La pureza de IgYs en el producto fue de ~90% como se puede observar en el SDS-PAGE (Figura 30). El SC muestra la presencia de dos bandas de proteínas teñidas fuertemente con CBB (carril 1 y 2), el peso molecular de las bandas fue de ~68 kDa y ~27 kDa, representan a la cadena pesada y ligera de IgY respectivamente (Figura 30).

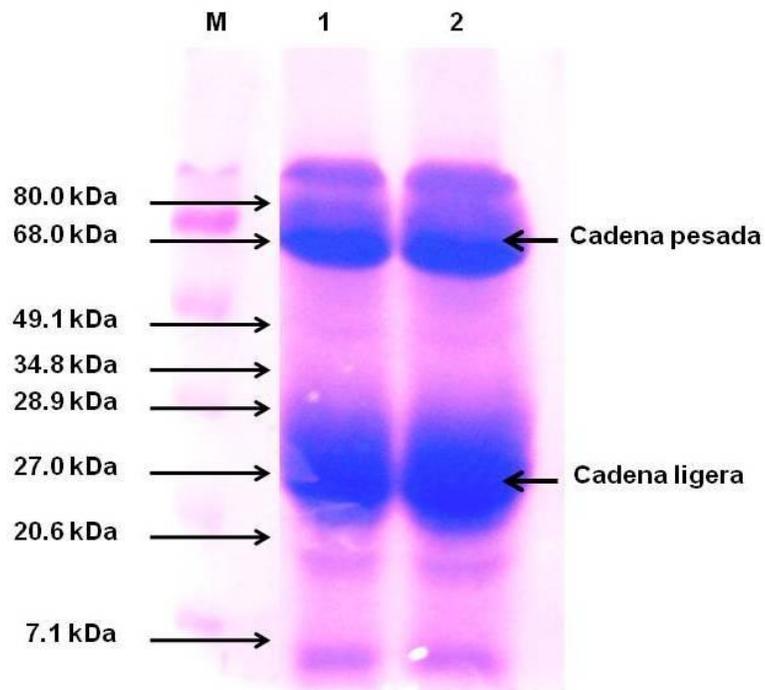


Figura 30. Patrón electroforético de inmunoglobulinas IgY purificadas (Supracox[™]) en un gel de duodecil sulfato de sodio acril- bisacrilamina al 12%. M, es el marcador de peso molecular, la línea 1 son IgYs purificadas, la línea 2 es repetición. Las flechas resaltadas en negro indican la cadena pesada y la cadena ligera de las IgYs purificadas.

3.6.4 ELISA de IgYs de Supracox® e IgYs de la yema de huevos de gallinas inmunizadas con esporozoitos completos de *E. tenella*

La reactividad del antisuero positivo de referencia hacia los antígenos del esporozoito (3.84 OD) y merozoito (3.84 OD) fue idéntica, este antisuero presentó la mayor respuesta hacia ambos SNs (Figura 31). Los niveles de anticuerpos de las inmunoglobulinas Y policlonales de la yema de las aves *SPF Leghorn* inmunizadas parenteralmente con el esporozoito de *E. tenella* mostraron mayor reactividad que los anticuerpos del SC. Los anticuerpos anti-esporozoito mostraron una ligera mayor reactividad hacia el antígeno del esporozoito (2.87 OD) que hacia el Ag del merozoito (2.68 OD). El producto SC mostró bajos niveles de anticuerpos reactivos, la inmunorreactividad hacia el antígeno del merozoito (0.28 OD) fue ligeramente mayor que la mostrada hacia el Sz (0.24 OD). La inmunorreactividad hacia ambos estadios asexuales de *E. tenella* de los anticuerpos de la yema de huevos de aves *SPF Leghorn White* no inmunizadas fue la más baja (< 0.12 OD) (Figura 31).

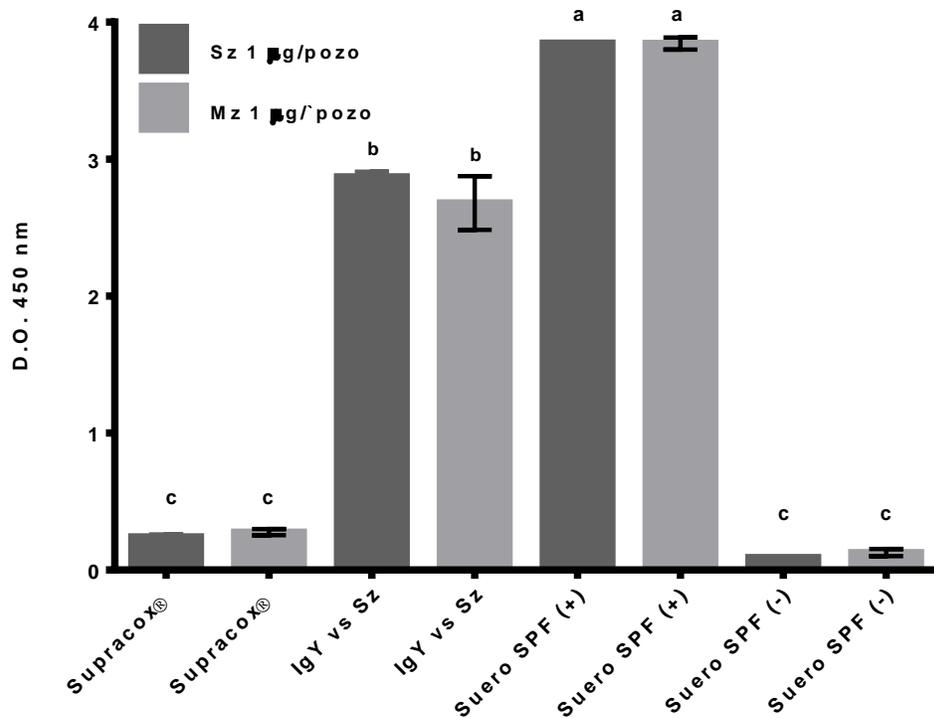


Figura 31. Reactividad en ELISA indirecta de IgY multivalentes de Supracox®, IgY policlonales de la yema de huevos de aves *SPF Leghorn White* inmunizadas con esporozoitos completos de *E. tenella* (IgY vs Sz), antisuero positivo de gallinas *versus E. tenella* [SPF Suero (+)] y suero negativo [SPF Suero (-)] hacia los antígenos esporozoito y merozoito de *E. tenella*. El suero de las aves *SPF Leghorn White* no inmunizadas no mostró

reactividad. Cada columna representa la media en OD \pm la desviación estándar (n=6) de dos observaciones independientes (1:100). Las columnas que no están identificadas con la mismas letra (a-c) presentan valores significativamente diferentes (P<0.05).

3.6.5 Western blot de Supracox® e IgYs de la yema de gallinas inmunizadas con esporozoitos completos de *E. tenella*

Los perfiles de polipéptidos de Sz y Mz observados en SDS-PAGE teñido con CBB fueron complejos, pero bastante similares entre ambos estadios de vida de *E. tenella* con ~25 bandas claramente identificadas en cada uno de ellos. Algunas bandas fueron comunes a ambas etapas zoito asexuales de *E. tenella*, mientras que otras fueron específicas de estadio (Figura 32A). Las diferencias observadas en los patrones de proteínas de las dos etapas de vida de *E. tenella* fueron particularmente evidentes a pesos moleculares menores a 50 kDa. Los Sz muestran bandas relevantes aproximadamente de 185, 120, 105, 94, 68, 47, 42, y 38 kDa, así también como dos bandas cercanas a los 25 kDa. Los merozoitos mostraron bandas a los 105, 53, 47, 44, 38 y 26 kDa, con una banda fuertemente teñida de 12 kDa.

La suspensión de SC o de las IgYs de yema colectadas de las aves *SPF Leghorn White* inoculadas Sc con esporozoitos de *E. tenella* fueron usadas independientemente para probar las proteínas de esporozoitos y merozoitos resueltas y transferidas a las membranas de PVDF. Solo una pequeña fracción del total de proteínas presentes en los SDS-PAGE fueron reconocidas por las IgYs experimentales (Figura 32C, 32D). En ambos ciclos de vida de *E. tenella* hubo diferencias en número e intensidad de tinción de los antígenos reconocidos por cada una de las preparaciones de IgY. La reacción más fuerte de la suspensión hiperinmune de IgYs policlonales de la yema del huevo de aves *SPF Leghorn* inmunizadas con el esporozoito completo de *E. tenella* se observó con el Ag del esporozoito. Se identificaron ocho antígenos en el Sz con pesos de ~120, 105, 82, 64, 47, 24, 23 y 17.5 kDa, con dos proteínas de ~34 y 27.5 kDa apenas visibles en este carril (Figura 32C). Este mismo compuesto reaccionó con dos polipéptidos comunes con el merozoito de ~105 y 82 kDa, así también con un antígeno inmunodominante específico del merozoito con un peso molecular de 26 kDa (Figura 32C).

Las IgYs policlonales del SC mostraron un mayor patrón de reconocimiento con el antígeno del merozoito que con el Ag del esporozoito (Figura 32D). En el análisis *Western blot* del SC (análisis efectuado 3½ años después de caducado el producto mantenido a 4°C de refrigeración todo este periodo), se observó que reacciona claramente con una proteína de ~82 kDa y débilmente con cuatro proteínas de ~60, 35, 24 y 17 kDa del esporozoito, Las

proteínas más claramente detectadas en el merozoito mostraron pesos moleculares de ~82, 60, 54, 40, 37.5, 30 y 13 kDa, y tres bandas menos evidentes de polipéptidos de ~24, 20 y 17.5 kDa fueron identificadas en este mismo antígeno (Figura 32D). Una proteína dominante de 82 kDa fue reconocida en ambos estadios zoitos asexuales de *E. tenella* por cada una de las dos preparaciones de IgYs evaluadas. El antisuero obtenido de las aves resistentes infectadas (oralmente) con ooquistes esporulados de *E. tenella* reconocieron 13 bandas preponderantes en el antígeno esporozoito y 14 bandas inmunodominantes fuertemente teñidas en el antígeno del merozoito de segunda generación de *E. tenella* (Figura 32B). Varias de estas bandas de proteínas también fueron reconocidas por ambas suspensiones de IgYs de yema evaluadas, pero con una aparente menor intensidad.

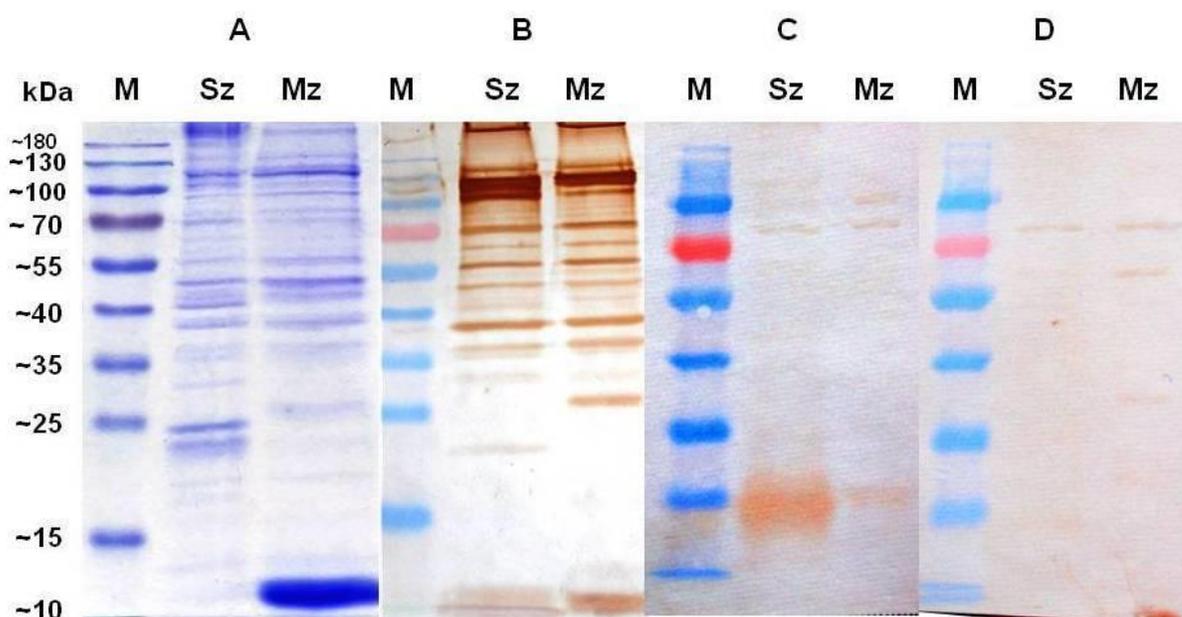


Figura 32. Polipéptidos del esporozoito (Sz) y merozoito (Mz) de *E. tenella* separados en SDS-PAGE al 12% y teñidos con azul brillante de Coomassie (A). Fueron probados en inmunotransferencias con antisuero de gallinas resistentes inmunizadas oralmente con ooquistes esporulados de *E. tenella* (B), inmunoglobulinas Y policlonales de yema de aves inmunizadas con el esporozoito completo de *E. tenella* (C), y con IgYs policlonales de yema de aves inmunizadas contra *Eimeria* sp (Supracox®) (D). El suero de aves SPF Leghorn White no inmunizadas no mostró evidencia de reactividad (datos no mostrados). El antisuero contra *E. tenella* oral fue diluido 1:100 en B, y ambas suspensiones de IgYs de yema 1:25 en C y D. M= marcador estándar de peso molecular (10 - 180 kDa).

3.6.6 Eficacia de Supracox® en los parámetros de protección evaluados

La eficacia de la protección de las IgYs del SC contra un alto desafío (3×10^4 ooquistes esporulados de *E. tenella*) en términos de peso corporal, conversión alimenticia, hematocrito, tasa de supervivencia, calificación de lesiones, ooquistes eliminados por gramo de heces, ooquistes presentes en tejido cecal e IAC se muestran en las tablas 13 y 14.

Aunque las aves en el grupo no-tratado desafiado (testigo positivo) mostraron 25% de mortalidad y ninguna de las aves *SPF Leghorn* suplementadas con 60 mg IgY SC murió, el resto de los parámetros evaluados no mostraron ninguna diferencia entre los dos grupos.

Tabla 13. Parámetros fisiológicos de protección de las IgYs de yema de gallinas inmunizadas con *Eimeria* sp en una infección con una alta dosis de ooquistes de *E. tenella* en aves *SPF Leghorn*

Grupo	Promedio de peso corporal (g)	Conversión alimenticia (g:g)	Hematocrito (%)	Tasa (%) supervivencia
Testigo s/desafío	963 ± 7.51 ^{a*}	6.03 ± 0.13 ^c	30.8 ± 1.45 ^a	100
60 mg IgY SC™	860 ± 90.0 ^b	48.44 ± 35.7 ^{ab}	27.7 ± 7.1 ^b	100
120 mg IgY SC™	918 ± 13.1 ^a	6.73 ± 0.31 ^c	34.9 ± 3.7 ^a	100
Testigo desafiado	891 ± 60.0 ^{ab}	23.56 ± 18.4 ^b	27.4 ± 4.6 ^b	75

*Datos dentro de la columna con distinta letra superíndice son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

Tabla 14. Inmunoprotección de las IgYs de yema de gallinas inmunizadas con *Eimeria* sp en una infección con alta cantidad de ooquistes de *E. tenella* en aves *SPF Leghorn*

Grupo	Calificación de lesiones promedio	Ooquistes por g de heces ($n \times 10^5$)	Ooquistes por g de tejido cecal ($n \times 10^6$)	Índice anticoccidial (IAC)
Testigo s/desafío	0.0 ± 0.0 ^{c*}	0.00 ^c	0.00 ^c	200
60 mg IgY SC™	3.25 ± 0.86 ^{ab}	3.10 ± 2.1 ^a	2.13 ± 1.53 ^a	55
120 mg IgY SC™	2.5 ± 0.67 ^b	1.10 ± 7.9 ^b	1.22 ± 0.82 ^b	155
Testigo desafiado	3.40 ± 0.79 ^a	3.9 ± 3.0 ^a	0.92 ± 0.34 ^b	47

*Datos dentro de la columna con distinta letra superíndice son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

Las aves suplementadas con 120 mg del SC y desafiadas con una alta cantidad de ooquistes esporulados de *E. tenella in vivo* mostraron una excelente protección. Los

resultados en este grupo fueron estadísticamente indistinguibles con relación a los resultados observados en el grupo no-tratado no-desafiado (testigo negativo). El peso corporal del grupo de 60 mg (IgY SC) fue significativamente menor ($P < 0.05$) al peso corporal del grupo testigo negativo o del grupo suplementado con 120 mg de IgYs (SC) (Tabla 13). El grupo tratado con 60 mg del SC mostró la peor conversión alimenticia durante el periodo de prepatencia. El HCT en las aves de los grupos tratados con 120 mg (IgY SC) y testigo negativo fue normal. Los hematocritos del grupo 60 mg (IgY SC) y del grupo testigo positivo fueron menores ($P < 0.05$) al HCT normal, no se observó diferencia significativa entre estos dos grupos (Tabla 13). Se observó una reducción significativa ($P < 0.05$) de la severidad de lesiones cecales en el grupo suplementado con 120 mg de IgYs (SC) comparada con las lesiones del grupo testigo positivo. En ambos grupos suplementados con diferentes concentraciones de IgYs la severidad de lesiones disminuyó gradualmente conforme se incrementó la cantidad de IgYs suplementadas *per os*. El grupo de 60 mg IgY (SC) mostró una reducción de lesiones del 4.5% con relación al testigo positivo, no se registró diferencia significativa entre ambos grupos (Tabla 14). La mayor reducción en la eliminación de OPGH la mostró el grupo suplementado con 120 mg de IgYs (<71.8%). Las aves suplementadas con 120 mg del producto (SC) mostraron una reducción significativa ($P < 0.05$) de los OPGH con relación a la cantidad de ooquistes eliminados por las aves del grupo 60 mg (SC) y el grupo testigo positivo. Aunque el grupo de 60 mg (SC) mostró una reducción de la eliminación de ooquistes en heces de 19.6% en comparación al grupo testigo positivo, no se observó diferencia estadística entre ambos grupos (Tabla 14). Comparado con el grupo de 60 mg (SC) las aves suplementadas con 120 mg (SC) mostraron una reducción significativa ($P < 0.05$) en la cantidad de ooquistes presentes en el tejido cecal después del desafío con *E. tenella* (Tabla 14). En los grupos infectados, el IAC del grupo testigo positivo fue el menor (IAC=47) y el grupo de 120 mg (IgY SC) fue el mayor (IAC=155) (Tabla 13). En los grupos suplementados con diferentes concentraciones de IgYs (SC), el IAC aumenta conforme se incrementa la cantidad de IgYs (SC) suministradas a las aves.

3.6.7 Estudio histológico

El grado de daño tisular observado en los sacos ciegos de manera general fue muy severo debido a la invasión y multiplicación de los estadios de vida de *E. tenella*, no evidencio ningún tipo de diferencia entre los grupos de tratamiento y el testigo no-tratado desafiado. El tejido cecal mostró una afectación grave por edema, inflamación, hemorragias, necrosis, atrofia de las vellosidades y fibrosis. Con base a la evaluación ordinal el grupo con mayor

calificación fue el suplementado con 120 mg de SC (2.01), seguido del grupo suplementado con 60 mg de SC (1.93) y el grupo testigo sin suplementar y desafiado (1.81).

3.7 Inmunización con esporozoitos completos inactivados de *E. tenella* en conejos (*Oryctolagus cuniculus*) y gallinas (*Gallus gallus*)

3.7.1 Reactogenicidad en los progamas de inmunización

En la cinética de reactividad de los anticuerpos de conejos y aves *SPF Leghorn* hacia el antígeno del esporozoito y merozoito de 2ª generación de *E. tenella* mostrada en la figura 32 se observó que ambos tipos de antisueros muestran reacción cruzada hacia el merozoito, la cual es de gran magnitud e indistinguible con la respuesta hacia el esporozoito que fue el antígeno con el que los conejos y aves fueron primo inmunizados (esporozoitos completos inactivados de *E. tenella* contenidos en la vacuna EtSz-IMS1313).

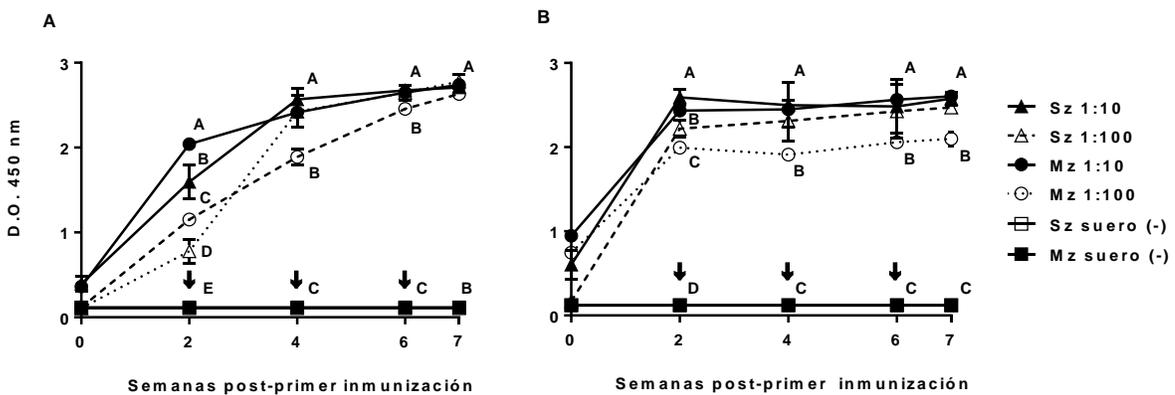


Figura 33. ELISA indirecta que muestra la dinámica de anticuerpos contra el esporozoito (Sz) y merozoito (Mz) en conejos (A) y aves *SPF Leghorn* (B) después de la inmunización con SzS completos de *E. tenella* a las 0, 1, 4 y 6 semanas (↓). Los antisueros reaccionan contra el antígeno Sz diluido 1:10 (▲) y 1:100 (△), o reaccionan contra el antígeno del Mz diluido 1:10 (●) y 1:100 (○). El suero preinmune fue diluido 1:10, se expuso al antígeno Sz (□) o al Mz (■). Los puntos en las figuras representan promedios ± DE de lecturas de OD. Distintas letras en la misma fecha de evaluación indican diferencia estadística **P* < 0.05.

La cantidad aproximada de anticuerpos en conejos y aves fue similar, sin embargo, las gallinas alcanzan la fase de meseta (*plateau*) en la producción de IgYs casi inmediatamente después de la segunda semana PI, mientras que la producción de las IgGs de los conejos alcanza esta fase de meseta hasta después de la cuarta semana post-inmunización. Si bien la inmunización se realizó utilizando la vacuna EtSz-IMS1313 de *E. tenella*, la respuesta

hacia los antígenos del Sz y Mz de *E. tenella* muestra una intensidad similar y comparte casi el mismo patrón dinámico en la producción de anticuerpos (Figura 33A y 33B). En la dilución 1:100 de los antisueros de las aves, la inmuno-reactividad contra el antígeno del esporozoito fue ligeramente mayor ($P < 0.05$) que la mostrada hacía el antígeno del merozoito (Figura 33B). Ambos antisueros fueron diferentes ($P < 0.05$) a la reactividad mostrada por el suero de los especímenes testigo no inmunizados (Figura 33).

La figura 34A muestra la separación de los polipéptidos presentes en los sobrenadantes de Sz y Mz de *E. tenella* en SDS-PAGE al 12% teñido con CBB. Aunque en cada antígeno examinado se puede observar un perfil complejo de polipéptidos teñidos y bien delimitados por bandas de diferente peso molecular, es posible identificar que ambos antígenos comparten bandas similares en masa, y algunas proteínas específicas a cada estado zoito asexual evaluado.

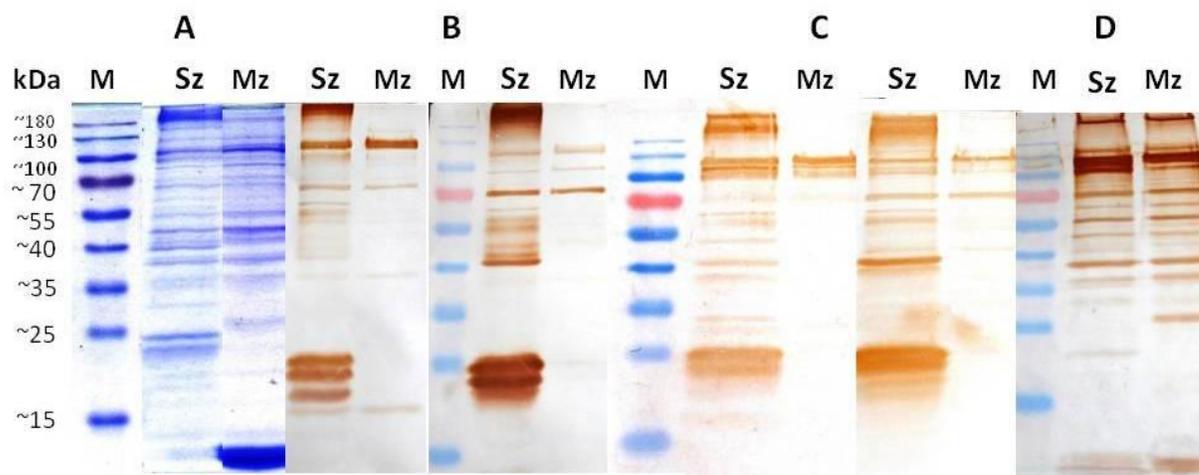


Figura 34. Proteínas del esporozoito (Sz) y merozoito (Mz) separados electroforéticamente en SDS-PAGE al 12% teñido con azul brillante de Coomassie (A). *Western blotting* con antisuero versus el Sz de conejo (B) y aves SPF Leghorn White (C). Reactividad del antisuero de aves resistentes infectadas oralmente con ooquistes de *E. tenella* (D). El antisuero fue diluido 1/8000 en C, 1/2000 en C y únicamente 1/100 en D.

La diferencia más notoria entre el perfil proteico de ambos antígenos evaluados se observó en las bandas con pesos moleculares menores a los 50 kDa. En el esporozoito fue notoria la presencia única de una banda de 42 kDa la cual fue altamente evidente por su mayor afinidad tintorial además de dos polipéptidos específicos por abajo de los 25 kDa, mientras que en el merozoito una banda circunscrita a los ~26-27 kDa se observó de forma única en este antígeno, otra banda de 10 kDa en este mismo antígeno fue notoriamente más

abundante y mostró la mayor afinidad tintorial de todas las bandas de este carril. Se observó que las proteínas de alto peso molecular son las que más se comparten entre ambos estadios con algunas diferencias relativas a su concentración en uno u otro estadio zoito asexual de *E. tenella* (Figura 34A). Al analizar el *Western blot*, los sueros anti- esporozoito de conejo (Figura 34B) y ave (Figura 34C) reconocen un patrón similar de polipéptidos en el esporozoito, principalmente en los antígenos con peso molecular mayor a 35 kDa. Las bandas preponderantes detectadas en el esporozoito mostraron un peso molecular de ~21, 23 y 24 kDa, en contraste, independiente al origen del animal inmunizado (conejo o ave) los sueros anti- esporozoito detectaron pocos polipéptidos de mayor peso molecular en el merozoito (~70 kDa y ~124 kDa). El antisuero de las aves infectadas naturalmente con ooquistes esporulados viables (Figura 34D) reconoce un patrón complejo de polipéptidos que es bastante similar entre ambos antígenos (Sz y Mz), esto principalmente por arriba de los 35 kDa, por abajo de este peso molecular, solo se observó una banda en común de 10 kDa, la cual está presente en ambos estadios zoitos asexuales de *E. tenella*, aunque ésta mostró mayor afinidad tintorial en el antígeno del merozoito que en el del esporozoito. Adicionalmente, se observó una banda específica de estadio de 23 kDa en el esporozoito, mientras que en el merozoito se observó una banda única de ~26-27 kDa (Figura 34D).

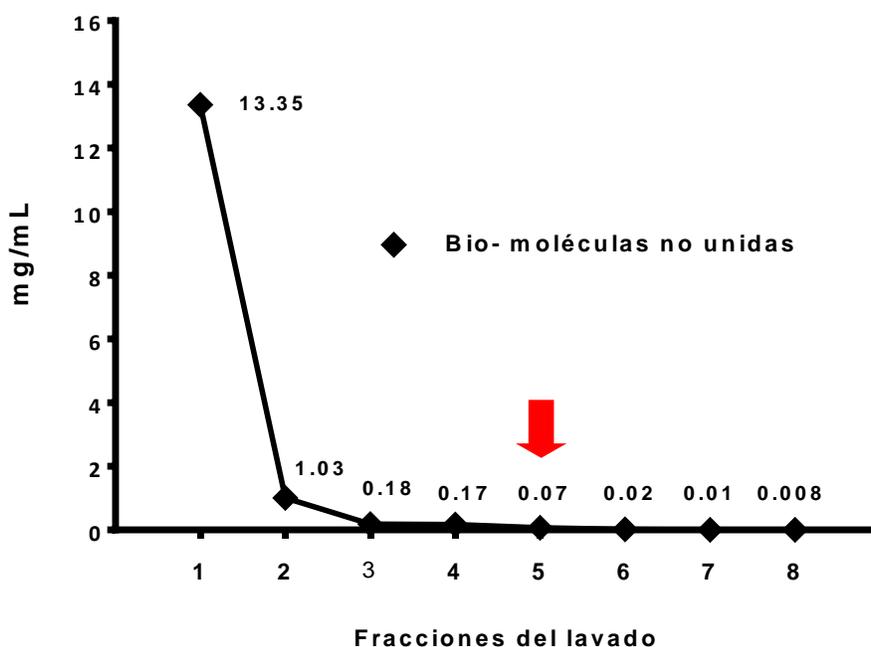


Figura 35. Espectrofotometría a 280 nm de las 8 fracciones obtenidas en el proceso de lavado

3.7.2 Purificación, cuantificación y caracterización de las inmunoglobulinas IgG de conejo

En la fase de unión se determinaron 44 mg de proteína sérica total por mL de suero empleado, esto a partir de una mezcla 50:50 (v/v) de sueros hiperinmunes de 2 conejos *New Zealand White* (1.25 mL c/uno, el total fue de 2.5 mL= 110 mg totales de proteína sérica). En la fase de lavado se recolectaron 8 fracciones de 1.5 mL cada una de las cuales mostró diferentes lecturas espectrofotométricas (Figura 35) en la fracción 5 (flecha roja) se observa el valor más cercano a cero (0.068), adicionalmente, se efectuó el análisis electroforético (SDS-PAGE 12%) e *immunoblotting* (IgG cabra vs IgG conejo) de las fracciones 1, 2, 3 y un pool, además de las fracciones de lavado (Figuras 36 y 37).

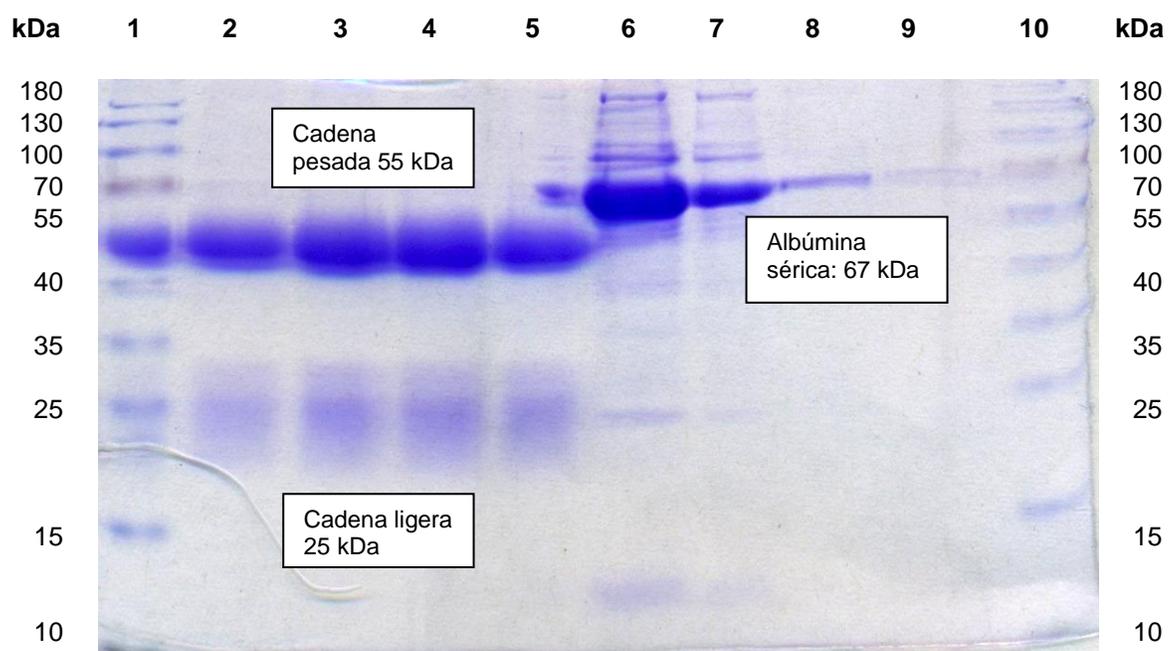


Figura 36. Electroforesis de las fracciones purificadas de IgGs de conejo obtenidas por cromatografía de afinidad en Sefarosa 4 B FF. Pozo 1: Marcador molecular, los números a la izquierda representan estándares de proteínas de masa molecular conocida. Pozo 2: Primer fracción IgG. Pozo 3: Segunda fracción IgG. Pozo 4: Tercer fracción IgG. Pozo 5: Pool de IgG. Pozo 6: Primer fracción de Lavado. Pozo 7: Tercer fracción de lavado Pozo 8: Sexta fracción de lavado Pozo 9: Octava fracción de lavado. Pozo 10: Marcador molecular, números a la derecha representan estándares de masa molecular.

En las fracciones 2 y 3 se observan de forma nítida las cadenas pesadas y ligeras, el grado de pureza obtenido (98%) fue mucho más aceptable que el reportado por otros autores que han utilizado otras técnicas de purificación como la precipitación progresiva con sulfato de amonio o sodio, o incluso cromatografía que utiliza características como hidrofobicidad o unión tiofílica, las cuales a diferencia de la cromatografía de afinidad empleada en el presente estudio muestran resultados inferiores. Las fracciones de lavado progresivamente muestran proteínas no absorbidas o unidas de forma inespecífica, la fracción de mayor detección en las primeras fracciones evaluadas fue principalmente albúmina sérica del conejo, la cual fue consistente con el peso (67 kDa) reportado previamente por diferentes autores, las fracciones de proteína disminuyeron paulatinamente, en la fracción 8 casi de forma ya indistinguible se observó una fracción de albúmina residual.

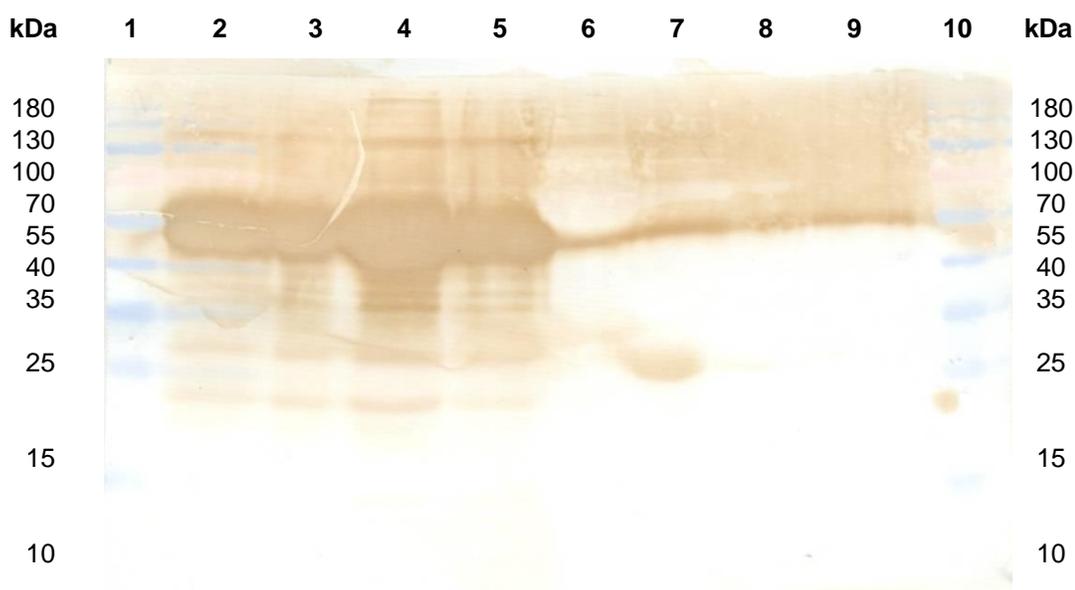


Figura 37. *Western blot* de las fracciones de IgG de conejo obtenidas por cromatografía de afinidad en Sepharosa 4 FF. Pozo 1: Marcador molecular, número a la izquierda es estándar de masa molecular. Pozo 2: Primer fracción IgG. Pozo 3: Segunda fracción IgG. Pozo 4: Tercer fracción IgG. Pozo 5: Pool de IgG. Pozo 6: Primer fracción de Lavado. Pozo 7: Tercer fracción de lavado Pozo 8: Sexta fracción de lavado Pozo 9: Octava fracción de lavado. Pozo 10: Marcador molecular, número a la derecha es estándar de masa molecular.

Debido al grado de pureza de las inmunoglobulinas logrado (la sensibilidad del CBB empleado para la visualización de las proteínas en el gel SDS-PAGE al 12% es capaz de detectar a partir de aproximadamente 0.2 μg de proteína/banda, observando en cada carril

adicional a las dos cadenas únicamente tres bandas tenues) se obvio el procedimiento de diálisis, aunque este es recomendable para eliminar componentes proteicos <140 kDa, los cuales potencialmente podrían reaccionar en los procedimientos en los cuales se emplean los anticuerpos purificados como el tamizaje de bibliotecas de Ph D.

En el *immunoblotting* se observó con fuerte tinción el reconocimiento de las cadenas pesadas (~55 kDa) de las tres fracciones analizadas (carril 2, 3 y 4), y la mezcla de estas (pool en carril 5), sin embargo, en las 4 fracciones analizadas se observó una menor reactividad tintorial de las cadenas ligeras por parte del anticuerpo cabra anti- conejo (~22.5 kDa). Se observó también el reconocimiento de bandas de ~27, 37 y 115 kDa (Figura 37)

La tinción de los carriles donde se depositó el material proveniente del lavado fue de alta afinidad solo para la corrida inespecífica, este se observó en el carril 7, 8 y 9 alrededor de los ~55 kDa, mientras que en el carril 6 este corrimiento proteico inespecífico fue de menor peso (~50 kDa), no hubo evidencia de reconocimiento inespecífico hacia la albúmina sérica del conejo (67 kDa) por parte de las IgG de cabra (HRP) anti-IgG de conejo (Figura 37)

Durante la fase de elusión se utilizaron 5 volúmenes del buffer (5 mL) y se recibieron 5 fracciones de 1 mL aproximadamente, cada una se recibió con 50 µL de 1 M Tris-HCl a un pH de 9.0/mL, cada fracción obtenida se verificó por espectrofotometría a 280 nm (Figura 38)

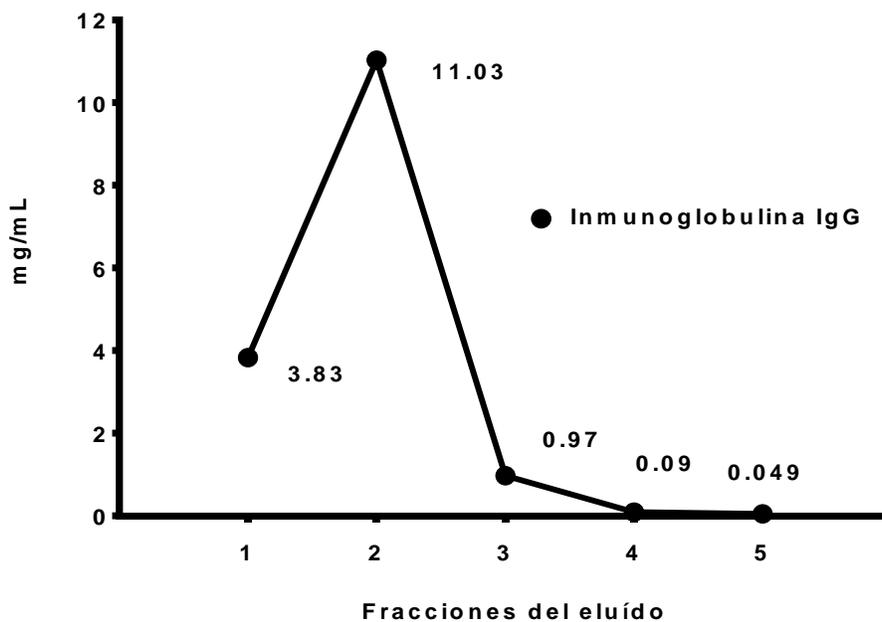


Figura 38. Espectrofotometría a 280 nm de las 5 fracciones del eluido obtenido

pH obtenido en las primeras tres fracciones:

Fracción 1= pH 8.0	Fracción 2= pH 7.5	Fracción 3= pH 7.0
--------------------	--------------------	--------------------

Tabla 15. Prueba de Bradford para determinar la cantidad de $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de inmunoglobulinas de conejo purificadas en las 3 primeras fracciones obtenidas por medio de cromatografía de afinidad con la proteína G en Sefarosa 4 de flujo rápido (GE Healthcare).

CURVA BSA		DILUCION MUESTRAS				
Esperado	ug BSA CURVA		ug/ul		Total ug/ul	ug/ul
1	1,10774059	F1	1,46861925	5	7,34309623	
2	2,15638075	F1	0,8959205	10	8,95920502	
3	2,68200837					7,2751046
4	3,60774059	F2	3,13179916	5	15,6589958	
5	4,041841	F2	2,51202929	10	25,1202929	
		F2	1,44769874	20	28,9539749	23,2444212
						Promedio
		F3	0,09309623	5	0,46548117	
		F3	-0,18148536	10	-1,81485356	
		F3	-0,27824268	20	-5,56485356	0,46548117
						Promedio
		Pool	2,14069038	5	10,7034519	
		Pool	1,34832636	10	13,4832636	
		Pool	0,55596234	20	11,1192469	11,7686541
						Promedio

Se obtuvo un total de 35.28 mg de IgGs (32.08% de recuperación con relación a los 110 mg de IgGs calculados a partir de los sueros de los dos conejos utilizados en los 2.5 mL aplicados a la columna de Sefarosa G 4 B FF).

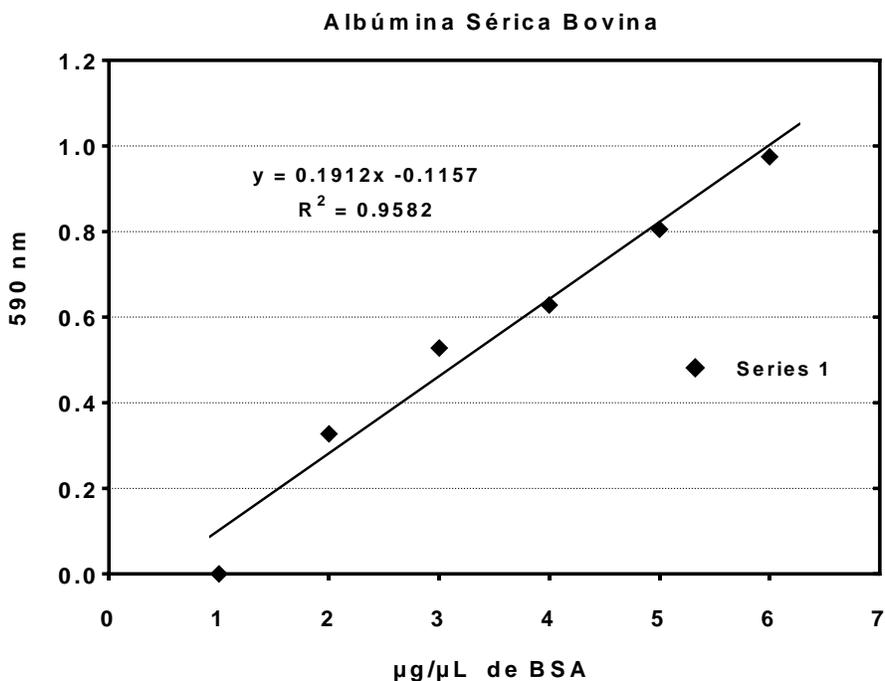


Figura 39. Reactividad espectroscópica de albúmina sérica bovina (BSA) utilizada como patrón de cálculo para la curva de correlación proteica al utilizar el reactivo de Bradford

3.7.3 Titulación por ELISA indirecta de las inmunoglobulinas IgG purificadas del suero hiperinmune de conejo contra los antígenos esporozoito y merozoito de *E. tenella*

En la prueba de ELISA indirecta se observó una reactividad óptima de los anticuerpos purificados por medio de la proteína G 4B FF, esto se reflejó con niveles de OD por arriba de 1.5 en ambos zoitos asexuales de *E. tenella*, aún a una dilución tan alta de las inmunoglobulinas como lo fue la dilución 0.94 µg/pozo (Figura 40). Adicionalmente, se determinó que la OD registrada hacia el antígeno soluble de los esporozoitos fue mayor que la registrada hacia el antígeno soluble de los merozoitos (1 µg/pozo), lo cual se evidenció aún más a partir de la dilución 1.87 µg/pozo (Figura 40). La respuesta observada hacia ambos antígenos es diferente a la determinada en estudios previos.

En la prueba de ELISA indirecta el suero original de los conejos a partir del cual se purificaron las IgG muestra una mayor reactividad que el *pool* de las fracciones de inmunoglobulinas purificadas (Figura 41). En los resultados se debe considerar que las diluciones de ambos componentes de inmunoglobulinas se efectuaron con base a diferente escala (Suero original= dilución doble seriada a partir de dilución décuple inicial. *Pool* de -

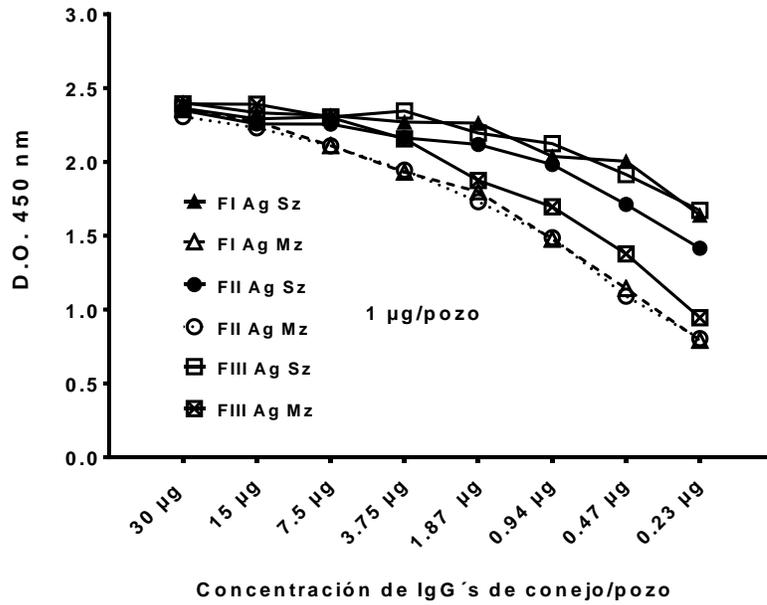


Figura 40. ELISA indirecta de tres fracciones de inmunoglobulinas de conejo purificadas con proteína G 4 FF hacia antígenos solubles de dos zoitos asexuales de *E. tenella*

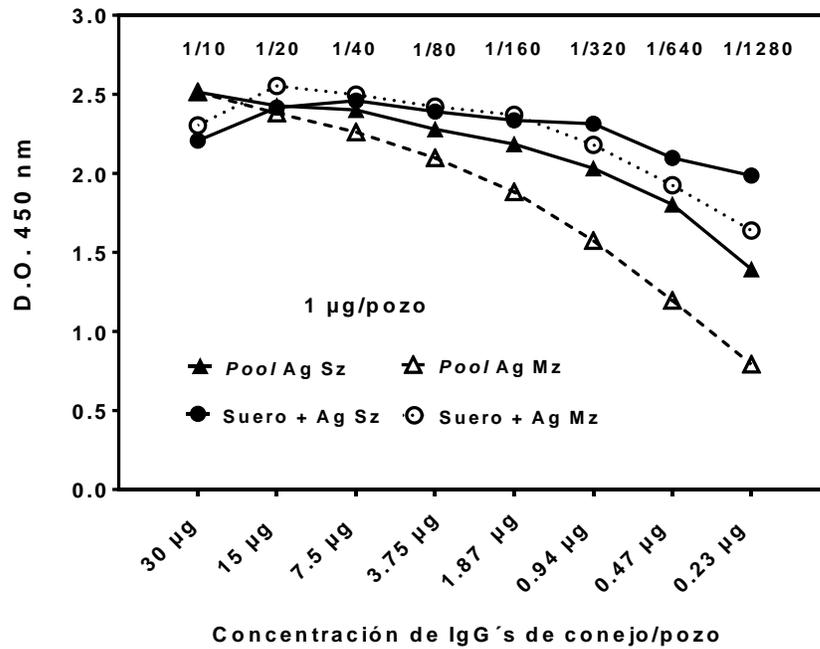


Figura 41. Reactogenicidad en ELISA indirecta de un *pool* de tres fracciones de inmunoglobulinas de conejo purificadas con proteína G 4B FF y el antisuero original de los conejos hacia antígenos solubles de *E. tenella*

fracciones de IgG= dilución doble seriada a partir de una cantidad específica de IgGs= 30 µg/pozo) (Figura 41). Los anticuerpos mostraron ser biológicamente aptos para utilizarse en la metodología de tamizaje de bibliotecas combinatorias de *Phage display* (Bibliotecas 12 mer y c7c f, *New England Biolabs® Inc*).

3.8 Tamizaje de bibliotecas combinatorias de péptidos desplegados aleatoriamente en la proteína III de fagos filamentosos M13 utilizando como ligandos anticuerpos IgG de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) versus el esporozoito completo de *E. tenella*

3.8.1 Primer Tamizaje (Ensayo completo)

Los anticuerpos purificados (pool fracciones 1, 2 y 3) se emplearon para el tamizaje de dos bibliotecas de fagos M13: *Phage display Peptide Library* 12 mer y c7c (*New England Biolab®*, Ipswich, MA, USA) (proporcionada por la técnico del laboratorio, en 1 µL de cada una de las dos bibliotecas referidas diluido en 99 µL de PBS 1 X, ambas bibliotecas habían sido previamente recuperadas de un primer tamizaje contra anticuerpos IgY *versus* virus de Aujesky efectuado por otro alumno del mismo laboratorio). El tamizaje se efectuó con la finalidad de identificar si existe un reconocimiento positivo de péptidos que mimetizan a los epítomos del parásito, y que estos sean altamente reactivos a los anticuerpos (ligando) que se obtuvieron a partir de las inmunizaciones con esporozoitos completos a cada uno de dos conejos, los Abs utilizados fueron mezcla de ambos conejos 50:50 (v/v), después de 3 rondas de bioselección se recuperaron 20 de las clonas más reactivas de cada una de las dos bibliotecas utilizadas (c7c f y 12mer lin), se amplificaron, se titularon, se realizó ELISA indirecta y las clonas positivas a la reacción se secuenciaron. En la tabla 16 se muestran los títulos obtenidos en los tres *pannings* efectuados durante la primera prueba de *Phage display*.

En el amplificado del eluido del segundo *panning* de la biblioteca 12 mer, se evaluó experimentalmente cuanto se reduce el título de los fagos después de su primer precipitación, se observó una reducción del título de 61.8% con relación al título del mismo eluido amplificado previo a la primer precipitación con PEG 20% 2.5 M NaCl.

En la tabla 17 se muestran los títulos obtenidos para cada una de 20 clonas seleccionadas y amplificadas de la biblioteca 12mer lin a través de la infección en *E. coli* K12 ER2738.

Tabla 16. Tamizaje de *Phage display* de las bibliotecas 12mer lin y c7c f con IgGs purificadas de conejos previamente inmunizados con esporozoitos completos de *E. tenella*.

IgGs Conejos (Pool de Fracción 1,2 y 3)	Ph D 12 mer lin ** (ufp/mL)		Ph D c7c f (ufp/mL)	
	Eluido	E. Amplificado	Eluido	E. Amplificado
1^{er} Panning (10 µg/pozo)	2.0 x 10 ³	1.2 x 10 ¹⁴	5.0 x 10 ⁵	7.5x10 ¹⁴
2^o Panning (5 µg/pozo)	7.8 x 10 ⁶	6.5 x 10 ^{13**}	2.0 x 10 ⁵	1.9 x 10 ¹³
3^{er} Panning (2.5 µg/pozo)	6.5 x 10 ⁷	-	7.0 x 10 ⁵	-

NOTA: **Título amplificado previo a la precipitación de los fagos en la 2^a ronda: 1.7 x10¹⁴ ufp/mL

Tabla 17. Título de las clonas de fagos M13 amplificados (12mer lin)*

Clona	Título	Clona	Título
1	6.0 x 10 ¹³	11	1.12 x 10 ¹⁴
2	3.0 x 10 ¹²	12	2.32 x 10 ¹⁴
3	1.2 x 10 ¹³	13	1.14 x 10 ¹⁴
4	3.7 x 10 ¹³	14	1.22 x 10 ¹⁴
5	5.0 x 10 ¹²	15	3.0 x 10 ¹³
6	3.8 x 10 ¹³	16	1.28 x 10 ¹⁴
7	1.0 x 10 ¹²	17	6.54 x 10 ¹⁴
8	8.0 x 10 ¹³	18	7.9 x 10 ¹³
9	- **	19	2.42 x 10 ¹⁴
10	4.0 x 10 ¹²	20	6.8 x 10 ¹³

*Datos dentro de la columna muestran cantidad de fagos en notación de Logaritmo base 10

**Clonas en particular que no alcanzaron el título mínimo requerido

En la tabla 18 se muestran los títulos obtenidos para cada una de 20 clonas seleccionadas y amplificadas de la biblioteca c7c f a través de infección controlada en *E. coli* K12 ER2738.

Tabla 18. Título de las clonas de fagos M13 amplificados (c7c f)

Clona	Título	Clona	Título
1	1.3×10^{13}	11	7.0×10^{12}
2	* 1.2×10^{14}	12	4.0×10^{12}
3	* 1.3×10^{14}	13	2.1×10^{13}
4	4.4×10^{13}	14	6.0×10^{12}
5	1.0×10^{13}	15	3.36×10^{14}
6	2.4×10^{13}	16	** 2.9×10^{13}
7	1.1×10^{13}	17	4.0×10^{12}
8	- **	18	4.5×10^{13}
9	** 7.4×10^{13}	19	1.0×10^{14}
10	1.3×10^{13}	20	4.32×10^{11}

* Condiciones óptimas para la re-amplificación de las clonas de fagos que no alcanzaron un título mínimo de 1×10^{13} : 10 mL de medio 2XYT, 200 μ L de *E. coli* K12 ER2738, 20 μ L dil. 1×10^3 del SN del amplificado previo que no alcanzó el título.

** Clonas en particular que no lograron alcanzar el título mínimo requerido

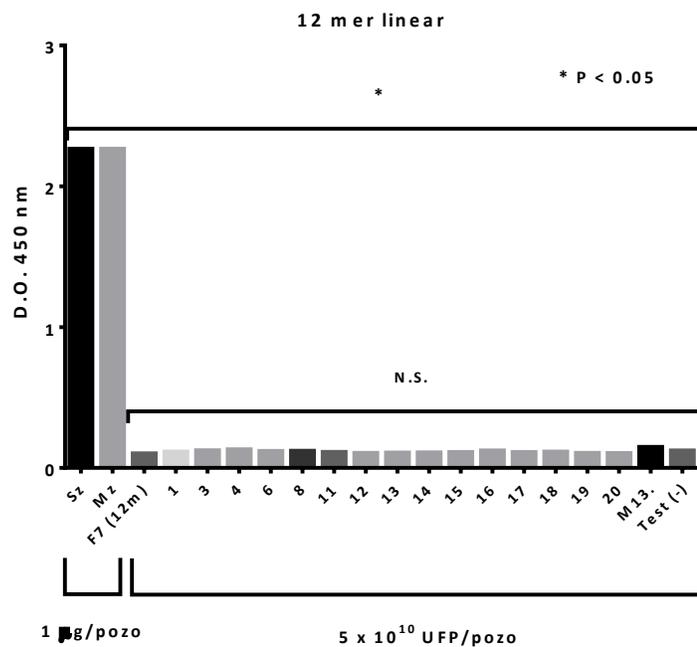


Figura 42. ELISA indirecta de clonas seleccionadas de la biblioteca 12mer lin utilizando suero hiperinmune de conejos *New Zealand* versus esporozoitos de *E. tenella*. Placa

sensibilizada con 5×10^{10} fagos/pozo, dilución del suero 1:100; dilución del anticuerpo secundario IgG Cabra anti-conejo 1:2000. Lecturas de OD por duplicado. La prueba se repitió tres ocasiones. *P<0-05, N.S.= Sin diferencia estadística. Revelado con OPD.

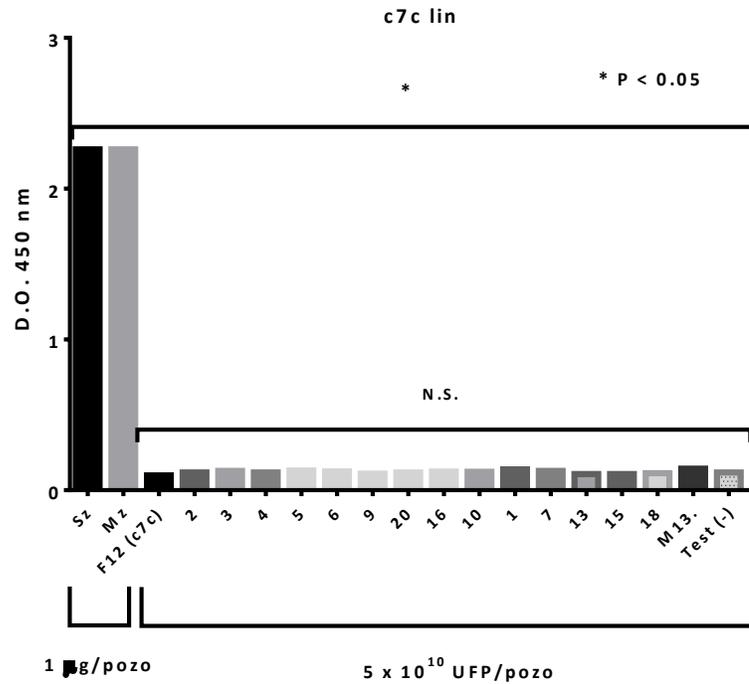


Figura 43. ELISA indirecta de las clonas seleccionadas de la biblioteca *c7c constrained* con el suero hiperinmune de conejos *New Zealand* versus los esporozoitos de *E. tenella*. Placa sensibilizada con 5×10^{10} fagos por pozo, dilución del suero 1:100; dilución del anticuerpo secundario IgG Cabra anti-conejo 1:2000. Lecturas de OD por duplicado. La prueba se repitió tres ocasiones. *P<0-05, N.S.= Sin diferencia estadística. Revelado OPD.

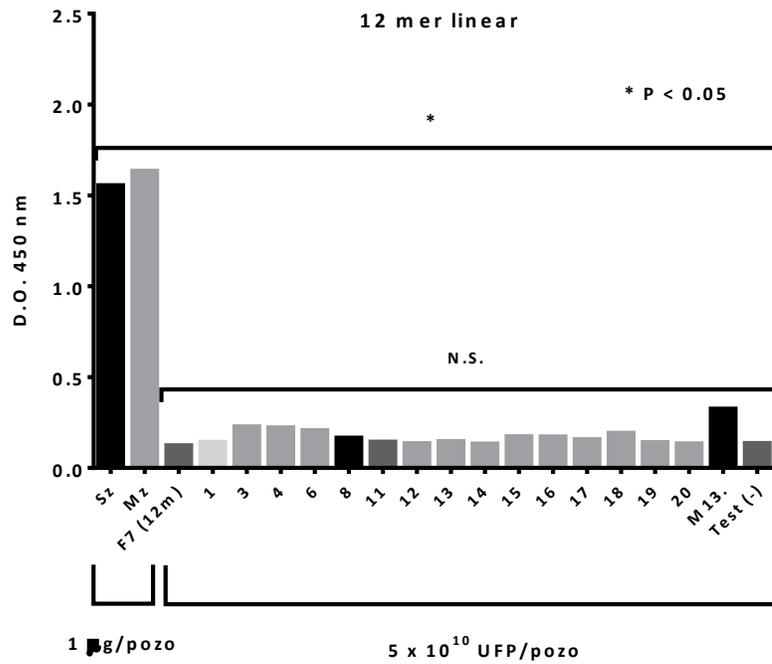


Figura 44. ELISA indirecta de clonas seleccionadas de la biblioteca 12mer lin con el suero hiperinmune de aves *SPF Leghorn versus* esporozoitos de *E. tenella*. Placa sensibilizada con 5×10^{10} fagos por pozo, dilución del suero 1:100; dilución del anticuerpo secundario IgG Cabra anti-pollo 1:1500. Lecturas de OD por duplicado. La prueba se repitió tres ocasiones. * $P < 0.05$, N.S.= No diferente estadísticamente. Revelado con OPD.

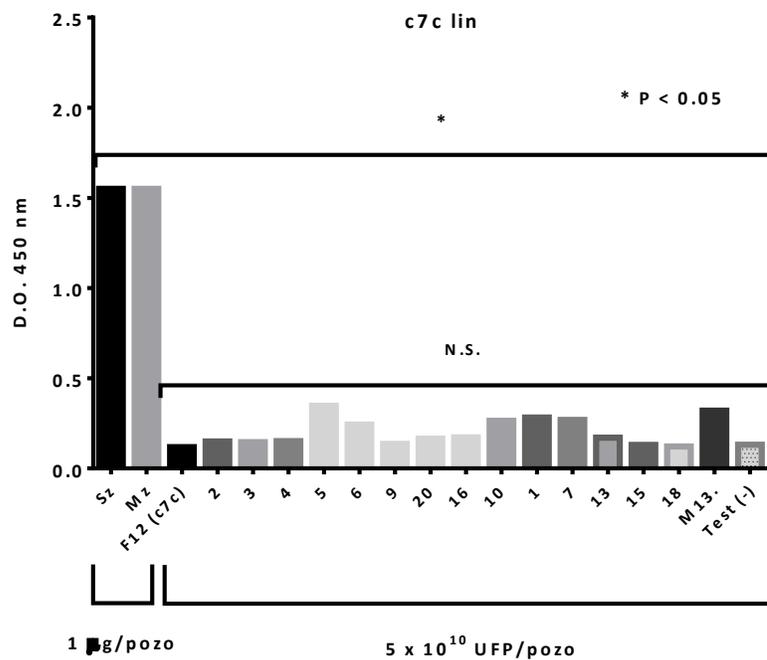


Figura 45. ELISA indirecta de las clonas seleccionadas de la biblioteca *c7c constrained* con el suero hiperinmune de aves *SPF Leghorn versus* los esporozoitos de *E. tenella*. Placa sensibilizada con 5×10^{10} fagos por pozo, dilución del suero 1:100; dilución del anticuerpo secundario IgG Cabra anti-pollo 1:1500. Lecturas de D.O. por duplicado. La prueba se repitió tres ocasiones. * $P < 0.05$, N.S.= Sin diferencia significativa. Revelado con OPD.

Tabla 19. Secuencias de ADN de las clonas de fagos M13 amplificadas en la biblioteca 12mer lin

Secuencia	Clona	Frecuencia
LRKGFSAVVAAF	1	12-1 (1/20)
VHWDFRQWWQPS	3,4,6,12, 13, 14,15, 16,17,18, 19,20	12-3 (17/20)
VQGDFRQWWQPS	8	12-8 (1/20)
YLPYDALRKA WG	11	12-11 (1/20)

Biblioteca 12mer lin = 17 clonas de secuencia idéntica, 1 clona de consenso (*motif*) sin identificador *linker set* (C8), una clona con secuencia diferente (11) y una clona sin *linker set* (C1). Dos de las secuencias con aparente consenso de residuos= DFRQWWQPS.

La inmunorreactividad de las clonas seleccionadas a partir de la biblioteca 12 mer y *c7c lin* hacia los Abs de conejos o aves *SPF Leghorn White* inmunizados Sc con esporozoitos completos de *E. tenella* fue menor y diferente ($P < 0.05$) al nivel mostrado por los controles del antígeno nativo del Sz y Mz utilizados ($1 \mu\text{g/pozo}$ de Ag Sz y Ag Mz) (Figuras 42, 43, 44 y 45). Adicionalmente mostraron ser estadísticamente indistinguibles con relación a los controles negativos (M13 *wt*, fago7 de 12 mer y fago 12 de *c7c*, estos últimos fueron fagos irrelevantes provenientes de otro tamizado con el mismo tipo de biblioteca, pero realizado con Abs *versus* Herpesvirus de enfermedad de Aujeszky) (Figuras 42, 43, 44 y 45).

Tabla 20. Búsqueda bio- informática por medio de *protein* BLAST *protein*►*protein** en base de datos de *E. tenella* (taxid 5802) de las clonas seleccionadas de la biblioteca 12mer lin

Secuencia	Proteína	Coincidencia
LRKGFSAVVAAF	- Proliferation-associated protein 2g4, putative	Pos. 12; 7/10 (70%)
VHWDFRQWWQPS	- Sulfate transporter, putative	Pos. 367; 6/9 (67%)
VQGDFRQWWQPS	- Sulfate transporter, putative	Pos. 367; 6/9 (67%)
YLPYDALRKAWG	- Chromosome III, complete sequence, related	Pos. 1,113; 6/6 (100%)

* <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Tabla 21. Secuencias de ADN de las clonas de fagos M13 amplificadas de la biblioteca c7c cons.

Secuencia	Clona	Frecuencia
CLESKSWSC	2	1/9
CLKNQSDQC	3	1/9
CEFSKFRSC	4	1/9
CTAFSLGKC	5,6,9,16,20	5/9
CSSGNLATC	10	1/9

Biblioteca c7c f = 9 clonas secuenciadas, 5 idénticas, 4 clonas diferentes, sin aparente consenso de residuos.

La baja inmuno- reactividad de las clonas en la prueba de ELISA indirecta, el reconocimiento bio- informático errático y la presencia de la clona Ph D 12 mer VHWDFRQWWQPS 17 veces en el tamizaje de la biblioteca 12mer link mostró indicios de una probable contaminación cruzada durante tamizaje y tamizaje, o bien contaminación cruzada de algunos de los reactivos utilizados para los *pannings*, sin embargo, en la exposición del trabajo de tamizaje de las dos bibliotecas con antisuero de aves hiperinmunizadas *versus* PrV Herpesvirus hecha por un alumno del mismo laboratorio, se observó que la Doctorante aisló la misma clona (VHWDFRQWWQPS) en su proceso de tamizaje, lo cual contribuyó a dilucidar que fue lo que sucedió en el proceso del tamizaje hecho con los anticuerpos purificados *versus* el esporozoito de *E. tenella*.

Tabla 22. Bio- informática *protein* BLAST *protein*► *protein** en la base de datos de *E. tenella* (taxid 5802) de las clonas seleccionadas de la biblioteca c7c

Secuencia	Proteína	Coincidencia
CLESKSWSC	- Hypothetical protein, conserved	6/9 (67%)
CLKNQSDQC	- Charged multivesicular body protein 1b/chromatin modifying protein 1B, related	6/8 (75%)
CEFSKFRSC	- LCCL domain-containing protein, putative	5/8 (63%)
CTAFSLGKC	- Hypothetical protein, conserved 60s ribosomal	6/7 (86%)
CSSGNLATC	- Hypothetical protein, conserved	6/9 (67%)

* <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

El 1 µL de cada biblioteca usado provenía del tamizaje de esta Doctorante, lo más probable fue un posible acarreo de clonas ya tamizadas unidas a su ligando primario (En este caso IgY's de aves hiperinmunizadas con PrV), lo poco comprensible aquí es determinar cómo se seleccionaron las clonas contaminantes *panning* tras *panning* utilizando anticuerpos de conejo reactivos contra el esporozoito de *E. tenella*. Una de las causas probables de la falla fue el bajo repertorio de fagos tamizados, esto atribuido al bajo título de las clonas suministradas por la jefe del Laboratorio desde el inicio del tamizaje (1 µL en lugar de 10 µL de la biblioteca original) (El título recomendado debe ser 1×10^9 en 100 µL/pozo en el caso ideal de cumplir con la titulación asegurada para cada biblioteca por parte del fabricante), este 1 µL provenía de un tamizaje previo, debido a la falta de experiencia del doctorante en este punto del trabajo, no se efectuó la titulación de las bibliotecas previo a su tamizaje, ni después de este segundo tamizaje

NOTA: Se debían de haber de titulado los µL de la biblioteca Ph D después de cada tamizaje con las IgGs de conejo.

Sin embargo, para determinar si la contaminación del primer proceso de tamizaje provenía del primer *panning* con Abs IgY *versus* el PrV hecho por el otro miembro del Laboratorio, se decidió efectuar una prueba de ELISA indirecta utilizando antisuero de aves *versus* PrV (Antisuero elaborado en Lab. I.A.S.A. Tehuacán, Puebla, México) (Figuras 46 y 47).

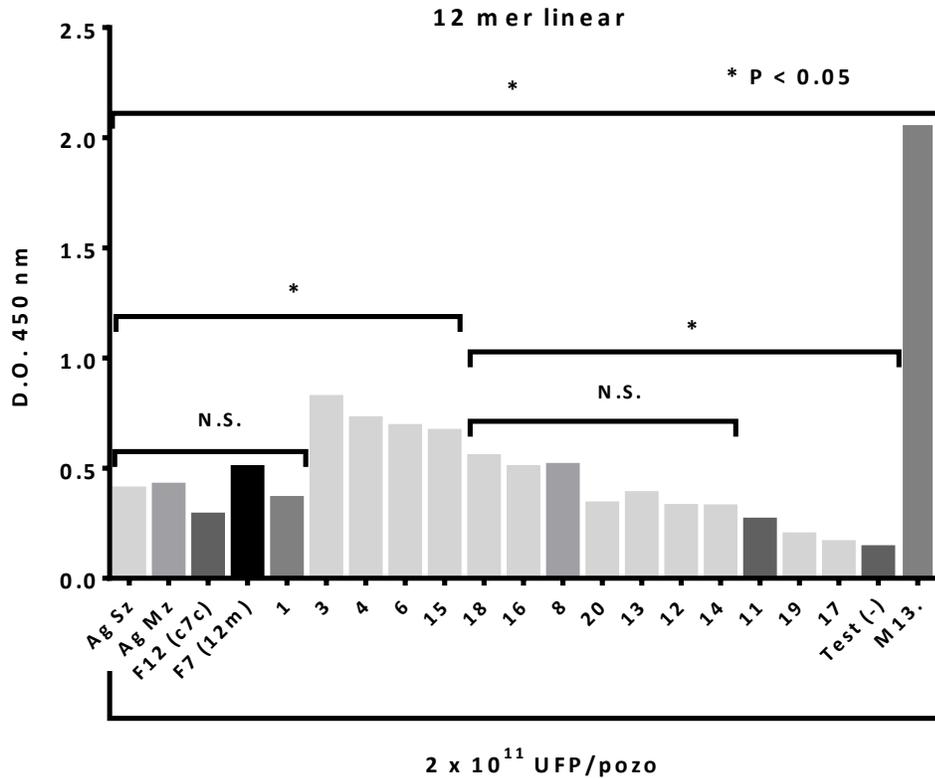


Figura 46. ELISA indirecta de clonas seleccionadas de la biblioteca 12 mer utilizando antisuero hiperinmune (Herpesvirus, PrV) de aves *SPF Leghorn White*. Placa sensibilizada con 2×10^{11} fagos por pozo, dilución suero hiperinmune 1:10; dilución del anticuerpo secundario IgG Cabra anti-IgY de ave 1:1500. Lecturas de D.O. por duplicado. Prueba repetida en tres ocasiones. *P<0-05, N.S.= Sin diferencia estadística. Revelado con OPD.

Con base a los resultados obtenidos se decidió efectuar adicionalmente una corroboración con una prueba de ELISA indirecta utilizando como antisuero un control positivo de una prueba comercial de ELISA indirecta *versus* α -herpesvirus el cual es el agente etiológico de la Laringotraqueítis aviar (ILT ab+ ELISA de X-OVO England) (Figura 48).

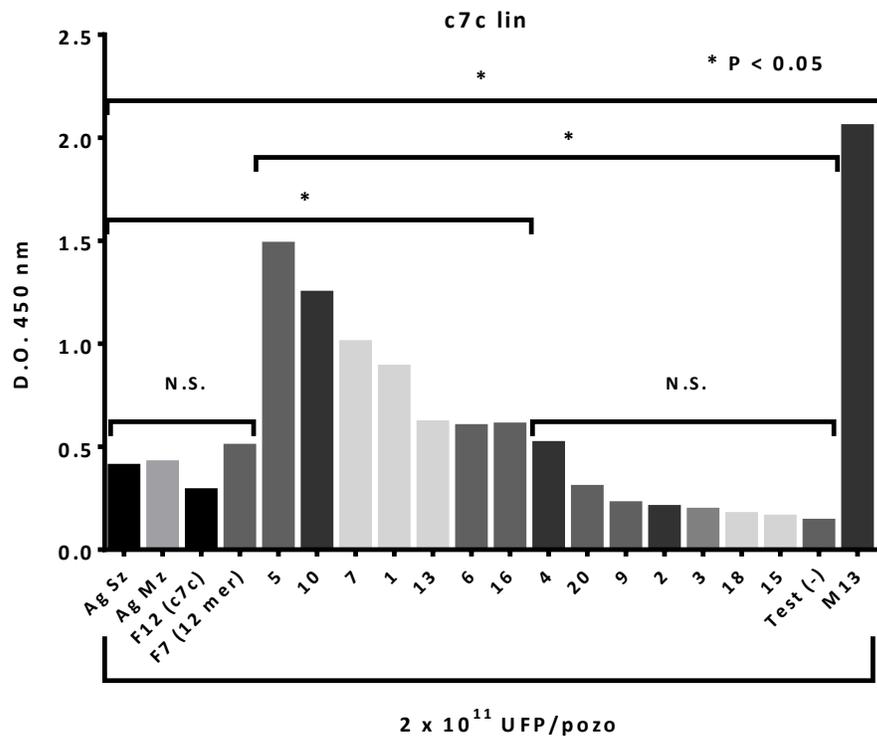


Figura 47. ELISA indirecta de clonas seleccionadas de la biblioteca c7c lin utilizando antisuero hiperinmune (Herpes virus PrV) de aves *SPF Leghorn White*. Placa sensibilizada con 2×10^{11} fagos por pozo, dilución suero hiperinmune 1:10; dilución del anticuerpo secundario IgG Cabra anti-IgY de ave 1:1500. Lecturas de D.O. por duplicado. Prueba repetida en tres ocasiones. * $P < 0.05$, N.S.= Sin diferencia estadística. Revelado con OPD.

La mayor parte de clonas seleccionadas de Ph D 12 mer y c7c para esta prueba mostraron reactividad, con los anticuerpos IgY positivos *versus* PrV, incluso al utilizar un antisuero *versus* el α -Herpesvirus agente etiológico de la Laringotraqueítis infecciosa de las aves mostrando mayor absorbancia (OD) que la observada al utilizar en la prueba ELISA los Abs de conejo *vs E. tenella*. No se determinó cual fue la causa exacta de la alta inmunoreactividad que mostró el fago M13 al utilizar los dos tipos de antisueros.

Con base a los resultados observados se decidió detener el proceso de caracterización de las clonas de ambas bibliotecas.

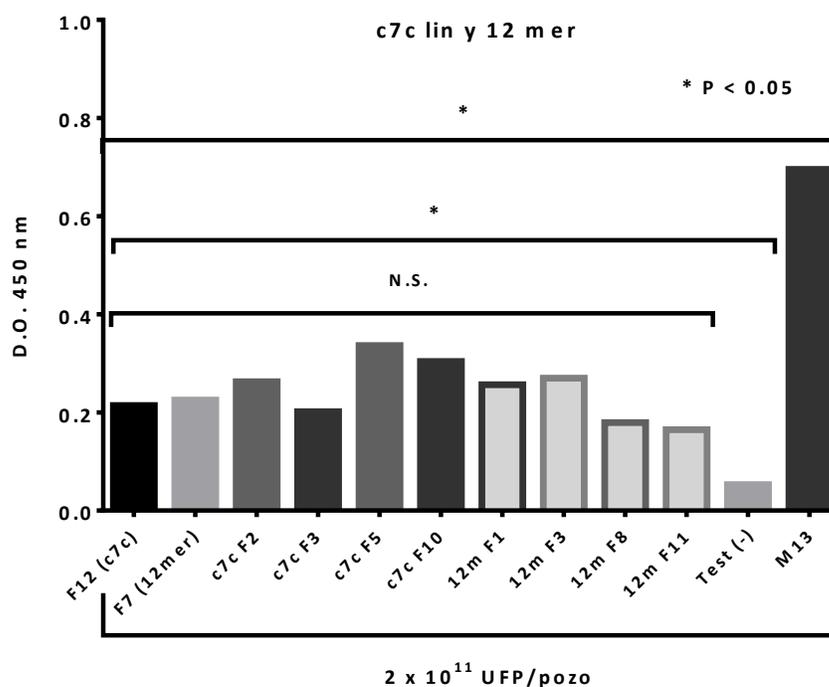


Figura 48. ELISA indirecta de diferentes clonas seleccionadas de la biblioteca c7c (n=4) y 12 mer (n=4) utilizando como anticuerpo primario un control positivo vs Laringotraqueítis aviar (ab+ α -Herpes aviar ELISA de X-OVO England). Placa sensibilizada con 2×10^{11} fagos por pozo, antisuero positivo directo 50 μ L/pozo; dilución del anticuerpo secundario IgG Cabra anti-pollo 1:1500. Prueba realizada tres veces. Lecturas de D.O. por duplicado. *P<0-05, N.S.= No hay diferencia estadística. Revelado con OPD.

Tabla 23. Títulos del tamizaje *Phage display* de las bibliotecas 12mer lin y c7c f con IgGs purificadas de conejos previamente hiperinmunizados con esporozoitos de *E. tenella*.

IgGs Conejos (Pool 4 y 6)	Ph D 12 mer lin ** (ufp/mL)		Ph D c7c f (ufp/mL)	
	Eluido	E. Amplificado	Eluido	E. Amplificado
1 ^{er} Panning (10 μ g/pozo)	0×10^3	-	1.0×10^4	-

3.8.2 Reinicio Primer Tamizaje

Se inicio un nuevo tamizaje de Ph D 12 mer y c7c con 1 μ L proveniente directamente de cada una de las bibliotecas suspendido en 99 μ L de PBS 1X/pozo.

3.8.3 Segundo Tamizaje

Se repitió el tamizaje debido a que no se alcanzó el título requerido en el eluido de la Ph D 12 mer; se incrementó a 5 μ L cada una de las bibliotecas.

IgGs Conejos (Pool 4 y 6)	Ph D 12 mer lin ** (ufp/mL)		Ph D c7c f (ufp/mL)	
	Eluido	E. Amplificado	Eluido	E. Amplificado
1^{er} Panning (10 μ g/pozo)	1.0 x 10⁴	-	0 x 10 ³	-

No se alcanzó el título requerido para el primer *panning* en el eluido de la biblioteca Ph D c7c f, el eluido del primer *panning* se juntó con el eluido de este segundo *panning* y ambas bibliotecas se amplificaron. Se obtuvo el título de este nuevo procedimiento:

IgGs Conejos (Pool 4 y 6)	Ph D 12 mer lin ** (ufp/mL)		Ph D c7c f (ufp/mL)	
	Eluido	E. Amplificado	Eluido	E. Amplificado
1^{er} Panning (10 μ g/pozo)	1.0 x 10⁴	> 1.0 x 10 ¹¹	1.0 x 10⁴	3.0 x 10 ¹¹

No se alcanzó el título requerido para la amplificación del primer eluido de la biblioteca de Ph D 12 mer y de la biblioteca c7c f, se detiene el tamizaje y se titulan las bibliotecas.

Titulación:

Biblioteca	Título
Ph D 12 mer lin =	5 x 10 ¹² ufp/mL
Ph D c7c f =	9 x 10 ¹² ufp/mL

Se determino un título bajo, se procedió a descartar la posibilidad de que los anticuerpos de conejo utilizados para el Ph D estuvieran mostrando un problema de ligación (*linking*) a nivel del paratopo, al no mantener buen nivel de afinidad hacia los antígenos nativos de *E. tenella* evaluados en el presente estudio. Se evaluó nuevamente su reactividad con ELISA indirecta.

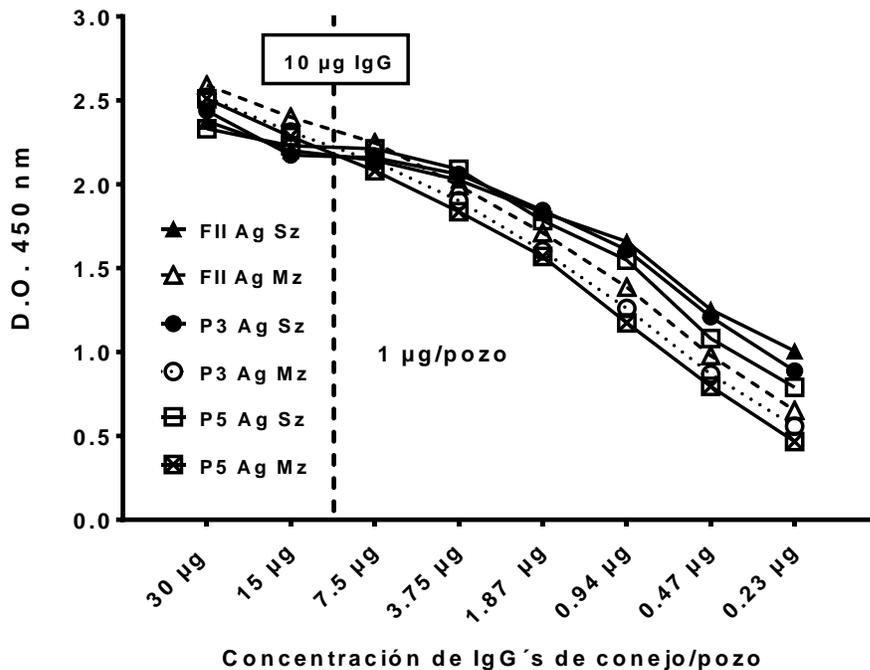


Figura 49. ELISA indirecta hacia antígenos de *E. tenella* (1 µg/pozo Ag Sz y Ag Mz) de IgGs purificadas con proteína G 4 FF de conejos hiperinmunizados contra el esporozoito de *E. tenella*. Diluciones dobles seriadas, inicio con 30 µg IgG/pozo. Dilución del anticuerpo secundario IgG cabra anti-conejo 1:2000. MDO: >4.0 (4 primeras diluciones dobles). Se indica la inmunorreactividad hacia los Ag de *E. tenella* con la concentración de IgGs purificadas (10 µg/ pozo) que se utilizó en el primer tamizaje. Lecturas OD por duplicado.

Los anticuerpos purificados de la fracción II o las mezclas de estos (*pool* 3 y 5) mostraron una inmuno-reactividad similar (Figura 49) a la recién determinada después de su purificación (Figuras 40 y 41). Se descarto que los anticuerpos fueran el problema de los títulos bajos mostrados en el primer eluido del segundo *panning* después de haber efectuado el primer *panning* del tamizaje fallido (bibliotecas ya tamizadas con otros ligandos).

Se verifico el pH de todas las soluciones utilizadas para el proceso, el potenciómetro mostro lecturas erráticas, se descartó el uso de todas las soluciones, se preparó una nueva solución de PBS estéril concentrado a 10X con un pH estándar, este reactivo se utilizó como base

para la preparación de los nuevos *stocks* de soluciones a emplear en un nuevo tamizaje con la finalidad de solventar el probable efecto negativo de las soluciones sobre el bajo título obtenido en ambas bibliotecas de los dos últimos ensayos de Ph D efectuados.

La cantidad en μL de cada biblioteca se utilizó de acuerdo con lo recomendado por el fabricante. Como ligando se utilizaron los Abs purificados de conejos inmunorreactivos contra el esporozoito de *E. tenella* de la fracción II, la inmunoreactividad de esta fracción fue verificada como positiva (Figura 49).

3.8.4 Tercer Tamizaje

Para el tamizaje de las bibliotecas de fagos M-13 comerciales (Ph. D, 12 mer y c7c *Phage display Peptide Library*, New England Biolab®, Ipswich, MA) se utilizó la fracción II de los anticuerpos purificados de conejo contra el esporozoito de *E. tenella*. Con base al protocolo original se utilizaron 10 μL de cada biblioteca, cantidad recomendada por el proveedor, los 10 μL se diluyeron en 90 μL de PBS 1X estéril por cada pozo de la placa.

Tabla 24. Ensayo de titulación de fagos en la biblioteca de *Phage display* 12mer y Ph D c7c

Título	Ph D 12mer	Ph D Circle 7c
Proveedor*	1×10^{13} UFP/mL	2×10^{13} UFP/mL
Calculado**	5×10^{12} UFP/mL	9×10^{12} UFP/mL
Adquirido	5×10^{10} UFP/10 μL	9×10^{10} UFP/10 μL
Por pozo	5×10^9 UFP/100 μL	9×10^9 UFP/100 μL
Diversidad	5×10^7 UFP/100 μL	9×10^7 UFP/100 μL
Fagos real/pozo	50,000,000 UFP	90,000,000 UFP
Recomendado	100,000,000 UFP	200,000,000 UFP

* New England Biolab®. **Debido al tiempo de almacenaje de las bibliotecas y al volumen disponible se tamizó con el título disponible, este consideró la mitad en cantidad de fagos, pero no de la diversidad peptídica recombinante de acuerdo a lo propuesto por el proveedor.

Se observó un incremento en el título del eluido del primer *panning* realizado con relación al eluido obtenido en el tercer *panning*, lo cual indica un evidente enriquecimiento de las clonas de fagos seleccionados por los anticuerpos-ligando empleados. En la biblioteca 12 mer link éste aumento fue de 3 logaritmos más y en la c7c mer de 2 logaritmos más (Tabla 25).

Tabla 25. Títulos del tamizaje de *Phage display* de las bibliotecas 12mer lin y c7c f con IgGs purificadas de conejos previamente hiperinmunizados con esporozoitos completos de *E. tenella*.

IgGs Conejos (Fracción II)	Ph D 12 mer lin ** (ufp/mL)		Ph D c7c f (ufp/mL)	
	Eluido	E. Amplificado	Eluido	E. Amplificado
1^{er} Panning (10 µg/pozo)	2.0 x 10 ³	3.0 x 10 ¹³	1.5 x 10 ⁵	4.8x10 ¹³
2^o Panning (5 µg/pozo)	2.8 x 10 ⁶	3.0 x 10 ^{12*}	3.3 x 10 ⁵	5.0 x 10 ^{12**}
3^{er} Panning (2.5 µg/pozo)	6.9 x 10 ⁶	Control	2.2 x 10 ⁷	Control

* Se utilizaron 80 µL de Ph D 12mer lin para el tercer panning: 2.0 x 10¹¹ UFP/pozo

** Se utilizaron 50 µL de Ph D c7c f para el tercer panning: 2.0 x 10¹¹ UFP/pozo

3.8.5 Clonas individuales

Después de efectuar un *miniprep* de las *E. coli* infectadas con cada clona de fagos seleccionados a partir del amplificado del eluido del tercer tamizaje de cada biblioteca, se verificó la integridad del ADN de cada clona seleccionada por medio de electroforesis (Clonas 1 a 20 de cada biblioteca con 3 µL de ADN por pozo, n=40) (Figura 50).

Se observó suficiente cantidad de ADN en buen estado (no degradado), a cada clona se le realizó PCR de secuenciación tipo Sanger y después de su depuración a través de columnas de Sefadex G50 se secaron al vacío y se realizó su secuenciación.

Se realizaron pruebas de ELISA indirecta de las clonas seleccionadas de la biblioteca 12mer lin y c7c mer con el antisuero hiperinmune (suero vs esporozoito de *E. tenella*) de los dos conejos *New Zealand* y de ambas aves *SPF Leghorn White*.

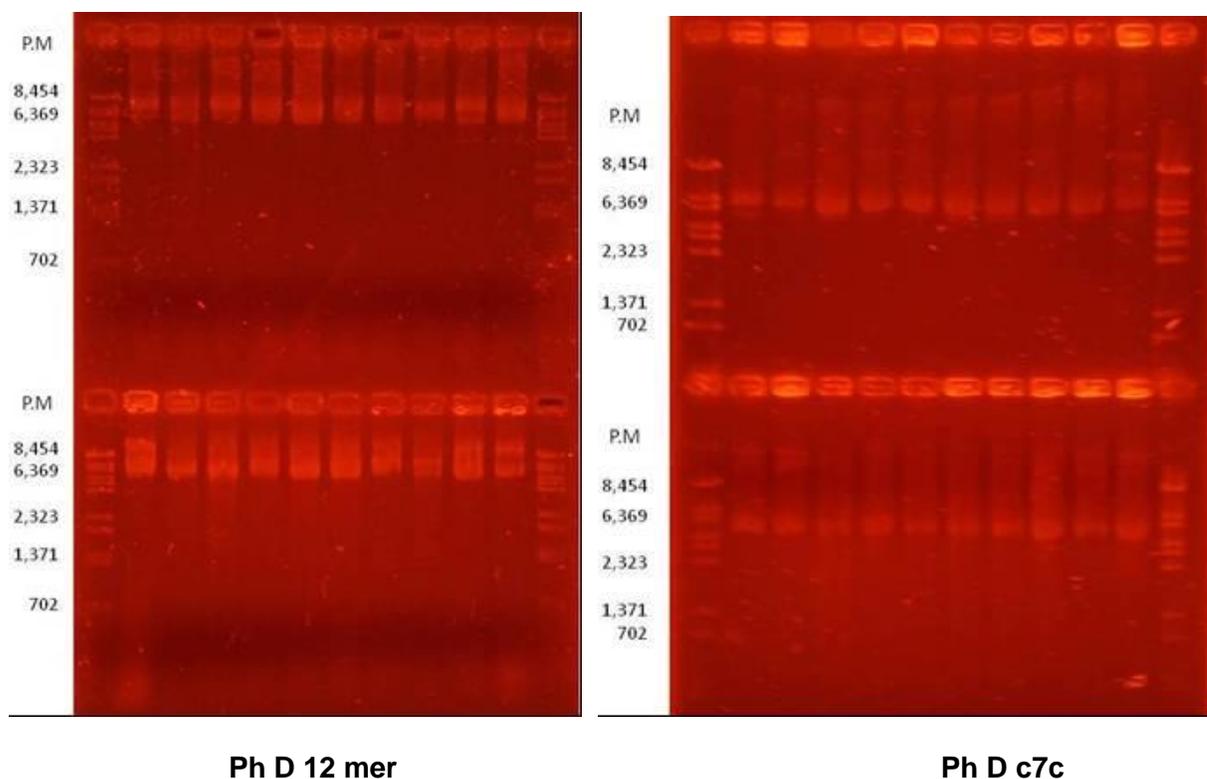


Figura 50. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio con ADN de cada una de 20 clonas seleccionadas a partir del tamizaje de la biblioteca 12mer lin y 20 clonas de ADN seleccionadas de la biblioteca c7c f. PM= Marcador de peso molecular en pares de bases.

3.8.6 Secuenciación del ADN de cada fagotopo

Se remitieron a secuenciar 40 clonas seleccionadas y se obtuvieron las secuencias descritas en la tabla 26 y 27.

Tabla 26. Secuencias ADN de clonas de fagos M13 amplificados en la biblioteca 12mer lin

Secuencia	Clona	Frecuencia
LHRGNEAVYAWP	1	1/20
AGHTTQFNSKTT	2,7,8,12,14,18,20	7/20
NRPDSAQFWLHH	3	1/20
HFAYWWNGVRGP	4,5,9,10,13,15,16,19	8/20
FPVNNMQLWQVT	6	1/20
PNSAFWAGSER	11,17	2/20

Biblioteca 12mer lin = 6 secuencias diferentes, 7 clonas con secuencia idéntica, 8 clonas idénticas entre sí, 2 clonas similares y 3 clonas únicas.

Tabla 27. Secuencias del ADN de las clonas de fagos M13 amplificados de la biblioteca *cyclic 7 cistein mer fold*.

Secuencia	Clona	Frecuencia
CNTGSPYEC	1,5	2/14
CMSTGLSSC	6	2/14
CSISLTHC	7,15,20	3/14
CRSANIYTC	8	1/14
CHPVSGQKC	9,16	2/14
CLKFWKPNC	10,18	2/14
CHQTKTKFC	11	1/14
CHNETQKMC	13	1/14
CVGISALLC	17	1/14

Biblioteca Circle 7c f = 9 secuencias diferentes, 3 pares de clonas de secuencia idéntica, 3 clonas idénticas entre sí, 5 clonas de secuencia única, seis clonas sin reporte de secuencia. Sin consenso de residuos aparente.

3.8.7 Análisis de las secuencias de cada clona seleccionada

Por medio de bio-informática fueron analizadas las 40 clonas seleccionadas, se obtuvieron identidades específicas con *E. tenella* para cada clona, se describen en la tabla 28, 29 y 30.

Los fagos de la biblioteca c7c lin en los cuales no se encontró secuencia de péptidos en la proteína III fueron los identificados como 2, 3, 4, 12, 14 y 19. En el tamizaje se obtuvieron únicamente 14 fagos con secuencia de péptidos, se volvió a amplificar y titular el tercer eluido del tercer *panning* de esta biblioteca (c7c f); a partir de las cajas sembradas se seleccionaron nuevamente 10 clonas de *E. coli* tetraciclina resistentes positivas a IPTG-Xgal, las cuales se procesaron nuevamente para obtener ADN y fagos de cada clona, los resultados de inmuno- reactividad se integraron y se muestran en las pruebas de ELISA indirecta de las clonas evaluadas en ambas bibliotecas (Figuras 51, 52, 53 y 54).

Tabla 28. Bio- informática *protein* BLAST *protein*► *protein** en base de datos de *E. tenella* (*taxid* 5802) de las clonas de la biblioteca 12 mer lin. Se encontraron secuencias en las 20 clonas.

Secuencia	Clonas	Búsqueda (Standard Protein BLAST) <i>E. tenella</i>	Identidad
LHRGNEAVYAWP	1	- Hypothetical protein, conserved [Eimeria tenella] Sequ ID: XP_013228393.1 Length: 1103 Matches: 1	Pos. 553 6/7 (86%)
AGHTTQFNSKTT	2,7,8, 12,14,1 8,20	- Cullin homog, putative [Eimeria tenella] Sequ ID: XP_013232647.1 Length: 208 Matches: 1	Pos. 54 6/7 (86%)
NRPDSAQFWLHH	3	- Hypothetical protein, conserved [Eimeria tenella] Sequ ID: XP_013228556.1 Length: 9860 Matches: 3	Pos. 1326 7/9 (78%) Pos. 812 6/14 (43%)
HFAYWWNGVRG P	4,5,9, 10,13, 15,16,1 9	- Dynein beta chain, flagellar outer arm, putative [Eimeria tenella] Sequ ID: XP_013232219.1 Length: 959 Matches: 1	Pos. 523 5/5 (100%)
FPVNNMQLWQVT	6	- Hydroxymethyl dihydropterin pyrophosphokinase-dihydropterolate synthase, putative [Eimeria tenella] Sequ ID: XP_013228005.1 Length: 640 Matches: 1	Sbjct 262 8/11(73%)
GPNSAFWAGSER	11,17	- Hypothetical protein, conserved [Eimeria tenella] Sequ ID: XP_013233745.1 Length: 1116 Matches: 3	Sbjct 76 6/7 (86%) Sbjct 984 5/8 (63%)

Búsqueda efectuada en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

De las 10 clonas adicionales remitidas a secuenciar, 5 clonas fueron positivas a un péptido c7c en la proteína III. En las cinco clonas positivas se observaron cuatro secuencias de péptidos diferentes. Las clonas 1' y 3' presentaron la misma secuencia: CPTNQHHLC. La 7' presentó una fracción de 4 residuos de una secuencia consenso (**CLKLGEKWC**) con los fagos 10 y 18 secuenciados previamente en la primera ronda de secuenciación: **CLKFWKPNC** y con el fago 10' de secuenciación reciente: **CAKLCLNNC**. Con base a la información obtenida en las pruebas de ELISA se seleccionaron 4 de las clonas más reactivas para caracterizarlas, esto a partir de las 40 originalmente seleccionadas (2 clonas de la biblioteca Ph D 12 mer y 2 de la PH D c7c).

Tabla 29. Bio- informática *protein* BLAST *protein*► *protein** en la base de datos de *E. tenella* (*taxid* 5802) de las clonas de la biblioteca c7c lin. Se encontraron secuencias en 14 clonas. No se encontraron secuencias en 6 clonas.

Secuencia	Clonas	Búsqueda (Standard Protein BLAST) <i>Eimeria tenella</i> taxid 5802	Identidad
CNTGSPYEC	1,5	- Microneme protein 4 [Eimeria tenella] Sequence ID: CAC34726.2 Length: 2340 Number of Matches: 10	Pos. 297; 991; 5/8 (63%) Pos. 769; 810; 810; 938; 1245: 6/9 (67%)
CMSTGLSSC	6	- Thrombospondin type 1 domain-containing protein, putative [Eimeria tenella] Sequence ID: XP_013235772.1 Length: 3774. Matches: 5	Pos. 3575; 7/9 (78%)
CSISLTHC	7,15,20	- Hypothetical protein, conserved [Eimeria tenella] Sequence ID: XP_013233649.1 Length: 961. Matches: 3	Pos. 412; 7/8 (88%)
CRSANIYTC	8	- Hypothetical protein, conserved [Eimeria tenella] Sequ. ID: XP_013232311.1 Length: 1348 Matches: 1	Pos. 1270; 5/7 (71%)
CHPVSGQKC	9,16	- Hypothetical protein ETH_00011430	Pos. 208; 6/7 (86%)
CLKFWKPNC	10,18	- Hypothetical protein, conserved [Eimeria tenella] SequID: XP_013228358.1 Length: 323 Number of Matches: 1	Pos. 185; 5/7 (71%)
CHQTKTKFC	11	- Hypothetical protein ETH_00037435 [Eimeria tenella] Sequ ID: XP_013229950.1 Length: 251 Matches: 1	Pos.137; 6/6 (100%)
CHNETQKMC	13	- Dynein heavy chain 3, axonemal, related [Eimeria tenella] Sequ ID: XP_013232337.1 Length: 1111 Matches: 1	Pos. 462; 6/9 (67%)
CVGISALLC	17	- Adenosine transporter, putative [Eimeria tenella] Sequ ID: XP_013231508.1 Length: 443 Matches: 1	Pos. 197; 7/9 (78%)

Búsqueda efectuada en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

Tabla 30. Bio- informática BLAST proteína-proteína* de la base de datos de *E. tenella* (taxid 5802) de 10 clonas seleccionadas de la biblioteca c7c (10 secuencias adicionales, identificadas como 1´a 10´ de biblioteca PhD c7c). Se encontraron secuencias solo en 5 clonas. Fuente: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

Secuencia	Clonas	Búsqueda (Standard Protein BLAST) <i>Eimeria tenella</i> taxid 5802	Identidad
CPTNQHHLC	1´,3´	- Regulator of chromosome condensation RCC1 (Precursor), related [<i>E. tenella</i>] Sequence ID: XP_013236104.1 Length: 812 Number of Matches: 1	Sbjct. 26; 6/8 (75%)
CMNNFNITC	2´	- Hypothetical protein, conserved [<i>E. tenella</i>] Seq ID: XP_013233414.1 Length: 1063 Number of Matches: 1	Pos. 1; 6/8 (75%)
CLKLGEKWC	7´	- Hypothetical protein ETH_00039830 [<i>E. tenella</i>] Sequence ID: XP_013231892.1 Length: 271 Number of Matches: 1	Sbjct 128; 6/7 (86%)
CAKLCLNNC	10´	- Asparaginyl-tRNA synthetase, putative [<i>E. tenella</i>] Sequence ID: XP_013227989.1 Length: 516 Number of Matches: 1	Sbjct 319; 6/9 (67%)

3.8.8 Caracterización con ELISA indirecta de las clonas seleccionadas en el tercer tamizaje

La inmunorreactividad individual de cada una de las clonas seleccionadas de la biblioteca 12 mer hacia el suero de los conejos inmunizados con el esporozoito completo de *E. tenella* fue diferente entre las mismas, las clonas 15, 11, 17 y 18 mostraron mayor reactividad que las restantes, los controles negativos (M13 irrelevante y M13 *wild type* sin expresión de péptido) mostraron los niveles más bajos de reactividad (Figura 51).

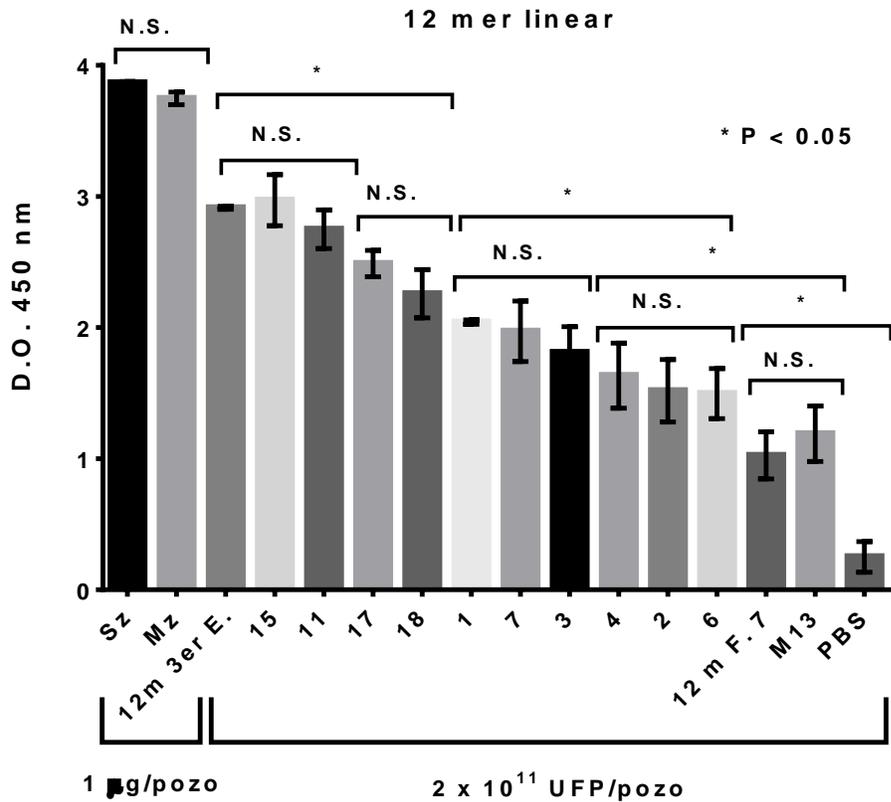


Figura 51. ELISA indirecta de las clonas seleccionadas de la biblioteca 12mer lin utilizando suero hiperinmune (*versus* esporozoito completo de *E. tenella*) de conejos *New Zealand White*. Placa sensibilizada con 2×10^{11} fagos por pozo, dilución del suero hiperinmune 1:10, dilución del anticuerpo secundario IgG Cabra anti-conejo 1:15,000. Los fagos 12m 3rd E. son un amplificado a partir del tercer eluido (control). El fago 12m F.7 es un fago irrelevante. El fago M13 es el *wild type*. Media \pm DE de la densidad óptica de tres ensayos, las lecturas fueron por duplicado. * $P < 0.05$, N.S.= No hay diferencia estadística. Revelado con TMB SS.

La inmunorreactividad individual de cada una de las clonas seleccionadas de la biblioteca c7c mer *cystein constrained* hacia el suero de los conejos inmunizados con el esporozoito completo de *E. tenella* fue diferente entre las mismas, las clonas 10', 10, 8, 1 y 6 mostraron mayor reactividad que las restantes, los controles negativos (M13 irrelevante y M13 *wild type*) mostraron los niveles más bajos de inmunorreactividad (Figura 52).

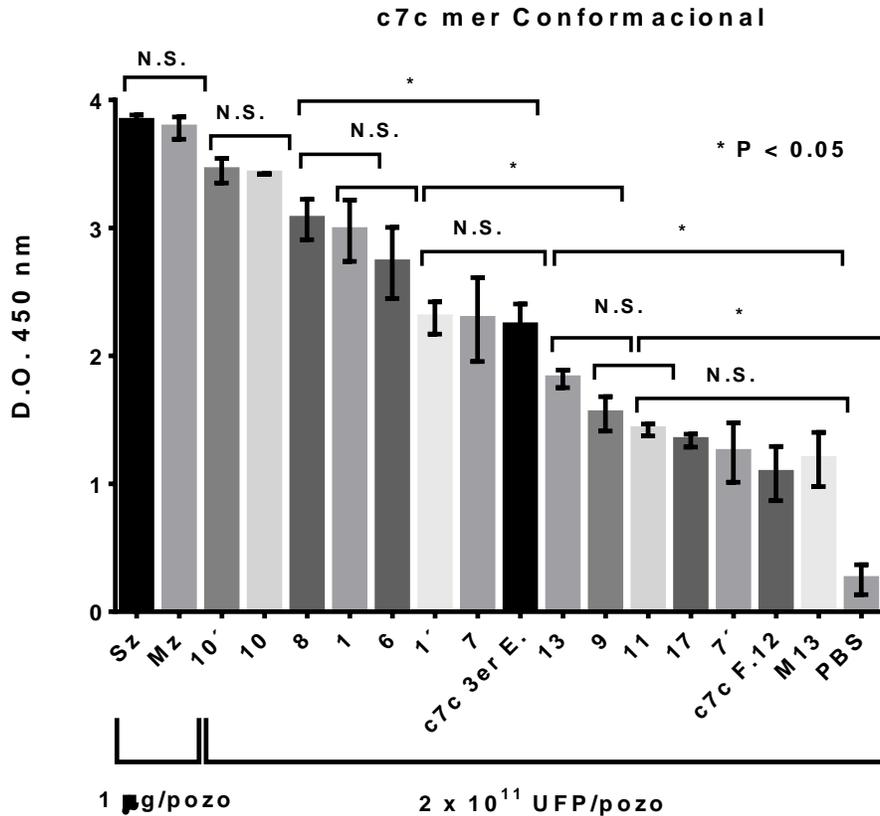


Figura 52. ELISA indirecta de las clonas seleccionadas de la biblioteca *c7c fold* utilizando suero hiperinmune (*versus* esporozoito completo de *E. tenella*) de conejos *New Zealand White*. Placa sensibilizada con 2×10^{11} fagos por pozo, dilución del suero hiperinmune 1:10, dilución del anticuerpo secundario IgG Cabra anti-conejo 1:15,000. Los fagos *c7c 3rd E.* son un amplificado del tercer eluído (control). El fago *c7c F.12* es un fago irrelevante. El fago M13 es el *wild type*. Media \pm DE de la densidad óptica de tres ensayos, lecturas por duplicado. * $P < 0.05$, N.S.= No hay diferencia estadística. Revelado con TMB SS.

La inmunorreactividad individual de cada una de las clonas seleccionadas de la biblioteca 12 mer hacia el suero de las gallinas *SPF Leghorn White* inmunizadas con el esporozoito completo de *E. tenella* fue diferente entre las mismas, las clonas 15, 11, 17 y 18 mostraron mayor reactividad, los controles negativos (M13 irrelevante y M13 *wt*) mostraron niveles bajos de reactividad (Figura 53).

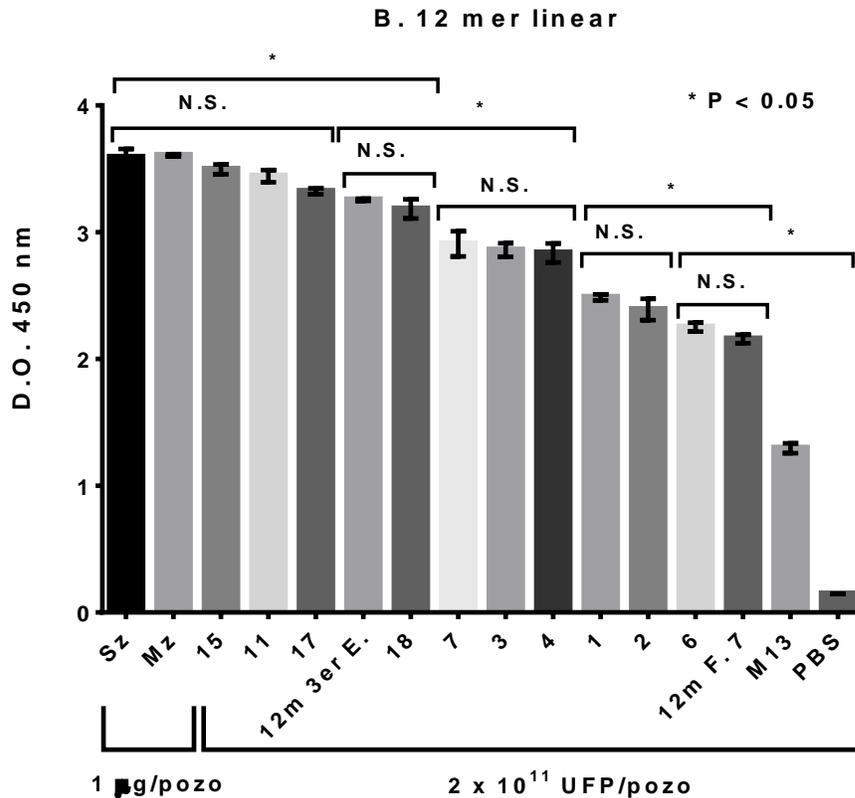


Figura 53. Reactividad en ELISA indirecta de clonas seleccionadas de la biblioteca 12mer lin utilizando suero hiperinmune (*versus* esporozoito completo de *E. tenella*) de gallinas *SPF Leghorn White*. Cada pozo fue sensibilizado con 2×10^{11} fagos, la dilución del suero fue 1:10, la dilución del anticuerpo secundario IgG Cabra anti-pollo fue de 1:15,000. Los fagos 12m 3rd E. son un amplificado del tercer eluido. 12m F.7 es un fago irrelevante. El fago M13 es el control *wild type*. Media \pm DE de la densidad óptica de tres ensayos, lecturas por duplicado. * $P < 0.05$, N.S.= No hay diferencia estadística. Revelado con TMB SS.

La inmunorreactividad individual de cada una de las clonas seleccionadas de la biblioteca c7c mer *cystein constrained* hacia el suero de las gallinas *SPF Leghorn White* inmunizadas con el esporozoito completo de *E. tenella* fue diferente entre las mismas, las clonas 10', 6, 8, 10 y 1 mostraron mayor reactividad, los controles negativos (M13 irrelevante y M13 *wild type*) mostraron los niveles más bajos de reactividad (Figura 54).

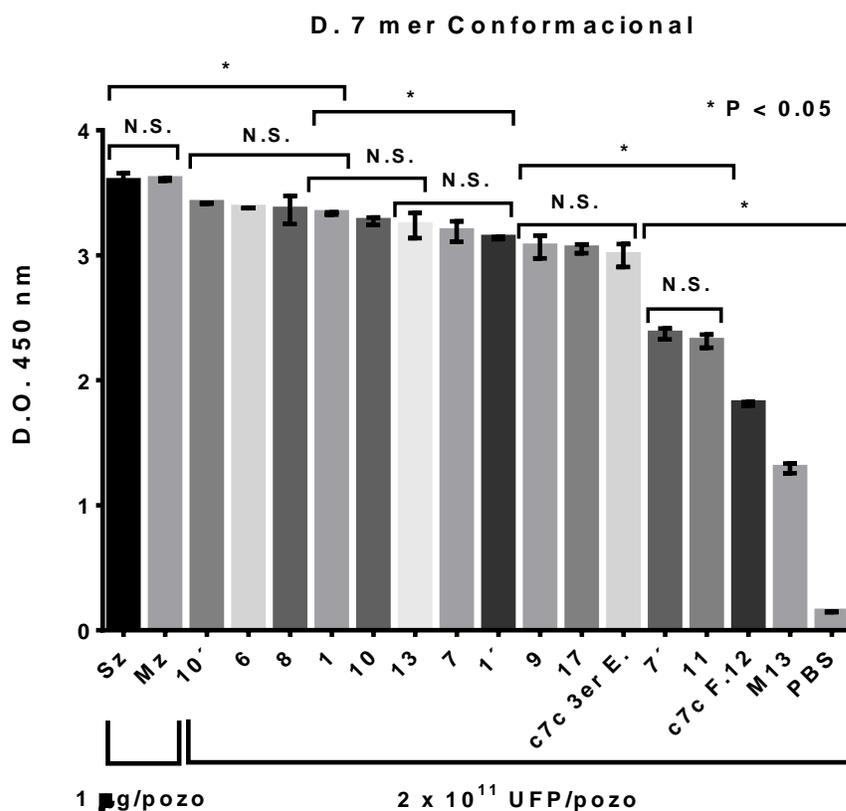


Figura 54. ELISA indirecta de clonas seleccionadas de la biblioteca *c7c fold* utilizando suero hiperinmune (*versus* esporozoito completo de *E. tenella*) de gallinas *SPF Leghorn White*. Cada pozo fue sensibilizado con 2×10^{11} fagos, la dilución del suero hiperinmune fue de 1:10, la dilución del anticuerpo secundario IgG Cabra anti-pollo fue de 1:15,000. Media \pm DE de la densidad óptica de dos ensayos, lecturas por duplicado. Los fagos *c7c 3rd E.* son un amplificado del tercer eluído. El fago *c7c F.12* es irrelevante. El M13 es el control *wild type*. * $P < 0.05$, N.S.= No hay diferencia estadística. Revelado con TMB SS.

3.8.9 Selección de clonas candidatas definitivas

Se seleccionaron como clonas candidatas los fagos 1 y 7 de la biblioteca Ph D circle 7c mer , y las clonas de los fagos 15 y 18 de la biblioteca Ph D 12 mer,

3.8.10 Caracterización mediante ELISA indirecta del antisuero contra las clonas candidatas

A partir de los 14 días PI los sueros anti- clona de los conejos inmunizados con las 4 clonas candidatas muestran reactividad positiva hacia ambos antígenos nativos (Sz y Mz).

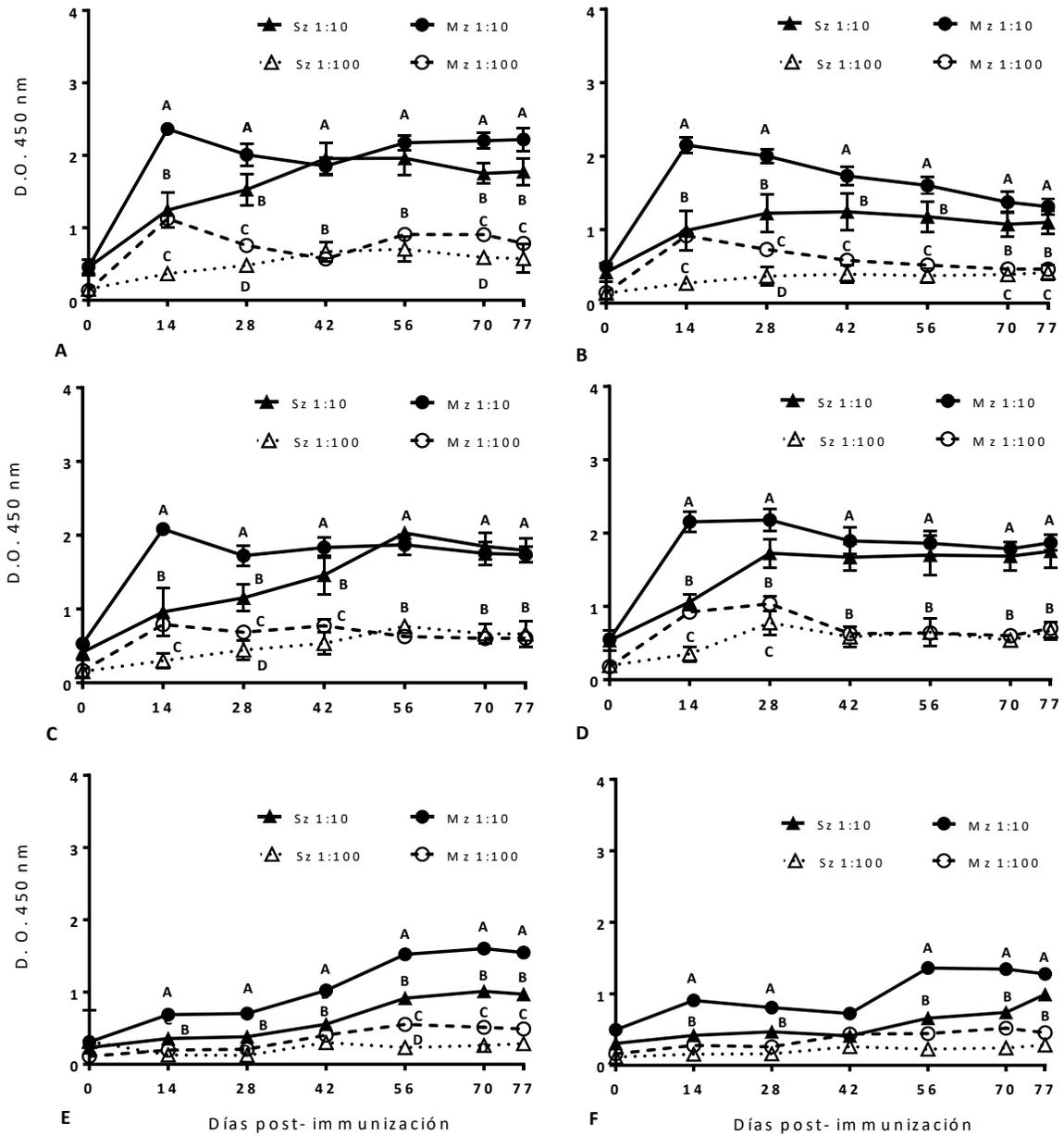


Figura 55. Cinética de anticuerpos de conejos inmunizados con 4 clonas de fagotopos seleccionados de dos bibliotecas de *Phage display* y 1 fago M13 irrelevante. Los antisueros de los conejos se probaron con los antígenos nativos de *E. tenella*. A dos diluciones (1/10 y 1/100). Los anticuerpos anti-clona se muestran en figura A (F.1, C-NTGSPYE-C), B (F.7, C-SISLTH-C), C (F.15, HFAYWWNGVRGP), D (F.18, AGHTTQFNSKTT), E (C.3 M13 F.12 c7c PrV) y F (C.4 M13 F.12 c7c PrV). Valores promedio en OD \pm DE por duplicado en tres ensayos hechos en diferente tiempo. Diferentes letras en la misma fecha de evaluación indican diferencia estadística $*P < 0.05$ (ANDEVA completada *post-hoc* c/prueba de Tukey).

La inmunorreactividad observada fue alta en el antisuero del conejo inmunizado con la clona del fago 1 (c7c), la reactividad fue mayor hacia el Mz (OD=2.6) que hacia el Sz (OD=1.45), el segundo fago con alta reactividad fue el F.18, los otros dos antisueros de las clonas evaluadas muestran un comportamiento similar entre sí con respecto hacia ambos Ags evaluados (Figura 55). Al día 77 el F.1 muestra aún alta reactividad hacia el Sz (2.17 O.D.), sin embargo, el fago 18 (12 mer) fue el que mostró la mayor reactividad (2.39 O.D.), mientras que los fagos 7 (c7c) y F.15 (12 mer) mostraron menores niveles. La reactividad hacia el SN del Mz fue mayor en el F.1, ligeramente menor en el F. 18, un poco menor en el F.15 y la menor reactividad hacia este antígeno se observó con el antisuero del fago 7 (c7c). El fago M13 mostró reactividad positiva de manera cronológicamente progresiva hacia los antígenos del Sz y del Mz a lo largo del programa de inmunización (Figuras 55E y 55F).

3.8.11 Caracterización por *Western blot* del suero anti- clona contra los antígenos nativos del esporozoito y merozoito de segunda generación de *E. tenella*

En el *Western blot* de la Figura 56 se muestra la magnitud, tipo y peso molecular de los polipéptidos solubles de los dos ciclos de vida de *E. tenella* (Sz y Mz) reconocidos por los antisueros de los conejos inmunizados con las clonas candidatas (F.1 y F.7 de Ph D c7c; F.15 y F.18 de PH D12mer,) y el fago M13 irrelevante (F.12 c7c PrV).

El antisuero contra el F.1 (Ph D c7c) muestra reconocimiento de una banda inmunodominante en el antígeno del Sz con peso de 68 kDa y otra de 78 kDa, con bandas de menor preponderancia de 150, 128, 98, 60, 45, 39, 31, ~26-27, ~23.5, 20, ~17.5 y ~14-15 kDa. En el Ag del Mz este mismo antisuero (F.1 Ph D c7c) muestra una banda inmunodominante de 39 kDa y otra de ~38 kDa, además de una banda de 68 y 60 kDa, ambas presentes también en el Sz; además en el antígeno del Mz reconoce una banda tenue de ~17.5 kDa y una más de ~14-15 kDa, ésta última también presente en el Sz, pero con menor reactividad (Figura 56C).

El antisuero contra el F.7 (Ph D c7c) muestra reconocimiento preponderante en el Sz de una banda de ~27 kDa, y otras tres menos reactivas de 31, 36 y 40 kDa. En el Mz, el antisuero *versus* F.7 (Ph D c7c) muestra una banda inmunodominante de 39 kDa y otra de ~38 kDa; además reconoció otras cuatro bandas, aunque de forma menos reactiva ~17.5, 55, 60 y 85 kDa (Figura 56D). El antisuero contra el F.15 (Ph D 12 mer) muestra reconocimiento en el Ag del Sz de una banda preponderante de 70 kDa y otra más ancha de ~26-27 kDa, además de otras bandas con aparente menor reactividad de 94, 63, 40 y 31 kDa.

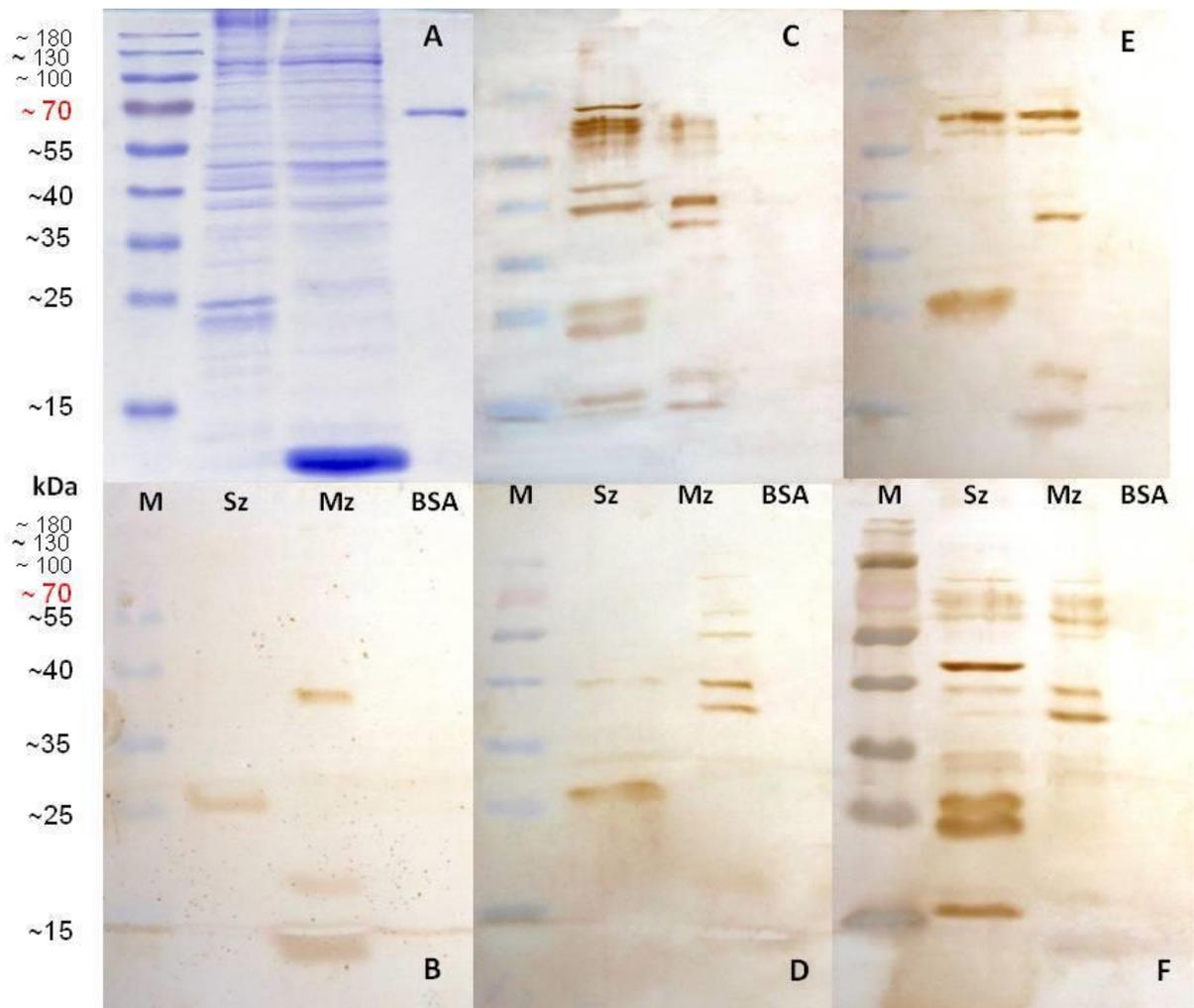


Figura 56. *Western blotting* del esporozoito y merozoito de segunda generación de *E. tenella* con sueros de conejos anti-clona y un fago M13 irrelevante. Los polipéptidos de esporozoitos (Sz) y merozoitos (Mz) de *E. tenella* y BSA se separaron por electroforesis en un gel de SDS-PAGE 12% (A), y se probaron en *Western blot* con suero de conejo anti-clona del M13 irrelevante (B); suero anti-clona del fago 1 (CNTGSPYEC) (C); suero anti-clona del fago 7 (CSISLTHC) (D); suero anti-clona del fago 15 (HFAYWWNGVRGP) (E); y suero anti-clona del fago 18 (AGHTTQFNSKTT) (F).

El antisuero contra el F.15 reconoce en el Ag del Mz una banda inmunodominante de 70 kDa y una menos fuerte de 63 kDa ambas presentes en el Sz; además de otra banda preponderante en el Mz de ~38 kDa; además en el Mz mostró el reconocimiento de tres bandas menos reactivas de 94, 55, 40 kDa, ~17.5 kDa y ~13 kDa (Figura 56E). El antisuero

versus el F.18 (Ph D 12 mer) en general fue el más reactivo junto con el F.1 (c7C), el antisuero F.18 muestra un fuerte reconocimiento en el Sz de una banda de 45 kDa, además de otras tres fuertemente teñidas de ~27, ~23 y ~16.5 kDa, con menor afinidad reconoce bandas de 230, 115, 94, 72, ~63, 39, ~38, 34 y 33 kDa. En el Mz, el antisuero contra F.18 (12 mer) reconoce una banda inmunodominante de ~38 kDa y otra de 39 kDa, ambas también presentes, aunque más tenues en el Sz, este antisuero reconoció otras bandas menos dominantes presentes también en el Sz de 94, 72, 63, 34 y 31 kDa, además de otras menos reactivas de 55, 16.5 y 13 kDa (Figura 56F). Ninguno de los antisueros *versus* las clonas de los fagos reaccionaron con el BSA (Fig. 56). Todos los antisueros *versus* fagos reconocen ambos tipos de antígenos (Sz y Mz de Et). Los fagos F.1 y F.18 mostraron un mayor patrón de reconocimiento, este coincide con la mayor absorbancia registrada hacia el Ag del Sz y el Mz en la prueba de ELISA indirecta (Figura 55). El suero anti-M13 reconoce en el Mz tres bandas estas pesaron ~38 kDa, 17.5 kDa y 13 kDa, este antisuero también reconoce una banda de ~26-27 kDa en el antígeno del Sz, estas 4 bandas en particular fueron detectadas por todos los sueros anti-clona F.1, F.7, F.15 y F.18 (Figura 56).

En el *Western blot* de los dos antisueros de conejos identificados como conejo 3 (C.3) y conejo 4 (C.4), los cuales fueron inmunizados durante 70 días *con* el fago M13 irrelevante, aunque débil mostraron reactogenicidad, el de mayor actividad fue el antisuero del C.3 que reconoce una banda de ~26-27 kDa en el Sz y otras tres en el Mz, las cuales mostraron un peso de ~38, ~17.5 y ~13 kDa, adicional a una banda de reactividad muy débil de ~28 kDa. Mientras que el antisuero del C.4 mostró reconocimiento únicamente en el Ag del Mz, reconoció las mismas cuatro bandas reconocidas por el antisuero del conejo 3. Ninguno de los antisueros *versus* el Fago M13 al igual que ninguno de los sueros anti-clonas F.1, F.7, F.15 y F.18 mostraron inmunoreacción hacia la BSA (Figuras 56 y 57).

En la figura 58, se muestra la reactividad de las ocho principales proteínas del fago M13 mp19 *wild type* con el antisuero recolectado al día 77 después de la inmunización de los conejos 3 y 4 *versus* el fago M13 mp19.

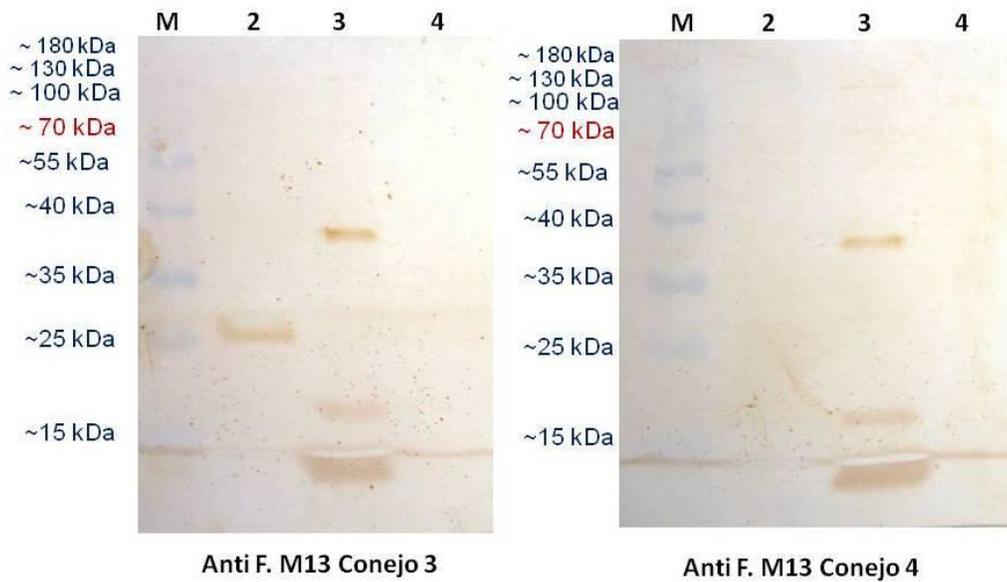


Figura 57. *Western blot* de antígenos del esporozoito (Sz) y merozoito de 2^a generación (Mz) de *E. tenella* (20 µg/carril 2 y 3, y 10 µg de BSA/carril 4 respectivamente), identificados como antisuero de conejos 3 y 4, ambos inmunizados con el fago M13 mp19 (Dilución del suero primario 1:50, dilución suero secundario 1:1,800), revelado colorimétrico con DAB (Sigma®).

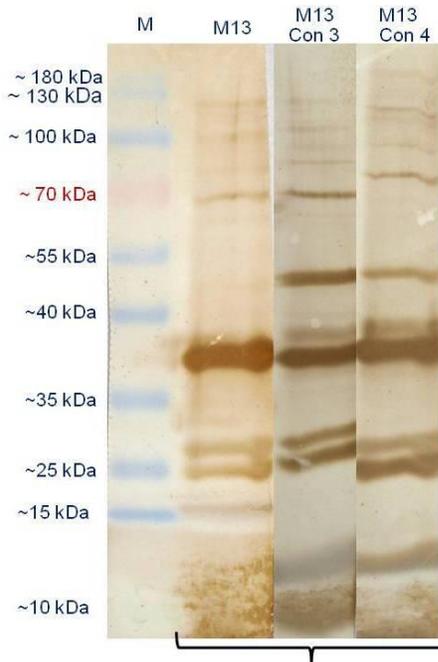


Figura 58. *Western blot* del fago filamentosos M13 mp19 *wt* (20 µg por carril 2, 3 y 4) probado con suero anti-clona M13 mp19 de los conejos número 3 (carril M13 Con 3) y número 4 (carril M13 Con 4) (Dilución del suero primario 1:100, dilución del suero secundario 1:1800),

reactividad colorimétrica con DAB (Sigma®). M= peso molecular estándar con sus valores aproximados en kDa a la izquierda de los indicadores de color azul, rojo y verde.

3.9 Inmunoprotección en pollos SPF Leghorn White con inmunógenos individuales de las clonas F.1 y F.7 de la biblioteca Ph D c7c, y de las clonas F.15 y F.18 de la biblioteca Ph D 12 mer, ante un desafío con alta cantidad de ooquistes de *E. tenella*

Al día de edad, las aves pesaron en promedio 37.8 g no hubo diferencia de peso entre los grupos. Al día 21 no hubo diferencia de peso promedio corporal entre los grupos de tratamiento. Al día 28 de edad, una semana PD las aves del grupo NIND mostraron un peso similar al grupo inmunizado con la vacuna EtSz-IMS1313, aunque ambos grupos mostraron mayores pesos no fueron diferentes al peso del grupo F.15 (12 mer), además mostraron diferencia ($P<0.05$) con el resto de los grupos inmunizados desafiados y con el grupo NID, el cual presento el menor peso, diferente ($P<0.05$) al de los grupos inmunizados con los 4 fagos experimentales y al fago testigo (M13) (Figura. 59, Tabla 31).

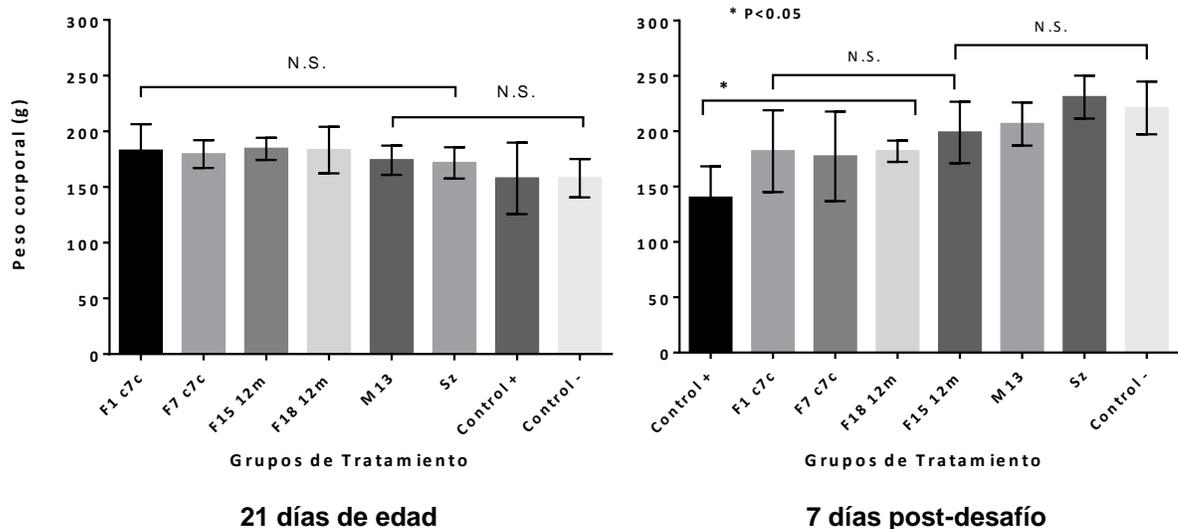


Figura 59. Peso corporal (g) de aves *SPF Leghorn White* inmunizadas subcutáneamente con 4 clonas individuales de fagos seleccionados de la biblioteca Ph D c7c, y Ph D 12mer, el fago M13 mp19 wt, esporozoitos completos inactivados de *E. tenella* y dos grupos testigos, No inmunizado No desafiado y No inmunizado Desafiado, al momento del desafío y 7 días post-desafío con 3×10^4 ooquistes esporulados de una cepa salvaje de *E. tenella*.

La mayor GRP 7 días PD la mostró el grupo NIND, seguido del grupo inmunizado con la vacuna de esporozoitos de *E. tenella*. El grupo del F.15 aparentemente mostró menor GRP, sin embargo, su ganancia de peso no se observó afectada en el mismo grado como la GRP registrada en los grupos inmunizados con los inmunótopos F.1, F.7, F.18 y el fago M13, los cuales mostraron una afectación grave, el grupo más afectado por el desafío fue el grupo NID, este mostró una afectación negativa muy grave, incluso su peso promedio fue menor al peso promedio de este mismo grupo registrado siete días antes (Figuras 59, 60, Tabla 31).

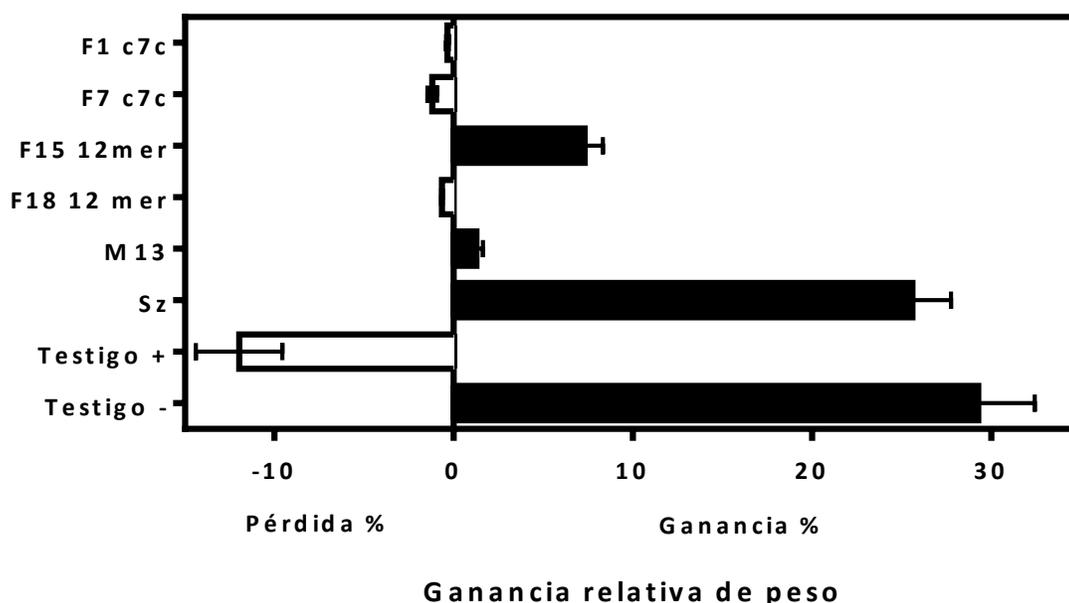


Figura 60. Ganancia relativa de peso corporal de aves *SPF Leghorn White* inmunizadas con 4 fagos seleccionados de la biblioteca Ph D c7c, y Ph D 12mer, el fago M13 mp19, esporozoitos completos de *E. tenella* y de 2 grupos testigo uno No inmunizado-Desafiado (Testigo +) y otro No inmunizado-No Desafiado (Testigo -), a los siete días post-desafío con 3×10^4 ooquistes esporulados de una cepa salvaje de *E. tenella*.

Debido a la presencia de valores negativos en la GRP de varios grupos, los porcentajes de GRP de cada grupo se consideraron con base al diferencial en gramos del peso promedio por grupo al momento del desafío con relación al peso promedio del mismo grupo siete días PD y no como porcentaje parcial del 100% de la GRP corporal de cada grupo con relación a la GRP presentada por el grupo NIND durante el mismo periodo.

Tabla 31. Efecto de la inmunización de aves *SPF Leghorn White* con cuatro inmunótopos individuales del esporozoito de *E. tenella*, esporozoitos completos de *E. tenella* y un fago M13 mp19 wt, frente al desafío con 3×10^4 ooquistes esporulados de *E. tenella*.

Grupos	Tasa de sobrevivencia (%)	Ganancia promedio de peso corporal (g)	Ganancia relativa de peso corporal	Calificación de Lesiones (media \pm DE)
No Inm. No Des.	100.0 ^a	63.07 \pm 7.83 ^a	100.0 ^a	0.00 \pm 0.00 ^d
Vacuna Sz	100.0 ^a	59.79 \pm 5.33 ^a	94.8 ^a	0.69 \pm 0.71 ^c
Fago 1 (c7c)	66.7 ^c	-0.54 \pm 0.11 ^c	-0.85 ^c	3.25 \pm 0.60 ^a
Fago 7 (c7c)	90.0 ^b	1.72 \pm 0.38 ^c	-2.72 ^c	3.15 \pm 0.76 ^{ab}
Fago 15 (12 mer)	63.6 ^c	14.52 \pm 2.06 ^b	23.0 ^b	2.66 \pm 0.99 ^b
Fago 18 (12 mer)	62.5 ^c	-1.20 \pm 0.06 ^c	-1.90 ^c	3.18 \pm 0.63 ^{ab}
Fago M13	70.7 ^c	3.62 \pm 0.62 ^c	4.38 ^c	3.06 \pm 0.74 ^{ab}
No Inm. Des.	76.9 ^c	-17.14 \pm 3.80 ^d	-27.2 ^d	3.80 \pm 0.25 ^a

	Índice protector de severidad de lesiones (%)	Eliminación de ooquistes ($\times 10^6$) (media \pm DE)	Tasa de disminución de ooquistes (%)	Índice anti-coccidial
No Inm. No Des.	100.0	0.00 \pm 0.00 ^c	100.00	200
Vacuna Sz	81.8	0.14 \pm 0.09 ^c	97.41	187
Fago 1 (c7c)	14,5	5.12 \pm 0.94 ^{ab}	5.36	-4
Fago 7 (c7c)	17.1	3.41 \pm 1.24 ^{ab}	36.97	31
Fago 15 (12 mer)	30,0	3.97 \pm 0.93 ^{ab}	26.62	31
Fago 18 (12 mer)	16.3	3.21 \pm 0.96 ^b	40.67	5
Fago M13	19.5	3.96 \pm 1.16 ^{ab}	20.89	16
No Inm. Des.	0.00	5.41 \pm 2.12 ^a	0.00	-28

Nota: Dentro de cada columna existe diferencia significativa ($P < 0.05$) entre cada uno de los valores con diferente literal. No hubo diferencia significativa entre los valores que comparten la misma letra. $n=20$.

De los grupos desafiados, el grupo inmunizado con esporozoitos completos de *E. tenella* mostró la menor eliminación de OPGH, aunque presento cantidad de OPGTC, ésta fue significativamente menor ($p < 0.05$) a la cantidad de OPGTC contabilizados en los grupos inmunizados con fagos y en el grupo testigo NID (Figura 61). El grupo NID elimino una gran cantidad de OPGH, aunque no difirió con relación a los OPGH eliminados por los grupos inmunizados con los inmunótopos y M13 *wt*, fue significativamente mayor ($p < 0.05$) al grupo F.18 y Sz completos. Los grupos inmunizados con los 4 inmunótopos no fueron diferentes entre sí, ni con el grupo M13 *wt*, pero si con el grupo inmunizado con Sz completos (Fig.61). De todos los grupos de fagos desafiados el grupo F.18 mostró la mayor tasa en la disminución de eliminación de ooquistes (40.67%), aunque el único con tasa de disminución $> 65\%$ fue el grupo de la vacuna de esporozoitos de *E. tenella* completos (Tabla 31).

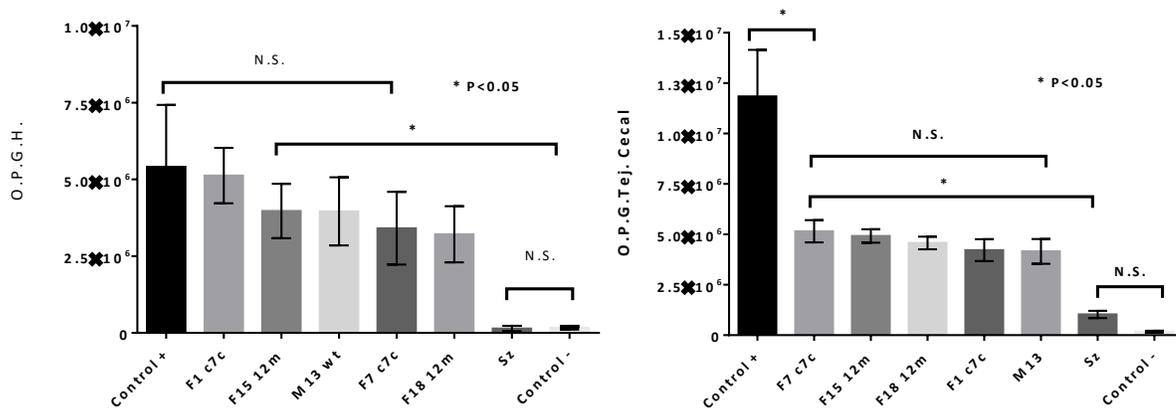


Figura 61. Cantidad de ooquistes de *E. tenella* contabilizados con la técnica de McMaster en las muestras de heces y tejido cecal de aves inmunizadas con los fagos 1 y 7 de Ph D c7c, F.15 y F.18 de Ph D 12mer, el fago M13 mp19 *wt*, esporozoitos completos de *E. tenella*, y grupos testigos N.I.D., y N.I.N.D.

El grupo con la mayor severidad de lesiones fue el testigo NID, los grupos F.1, F.7, F.18 y M13 no fueron diferentes a este grupo. Los grupos F.18, F.7, F.15 y M13 no difirieron entre sí, sin embargo, mostraron una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) con relación a la severidad de lesiones del grupo inmunizado con Sz. El grupo F.1 mostró mayor severidad de lesiones ($p < 0.01$) que las mostradas en el grupo F.15. El grupo Sz presentó la menor severidad de lesiones ($p < 0.01$) con relación a los grupos inmunizados con Fagos y grupo NID, sin embargo, presento mayor valor ($p < 0.01$) al del grupo testigo NIND. De los grupos desafiados el grupo inmunizado con esporozoitos completos fue el único que mostró un índice protector $> 65\%$ (Figura 62, Tabla 31).

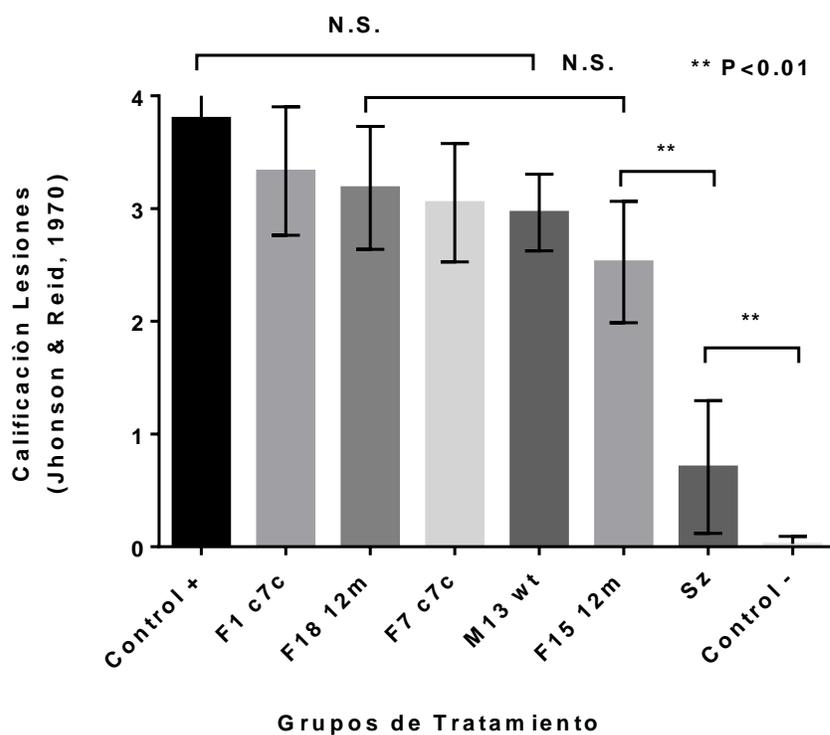


Figura 62. Calificación de la severidad de lesiones en aves *SPF Leghorn White* inmunizadas al día 1 y 10 de edad con las clonas F.1 y F.7 de la biblioteca c7c, F.15 y F.18 de la biblioteca Ph D 12mer, el Fago M13 *wt* y 5.3×10^6 esporozoitos completos/ave, 7 días después del desafío con 3×10^4 ooquistes de *E. tenella*/ave (Jhonson & Reid, 1970).

La mortalidad en el grupo F.7 fue menor ($P < 0.05$) a la observada en los tres grupos inmunizados con las clonas candidatas F.1, F.15 y F.18, el M13 mp19 *wt* y el grupo NID, los cuales presentaron alta mortalidad y no difirieron entre sí. La mortalidad de todos los grupos de fagos y el grupo NID fue mayor ($P < 0.05$) al grupo inmunizado con Sz completos de *E. tenella* y al grupo NIND, ambos no presentaron aves muertas (Figura 63, Tabla 31).

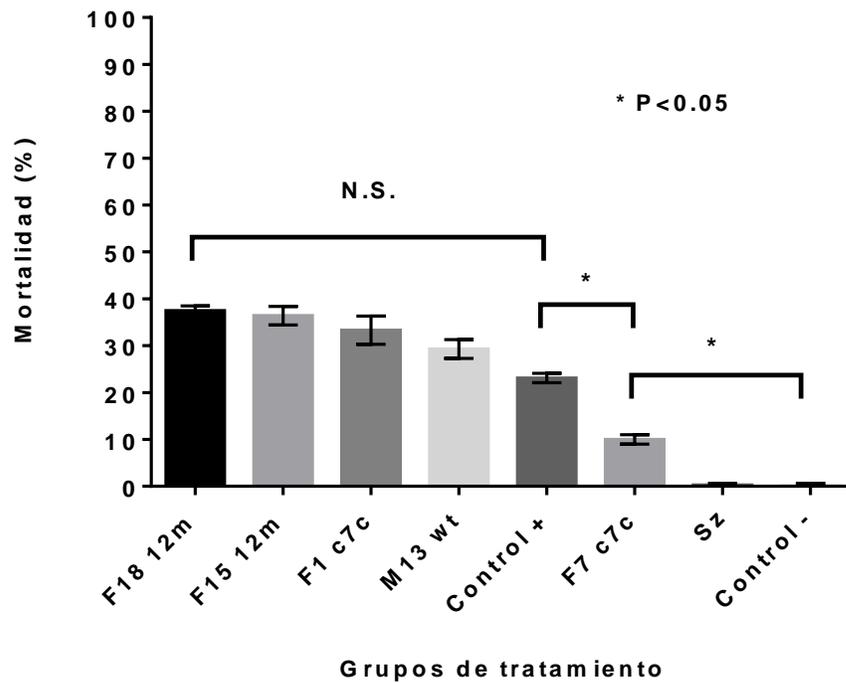


Figura 63. Mortalidad en prepatencia después del desafío al día 21 de edad con 3×10^4 ooquistes de *E. tenella* a aves *SPF Leghorn White* inmunizadas previamente al día 1 y 10 de edad con las clonas F.1 y F.7 seleccionadas de la biblioteca de Ph D c7c y las clonas F. 15 y F.18 seleccionadas de la biblioteca Ph D 12mer, el fago M13 mp19 wt y los esporozoitos completos de *E. tenella*, además del grupo no inmunizado desafiado.

El grupo inmunizado con Sz completos presento el mayor índice de protección anticoccidiana (IAC= 187), seguido de valores bajos en los grupos inmunizados con F.7 y F.15 (IAC= 31), y con valores muy bajos el M13 (IAC= 16) y F.18 (IAC=5). El grupo F1 (IAC= -4) y el grupo testigo NID (IAC= -28) de manera inédita presentaron un valor de IAC negativo (Figura 64, Tabla 31).

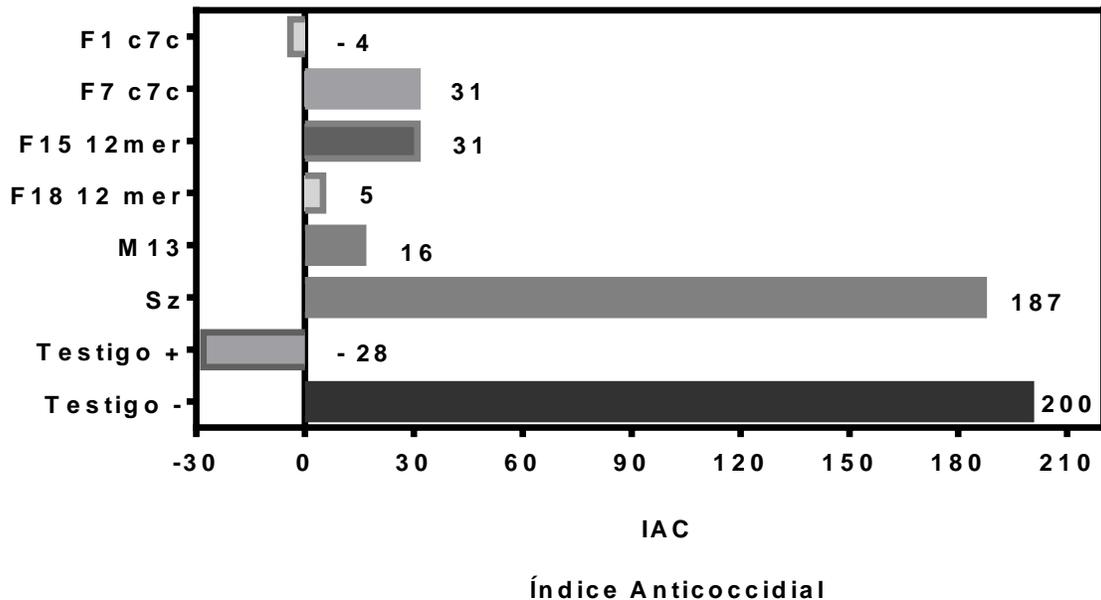


Figura 64. Índice de protección anticoccidiana frente a un desafío con 3×10^4 ooquistes de *E. tenella* al día 21 de edad de aves *SPF Leghorn White* inmunizadas al día 1 y 10 de edad con las clonas F.1 y F.7 de la biblioteca de Ph D c7c y las clonas F. 15 y F.18 de la biblioteca Ph D 12mer, el fago M13 *wt* y esporozoitos completos de *E. tenella*, aves del grupo no inmunizado desafiado y no inmunizado no desafiado. (McManus et al. 1968).

Al día tres de edad los sueros de las aves NIND muestran alta reactividad contra ambos zoitos asexuales de *E. tenella* (Figura 65). Al día 21 de edad, la reactividad de los grupos inmunizados con las 4 clonas candidatas y el fago M13 fue similar entre sí, no fueron diferentes al título mostrado por el grupo testigo NIND, pero si con el del grupo inmunizado con Sz completos. De todos los grupos inmunizados, el grupo de Szs completos mostró la mayor inmuno- reactividad, sin embargo, esta fue menor al control positivo de referencia (Suero de aves *SPF Leghorn* versus el Sz de *E. tenella*). De forma general la reactividad de los antisueros fue mayor hacia el Mz que hacia el esporozoito (Figura 65).

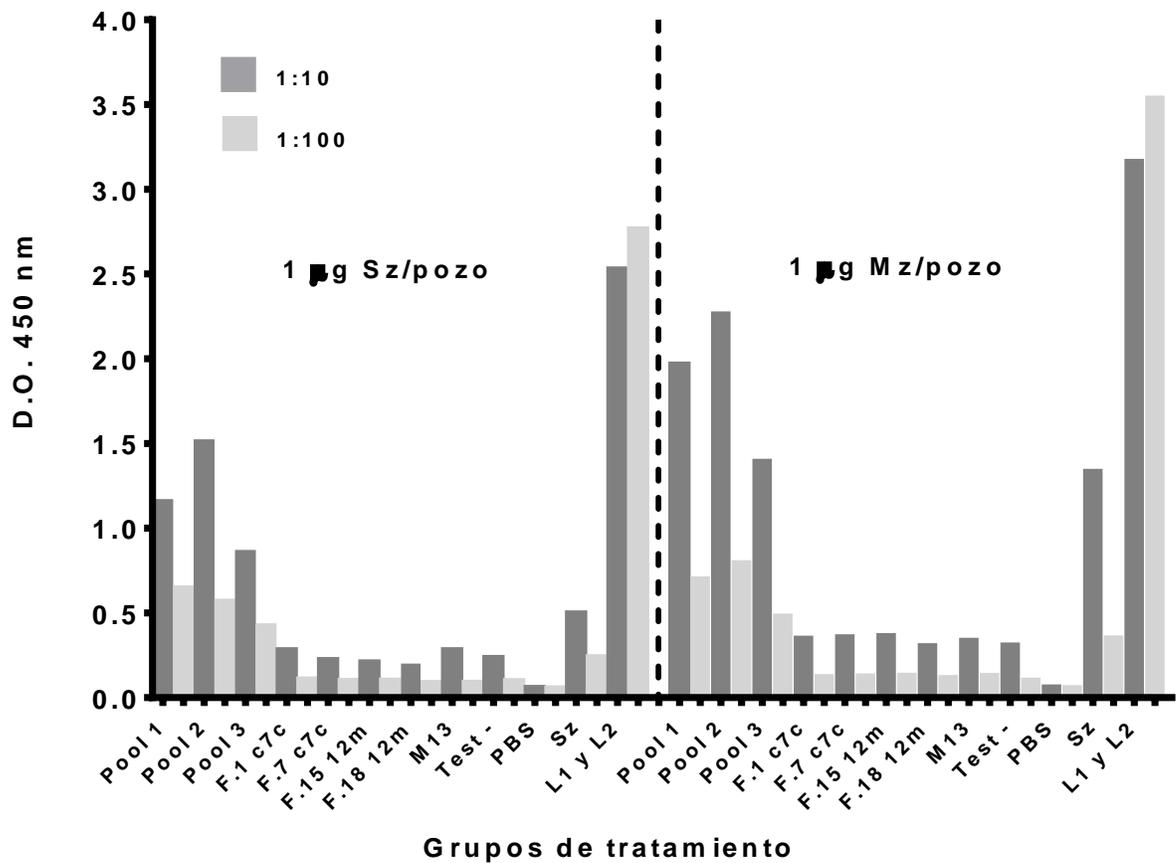


Figura 65. ELISA indirecta al día 21 de edad con sueros de aves *SPF Leghorn White* inmunizadas al día 1 y 10 de edad con las clonas F.1 y F.7 de la biblioteca Ph D c7c, y F. 15 y F.18 de la biblioteca Ph D 12mer, el fago M13 mp19 *wt* y los esporozoitos completos de *Eimeria tenella*. El suero del grupo testigo negativo se obtuvo de aves No Inmunizadas- No Desafiadas. Se incluyen tres *pools* de sueros (tres aves de 3 días de edad no inmunizadas c/uno). El antisuero positivo de referencia (aves *SPF Leghorn* inmunizadas vs Sz de *E. tenella*, L1 y L2). Lecturas de OD por duplicado, Anticuerpo primario a 1:10 y 1:100, Anticuerpo secundario 1:4,500, Colorimetría 100 µL de TMB dimetil sulfóxido, 20 min de reacción HRP con H₂O₂ y paro de reacción con 100 µL/pozo de 2N H₂SO₄. Espectrofotometría de absorbancia a 450 nm.

3.10 Inmunoprotección de aves SPF Leghorn inmunizadas con inmunógenos mixtos compuestos por las clonas F.1, F.6 y F10' de Ph D c7c, y F.11, F.15, F.18 de Ph D 12 mer, frente a un desafío patógeno con E. tenella

El peso promedio de las aves al día de edad fue de 38.5 g. Al día 25 de edad, fecha del desafío, no hubo diferencia entre los pesos promedio de los dos grupos inmunizados con los fagos (mezcla F de Ph D c7c= 169.26 g/ave; mezcla F de Ph D 12 mer= 167.76 g/ave), pero si con relación al resto de los grupos (M13 irrelevante= 175.71g/ave; Sz=185.17g/ave; Grupos testigo (+) y (-) = 173.85 g/ave) (Figura 66).

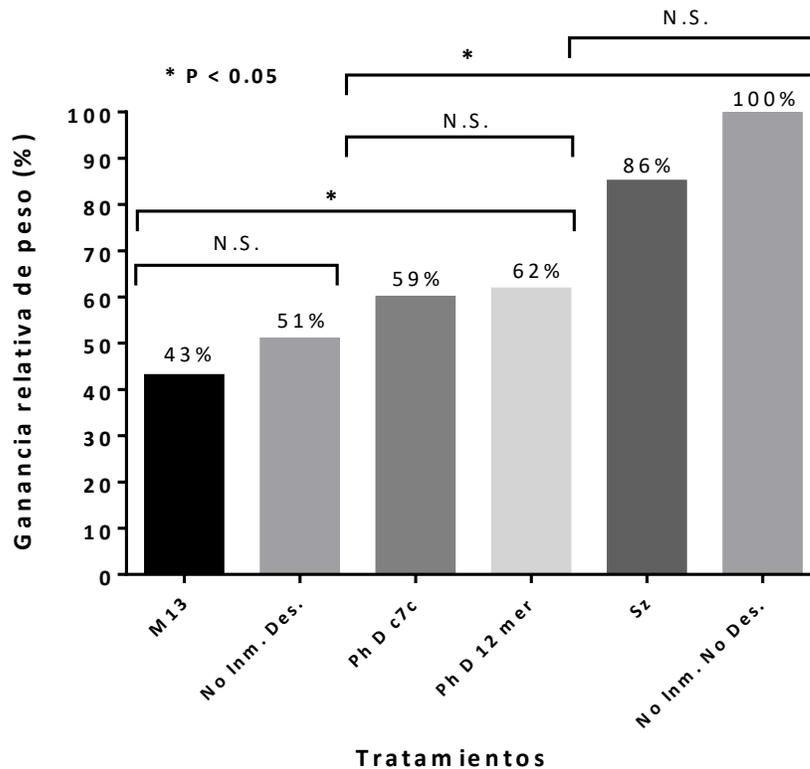


Figura 66. Ganancia relativa de peso corporal de aves *SPF Leghorn White* inmunizadas con fagos seleccionados de la biblioteca Ph D c7c, y Ph D 12mer, M13 irrelevante, esporozoitos de *E. tenella* y grupos testigo No inmunizado- Desafiado y No inmunizado- No desafiado, siete días después del desafío con 10,000 ooquistes de *E. tenella*.

Al día 32 de edad, el grupo inmunizado con los Sz (peso promedio= 226.03 g/ave) mostró un peso similar a las aves del grupo NIND (peso promedio= 224.97 g/ave), ambos grupos fueron los de mayor peso, diferentes ($P < 0.05$) al resto de los grupos inmunizados y controles positivos (testigo + y M13) (Figura 66).

Tabla 32. Efecto de la inmunización y refuerzo inmunológico de aves Leghorn con dos diferentes mezclas de mimótopos (Bibliotecas Ph D c7c y 12 mer) del esporozoito de *E. tenella*, esporozoitos completos de *E. tenella* y un fago M13 mp19 wt, frente al desafío con 1×10^4 ooquistes de *E. tenella* al día 25 de edad.

Grupos	Tasa de sobrevivencia (%)	Ganancia promedio de peso corporal (g)	Ganancia relativa de peso corporal (%)	Calificación de Lesiones (media \pm DE)
No Inm. No Des.	100.0 ^a	48.63 \pm 3.90 ^a	100.0 ^a	0.00 \pm 0.00 ^c
Vacuna Sz	100.0 ^a	40.87 \pm 4.50 ^a	84.0 ^a	1.43 \pm 0.67 ^b
Fagos (c7c)	66.7 ^c	28.82 \pm 4.34 ^b	59.3 ^b	1.62 \pm 0.68 ^b
Fagos (12 mer)	62.5 ^c	29.55 \pm 3.19 ^b	60.8 ^b	2.00 \pm 0.85 ^b
Fago M13 mp19	87.5 ^b	19.90 \pm 2.70 ^c	40.9 ^c	3.17 \pm 1.01 ^a
No Inm. Des.	76.9 ^{bc}	21.77 \pm 1.68 ^c	44.8 ^e	3.46 \pm 0.40 ^a

	Índice protector de severidad de lesiones (%)	Eliminación de ooquistes ($\times 10^6$) (media \pm DE)	Tasa de disminución de ooquistes (%)	Índice anti-coccidial
No Inm. No Des.	100.0	0.00 \pm 0.00 ^d	100.00	200
Vacuna Sz	58.7	0.78 \pm 0.37 ^c	79.1	146
Fagos (Ph D c7c)	53,2	1.76 \pm 0.24 ^b	52.8	126
Fagos (Ph D 12	42.2	2.21 \pm 0.78 ^b	40.8	120
Fago M13 vs	8,4	4.81 \pm 0.43 ^a	-28.7	57
No Inm. Des.	0.00	3.74 \pm 2.01 ^a	0.00	79

Nota: Dentro de cada columna existe diferencia significativa ($P < 0.05$) entre cada uno de los números con diferente letra. No hubo diferencia significativa entre los valores que comparten la misma letra. $n=22$.

El grupo inmunizado con las mezclas de fagos de la biblioteca Ph D 12 mer (197.31 g/ave) y Ph Dc7c (198.07 g/ave) mostraron mayor ganancia de peso ($P < 0.05$) con relación al grupo

NID (202.09 g/ave) y al grupo inmunizado con el fago M13 irrelevante (195.62 g/ave). El grupo M13 mostró el peor comportamiento en ganancia de peso, aunque sin diferencia estadística su rendimiento fue menor al del grupo No inmunizado-Desafiado (Figura 66).

A excepción del grupo inmunizado con el Fago M13 en el cual murió un ave al día 5 PD, el resto de los grupos desafiados presentó nula mortalidad (Figura 67).

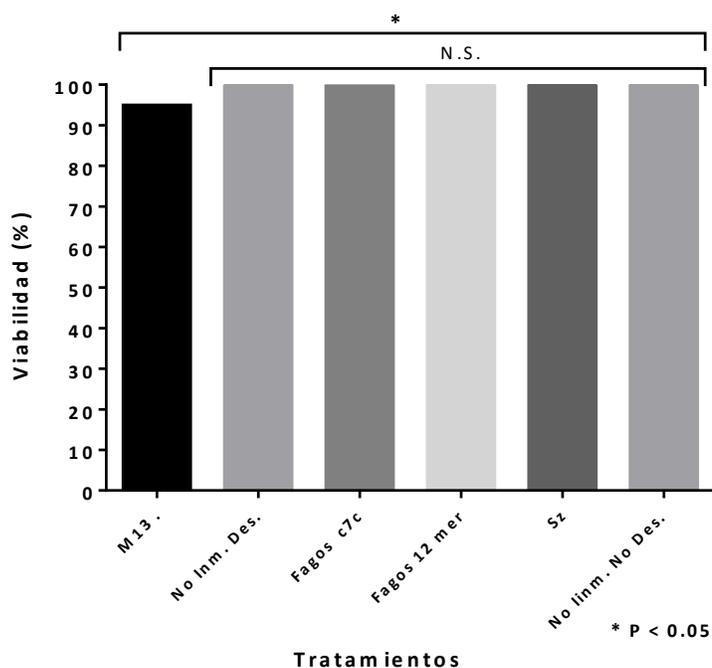


Figura 67. Viabilidad 7 días post-desafío en aves *SPF Leghorn White* inmunizadas al día 3, 13 y 20 de edad con las mezclas de fagos 1, 6 y 10 de la biblioteca Ph D c7c, y F.11, F.15 y F.18 de la biblioteca Ph D 12 mer, el fago irrelevante M13 y los esporozoitos de *E. tenella*, además de las aves No inmunizadas- No desafiadas.

El grupo con mayor severidad de lesiones fue el grupo testigo No inmunizado- Desafiado (Una de las aves presento tiflitis hemorrágica unilateral severa, la cual no se observó en ninguna de las aves del resto de los grupos desafiados), sin embargo, su calificación global de lesiones en sacos ciegos no fue diferente a la registrada en el grupo de aves inmunizadas con el fago M13 (Figura 68).

Los grupos de fagos de las bibliotecas Ph D c7c, Ph D 12 mer y el grupo inmunizado con Sz fueron diferentes ($P < 0.05$) a los grupos control + al desafío (T+ y M13). Aun cuando el grupo de aves inmunizadas con la mezcla de fagos de la biblioteca Ph D 12 mer mostró una aparente mayor calificación en severidad de lesiones, los grupos de fagos de la Ph D c7c, Ph D 12 mer y el el inmunizado con Sz completos no difirieron entre sí. De todos los grupos

desafiados, las aves del grupo inmunizado con 5.3×10^5 esporozoitos de *E. tenella* mostró la menor severidad de lesiones, sin embargo, estas fueron diferentes al grupo NIND, de hecho, las aves en este grupo no presentaron ningún tipo de lesión (Figura 68).

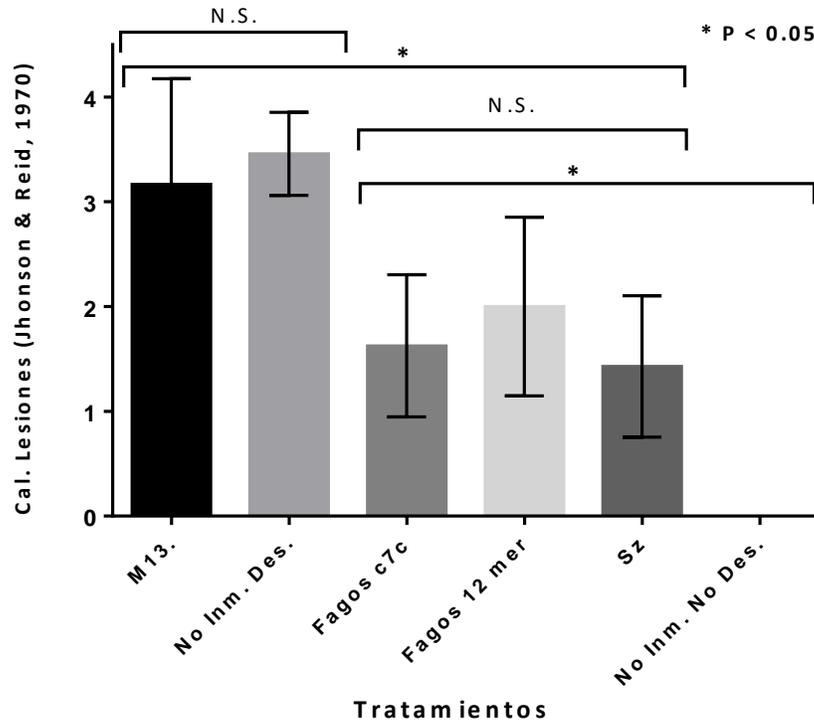


Figura 68. Calificación de lesiones siete días después del desafío con 10,000 ooquistes esporulados de *E. tenella*/ave, en aves SPF Leghorn White de 32 días de edad inmunizadas al día 3, 13 y 20 de edad con 2 mezclas de 3 fagos seleccionados a partir de cada una de las dos bibliotecas tamizadas (Ph D c7c y 12 mer), un fago M13 irrelevante y esporozoitos completos administrados por vía intramuscular,

El grupo inmunizado con SzS y la mezcla Ph D F.c7c presentaron la menor cantidad de OPGH. Aunque ambos mostraron mayor cantidad de OPGT, esta no fue diferente a la observada en el resto de los grupos inmunizados (Figura 69). El grupo inmunizado con el fago M13 mostró mayor cantidad de ooquistes en heces y tejido cecal, aparentemente la cantidad de OPGH no fue diferente al grupo testigo NID, pero si al resto de los grupos inmunizados y desafiados (Figura 69). El grupo de aves inmunizadas con la mezcla Ph D 12 mer, aunque elimino una menor cantidad de OPGH ($P < 0.05$) con relación a los grupos M13 y NID, mostró ligeramente una mayor cantidad de ooquistes en heces y tejido cecal que el grupo inmunizado con la mezcla de fagos c7c. El grupo inmunizado con los SzS mostró un

comportamiento similar al grupo inmunizado con fagos de la biblioteca Ph D 12 mer. El grupo NIND no registró la presencia de ningún ooquiste compatible con *Eimeria* sp (Figura 69).

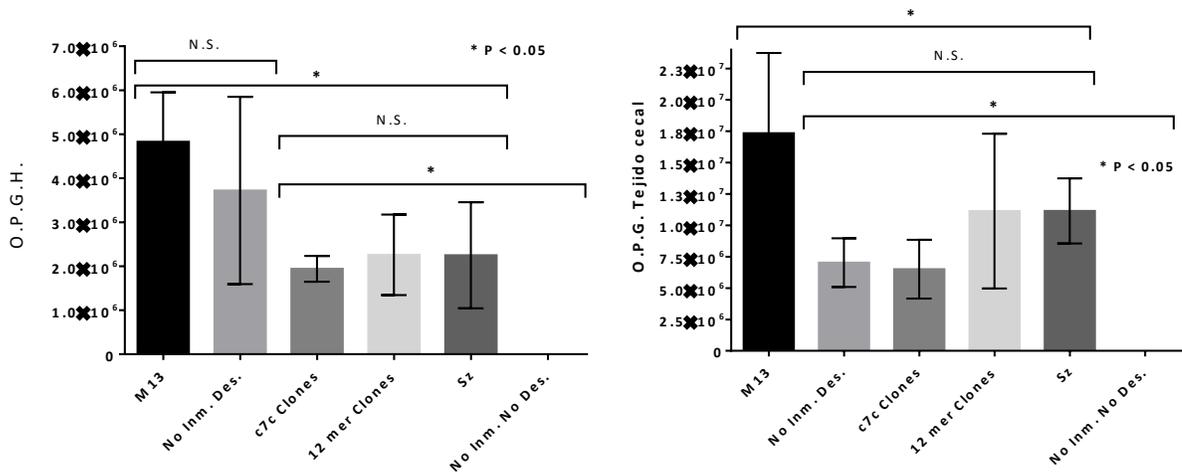


Figura 69. Ooquistes de *E. tenella* cuantificados con la técnica de McMaster en muestras de heces y tejido cecal de aves inmunizadas con la mezcla de los fagos 1, 6 y 10 de Ph D c7c y fagos 11, 15 y 18 de la Ph D 12mer, el fago M13 irrelevante, esporozoitos-completos de *E. tenella*, aves del grupo No inmunizado-Desafiado y del grupo No inmunizado-No desafiado. Se muestra el promedio y en barra ± la desviación estándar. N=20. (*P<0.05).

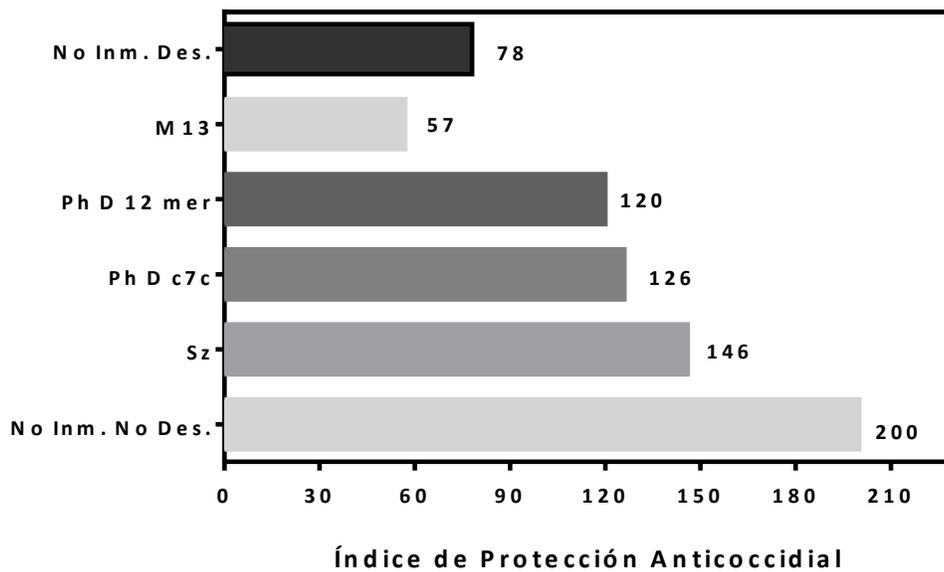


Figura 70. Índice de protección anticoccidiana de las aves inmunizadas con la mezcla de los fagos 1, 6 y 10 de Ph D c7c y los fagos 11, 15 y 18 de la Ph D 12mer, el fago M13

irrelevante, esporozoitos completos de *E. tenella*, el grupo No inmunizado desafiado y el grupo testigo negativo, después del desafío con 1×10^4 ooquistes esporulados de *E. tenella*.

Ante un desafío con 10,000 ooquistes esporulados de *E. tenella* los grupos inmunizados con las mezclas de los fagos de las bibliotecas de Ph D c7c y 12 mer mostraron un mayor IAC que el mostrado por el grupo M13 o el testigo NID, sin embargo, esta protección fue moderadamente menor que mostrada por los Szs completos de *E. tenella* (Figura 70).

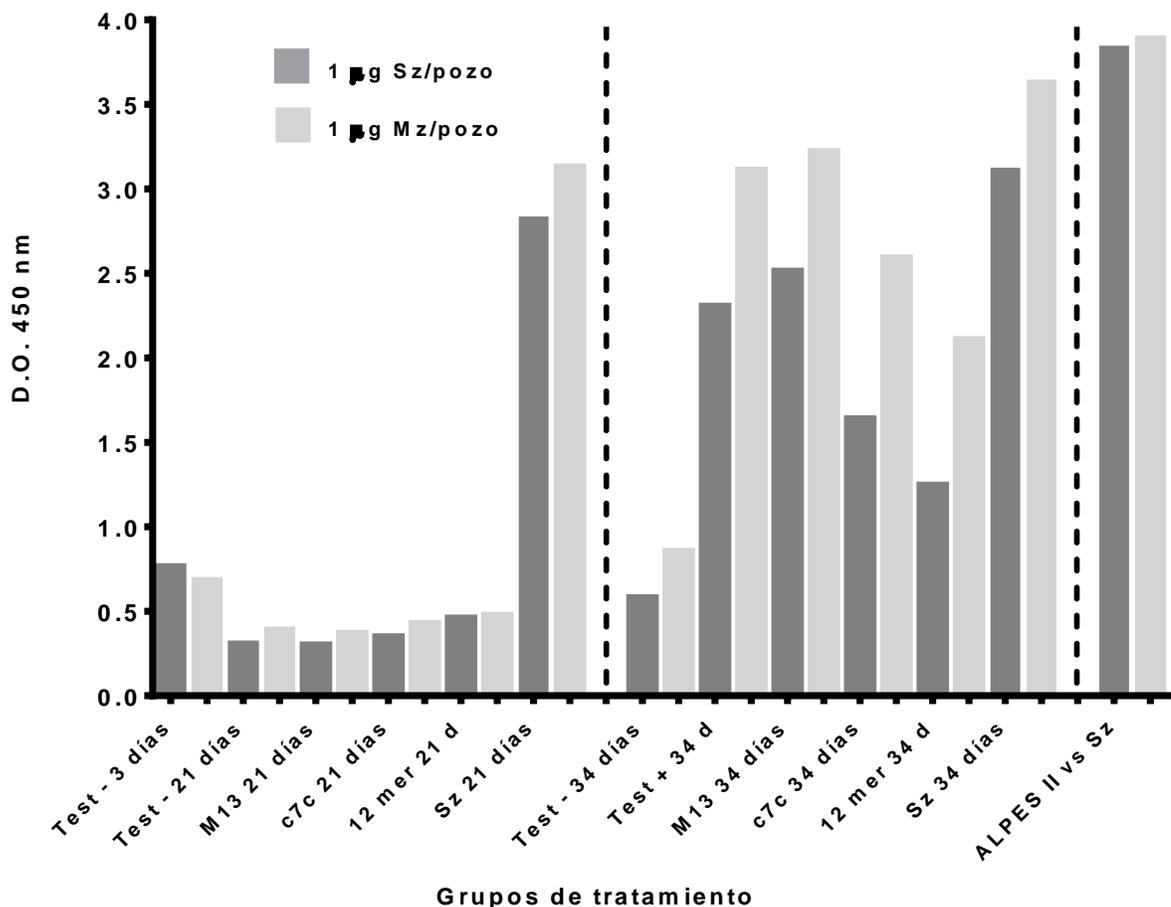


Figura 71. ELISA indirecta con sueros de aves *SPF Leghorn White* inmunizadas al día 3, 13 y 20 de edad con una mezcla de las clonas F.1, F.6 y F.10' de la biblioteca Ph D c7c, y una mezcla de F. 11, F. 15 y F.18 de la biblioteca Ph D 12mer, un fago M13 irrelevante y esporozoitos completos de *E. tenella*. Se incluyen sueros de aves testigo No Inmunizadas No Desafiadas. El antisuero positivo es de referencia (aves *SPF Leghorn White* inmunizadas vs el Sz de *E. tenella*). Lecturas OD por duplicado, Anticuerpo primario (1:10), Anticuerpo Secundario (1:4,500). Colorimetría 100 µL de TMB dimetil sulfóxido, 20 minutos de reacción

HRP con H₂O₂ y paro de reacción con 100 µL/pozo de 2N H₂SO₄. Espectrofotometría de absorbancia a 450 nm.

El suero de las aves testigo NIND sangradas al día 3 de edad muestra inmunorreactividad positiva hacia ambos zoitos asexuales de *E. tenella* (Sz OD=0.76 Mz OD=0.68) (Figura 71). Al día 21 de edad, los sueros pre- desafío de las dos mezclas de fagos (c7c: Sz OD=0.35 Mz OD =0.42 y 12 mer: Sz OD =0.46 Mz OD =0.47) aunque muestran ligeramente mayor reactividad hacia ambos estadios asexuales de *E. tenella*, no fueron diferentes al grupo inmunizado con el fago M13 (Sz OD=0.29 Mz OD=0.37) o al grupo testigo NIND (-) (Sz OD =0.30 Mz OD=0.38); únicamente fueron diferentes ($P<0.05$) con relación al grupo inmunizado con los Szcs completos de *E. tenella*, las aves de este grupo mostraron alta reactividad en esta fecha (Sz OD=2.82 Mz OD=3.12) (Figura 71).

Al día 34 de edad, los sueros de post- convalecencia de las dos mezclas de fagos (c7c: Sz OD=1.63 Mz OD=2.58 y 12 mer: Sz OD=1.24 Mz OD=2.10), mostraron mayores valores de OD con respecto al antisuero del grupo testigo NIND (-) (Sz OD=0.57; Mz OD=0.85), sin embargo, estos valores son menores a los valores OD promedio observados en los grupos inmunizados con el fago M13 (Sz OD=2.50; Mz OD=3.21) y el grupo testigo NID (+) (Sz OD=2.30; Mz OD=3.11); el grupo inmunizado con los esporozoitos completos de *E. tenella* mostró la mayor inmuno- reactividad en esta fecha (Sz OD=3.11; Mz OD=3.63), sin embargo, ésta reacción fue ligeramente menor con relación a los valores OD mostrados por el antisuero del control positivo de referencia (SPF) (Sz OD=3.83; Mz OD=3.89) (Figura 71).

4.0 DISCUSIÓN

4.1 Cepa patógena de *E. tenella*, aislamiento, replicación y recolección de ooquistes

En una tesis de maestría dirigida en 1998 por el Doctor John R. Barta (Repositorio *U. of Guelph*), se indica que para obtener la mayor cantidad de ooquistes para obtención de esporozoitos y sus fracciones, es recomendable inocular aves domésticas de 3-4 semanas con $\sim 5 \times 10^3$ ooquistes esporulados/ave, mientras que en aves >4 y hasta 6 semanas de edad se pueden emplear $\sim 6 \times 10^3$ ooquistes esporulados/ave, en tanto que aves >6 semanas se recomienda utilizar $\sim 7 \times 10^3$ ooquistes esporulados frescos/ave (ooquistes con máximo 2 semanas después de completar su esporulación), estas cantidades son similares a las recomendadas por Morales y Lucio (2012) para la obtención de IgYs específicas de yema de huevo. De acuerdo con Tomley (1997) la dosis de ooquistes, el método y el periodo de recolección de ooquistes depende de varios factores como la edad y estirpe de las aves utilizadas para la replicación de la cepa de *Eimeria* sp., tiempo de almacenaje de los ooquistes y la etapa de desarrollo que se desea obtener. La Dra. Fiona Tomley (1997) indica que para el aislamiento y replicación de cepas salvajes de *E. tenella* análogas a la empleada en el presente estudio, por ejemplo, se deben infectar vía oral (per os) aves de la raza *Light Sussex* de 6 a 8 semanas de edad con dosis de $\sim 10^3$ a $\sim 6 \times 10^3$ ooquistes esporulados (Regla *ad hoc*: entre más frescos los ooquistes, menor la cantidad a emplear) y la recuperación debe efectuarse directamente de los sacos ciegos 7 días después utilizando tratamiento químicos o enzimáticos. Una vez que los ooquistes han sido recolectados, limpiados y esporulados se pueden almacenar a 4°C, aunque bajo estas condiciones pueden permanecer viables por varios meses, es mejor utilizarlos tan pronto como sea posible después de su esporulación, sobre todo para estudios que requieran una eficiente recuperación de esporozoitos o altos niveles de tasas de invasión celular (bioensayos). Como regla de trabajo, Tomley (1997) recomienda utilizar estos ooquistes para experimentos dentro de un periodo máximo de 8 semanas después de su recolección. Aparentemente el grado de frescura del inoculo después de su esporulación determina mayor patogenicidad, por lo cual en los estudios de potencia u obtención de ooquistes esporulados además de considerar la cantidad de ooquistes por ave y la edad de estas, se debe tomar en cuenta el grado de frescura de los ooquistes esporulados a utilizar. En la discusión de los resultados del protocolo de prueba de dos dosis primarias de inmunización de ooquistes esporulados de *E. tenella* utilizadas para la obtención de la mayor cantidad de ooquistes (*stock* de laboratorio

experimental) y anticuerpos positivos a *E. tenella* se amplía y profundiza más sobre la relevancia de ambos parámetros (Capítulo 4.4).

4.2 Obtención de esporoblastos y esporozoitos de *E. tenella*

La pared del ooquiste de *Eimeria* sp aviar muestra una estructura única que le confiere una gran resistencia a las condiciones ambientales más adversas (Belli et al., 2006). Existen varios métodos que pueden utilizarse para romper la pared del ooquiste en *Eimeria* sp; los más comunes incluyen sonicación, microondas, calentamiento y maceramiento en mortero (Landers, 1960). La mayor ventaja de utilizar perlas de vidrio para romper la pared es que representan una forma eficiente para procesar de forma económica grandes cantidades de ooquistes. El concepto de trituración mecánica con perlas de vidrio proviene de extrapolar el mecanismo *in vivo* por el cual los ooquistes son triturados en la molleja del ave con ayuda del *gritt*. Bajo este contexto se ha observado, por ejemplo, que para lograr la liberación de esporoblastos de *E. separata* se requiere usar ácido clorhídrico, pepsina y tripsina (Kowalik y Zahner, 1999). El pretratamiento de ooquistes de *E. nieschulzi* con pepsina desestabiliza la estructura de la pared del ooquiste, asegurando que la rotura mecánica por agitación con perlas de vidrio sea más eficiente (Kurth y Entzeroth, 2008). Krücken et al (2008) describieron que la estructura de la pared de los ooquistes de *E. tenella* se rompe utilizando un simple homogeneizador de tejido recubierto de teflón sin pretratamiento previo. Los esporoblastos de *E. tenella* han sido liberados también por medio de agitación a alta velocidad de los ooquistes con perlas de vidrio de 4 mm (Wagenbach, 1969). En nuestro estudio la obtención de los esporoblastos de *E. tenella* no requirió enzimas, únicamente perlas de vidrio. La alta resistencia mecánica de los ooquistes de *Eimeria* sp requiere de una gran cantidad de perlas de vidrio durante la agitación con el vortex. De forma análoga a lo utilizado aquí, Dulski y Turner (1988) previamente habían ya descrito un protocolo para romper los ooquistes de *E. tenella* utilizando perlas de vidrio de 3 mm, descubrieron que aproximadamente el 60% de los ooquistes se rompían por agitación orbital a 200 rpm. Por otra parte, los ooquistes de *E. tenella* colocados en un volumen igual de perlas de vidrio de 0.5 mm y expuestos a velocidad máxima de agitación dan como resultado esporoblastos completamente invisibles y vacíos (Tomley, 1997). Si se utilizan demasiadas perlas de vidrio, una velocidad muy alta o demasiado tiempo de agitación, los esporoblastos pueden dañarse. Con la finalidad de asegurar un alto rendimiento de esporoblastos intactos, el procedimiento de agitación debe detenerse después de una duración de tiempo específico (Cha et al., 2021). Después de triturar la pared de los ooquistes, los esporoblastos y las perlas de vidrio

se recolectan por separado. El uso de perlas de vidrio muy pequeñas puede resultar en una mayor dificultad para recuperar los esporoblastos. Por lo cual, con base a los resultados obtenidos por Cha et al (2014, 2021) y You (2014), y los resultados obtenidos aquí al utilizar perlas de vidrio de 1 mm por 1:10 minutos a 2000 rpm (Vortexer®) consideramos que estos parámetros pueden ser una buena opción para maximizar la liberación y recuperación de los esporoblastos. En el protocolo original de ruptura y agitación de ooquistes de *Eimeria* sp., para obtener esporoblastos provisto personalmente por el Dr. John R. Barta del Ontario Veterinary College de la U. de Guelph en Guelph Canada durante una estancia de adiestramiento, originalmente se contempla la utilización de 5×10^7 ooquistes esporulados en volúmenes parciales de 0.9 mL de PBS 1X que se agregan a un vial con 3.33 g de perlas de vidrio de $250 \mu\text{m}$, sin embargo, el vial es específico para un aparato desintegrador tipo Mickle (Brinkman Instruments, Westbury, NY. USA), en el protocolo del Dr. Barta se recomienda aplicar tiempos de ruptura por lapsos de 8-15 segundos, detenerse y verificar el porcentaje de ruptura, si quedan ooquistes por romper se recomienda llevar el proceso hasta un minuto. En este protocolo se requiere de un equipo específico (desintegrador, viales, perlas de vidrio, etc), por lo cual las condiciones de procesamiento para la obtención de esporoblastos de *Eimeria* sp., en los protocolos descritos por Dulski y Turner, (1988); Cha et al (2014, 2021) y You (2014) se adecuan mejor a las condiciones de equipamiento general de un laboratorio estándar (F.M.V.Z.-U.N.A.M.).

Con base a los resultados obtenidos se propuso adecuar un protocolo que considerará la cantidad total fija de ooquistes esporulados requeridos para cada procedimiento de ruptura, el volumen idóneo de PBS 1X en el cual se deben re- suspender estos, uso de vortex de velocidad fija, además de considerar la proporción de los ooquistes ya suspendidos con relación al volumen y peso de las perlas de vidrio, el tamaño óptimo de estas, el tamaño del vial de ruptura y el periodo de tiempo óptimo de agitación para lograr el mayor rendimiento de esporoblastos, esto de acuerdo a lo propuesto por diferentes publicaciones recientes (Cha et al., 2014, 2021; You, 2014), el objetivo era lograr un 90% de rendimiento, 30% más de lo propuesto originalmente por Dulsky y Turner (1988). Sin embargo, al analizar los artículos de Cha et al (2014) y de You (2014), la información descrita por ellos no es suficientemente clara y puntual con relación a detalles técnicos para la óptima obtención de los esporoblastos, por ejemplo, mientras Cha et al (2014) efectuó un estudio muy completo para la ruptura de ooquistes que considera tamaño de la perla de vidrio usada, tiempo de agitación y velocidad del vortex, desafortunadamente su investigación la efectuó utilizando ooquistes de otra especie (*E. acervulina*) con características morfológicas y físicas distintas a

los ooquistes de *E. tenella*. Por otra parte, aunque You (2014) trabajo con ooquistes de *E. tenella*, y de hecho con base a los resultados de ese estudio en el presente trabajo se optó por perlas de vidrio de 1 mm Θ y tiempo de agitación cercana a 1 minuto, en su investigación You (2014) utiliza únicamente una velocidad fija de agitación del vortex (3,200 rpm), además, al igual que Cha et al (2014) no especifica exactamente el tipo de vial utilizado ni la proporción óptima de cantidad de perlas de vidrio a usar con relación a la cantidad de ooquistes a romper. La pared de los ooquistes de *Eimeria* spp. tiene características *sui generis* (Belli et al., 2006). Algunas especies de *Eimeria* son más susceptibles a los agentes químicos, mientras que otras son más susceptibles a la abrasión mecánica, debido a que la pared del ooquiste de cada especie de *Eimeria* es única, y cada una se rompe o se lisa tras la aplicación de diferentes grados de tensión química o mecánica, se deben evaluar diferentes métodos para mejorar el rendimiento total de esporoblastos y esporozoitos viables con la finalidad de poder usarlos en diversas aplicaciones bioquímicas, bioensayos con cultivos de tejido y pruebas inmunológicas que consideren particularmente a este parásito.

4.3 Obtención de merozoitos de segunda generación de *E. tenella*

De acuerdo a diferentes autores, el factor más importante que puede llegar a tener un efecto detrimental dentro del proceso de purificación de los merozoitos de segunda generación de *E. tenella* es el tiempo de contacto que tienen con el buffer de lisis (Tripsina), variable que debe vigilarse estrechamente. Adicionalmente el tipo de buffer utilizado para la eliminación de los glóbulos rojos presentes en la suspensión es clave para lograr una purificación óptima sin afectar a los merozoitos. Aún cuando en el presente estudio no se pudo contar con la columna DE-52 recomendada como primera instancia para obtener un apropiado grado de pureza de los merozoitos, la adecuación de la purificación realizada con base a lo indicado por Geysen *et al* (1991), Xie et al (1990) y Liu et al (2009) permitió obtener un alto grado de pureza, lo cual se pudo verificar al analizar los resultados obtenidos en las pruebas efectuadas en los estudios de análisis de estos mismos merozoitos a través de las técnicas de ELISA indirecta, SDS-PAGE y *Western blotting* efectuadas en los estudios subsecuentes de evaluación biológica e inmunológica. Después de una búsqueda exhaustiva de la equivalencia en cantidad de merozoitos de segunda generación con relación a su masa en μg de proteína total no se logró obtener una fuente confiable o referencia de equivalencia publicada, por lo cual hasta donde sabemos por primera vez determinamos aquí una equivalencia de la cantidad aproximada de merozoitos con relación a su peso molecular proteico total: proteína total (7.5×10^6 Mz de *E. tenella* equivalen a 100 μg de proteína).

4.4 Obtención de anticuerpos séricos policlonales positivos a *E. tenella* y valoración de la máxima cantidad en la producción de ooquistes para generar un stock experimental

La respuesta inmune a coccidia después de la inmunización con una dosis baja de ooquistes se evalúa regularmente contabilizando la producción total de ooquistes (una medida aproximada de poder bloquear la capacidad del parásito para replicarse dentro de las células del huésped), mientras que después de la inmunización con una dosis alta de ooquistes los parámetros que se evalúan además de la cantidad de OPGH, es el control del sistema inmune del huésped sobre la incidencia de mortalidad, la GRP y la magnitud de las lesiones en intestino (una medida directa de la respuesta clínica- inmunológica del huésped) (Long y Millard, 1979, Lillehoj, 1988; Suprihati y Yunus, 2018; Soutter et al., 2021). Usualmente se considera que la inmunidad clínica precede a la inmunidad completa (esterilizante) contra *Eimeria* sp. (Esto último se considera como el criterio más estricto de evaluación) donde la eliminación de ooquistes es completamente negativa, sin embargo, estas medidas de observación no siempre muestran correlación entre sí (Davis et al., 1978; Smith et al., 1993; Guzman et al., 2003; Chasser et al., 2020). La disminución en la eliminación de ooquistes fecales después del desafío con *Eimeria* sp es un criterio apropiado para evaluar el grado de protección inmune alcanzada por las aves previamente inmunizadas (Lillehoj, 1988; Onaga et al., 1989; Guzman et al., 2003; Suprihati y Yunus, 2018; Chasser et al., 2020; Soutter et al., 2021). A la par de la protección clínica que proporciona una vacuna capaz de disminuir significativamente la eliminación de ooquistes, la disminución de estos es muy deseable debido a que se contribuye a reducir la contaminación ambiental por ooquistes patógenos y de esta manera se ayuda a disminuir el riesgo de infección en las aves susceptibles (Lillehoj, 1988; Chapman et al., 2005b; Dalloul y Lillehoj, 2006; Soutter et al., 2020). En el presente estudio, como principal criterio para determinar el desarrollo de inmunidad completa contra *Eimeria tenella* después de cada infección posterior (inmunización: desafío) se verifico la cantidad de ooquistes eliminados por los dos grupos inmunizados primariamente con diferentes cantidades de ooquistes (5K y 10K).

Después de la primer inmunización, las aves del grupo 5K mostraron la mayor eliminación de OPGH, sin embargo, desde el principio de la infección y con base a la cantidad de esporozoitos liberados a partir de los ooquistes de la primera dosis inmunizante estas aves aparentemente fueron más capaces de conservar suficiente cantidad extra de enterocitos y linfocitos intraepiteliales en los sacos ciegos después de las primeras fases de esquizogonia y merogonia, por lo cual, los estadios asexuales y sexuales posteriores a las etapas iniciales

podieron completar exitosamente su desarrollo dando como resultado la eliminación final de una gran cantidad de OPGH (característica clásica descrita anteriormente ya para una dosis tipo “*crowding- threshold*” que es cercana o lindero al límite máximo de replicación tisular) (Williams, 1973; Williams, 2001; Johnston et al., 2001) lo que permitió a su vez que las aves fueran aptas para desarrollar una inmunidad temprana apropiada (Davis et al., 1978; Rose y Hesketh, 1987; Lillehoj, 1988; Suprihati y Yunus, 2018; Soutter et al., 2021). A las 17 semanas de edad, después del segundo desafío, el grupo 5K no mostró presencia detectable de ooquistes en heces, lo que significa que estas aves alcanzaron en esta fecha un estado de inmunidad esterilizante.

Después de la primer inmunización, durante la etapa de prepatencia, las aves del grupo 5K presentaron únicamente signos clínicos moderados, esto indica que el parásito produjo únicamente inflamación y daño tisular moderado (Davis et al., 1978; Suprihati y Yunus, 2018; Soutter et al., 2021). En contraste, las aves del grupo 10K eliminaron significativamente menor cantidad de ooquistes en heces después de la primer infección, sin embargo, estas aves continuaron eliminando cantidades significativas de OPGH en el transcurso de las semanas posteriores a los dos desafíos que siguieron a la primo- inmunización, esta eliminación de OPGH en el grupo 10K continuo incluso después del último desafío, lo que indica que estas aves fueron inhábiles para desarrollar inmunidad esterilizante. La ausencia del cese en la eliminación de OPGH de estas pollonas sugiere que adquirieron una inmunidad muy pobre desde la primer inmunización y consecuentemente las aves de este grupo solo pudieron desarrollar una respuesta inmune débil después de cada desafío. En contraste a lo observado aquí, Ryley et al., (1976) mostraron que aves inmunizadas primariamente con 1×10^4 ooquistes/ave eliminaron una mayor cantidad de OPGH que aves inmunizadas primariamente con 5×10^3 ooquistes/ave, sin embargo, estos investigadores reconocieron que este evento no fue consistente y que la edad de las aves puede volverse una limitante entre la producción óptima de ooquistes (para generar un *stock* experimental o vacunal) y el incremento en la tasa de mortalidad que se presenta después de la infección. Recientemente, Soutter et al (2021) usaron dosis experimentales de ooquistes de *E. tenella* (cepa Houghton) definidas por ellos mismos como dosis altas (4×10^3 , 8×10^3 y 1.2×10^4 ooquistes/ave) para inmunizar a tres diferentes estirpes de aves (Hy-line Brown, Hy-line Silver Brown y Lohmann Brown), esto con el objetivo de evaluar con base al genotipo específico de ave utilizado cada una de las respuestas inmunes exhibidas por cada estirpe, para lo cual después de la inmunización analizaron la tasa de replicación del parásito, la severidad de lesiones producidas y la transcripción de citocinas específicas indicadoras del

tipo de respuesta inmune específica en los sacos ciegos. A diferencia de nuestro estudio Soutter et al (2021) no observaron mortalidad entre las aves de las tres estirpes analizadas, aún empleando la dosis más alta (1.2×10^4 ooquistes/ave), dosis que fue ligeramente mayor a la que usamos nosotros (10K). Soutter et al (2021) determinaron que las diferentes magnitudes en las dosis que emplearon no reveló una variación significativa en el grado de lesiones inducidas, esto específicamente sobre la tasa de replicación del parásito o en la expresión cecal de citocinas inmunes. De forma general los resultados del estudio de Soutter et al (2021) no son acordes con los hallazgos que nosotros observamos en nuestro estudio. Esto podría indicar tres hechos importantes (i) la cepa específica de *E. tenella* usada en cada uno de los ensayos experimentales tanto en el de Soutter et al (2021) (cepa Houghton) como en el nuestro (cepa QRO-15) es la clave para explicar los diferentes niveles de habilidad para la invasión celular del parásito (patogenicidad) *per se*, la magnitud de la inflamación inducida por la invasión del mismo (patogenicidad) y por lo tanto los diferentes patrones de mortalidad observados; (ii) la estirpe y edad de las aves en cada estudio experimental fueron diferente y por lo tanto explicarían un efecto clave en los resultados observados; (iii) o bien, la cantidad real de los ooquistes esporulados que se cuantificaron para formular las diferentes dosis de inmunización en cada caso no fueron tan precisas como deberían ser, por ejemplo, el equipo de Soutter et al (2021) utilizó la cámara de recuento Fuchs-Rosenthal (0.2 mm *depth*) (Tomley, 1997) para efectuar estas determinaciones, y de acuerdo a la validación de confianza de los conteos de ooquistes de *E. tenella* realizados a través de pruebas de homocedasticidad de varianza (Prueba de Hartley) efectuados previamente por Juárez et al (2002) con ooquistes de *E. tenella* en suspensión, este tipo de técnica diseñada para el conteo de células sanguíneas no es estadísticamente confiable para la estandarización de inóculos de ooquistes parasitarios, la técnica más precisa para determinar con adecuada certidumbre estadística (parámetro sugerido por Ronald A. Fisher: $P < 0.05$) la cantidad real de ooquistes de *E. tenella* en una muestra o inóculo hasta ahora es la cuantificación de ooquistes de *E. tenella* utilizando la técnica de dilución en SSS utilizando para ello la cámara de McMaster (Marienfeld™ Lauda-Königshofen, Germany) (Long y Rowell, 1958). Otro hecho importante a considerar en este tipo de ensayos experimentales al margen de los tres mencionados anteriormente es tomar en consideración que tan fresco se encuentra el inóculo de ooquistes esporulados al momento de utilizar estos. Por ejemplo, Tomley (1997) considera que este es el principal criterio que debe determinar la decisión de que cantidad de ooquistes deben utilizarse para los ensayos experimentales de inmunización/desafío (entre más recientes se encuentras los ooquistes después de su

esporulación menor deberá ser la cantidad a incorporar en el inóculo), de hecho, esta investigadora recomienda el uso de ooquistes esporulados de *E. tenella* para la formulación de los inóculos de infección dentro de un periodo no mayor a 8 semanas después de su esporulación, Tomley (1997) determinó que para optimizar la cantidad obtenida de ooquistes en heces (típicamente se pueden obtener hasta 10^8 ooquistes totales por ave) se deben inocular oralmente pollos de una raza como Light Sussex de 6 a 8 semanas de edad con 10^3 a 6×10^3 ooquistes esporulados de *E. tenella*. Con el objetivo de obtener un óptimo stock de ooquistes de *E. tenella*, Ryley et al (1976) indicaron que la edad de las aves a inocular es otro parámetro importante en la selección de la dosis inicial. Varios investigadores han utilizado dosis altas de *E. tenella* (1×10^4 ooquistes/ave) con la creencia de que dosis altas dan como resultado mejor exposición a los parásitos y por lo tanto generan títulos altos de anticuerpos PI (Williams, 1973; Davis et al.1978; Lillehoj, 1988; Gilbert et al, 1988; Onaga et al., 1989; Smith et al., 1993; Morales y Lucio, 2012). Sin embargo, de acuerdo con nuestras observaciones, la inmunización primaria con 10K resultó en una menor cantidad total de ooquistes eliminados y las aves mostraron signos clínicos graves, ambos efectos se acompañaron con un desarrollo parcial mediocre de inmunidad contra coccidia (cantidad de OPGH producidos y persistencia en su eliminación aún después del segundo desafío).

Chapman y Rayavarapu (2007) observaron que los pollos inmunizados primariamente con 1×10^5 ooquistes/ave de *E. maxima* durante el periodo de prepatencia mostraron una baja ganancia de peso corporal, sin embargo, ninguna de las aves murió; aunque todas las aves sobrevivieron, estos investigadores no registraron el tipo específico de signos clínicos que las aves presentaron de manera cronológica, a diferencia de nuestro estudio, en el cual todos los signos clínicos se describen y califican de acuerdo al tiempo y grado de severidad con el que se presentan en ambos grupos inmunizados. La severidad de los signos clínicos en las aves inmunizadas con la mayor dosis de ooquistes (10K) fue mayor, lo que indica que la afectación del estado general de salud en estas aves va a la par con los eventos severos de inflamación que ocurren a nivel de tejido intestinal durante el periodo inmediato posterior a la primer infección (Ryley et al., 1976; Davis et al.1978; Lillehoj, 1988; Suprihati y Yunus, 2018; Soutter et al., 2021). Aunque subvalorada por muchos investigadores no veterinarios, la descripción y calificación de los signos clínicos en este tipo de pruebas contribuye a generar información muy valiosa acerca del efecto que la cantidad de ooquistes de *Eimeria* sp., utilizada en la inmunización primaria muestra sobre el estado general de salud de las aves, sin embargo, no existe un estudio puntual que categorice específicamente la magnitud en la signología clínica presentada de acuerdo a la cantidad de ooquistes inoculados

primariamente (Suprihati y Yunus, 2018; Soutter et al., 2021), por lo cual se requiere ahondar en el futuro sobre este aspecto.

La cantidad de tejido intestinal remanente que permanece sano después de la infección con *Eimeria* sp., se encuentra determinada por la cantidad inicial de ooquistes utilizados en la dosis de inmunización primaria y en la resolución clínica efectiva que muestra la respuesta inmune del ave inmediatamente después de la primer inmunización (Lillehoj, 1988; Williams, 2001; Juárez et al, 2007). Generalmente los estados endógenos tempranos del ciclo de vida de *E. tenella* se consideran mucho más inmunogénicos que los estadios asexuales y sexuales tardíos (McDonald et al, 1988; Lillehoj y Trout, 1993, 1996; Constantinoiu et al., 2008; Suprihati y Yunus, 2018). Después de la primer infección, los últimos estadios de *Eimeria* sp., requieren un mínimo remanente de enterocitos sanos para poder replicarse, por lo cual, también debe existir cantidad suficiente de DC, MΦ, NK y LT intraepiteliales con la finalidad de que estas células inmunes sean capaces de montar una rápida respuesta inmune eficaz (Rose, 1987; Lillehoj y Trout, 1993, 1996; Dalloul y Lillehoj, 2006). Si la infección primaria (estrategia de inmunización) genera una alta presión inicial de infección, las células huéspedes son destruidas en gran proporción antes de que el desarrollo del parásito se complete reduciendo de esta forma la cantidad de ooquistes producidos y limitando el desarrollo de una respuesta inmune apropiada. Davis et al (1978) sugirió que el nivel de inmunoglobulinas contra *E. tenella* se encuentra directamente relacionado a la cantidad de células linfoides presentes en la submucosa intestinal. Por lo cual, si una dosis de saturación (*crowded dose*) de *E. tenella* disminuye prematuramente la disponibilidad de células linfoides a este nivel de tejido las células inmunes remanentes sobrevivientes no pueden montar una respuesta inmune exitosa (Lillehoj, 1988). Los mecanismos de control de coccidiosis aviar por medio de inmunización concomitante a la presencia de células entéricas sobrevivientes en las cuales el parásito pueda replicarse dependen principalmente de un desarrollo temprano de inmunidad ligada a células (Rose y Long, 1971; Lillehoj y Trout, 1996; Rose y Hesketh, 1982). Con base a los resultados observados aquí se puede determinar que inmediatamente después de la primer inmunización con la dosis de 5×10^3 oocistos/ave debió haber habido aún suficiente cantidad de GALT, el cual fue suficiente para montar una respuesta inmune eficaz contra este parásito (Lillehoj y Trout, 1996). Es evidente que en este grupo (5K) inmediatamente después de la primer infección, las DC, MΦ, LT, LB y NK, pudieron desplegar una rápida respuesta de inmunidad adaptativa contra *E. tenella* (Dalloul y Lillehoj, 2006). Mientras que el grupo 10K mostró un clásico efecto de saturación temprana del tejido intestinal, a esta dosis de ooquistes y debido a los efectos observados en

este grupo en particular se le describe como una “*crowded dose*”, sus efectos sobre la cantidad de OPGH eliminados y las tasas de mortalidad ocasionadas en las aves afectadas ha sido ya revisado previamente por Ryley et al (1976) y Williams (1973, 2001). Se requiere de estudios adicionales que ayuden a dilucidar las posibles discrepancias observadas entre las cepas de *E. tenella* usadas (e.g. Houghton vs QRO-15), edad y bagaje genético de las aves experimentales (e.g. consanguíneo vs híbrido), exactitud en la cantidad de ooquistes del inóculo experimental (e.g. McMaster vs FLOTAC), grado de frescura del inóculo, magnitud de daño intestinal y signos clínicos inducidos bajo diferentes dosis de infección primaria.

Al utilizar la prueba de ELISA indirecta se observó que la dinámica en la respuesta de anticuerpos contra los antígenos del Sz y Mz fue bastante similar, lo cual provee fuerte evidencia de que ambos estadios asexuales comparten una gran cantidad de Ags en común (Constantinoiu et al., 2007; Reid, et al., 2014; Liu et al, 2017; Liu et al, 2020a; Juárez-Estrada et al., 2021a). Los anticuerpos del grupo 5K reconocen ambos estadios de vida de *E. tenella* (Sz y Mz), además, después de la inmunización primaria mostraron mayores títulos de absorbancia en comparación con los exhibidos por el grupo 10K, esto indica un desarrollo general positivo de la respuesta inmune en el grupo inmunizado con la menor cantidad de ooquistes (5K) evaluados. Los altos títulos de anticuerpos en el grupo 5K se mantuvieron durante todo el periodo de evaluación del estudio. Aunque la prueba de ELISA se efectuó con la misma cantidad de ambos tipos de Ags por pozo (1 µg/pozo), la respuesta inmune humoral contra el antígeno del Mz en el grupo 5K fue ligeramente mayor que la reactividad mostrada contra el Sz. Los resultados concuerdan con los obtenidos por Constantinoiu et al., (2007) en su evaluación de la prueba ELISA del antisuero de aves inmunizadas con *E. tenella* utilizando 1 µg/pozo de cada uno de los dos estadios asexuales de *E. tenella* similares a los usados aquí. Constantinoiu et al., (2007) observaron que los antisueros de estas aves reaccionaron ligeramente un poco más con los Mzs que con los Szs. La reacción más fuerte en OD observada en ELISA hacia el merozoito sugiere que esta fase asexual puede ser más antigénica que los esporozoitos cuando la infección ocurre de manera natural (oral) en comparación a cuando se utiliza para la inmunización una ruta parenteral (Talebi y Mulcahy, 1995; Juárez-Estrada et al., 2021a). Este hecho probablemente se debe a la mayor cantidad de merozoitos que se liberan en las fases de merogonia que se suceden dentro del ciclo de vida del parásito, las cuales ocasionan ruptura de los enterocitos y en consecuencia eventos de inflamación e inmuno-mediación más robustos que los inducidos por el esporozoito *per se* al momento de la invasión primaria. Otra probable causa de esta

diferencia se debe posiblemente a una mayor expresión génica de antígenos en la fase del Mz de 2ª generación en comparación a la fase del Sz, hecho recientemente documentado por Reid, et al (2014), donde, por ejemplo, observaron que el Sz posee únicamente 4 tipos de SAGs (*GPI anchorage*) mientras que la cantidad de este tipo de SAGs en el merozoito es mucho mayor. Debido a la gran cantidad de Mzs que se producen durante el ciclo de vida natural del parásito y al alto grado de dificultad técnica que implica obtener los Szs a partir de los ooquistes, aunado a su bajo rendimiento, algunos investigadores han optado por usar únicamente Mzs para sus estudios de ELISA indirecta o WB (Constantinoiu et al. 2011). Después de la primer inmunización, las aves inoculadas con una menor cantidad de oocistos (5K) aparentemente fueron más capaces de mantener una cantidad suficiente de LB estimulados, y estos fueron a su vez capaces de generar suficiente cantidad de células plasmáticas y LB de memoria que permitieron desplegar una rápida respuesta anamnésica humoral protectora tan pronto como fueron desafiadas con la primer dosis extra- alta de *E. tenella* (1×10^5 oocistos/ave). Los anticuerpos en el grupo 5K reactivos a ambos estadios de vida de *E. tenella* fueron detectados 2 semanas después de la primera inmunización, este grupo mostró un pico de anticuerpos a las 6 semanas PI y después el nivel de anticuerpos declinó ligeramente antes de alcanzar una fase de meseta a las 8 semanas PI. Esta dinámica de la respuesta de anticuerpos hacia el Sz y el Mz en aves infectadas con *E. tenella* fue ligeramente diferente al patrón de reacción serológica descrita en estudios previos realizados en aves inmunizadas y criadas en piso (Onaga et al., 1989; Guzman et al., 2003; Constantinoiu et al., 2008), sin embargo, fue similar a la respuesta serológica de aves criadas en jaula y que fueron primo inmunizadas con una cepa atenuada de *E. tenella* y de forma análoga al presente estudio también fueron desafiadas subsecuentemente dos veces (Constantinoiu et al., 2008). Los anticuerpos del grupo 5K producidos después del segundo desafío, a las diez semanas de evaluación mostraron un nivel de absorbancia mayor (Mz= OD ~1.9) que el nivel mostrado en la misma fecha de evaluación por el grupo 10K (Mz= OD ~1.3). Interesantemente y conservando las proporciones metodológicas de cada estudio, en el mismo periodo de evaluación (10 sem PI) Constantinoui *et al* (2008) reportó un nivel de reactividad en su grupo inmunizado y mantenido sin recirculación de ooquistes (Mz= OD ~1.8) similar al observado en el presente estudio en la misma fecha con el grupo 5K (10 sem PI).

El patrón de respuesta humoral observado en el grupo 5K sugiere fuertemente un evento temprano de maduración inmunológica por afinidad de anticuerpos, el cual es indicativo de un desarrollo temprano de inmunidad esterilizante *versus E. tenella*. De hecho, si

consideráramos como criterio principal de inmunidad esterilizante la capacidad de las aves para mostrar una tasa cero en la producción y eliminación de ooquistes en heces después de un desafío, basándonos en nuestros resultados podemos concluir que para alcanzar la inmunidad esterilizante a *E. tenella* después de la primera inmunización con una dosis 5K, se requiere al menos de una dosis de refuerzo. Adicionalmente sugerimos que la dosis de ooquistes utilizada en el grupo 5K provee un excelente balance entre óptima producción de ooquistes (*stock* experimental o vacunal) y la producción de anticuerpos específicos a *E. tenella*, los cuales se pueden utilizar para ensayos inmunológicos de laboratorio (suero positivo de referencia), o incluso para su producción y dosificación en pollos de engorda por medio de inmunidad pasiva, esto de acuerdo a lo descrito previamente por Morales y Lucio (2012) y Juárez-Estrada et al (2021b). Aun cuando la respuesta serológica contra el Mz en el grupo 10K fue ligeramente mayor que la respuesta hacia el esporozoito, la respuesta de Abs a la más alta dilución del suero usada (1:100) mostró inconsistencia a lo largo de todo el estudio, incluso después del último desafío (1×10^6 oocistos/ave de *E. tenella*) lo cual indica una serie afectación de la inmunidad humoral en este grupo.

Al implementar una prueba de ELISA indirecta, Constantinou et al (2007) observaron reactividad similar hacia ambos estadios asexuales de *E. tenella* (Sz y Mz) por parte de los Abs generados con una vacuna comercial (*Eimeriavax 4M[®]*), sin embargo, esta respuesta fue ligeramente diferente en absorbancia y tiempo con respecto a los resultados mostrados en ambos grupos de nuestro estudio. Estas diferencias deben considerarse en un contexto de detalles técnicos como la cantidad inicial de ooquistes usados en la primo inmunización (~400 vs 5K o 10K oocistos/ave), ruta de administración (oral u ocular), tipo de cepa (atenuada o de campo), intervalo de desafío, condiciones de crianza de las aves y permitir o no recirculación de los ooquistes infectantes (cama vs jaula), o bien, condiciones particulares del inmunoensayo y del laboratorio en ambos tipos de estudio (reactivos, Abs secundarios, tipo de sustrato, tiempos de incubación, temperaturas de reacción, etc.).

Cuando en la prueba de ELISA los antisueros del grupo 5K fueron utilizados en pool, se observó que la reactividad hacia ambos estadios asexuales zoitos de *E. tenella* fue bastante homogénea, eso sugiere que todas las aves se encontraban completamente inmunes después del último desafío. Sin embargo, cuando estos mismos antisueros aleatoriamente se analizaron de forma individual (5K), cada antisuero mostró una reactividad diferente contra ambos antígenos (Sz y Mz), lo cual sugiere que estas aves (híbridas) no montan de forma individual una respuesta inmune humoral homogénea hacia ambos Ags (Figura 12). A pesar de las numerosas investigaciones efectuadas sobre anticuerpos contra coccidia en

una amplia diversidad de especies de aves y mamíferos, el papel de los anticuerpos circulantes reactivos a coccidia aún no es bastante claro (Rose, 1987; Talebi, 2001). El principal propósito de la prueba ELISA implementada en el presente estudio fue probar la inmunorreactividad humoral de un conjunto de aves más que la valoración individual (Onaga et al., 1989; Smith et al, 1993; Guzman et al, 2003; Constantinoiu et al., 2007; 2011), por lo cual una respuesta de anticuerpos distribuida de manera no uniforme en tan poca proporción de sujetos experimentales no debería ser suficiente motivo para descartar a la prueba ELISA como una herramienta útil para monitorear el grado de exposición e inmunidad contra *Eimeria* sp en aves después de una infección natural o una inmunización experimental (Gilbert et al., 1988; Guzman et al, 2003; Constantinoiu et al., 2008). De hecho, los resultados observados en el presente estudio son consistentes con datos reportados previamente, lo que muestra que la prueba de ELISA indirecta puede utilizarse como una herramienta útil para monitorear el estado inmune de las aves (Onaga et al., 1986, 1989; Smith et al., 1993; Guzman et al., 2003; Constantinoiu et al., 2007; 2008). Si bien varios investigadores han propuesto que la prueba de ELISA puede ser útil para monitorear el estado inmune de las aves debido a que el desarrollo de la respuesta inmune humoral es paralela a la generación de la respuesta mediada por células, aún se requiere contar con mayor cantidad de información para poder corroborar esta propuesta, debido a que el nivel de anticuerpos en aves individuales después de una sola infección con coccidia no siempre parece correlacionar con el nivel de protección (Smith et al, 1993; Constantinoiu *et al.*, 2008). Hasta ahora, no se ha podido establecer firmemente una vinculación directa entre nivel de anticuerpos y grado de resistencia a la infección después de una sola inmunización (Davis et al., 1978; Gilbert et al., 1988), aunque el presente estudio contribuye a arrojar luz en este aspecto, sobre todo por los niveles de Abs observados en el grupo 5K inmediatamente después del primer desafío. Actualmente, la prueba de ELISA no se puede utilizar para medir con precisión la inmunidad contra coccidia a nivel de campo, sin embargo, es una prueba muy útil para monitorear los experimentos efectuados en el laboratorio donde se requiere contar con una evidencia objetiva de la infección.

En el presente estudio el análisis de SDS-PAGE de los Szs y Mzs purificados mostró que el patrón de polipéptidos obtenidos es tan complejo como los obtenidos previamente por otros investigadores (Murray y Galuska, 1987; Tomley, 1994a; Constantinoiu et al., 2008, 2011; Al-Idreesi et al., 2013). Murray y Galuska (1987) en un SDS-PAGE de esporozoitos de *E. tenella* detectaron 11 polipéptidos (23, 28, 45, 50, 60, 82, 94, 105, 175 y 235 kDa), mientras que Al-Idreesi *et al* (2013) en un SDS-PAGE similar determinaron 11 polipéptidos de

diferente peso (10.9, 11.6, 13.9, 25.9, 37.5, 51.1, 77, 100, 107, 113 y 155 kDa). La diferencia en peso molecular de los polipéptidos detectados entre ambos estudios y el SDS-PAGE de Szs de *E. tenella* efectuado en el presente estudio podría deberse a los métodos y condiciones usadas en cada prueba o bien a las condiciones de ejecución de la técnica SDS-PAGE de cada estudio. En el futuro podría ser esclarecedor realizar una identificación por medio de 2D SDS-PAGE complementada con *Western blott* y MS MALDI-TOF.

Las membranas de *Western blotting* permitieron identificar algunas diferencias antigénicas entre esporozoitos y merozoitos, aunque la mayor parte de los antígenos observados parecen ser comunes a ambos estadios asexuales de *E. tenella*. El que Szs y Mzs comparten los mismos antígenos ha sido mostrado previamente en estudios efectuados con antisueros de aves y conejos (Ko et al., 1990; Tomley, 1994; Talebi, 1995; Talebi y Mulcahy 1995; Talebi, 2001; Constantinoiu et al., 2008; Juárez-Estrada et al., 2021a). De hecho, se ha observado que muchos antígenos con pesos moleculares mayores a 50 kDa parecen ser idénticos en ambos estadios asexuales de *E. tenella* (Murray y Galuska, 1987; Constantinoiu et al., 2008, 2011; Al-Idressi et al., 2013, 2016; Juárez-Estrada et al., 2021a). El tipo de inmunización utilizada en el grupo 5K permitió desarrollar anticuerpos específicos que reconocen un patrón claro y consistente en ambos antígenos de *E. tenella*, lo cual ocurre inmediatamente después de la primer inmunización. La alta inmuno- reactividad en este grupo se mantuvo a lo largo de todo el estudio incluso en la evaluación aleatoria individual (5K) efectuada después del segundo desafío. El antisuero del grupo 5K identifica bandas de diferente peso molecular y la resolución de estas bandas se incrementa después de cada desafío. En contraste, el antisuero del grupo 10K mostró un patrón de reconocimiento antigénico pobre en ambos estadios de *E. tenella* evaluados, incluso aún después del último desafío. La respuesta inmune en el grupo 10K mostró un deterioro severo, consecuentemente los antisueros no mostraron un reconocimiento fuerte y claro de ambos estadios de *E. tenella*, de hecho, estos antisueros apenas y lograron identificar algunas bandas de polipéptidos. En las membranas transferidas se observó que en los dos diferentes grupos de inmunización existen polipéptidos compartidos entre ambos estadios del ciclo de vida de *E. tenella*, ambos tipos de antisuero muestran un patrón inmunodominante de reconocimiento, si bien este perfil fue más relevante para el Mz que para el Sz. De hecho, los Abs del grupo 10K no reaccionaron tan fuertemente con los antígenos del esporozoito como si lo hicieron con los del merozoito, de esta forma es claro reconocer que el estadio de infección inicial del parásito (Sz) fue débilmente reconocido desde el principio de la inmunización primaria en este grupo (10K) y este reconocimiento no mejoró después de los

dos subsecuentes desafíos (Figura 11B). Esta observación sugiere un deterioro temprano de los LT CD4+, LT CD8+, MΦ, DC, NK y LB2, afectando probablemente su viabilidad en el epitelio intestinal y limitando con ello su capacidad para desarrollar una respuesta inmune fuerte y sólida hacia coccidia (Davis et al., 1978; Lillehoj, 1988; Lillehoj et al., 1989). Esto nos muestra un clásico ejemplo de la relación dosis- respuesta inmune, donde a una gran cantidad de esporozoitos infectantes se presenta un incremento en el daño de células epiteliales e intraepiteliales (GALT) (Lillehoj y Trout, 1996; Williams, 1973, 2001; Johnston et al, 2001; Dalloul y Lillehoj, 2006). Los Szs de *Eimeria* no se desarrollan en las aves que ya desarrollaron una inmunidad esterilizante, muchos son bloqueados antes de penetrar a las células y muchos no pueden seguir dividiéndose aún estando dentro de estas (Rose y Hesketh, 1987). Lillehoj y Trout (1993) han indicado que los LT CD8+ en aves están directamente involucrados en el reconocimiento y contención inmune de los estadios PI de *E. tenella*. Si la función e integridad de las CPA como MΦ, DC y LB2 se deteriora desde el principio de la primer inmunización debido a una alta dosis de ooquistes de *E. tenella*, esto podría estar ocasionando que las aves desarrollen una respuesta inmune pobre vinculada a la falta de LT CD8+ *E. tenella*-específicos presentes en los desafíos subsecuentes. En el presente estudio, los animales primariamente inmunizados con 10K mostraron un estado de inmuno- compromiso que involucró a la inmunidad celular, y de acuerdo con los resultados observados, esto sugiere también un efecto negativo grave en el procesamiento antigénico de las CPA y los LB, lo cual evidentemente influyo detrimentalmente sobre la respuesta inmune humoral a *E. tenella*. Esto nos permite concluir que si se requiere obtener una inmunidad completa contra cepas salvajes de *E. tenella* en México, la inmunización primaria con una dosis inicial de 1×10^4 oocistos/ave en pollonas de reemplazo híbridas de 8 semanas de edad no es recomendable.

En los *immunoblots* probados con el antisuero de las aves inmunizadas primariamente con 5K se reconoció una mayor cantidad de antígenos en ambas fases zoitos asexuales que los reportados previamente (Tomley, 1994; Talebi, 1995, Guzman et al., 2003; Al-Idressi et al., 2013). Aunque, la masa en peso molecular de algunos polipéptidos dominantes fueron diferentes a algunos estudios hechos previamente (Lillehoj y Trout, 1993). Por ejemplo, un antígeno de 44-45 kDa identificado en ooquistes esporulados o esporozoitos de *E. tenella* con antisuero de pollos y conejos previamente inmunizados (Tomley, 1994; Murray y Galuska, 1991; Talebi y Mulcahy, 1995, Al-Idressi et al., 2016) no se pudo detectar en nuestro estudio, esto a pesar de que pudimos observar la presencia de abundantes bandas de 42, 43 y 45 kDa en los antígenos de Szs y Mzs de nuestro SDS-PAGE. Sin embargo, si

podimos identificar algunos cercanos a estos pesos, observando bandas de polipéptidos reactivos de 42 y 47 kDa. Estas diferencias se podrían deber al efecto de la idiosincrasia en la respuesta inmune de los diferentes individuos inmunizados en cada caso, esto debido principalmente a sus haplotipos particulares de MCH-II. Por otra parte, Constantinoiu et al., (2008) en una prueba de inmunización/desafío identifico un antígeno inmunodominante en esporozoitos de 31 kDa y otro de 34 kDa en merozoitos de *E. tenella*, ambos polipéptidos con pesos moleculares estrechamente cercanos a los pesos de dos bandas similares que identificamos aquí como antígenos dominantes en los SNs de esporozoitos y merozoitos respectivamente. El polipéptido de 26 kDa que fue el más reactivo y dominante en el antígeno del Mz (presente pero tenue también en el carril del Sz) inmediatamente después de la inmunización con 5K (Figura 11A) ha sido consuetudinariamente identificado como dominante y protectoro desde estudios tempranos efectuados por Karkhanis et al (1991), este polipéptido presente también en el antígeno del esporozoito coincide con los hallazgos recientes descritos por Liu et al (2019) para la proteína de un antígeno de superficie 10 de *E. tenella* (EtSAG10) presente en la superficie de Sz, Mz y vacuola parasitófora, se ha reportado que esta proteína juega un papel importante en la infección de las aves por parte del Sz (Karkhanis et al, 1991). Aunque se han hecho diversos intentos de inmunizar a las aves con antígenos de *Eimeria* sp no viables (ooquistes s/esporear) los resultados han sido infructuosos, sin embargo, se ha descubierto que los extractos de esporozoitos u ooquistes esporulados de *E. tenella* inducen altos niveles de inmunidad protectora, se ha observado que estos extractos contienen hasta 15 polipéptidos importantes, muchos de los cuales están asociados con antígenos de superficie de los esporozoitos (20-30 kDa) los cuales son capaces de inducir una respuesta inmune óptima (Wisher et al., 1986; Karkhanis et al, 1991; Lillehoj y Trout, 1993). En las infecciones con *Eimeria* sp el reconocimiento de antígenos efectuado con los antiseros de aves previamente inmunizadas puede variar con base al origen de los Abs usados (sistémicos o locales), el paso del tiempo PI y con el tipo de cepa de *Eimeria* que se está utilizando, lo cual puede explicar las ligeras diferencias observadas en el reconocimiento de antígenos realizado por otros investigadores y los que nosotros pudimos observar aquí (Tomley, 1994; Talebi y Mulcahy, 1995; Réfega et al., 2003; Constantinoiu et al, 2011; Al-Idressi et al., 2016).

Cuando los antiseros de las aves del programa de inmunización con 5K fueron analizados de forma individual, se observó que el suero del ave uno desplegó un patrón de reconocimiento antigénico más amplio y claro hacia ambos zoitos asexuales de *E. tenella* (Figura 13), lo cual es indicativo de que esta ave desarrollo anticuerpos con mayor afinidad

hacia ambos tipos de antígenos, mientras que las aves dos y tres revelaron un patrón más débil de reconocimiento antigénico hacia ambos estadios asexuales de *E. tenella*. Sin embargo, una banda dominante de ~26 kDa fue claramente identificada por los antisueros de las tres aves, este polipéptido como se comentó anteriormente está estrechamente vinculado a SAG 10 (Liu et al., 2019). Por otra parte, una banda con un peso experimental de 26.86 kDa ha sido vinculada previamente con un antígeno del esporozoito denominado como precursor TA4 (SAG 1) (Tennyson y Barta, 2000; de Venevelles et al., 2004; Blake et al, 2017). Algunas investigaciones han predicho que el precursor de la proteína EtMIC2 que corresponde a una proteína de fusión codifica un polipéptido de 489 aminoácidos con una masa molecular deducida de 54.8 kDa (Sun et al., 2014). En una investigación hecha previamente por de Venevelles et al (2004) utilizando 2D SDS-PAGE y MALDI-TOF identificaron a EtMIC2, este polipéptido mostró un peso molecular experimental de 53.4 kDa. Nuestros resultados utilizando el antisuero individual de las tres aves 5K mostraron el reconocimiento de una banda específica de ~53 kDa en ambos estadios de *E. tenella*, banda que coincide estrechamente con el peso predicho y descrito de forma experimental para EtMIC2, por lo cual es altamente probable que se trate de este mismo polipéptido. De acuerdo con Kawazoe et al (1992), las proteínas micronemales se hallan fuertemente conservadas entre Szs y Mzs, mientras que la mayoría de epitopos de roptrias y muchos antígenos de membrana son esporozoito-específicos. Adicionalmente, todos los antisueros identificaron una banda de ~105 kDa en ambos ciclos de vida de *E. tenella*, de acuerdo con investigaciones previas (Venevelles et al., 2004) un polipéptido de masa molecular similar ha sido estrechamente vinculado con EtMIC1.

La correlación del reconocimiento antigénico en los *immunoblots* de cada suero individual con el nivel de absorbancia observado en ELISA por el mismo suero fue alta. El antisuero del ave número uno mostró la mayor absorbancia, mientras que el antisuero del ave dos desplegó un menor nivel de reactividad (Figura 12). Al emplear como animales experimentales híbridos muy similares de una línea consanguínea de pollo de engorda, Constantinoiu et al (2007) observaron patrones de reconocimiento antigénico hacia el Sz y Mz bastante similares entre las 5 aves cuando las analizaron de forma individual, la respuesta de estos cinco antisueros no es coincidente en la homocedasticidad de la respuesta de reconocimiento antigénico de ambos estadios de vida de *E. tenella* que nosotros observamos aquí al utilizar los tres antisueros provenientes de nuestras tres aves híbridas, ya que la magnitud de la respuesta inmune humoral y el patrón de reconocimiento antigénico mostró gran variabilidad entre cada una de ellas. Sin embargo, con base al

reconocimiento homogéneo de algunos de los polipéptidos descritos anteriormente, nosotros reconocemos el efecto dominante que tienen algunos antígenos específicos de *E. tenella* que independientemente al origen del genotipo de las aves estos muestran una importante influencia capaz de estimular una respuesta inmune humoral fuerte pero específica a polipéptidos particulares (Bumstead y Millard, 1987; Lillehoj, 1988, Pinard et al, 1998; Réfega et al., 2003; Constantinoiu et al., 2008, 2011; Mtshali y Adeleke, 2020; Soutter et al., 2021). Por lo cual, la optimización de la dosis de infección/desafío en una línea de aves apropiada es esencial para maximizar el valor y eficacia de los estudios *in vivo* (Bumstead y Millard, 1987; Pinard et al, 1998; Soutter et al., 2020, 2021). Para el caso de la coccidiosis aviar, esta estrategia de selección puede contribuir a reducir el número de aves requeridas para determinar adecuadamente diferencias estadísticas significativas en los estudios experimentales (Soutter et al., 2021). Las IgYs del grupo 5K podrían estar identificando algunos antígenos tipo-B altamente inmunogénicos de *E. tenella* como EtSAG1 (TA4), EtSAG10, EtMIC1 y EtMIC2. Estos antígenos inmunodominantes podrían secuenciarse y sus correspondientes construcciones de cADN podrían clonarse en plásmidos apropiados y expresarse en vectores *ad hoc* para ser utilizados como inmunógenos y probar así su grado de inmunogenicidad e inmunoprotección frente a un desafío patógeno con *E. tenella*.

Conclusión

- La disminución en la eliminación de ooquistes en heces después de al menos un desafío/refuerzo con *Eimeria* sp es un criterio apropiado para evaluar el grado de inmunidad generado hacia coccidia.
- La inmunidad esterilizante contra coccidia con una dosis adecuada en la primo-inmunización requiere al menos de una dosis de refuerzo.
- La descripción puntual de los signos clínicos proporciona información valiosa sobre el efecto que los diferentes esquemas de primo-vacunación contra *E. tenella* muestran sobre el estado de salud de las aves.
- La prueba de ELISA indirecta probó ser una herramienta útil para evaluar el estado inmune de las aves después de una infección.
- Existen antígenos de esporozoitos y merozoitos de *E. tenella* que son capaces de estimular una respuesta inmune humoral fuerte pero específica independientemente del bagaje genético de las aves utilizadas para la prueba.

- Los diseños experimentales diseñados para evaluar la inmunidad primaria hacia coccidia no deben considerar el uso de una “crowed dose” a menos que se desee evaluar el grado de patogenicidad particular de una cepa por medio de la mortalidad inducida.
- El inmunógeno de 5×10^3 oocistos/ave de *E. tenella* es una dosis que administrada en aves híbridas de 8 semanas proporciona resultados óptimos en el rápido desarrollo de inmunidad esterilizante hacia este protozooario.
- Una dosis de 5×10^3 oocistos/ave de *E. tenella* en aves híbridas de 8 semanas de edad genera un balance óptimo entre la cantidad de ooquistes producidos requeridos para un stock experimental o vacunal, y las IgYs generadas que muestran un reconocimiento inmunológico particular de antígenos tipo B.

4.5 Evaluación inmunológica de los esporozoitos de *E. tenella*

Con base a la metodología y los estudios efectuados por Constantinoiu et al (2007, 2008 y 2011) fue posible determinar la evaluación biológica e inmunológica de los esporozoitos y merozoitos aislados y purificados en el presente estudio. En la discusión de los resultados del protocolo de prueba de las dos dosis primarias de inmunización de ooquistes esporulados de *E. tenella* empleadas para la obtención de la mayor cantidad de ooquistes (stock de laboratorio experimental) y Abs altamente reactivos a *E. tenella* (Capítulo 4.4), de la prueba de potencia de la vacuna experimental de esporozoitos completos inactivados de *E. tenella* utilizada en el presente estudio como inmunógeno de conejos y aves SPF utilizados para la obtención de sueros de referencia para las pruebas de *Phage display*, en el estudio del uso profiláctico de inmunoglobulinas IgY provenientes de la yema de huevo de aves inmunizadas versus *Eimeria* sp y desafiadas con la cepa QRO-15 (Juárez-Estrada et al, 2021a, 2021b), se amplían aspectos de discusión sobre estos parámetros (Capítulo 4.4). En la caracterización experimental de polipéptidos en los sobrenadantes de antígenos de SzS y MzS de *E. tenella* por medio de WB se identificaron bandas inmunodominantes principalmente en el SN de esporozoitos siendo las más evidentes de 112 kDa y 118 kDa; aunque la fracción de 82 kDa se ha mencionado frecuentemente dentro de las fracciones más antigénicas en el rango de 81-84 kDa, que de acuerdo a Guzman et al (2003) pueden ser excelentes opciones para utilizarse como candidatos en vacunas subunitarias. En el SN de esporoblastos únicamente se detectaron tres bandas de 26-27 kDa, 12 kDa y 10 kDa, el ooquiste completo no presentó reacción evidente al antisuero (Figura 26). En pruebas subsecuentes se determinó una banda preponderante de ~26-27 kDa identificada por Abs policlonales de aves inmunizadas contra *Eimeria* sp de Supracox™, incluso al utilizar como fuente antigénica un *pellet* de Sz 18-19. Fue evidente también la preponderancia de una banda de 50-53 kDa y otra de 27 kDa, Karkhanis et al. (1991) utilizando electroforesis SDS-PAGE identificó un polipéptido similar de 27 kDa con actividad protectora, el cual fue purificado a partir de ooquistes esporulados de *E. tenella*. Mientras que Guzman et al (2003) identificó también una fracción antigénica de 27 kDa que presentó alta inmunorreactividad con el suero de aves vacunadas con una vacuna virulenta de *E. tenella*, sin embargo, interesantemente esta reactividad no se observó en el suero de las parvadas vacunadas con una cepa atenuada de *E. tenella* o con el antisuero de las aves no vacunadas. Constantinoiu (2008) ha descrito que algunas aves por idiosincrasia inmuno-genética (haplotipo MHC-II) detectan o no la fracción de 31 kDa en esporozoitos e invariablemente lo hacen con una banda en los merozoitos de 34 kDa, que aquí se observó en un rango de ~36 kDa.

4.6 Inmunoterapia con IgYs policlonales provenientes de la yema de huevo de gallinas inmunizadas con *Eimeria* sp., en aves *SPF Leghorn White* severamente infectadas con una dosis extra- alta de una cepa salvaje de *E. tenella*

La vacunación con cepas vivas o atenuadas de *Eimeria* sp., se ha utilizado regularmente para generar protección efectiva contra la enfermedad por medio de inmunidad específica adquirida. Sin embargo, se ha efectuado poca investigación sobre el nivel de protección que se logra a través de la inmunización pasiva directa utilizando anticuerpos (Abs) hiperinmunes específicos contra *Eimeria* sp., provenientes de la yema de huevo de gallina (Xu et al., 2011). La inmunidad celular y humoral se encuentran involucradas en la protección de los pollos contra las infecciones por *Eimeria* sp (Rose, 1987). Diversos estudios han mostrado que la inmunidad celular es de suma importancia en la protección contra la infección por *Eimeria* sp aviar, mientras que el rol de la inmunidad humoral muestra un papel relativamente menor (Rose y Long, 1971; Rose, 1987; Lillehoj, 1986). Sin embargo, varios estudios recientes han confirmado la habilidad que muestran los antígenos de células B y los correspondientes anticuerpos reactivos a este tipo particular de antígeno para bloquear la invasión, el desarrollo y la transmisión de algunos agentes patógenos en la avicultura comercial y la ganadería en general (Xu et al., 2011; Gadde et al., 2015). La administración oral de IgYs específicas ha mostrado ser efectiva contra agentes patógenos gastrointestinales como *Escherichia coli*, *Campylobacter* sp y *Salmonella* sp., incluso contra *Helicobacter pylori* además de virus como el de la infección de la bolsa de Fabricio, enfermedad de Newcastle y rotavirus (Tsubokura et al., 1997; Xu et al., 2011; Rahman et al., 2013; Gadde et al., 2015 Vandeputte et al., 2019). La inmunidad pasiva mediada por anticuerpos de transmisión materna ha mostrado a su vez ser efectiva contra las infecciones con *Eimeria* sp (Ziomko et al., 2005; Wallach, 2010; Sharman et al., 2010; Jun et al., 2012; Wiedmer et al., 2017). Sin embargo, desde los primeros estudios de Danforth (1983), Crane et al (1988), Danforth y McAndrew (1987), Smith et al. (1994) y Sasai et al (1996) concernientes a la protección inmune con anticuerpos IgY específicos contra *Eimeria* sp., se ha prestado poca atención a la terapia de inmunidad pasiva directa para el control de brotes de coccidiosis clínica en pollos de engorda, gallinas de reemplazo y aves reproductoras. El presente estudio muestra un efecto terapéutico anticoccidial efectivo en aves tratadas con IgYs específicas a *Eimeria* sp., administradas *per os* durante una infección clínica experimental con una alta dosis de ooquistes esporulados de *E. tenella*. El tratamiento con la suspensión de IgYs multivalentes específicas contra *Eimeria* sp., en aves desafiadas con una cantidad muy alta de una cepa salvaje de *E. tenella* resulto en nula mortalidad, menor eliminación de OPGH, niveles

normales de HCT, una calificación baja en severidad de las lesiones cecales y un incremento del IAC, así como una mejora en el rendimiento de crecimiento corporal y bienestar animal de las aves, esto en comparación a las aves no tratadas. La dosis de infección de ooquistes utilizada en nuestro estudio fue mucho más alta que la cantidad de ooquistes utilizados en estudios similares (Lee et al., 2009a, Lee et al., 2009b; Xu et al., 2013a; Wiedmer et al., 2017). Se utilizó una dosis de saturación (*crowded dose*) con la finalidad de probar de manera real el efecto terapéutico de la suplementación con las IgYs específicas a *Eimeria* sp (SC) en las condiciones más cercanas al peor escenario de infección con *Eimeria* que se podría presentar de forma imprevista dentro de una caseta de aves mientras los pollos están en crianza y desarrollo (Wallach, 2008). De hecho, los datos obtenidos indican que la dosis proporcionada de acuerdo a la prescripción sugerida por el fabricante de la suspensión de IgYs específicas a *Eimeria* sp (SC) (60 mg/ave/día) (Morales y Lucio, 2012) previno contra la muerte de las aves en este grupo, sin embargo, esta dosis no protegió tan exitosamente contra los signos clínicos y los efectos adversos colaterales como si lo hizo la dosis más alta de IgYs que nosotros utilizamos en uno de los grupos del estudio (120 mg/ave/día). La protección de inmunidad pasiva ofrecida por la menor dosis utilizada en el estudio fue débil, mientras que la protección eficiente lograda con la mayor dosis de IgYs se mantuvo a lo largo del estudio. Estas diferencias es posible explicarlas al considerar la cantidad intrínseca de IgYs contenidas en cada uno de los dos diferentes tratamientos. La protección parcial observada al emplear la menor dosis de IgYs posiblemente se explica por una relación dosis-efecto, la cual debido a una menor concentración de las IgYs suplementadas, es posible que éstas IgYs no fueron suficientes para contrarrestar efectivamente el efecto adverso ocasionado por el uso de una mayor cantidad de ooquistes contenida en la dosis original del desafío (*crowded dose*) (Davis et al., 1978; Rose y Hesketh, 1987; Wallach, 2008). Aparentemente la cantidad de ooquistes sobrepasa la cantidad mínima de IgYs requeridas a nivel intestinal con la finalidad de neutralizar de manera efectiva la infección por *E. tenella* (Davis et al., 1978; Rose y Hesketh, 1987). De hecho, la cantidad de ooquistes usada es mucho más alta que la cantidad de ooquistes a los cuales los pollos de engorda están normalmente expuestos bajo condiciones de campo durante la fase de desarrollo (Wallach et al., 1995; Lee et al., 2012). Sin embargo, un hecho sobresaliente fue que ninguna de las aves experimentalmente infectadas y tratadas con cualquiera de las dos dosis de SC murieran; en lugar de esto, a lo largo del periodo de patencia estas aves se recuperaron rápido de la enfermedad, mientras que el 25% del total de las aves que fueron infectadas experimentalmente y no recibieron ningún tipo de tratamiento terapéutico murió. Por lo que

sabemos, ningún tipo de preparación de IgYs específicas contra *Eimeria* sp., provenientes de la yema de huevo de gallina se ha utilizado antes en una prueba experimental con la finalidad de evaluar el efecto terapéutico en aves con un cuadro clínico severo de coccidiosis cecal producido experimentalmente con una cantidad tan grande de ooquistes de *E. tenella*. En primera instancia y con base a los resultados observados podemos concluir que la dosis de IgYs que el fabricante de la suspensión de SC recomienda para su uso comercial (60 mg/ave/día) (Morales y Lucio, 2012) puede emplearse en el campo como una herramienta inmunoterapéutica valiosa contra una infección severa por *E. tenella*, sin embargo, con la finalidad de evitar cualquier tipo de efecto adverso o negativo sobre el rendimiento de la parvada nosotros recomendamos utilizar la suspensión de IgYs (SC) a una dosis de 120 mg/ave/día.

La recuperación de muy pocos esporozoitos de *Eimeria tenella* de la luz cecal de pollos de engorda inmunizados y desafiados con una cepa homóloga sugiere que la destrucción intraluminal de los estadios invasivos iniciales puede ser uno de los principales mecanismos involucrados en la restricción inmuno- mediada de la replicación de *Eimeria*, una razón práctica de esto es la disminución real de la cantidad de esporozoitos en comparación a la contenida en la dosis infectante original (Rose y Hesketh, 1987). La explicación más probable para este efecto es la acción de Abs específicos secretados o producidos a este nivel (Davis et al., 1978; Réfega et al., 2003). Estos anticuerpos han sido detectados en el intestino, y su concentración se encuentra directamente relacionada con la magnitud del efecto protector (Davis et al., 1978; Rose y Hesketh, 1987; Réfega et al., 2003). Mientras que por una parte el mecanismo exacto a través del cual las IgYs contrarrestan la actividad del agente patógeno aún no ha sido esclarecido exactamente, por otra parte, se sabe que los mecanismos de neutralización dependen en gran medida de una eficiente interacción antígeno-anticuerpo (Rahman et al., 2013). Por ejemplo, en la infección por *Babesia* sp, se ha mostrado que los anticuerpos IgG producidos como resultado de una infección *in vivo* pueden prevenir la invasión a los eritrocitos por unión y neutralización de los esporozoitos. antes de que estos invadan sus células diana (Frölich et al., 2012). Observaciones similares han sido reportadas en pollos donde los anticuerpos antiproteínas específicas del esporozoito como EtSAG1 parecen inhibir la unión del parásito a las células y así evitan la invasión (Danforth, 1983). Tentativamente algunos investigadores han propuesto algunas teorías acerca de los mecanismos de acción de las IgYs, esto con la finalidad de explicar cómo estas IgYs específicas protegen a las aves contra la actividad de los agentes patógenos (Xu et al., 2011; Gadde et al., 2015). Uno de los principales mecanismos

propuestos involucra la unión de los Abs a Ags específicos de los agentes patógenos, de esta forma deterioran su crecimiento o sus principales funciones biológicas. Por ejemplo, se ha descrito que los Abs se unen a la estructura de las bacterias, tales como el flagelo, fimbrias (pili sexual), proteínas externas de membrana y lipopolisacáridos (LPS), e inhiben de esta forma la adhesión bacteriana a la mucosa intestinal. Esta reducción en la adherencia a la pared intestinal reduce su crecimiento y su habilidad para colonizar las células intestinales o hacer translocación (Lee et al., 2002; Xu et al., 2011). Tsubokura et al. (1997) sugirieron que la inhibición del crecimiento bacteriano o su colonización atribuida al tratamiento con IgYs específicas puede deberse a aglutinación bacteriana, ocasionando una reducción de cfu más que ha un efecto directo sobre bacterias individuales. Aunque la aglutinación puede ser un mediador en la inhibición del crecimiento bacteriano, es poco probable que sea el más importante, esto se debe a que la reticulación de las bacterias se ve impedida por el impedimento estérico de los brazos Fab de las inmunoglobulinas unidos ambos a su superficie (Lee et al., 2002). Aunque Rose y Hesketh (1987) especularon acerca de que la aglutinación podría ser el mayor mecanismo inhibitorio de la invasión de los Szs de *E. tenella* a los enterocitos de los huéspedes inmunizados por parte de las inmunoglobulinas presentes en la luz intestinal, varios estudios *in vitro* han sugerido que la inhibición de la adhesión del parásito a su célula huésped es el mecanismo dominante por el cual las IgYs específicas contrarrestan la actividad de *Eimeria* (Danforth y McAndrew, 1987; Sasai et al., 1996; Abi-Ghanem et al., 2008; Zimmermann et al., 2009). Otros mecanismos que se han propuesto para tratar de explicar la acción de las IgYs a este nivel ha sido la opsonización seguida de fagocitosis, la inhibición de actividad enzimática, principalmente de proteasas y la neutralización de toxinas o proteínas mediadoras de la invasión (Dowse y Soldati, 2004; Lamarque et al., 2011; Besteiro et al. 2011; Xu et al., 2011; Rahman et al., 2013; Ramírez-Flores, 2018). La unión de IgYs específicas a la bacteria puede alterar también las cascadas de señalización celular bacteriana y de esta forma reducir la producción y liberación de toxinas (Xu et al., 2011). Aunque las IgYs contra *Eimeria* sp administradas en nuestro estudio podrían prevenir la internalización de las fases sexual y asexual de *Eimeria tenella* dentro de los enterocitos sugiriendo un mecanismo de bloqueo de la adherencia o desactivación de las proteínas *Eimeria*- específicas de invasión (ejem. Interacción EtAMA1–EtRON2) debida a la inhibición de su actividad enzimática o procesamiento proteolítico (Dowse y Soldati, 2004; Lamarque et al, 2011; Xu et al., 2011; Morgan et al., 2007; Ramírez-Flores, 2018; Ma et al., 2019), el mecanismo exacto a través del cual estas IgYs específicas protegen a las aves no se conoce aún con exactitud. Conocer el principal mecanismo de

acción de estas IgYs específicas podría contribuir a diseñar mejores estrategias u obtener inmunoglobulinas específicas que se utilizarían para lograr efectos más eficientes de inmunoprotección ya sea profiláctica o terapéutica. Por lo cual, se requieren más estudios que contribuyan a esclarecer la principal acción anti-protozoaria que despliegan estas IgYs durante la infección con *Eimeria* sp.

En el presente estudio se analizaron variables como la ganancia de peso corporal, la tasa de eliminación de ooquistes, viabilidad, hematocrito, calificación de lesiones y el índice de protección anticoccidiana con la finalidad de evaluar la protección inmune proporcionada por la administración terapéutica oral de las IgYs *Eimeria* sp-específicas. Cuando todos estos parámetros se analizaron por separado o utilizando únicamente el IAC se observaron mejores resultados de protección en el grupo tratado con la dosis más alta de IgYs. Este resultado se podría deber a que las IgYs tienen como blanco diferentes estadios de la fase de vida de *E. tenella* (Constantinoiu et al, 2008). Sin embargo, ¿Cuál de estos estadios es el más afectado con este tipo de inmunoterapia? Esto tampoco se conoce con exactitud. Interesantemente, mientras que, en los *immunoblots* la preparación SC mostró la mayor reactividad hacia el antígeno del merozoito, la preparación experimental de IgYs de la yema de las aves *SPF Leghorn* inmunizadas con la vacuna EtSz-IMS1313 preparadas específicamente para fungir como testigo fueron más reactivas al antígeno del Sz. Es imprescindible efectuar estudios adicionales para esclarecer que estadio de vida de *Eimeria* sp se reconoce en mayor proporción por cada tipo particular de IgY experimental (Tomley et al, 1994a, 1994b; Constantinoiu et al., 2008; Liu et al., 2009; Wiedmer et al., 2017).

Cuando se compararon los resultados del grupo suplementado con 120 mg de SC con los resultados del grupo control no tratado-infectado, en todas las variables de respuesta estudiadas el tratamiento con las IgYs mostró claramente un aumento significativo de la resistencia de las aves contra la infección con *E. tenella*. Sin embargo, cuando las aves suplementadas con 60 mg de SC fueron comparadas con el grupo no tratado-infectado, aunque no se observaron diferencias significativas en la ganancia de peso corporal, tasa de eliminación de ooquistes, HCT, calificación de lesiones y el IAC, si se observó diferencia significativa en términos de mortalidad. La diferencia observada entre ambos grupos tratados con las IgYs del SC podría deberse a la magnitud de los títulos de anticuerpos alcanzados a nivel intestinal de cada ave suplementada que recibió cada una de las dos diferentes dosis de SC (Rose y Hesketh, 1987; Davis et al., 1978). Esto posiblemente sugiere que la cantidad de IgYs administradas oralmente a cada ave de cada grupo podría exhibir un tipo de relación

dosis-respuesta dependiente, esto de acuerdo con la concentración de IgYs en cada uno de los dos grupos, lo cual posteriormente se discute.

Aunque el grupo suplementado con 60 mg de SC difirió únicamente en términos de viabilidad con el grupo no tratado-infectado, la razón de por qué ninguna de las aves murió en este grupo aún no se conoce exactamente. Previamente algunos investigadores han puntualizado que cuando pollos libres de gérmenes (gnotobióticos) fueron desafiados con altas dosis de ooquistes esporulados de una cepa patógena de *E. tenella*, si bien algunas de estas aves mostraron lesiones severas y hemorragias profusas dentro de los sacos ciegos, ninguna de ellas murió (Visco y Burns, 1972a, 1972b; Macdonald et al., 2017; Zhou et al., 2020). Sin embargo, cuando las aves con microbiota “normal” fueron desafiadas, incluso con una dosis de desafío menor a la empleada en la infección previa de las aves “gnotobióticas”, casi todas las aves “normales” exhibieron lesiones cecales severas e inesperadamente una proporción significativa de ellas murieron incluso sin mostrar signología clínica evidente (Visco y Burns, 1972a, 1972b; Arakawa y Ohe, 1975; Baba et al., 1990). De acuerdo con Kimura et al (1976), durante los primeros 7-10 días PI de la infección con *Eimeria* sp., se observa un incremento del crecimiento de MOs patógenos en la luz intestinal de las aves, MOs como *Clostridium perfringens*, esto hace que la microbiota intestinal entre a un estado de desbalance durante un periodo de dos a tres semanas posteriores a la infección inicial con *Eimeria* sp. Durante este mismo periodo de patencia coccidiana, recientemente Macdonald et al. (2017) observaron que todas las unidades taxonómicas operacionales diferenciales (OTUs) pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* mostraron un incremento moderado pero persistente. Macdonald et al. (2017) proponen que el principal efecto patológico observado en los sacos ciegos después del daño a los enterocitos debidos a la infección por *E. tenella* se puede atribuir en gran proporción a la complicación derivada de la disbiosis del microbioma ocasionado por MOs anaerobios-facultativos tales como Enterobacteriaceas coliformes y no coliformes, además de *Clostridium* sp. Por lo cual, aparentemente la magnitud del daño patológico causado por la infección con *E. tenella* durante el periodo de patencia se encuentra fuertemente asociado con disbiosis de la microbiota cecal (Zhou et al., 2020). Aunque las aves en el grupo tratado con 60 mg/ave/día de SC no mostraron una protección anticoccidial tan exitosa como la mostrada por el grupo tratado con las 120 mg/ave/día de SC, se debe hacer hincapié en el hecho de que ninguna de estas aves murió. De acuerdo con el análisis de las membranas de transferencia (WB), algunas IgYs reconocen diversos epítomos específicos en los esporozoitos de *E. tenella* y varios más en los merozoitos, sin embargo, no podemos estar seguros de que todas las IgYs contenidas en

el producto SC estén involucradas exclusivamente en el 100% de la protección inmune específica contra la infección por *E. tenella per se*. Por lo tanto, podemos deducir que después de la infección con *E. tenella*, el SC podría tener dentro de su formulación otras sustancias o elementos, dentro de los cuales posiblemente se encuentren también otras IgYs con especificidades diferentes al parásito *per se*, es factible que estas sustancias (componentes intrínsecos de la yema) o IgYs, por mecanismos aún desconocidos estén contrarrestando la actividad patogénica de las bacterias secundarias oportunistas, previniendo de esta forma la muerte de estas aves. Un examen minucioso de la presencia de estas sustancias e IgYs desconocidas y los mecanismos protectivos que están desplegando durante las interacciones bacterianas que ocurren en el intestino al momento de la infección con coccidia podría ser muy esclarecedor. De hecho, esto constituye una novedosa línea de investigación, ya que se podría obtener un producto que no solo favorezca la protección específica contra la infección por *Eimeria* sp., también contaríamos con un producto promotor del equilibrio del microbioma intestinal, el cual aún no existe.

Con la finalidad de evaluar la acción profiláctica de las IgYs contra coccidia, el polvo liofilizado de IgYs obtenido de yemas de huevo de gallinas previamente inmunizadas con diferentes especies de *Eimeria* usualmente se ha proporcionado de forma oral a pollos durante su fase de crecimiento. En contraste, en el presente estudio analizamos la acción terapéutica de una suspensión líquida hiperinmune de IgYs específicas de *Eimeria* sp., suplementadas *per os* durante el periodo de prepatencia de una infección severa con *E. tenella*. La dosificación terapéutica de las IgYs afectó significativamente la eficacia de inmuno-protección en una aparente relación dosis-respuesta. Anteriormente se había podido observar una característica relación de dosis-respuesta similar, esto cuando de forma profiláctica se proporcionó a las aves en el alimento polvo liofilizado de IgYs *Eimeria* sp-específicas (Lee et al., 2009a, Lee et al., 2009b; Xu et al., 2013a). Lee et al. (2009a) mencionan que la suplementación de dietas de pollo de engorda con bajos niveles (0.01, 0.02, 0.05, ó 0.5%) de polvo liofilizado de IgYs hiperinmunes de yema de huevo *Eimeria* sp-específicas (SC) reduce significativamente la producción de ooquistes, pero no muestra ningún efecto sobre la ganancia de peso corporal cuando las aves son desafiadas con 1×10^4 ooquistes/ave de *E. acervulina*, mientras que la suplementación con altas concentraciones de SC (10% ó 20%) protegió a las aves contra subsecuentes desafíos con *E. acervulina*, y estas aves mostraron mayor ganancia de peso corporal y baja eliminación de ooquistes en heces, esto en comparación a las observadas en las aves del grupo no-tratado desafiado. Lee et al. (2009b) también observaron efectos similares con marcado incremento

en la ganancia de peso corporal, reducción en severidad de lesiones intestinales y menor eliminación de ooquistes después del desafío con *E. maxima* o *E. tenella* cuando las aves fueron profilácticamente alimentadas con SC en una relación dosis-respuesta dependiente. En ambas investigaciones, la suspensión de IgYs hiperinmunes utilizadas se obtuvo a partir de aves inmunizadas previamente con las tres principales especies de *Eimeria* que afectan al pollo de engorda (*E. acervulina*, *E. maxima*, y *E. tenella*) (Lee et al., 2009a, 2009b). En otro estudio efectuado por otro grupo de investigadores, las IgYs hiperinmunes fueron producidas a partir de yemas de huevos de gallinas inmunizadas con cinco especies de *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix*, y *E. praecox*), las IgYs fueron purificadas y liofilizadas a partir de las yemas de huevos de gallinas inmunes (Xu et al., 2013a). Cuando unos pollos híbridos fueron alimentados experimentalmente con este polvo liofilizado a diferentes niveles (0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.50, o 1%), este compuesto hiperinmune elaborado con base a IgYs *Eimeria* sp-específicas de yema de huevo les confirió protección contra un desafío con 1×10^4 ooquistes de *E. tenella*/ave en una aparente relación dosis-respuesta dependiente. Xu et al. (2013a) observaron que el grupo de aves suplementadas con el máximo nivel de polvo liofilizado de IgYs (1.0 %); y que subsecuentemente fueron desafiadas con 1×10^4 ooquistes de *E. tenella*/ave a los 7 días PD mostraron un IAC de 160.4. Tomando en consideración las diferencias relativas a diseño experimental, el valor de IAC obtenido por Xu et al. (2013a) en ese grupo, aunque ligeramente mayor al IAC que nosotros registramos en nuestro grupo suplementado con la mayor dosis de IgYs *Eimeria* sp-específicas (IAC = 155), ambos son muy similares, aún cuando un fuerte factor diferencial entre ambos estudios fue la dosis de desafío utilizada, nosotros empleamos aquí una dosis tres veces mayor (3×10^4 ooquistes /ave) que la utilizada por Xu et al. (2013a). Esto indica que las IgYs (SC) suplementadas como inmunoterapia a la más alta dosis probada aquí muestra una eficacia protectora tan exitosa como la obtenida con el liofilizado de IgYs *Eimeria* sp-específicas probado por Xu et al. (2013a) a su mayor nivel de inclusión (1.0 %). Todos estos estudios sugieren que suplementar el alimento o el agua de bebida con IgYs hiperinmunes *Eimeria* sp-específicas es una estrategia prometedora para el control de infecciones inesperadas de coccidiosis aviar, y podría contribuir significativamente a reducir las pérdidas económicas causadas por esta enfermedad.

Hasta ahora, con la finalidad de obtener las IgYs específicas a partir de la yema de las aves todos estos estudios han utilizado parásitos vivos administrados por vía oral (natural) en sus programas de inmunización. Nuestros resultados de *Western blot* identificaron varias bandas

de polipéptidos en ambos estadios asexuales zoitos de *E. tenella* de las aves inmunizadas por vía oral (natural), mientras que solo unas pocas bandas fueron reconocidas por la suspensión de IgYs del SC en ambos estadios de vida de *E. tenella*. Por otra parte, la reactividad en ELISA de la suspensión SC hacia ambos antígenos de *E. tenella* fue mucho menor comparada a la reactividad mostrada por nuestra preparación experimental de IgYs específicas vs esporozoito de *E. tenella* obtenidas de las yemas de huevos ovopositados por las aves SPF inmunizadas con la vacuna de esporozoitos completos. Aparentemente la preparación SC mostró una baja reactividad en ambas pruebas analíticas (ELISA y *Western blot*), sin embargo, independiente a estos resultados, las IgYs en el SC probaron proteger exitosamente a las aves infectadas con una dosis muy alta de ooquistes esporulados de *E. tenella*. Bajo este contexto debe considerarse que una ruta parenteral de inmunización podría también ser muy apta para obtener una gran cantidad de anticuerpos *Eimeria* sp-específicos circulantes y consecuentemente aumentar los títulos de anticuerpos *Eimeria* sp-específicos en la yema de los huevos, de esta forma posiblemente se requeriría una dosis mucho menor de administración de anticuerpos *Eimeria* sp-específicos de yema para lograr una protección exitosa (Rose and Long, 1971; Jun et al., 2012; Wiedmer et al., 2017; Juárez-Estrada et al., 2021b), lo cual en el futuro deberá probarse bajo un apropiado diseño experimental. Adicionalmente la identificación precisa de las proteínas inmunogénicas del parásito a las que se dirige la respuesta de anticuerpos protectores contra la coccidiosis aviar permitirá en el futuro la aplicación extensiva de esta tecnología de inmunización pasiva (Sasai et al., 1996; Constantinoiu et al., 2008; Liu et al., 2009; Jahn et al., 2008, Jun et al., 2012; Wiedmer et al., 2017).

Se requiere efectuar más estudios sobre estrategias de inmunización que utilicen antígenos protectores definidos de *Eimeria* sp., o sus epítomos subunitarios o recombinantes inyectados a través de la vía parenteral. De hecho, algunos anticuerpos monoclonales de ave específicos contra diferentes moléculas del parásito involucradas en la invasión celular han sido ya previamente descritos (Danforth and McAndrew, 1987; Crane et al., 1988; Ko et al., 1990; Wallach et al., 1995; Sasai et al., 1996; Jahn et al., 2009). La construcción de bibliotecas de anticuerpos de desplegamiento de fagémidos de una sola cadena del fragmento variable (scFv) que sean capaces de bloquear la invasión de *Eimeria* sp., es otra tecnología prometedora que puede utilizarse para el desarrollo de una nueva estrategia de inmunoterapia contra la coccidiosis aviar (Abi-Ghanem et al., 2008; Zimmermann et al., 2009; Turunen, et al, 2009; Zhao et al., 2010). Deben desarrollarse además estudios con tecnologías novedosas y originales (ejem. *Phage display*, ELI) para identificar exitosamente

los epítomos protectores clave de los parásitos *Eimeria*, por lo cual, se justifica una mayor investigación sobre este tema. La inmunoterapia oral representa una estrategia novedosa para prevenir lesiones patológicas severas y la mortalidad en las aves cuando ocurre inesperadamente un brote severo por *E. tenella* y el uso de anticoccidianos químicos o ionóforos se encuentra restringido o prohibido.

Conclusión

- La inmunidad oral pasiva en los pollos utilizando una suspensión hiperinmune de IgYs de yema de huevo específicas de *Eimeria* sp. es lo suficientemente potente como para controlar los signos clínicos, la mortalidad y la presión ocasionada por una infección severa con el parásito.
- La inmunoterapia oral administrada *per os* con IgYs de yema de huevo específicas de *Eimeria* sp., representa una manera natural alterna al uso de anticoccidianos químicos o ionóforos para controlar con éxito las infecciones por *E. tenella*.
- La adecuada identificación de las proteínas inmunogénicas del parásito a las que se dirige la respuesta de anticuerpos protectores contra la coccidiosis aviar facilitará en el futuro la aplicación extensiva de esta tecnología de inmunización pasiva y la creación de vacunas de tercera generación.

4.7 Inmunización con esporozoitos completos inactivados de *E. tenella* adsorbidos en un adyuvante con base a nanopartículas (IMS 1313 VG Montanide™) en conejos (*Oryctolagus cuniculus*) y aves (*Gallus gallus*) SPF Leghorn White

Actualmente se conoce que las gallinas domésticas después de ser infectadas varias veces por vía oral con cantidades específicas de ooquistes esporulados de *E. tenella* se vuelven completamente resistentes a infecciones subsecuentes con el parásito (Long et al., 1986; Constantinoiu et al., 2011; Soutter et al., 2020). Al utilizar antisueros de aves previamente inmunizadas por vía natural con ooquistes esporulados de *E. tenella* en inmunotransferencias (*immunoblots*) de esporozoitos y merozoitos de segunda generación de *E. tenella*, se ha observado que estos antisueros identifican un patrón similar de antígenos en ambos ciclos de vida (Constantinoiu et al., 2008; Juárez-Estrada et al., 2021b). Conforme adquiere resistencia después de varias infecciones con el parásito (booster) el sistema inmune de las aves logra un reconocimiento específico de antígenos altamente inmunogénicos presentes tanto en SzS como en MzS de *E. tenella* (Constantinoiu et al., 2008, 2011; Juárez-Estrada et al., 2021b). Los conejos y aves SPF Leghorn inmunizadas de manera subcutánea con la vacuna experimental EtSz-IMS1313 producen anticuerpos que aparentemente reconocen los mismos antígenos específicos en cada estadio de vida del parásito (Juárez-Estrada et al., 2021a). Las observaciones de los *Western blot* en ambas especies son consistentes con estudios previos que muestran que los anticuerpos generados contra un ciclo de vida del parásito reaccionan de forma cruzada hacia antígenos de otro estadio de vida del mismo parásito (Danforth y McAndrew, 1987; Ko et al., 1990; Tomley, 1994a, 1994b; Sasai et al., 2008). Aunque los conejos y aves aparentemente responden a los mismos antígenos de *E. tenella*, los conejos mostraron una respuesta de anticuerpos más fuerte y sólida comparada con la respuesta inmune exhibida por las aves inmunizadas con el mismo inmunógeno. De hecho, con la finalidad de optimizar favorablemente la visualización de las membranas WB de ambos conejos, los antisueros se tuvieron que diluir 1/8000 eliminando así artefactos y manchas del trasfondo (*background*) de la membrana, mientras que los *immunoblots* con anticuerpos de las aves se pudieron apreciar de forma similar a la visualización de las membranas de WB reveladas con los antisueros de los conejos al diluir los antisueros de ambas aves a una cuarta parte (1/2000) de la dilución hecha con los antisueros de los conejos (Figura 34). Se ha observado que los *Western blotting* probados con anticuerpos de aves inmunizadas por vía natural (oral) únicamente se pueden visualizar de forma apropiada con bajas diluciones del antisuero (1/25 a 1/100) (Tomley, 1994a, 1994b; Constantinoiu et al., 2008, 2011; Juárez et al., 2021b). Esto es consistente con evidencia previa que ha

mostrado que los esporozoitos inoculados parenteralmente en conejos son mucho más inmunogénicos por esta ruta que las aves infectadas oralmente con ooquistes esporulados completos (Talebi y Mulcahy, 1995; Talebi, 2001). Se ha sugerido que el reconocimiento de antígenos puede diferir entre huéspedes (Rose y Mockett 1983). Adicionalmente, se ha propuesto que un huésped heterólogo como el conejo reconoce más epítomos-clave en el Sz de *Eimeria* sp. aviar, que los huéspedes naturales (Talebi y Mulcahi, 1994, 1995; Talebi et al., 2001; Tomley, 1994a, 1995b).

4.8 Tamizaje de bibliotecas de péptidos sintéticamente recombinados desplegados de forma aleatoria en fagos filamentosos M13 (12mer lin y c7c f) utilizando como ligandos anticuerpos purificados IgG de conejo versus el esporozoito completo de *E. tenella*

Las bibliotecas combinatorias de presentación de fagos pueden emplearse para el escrutinio de péptidos recombinantes que este tipo de fagos filamentosos (Ff: f1, M13, or fd) despliegan vinculados a su proteína III u VIII. Para este tipo de tamizaje se pueden emplear como ligandos anticuerpos monoclonales o policlonales específicos a diferentes antígenos de los agentes patógenos en investigación, esto con la finalidad de identificar mimotopos de epítomos inmunodominantes del agente patógeno que previamente fueron reconocidos por el sistema inmune del organismo inmunizado y que se encuentran relacionados estrechamente a la expresión de epitopes tipo B de linfocitos reactivos (Adda et al., 1999, 2002; Gazarian, 2005; Pande et al., 2010; Juárez-Estrada et al., 2021a). Debido a la limitada información relativa a la naturaleza real de los antígenos protectores de *E. tenella*, en el presente estudio se utilizaron anticuerpos generados en conejos *New Zealand* específicamente reactogénicos al esporozoito intacto de *E. tenella* con el objetivo de poder identificar epítomos inmunodominantes de esta fase zoito asexual. Con base a la metodología se identificaron y seleccionaron clonas provenientes de dos bibliotecas combinatorias de fagos que despliegan aleatoriamente péptidos recombinantes de 12 aa lineales ó 7 aa flanqueados por cisteínas (conformacional o bucle debido al puente disulfuro inducido) utilizando como ligandos los anticuerpos de conejo anti-esporozoito de *E. tenella*. Después de tres rondas de bioselección (*panning*), fueron aleatoriamente seleccionadas veinte clonas de fagos de cada biblioteca, estas se amplificaron, se purificaron y se caracterizaron como péptidos a través de la secuenciación nucleotídica de su ADN. La mayoría de las 20 clonas seleccionadas a partir de cada biblioteca fueron altamente reactogénicas al suero de conejo anti-esporozoito en la prueba de ELISA indirecta, lo que confirmó que el péptido seleccionado de cada fago se unía exitosamente al paratopo de anticuerpos específicos contra el esporozoito de *E. tenella*. La

secuenciación del ADN de las 40 clonas de fagos seleccionados reveló que algunas clonas eran idénticas y fueron seleccionadas repetidamente con base a una mayor presencia de estas durante el último amplificado del tamizaje efectuado con *Phage display* (3er amplificado). En este contexto, teóricamente se espera que la relativa abundancia de anticuerpos monoespecíficos altamente reactivos dentro de toda la mezcla policlonal de anticuerpos presentes en un antisuero inmune conduzca a la selección de clonas altamente específicas en el ensayo de selección aleatoria de Ph D (Adda et al., 1999; 2002; Gazarian, 2005). El escrutinio de las bibliotecas de *Phage display* proporciona información muy útil sobre las características estructurales de los epítomos, sin embargo, un análisis exacto de los mismos a través de fagotopos puede llegar a ser complejo, esto debido a la misma complejidad de las estructuras antigénicas de los agentes patógenos (Coley et al, 2001; Adda et al., 2002; Gazarian, 2005; Costa et al., 2019; Ma et al., 2019). En el caso de los parásitos del *Phylum Apicomplexa*, en especial los de tipo coccidia, su amplia diversidad genómica puede llegar a ser en sí problemática, ya que además de presentar diferentes etapas zoito asexual y sexual en su ciclos de vida (ejem. *Toxoplasma*: esporozoito, taquizoito, bradizoito, gametocitos, etc.), cada una de estas fases del ciclo de vida del parásito se encuentra dotada de un mosaico multidiverso de antígenos superficiales y estructurales, adicional a esta diversidad, debe considerarse la presencia de posibles cambios debido a la ocurrencia de expresión polimórfica de algunos de estos componentes, sobre todo en los parásitos Apicomplexa de ciclo heterogénico (Adda et al., 1999; Coley et al, 2001; Blake et al, 2015, 2020; Costa et al., 2019). Las implicaciones de los cambios en la tasa de polimorfismo han impedido en parte el desarrollo exitoso de vacunas elaboradas con base a ingeniería genética (proteínas recombinantes, vectorizadas subunitarias y de ADN), por ejemplo, el alto polimorfismo que presentan algunos componentes clave para la invasión, como es el antígeno apical de membrana 1 (AMA1) de *Plasmodium* sp., ha hecho imposible hasta hoy en día el desarrollo de una vacuna universal efectiva contra la malaria humana (Blake et al, 2014, 2015). La especificidad de los fagotopos es otro rubro de incertidumbre ya que no siempre es claro si los péptidos recombinantes del fago se unen al fragmento Fc del anticuerpo o al sitio de unión específico Fab. Debido a la distancia filogenética los dominios en la Fc de IgG del conejo muestran una estructura un poco diferente a la Fc de la IgY de las aves (Gadde et al., 2015). Con el fin de discriminar si los fagotopos se unen específicamente a la región CDR del paratopo de la región Fab de los anticuerpos policlonales de conejo, sitio de interacción específica entre los péptidos recombinante del fago y el sitio diana de la IgG, y determinar así su veracidad como mimótopo de un epítomo específico de cada fagotopo

seleccionado usualmente se utiliza ELISA indirecta de tipo mimético (*mimicry* ELISA), ésta consiste en una ELISA de competencia de inhibición que utiliza los fagotopos seleccionados y el antígeno nativo juntos en un mismo pozo, el resultado se compara con la ELISA simple indirecta de los fagotopos solos, a *grosso modo* en la *mimicry* ELISA se utilizan como blanco los anticuerpos originalmente utilizados para el tamizaje (fijados primariamente a la placa de ELISA) con cantidades estándar del antígeno nativo (e.g. 1 µg/pozo) mezclados con el fagotopo en cuestión (e.g. 1 x 10⁹ ufp/pozo), posteriormente como anticuerpo secundario se utiliza un anticuerpo anti M13 (adicionalmente se pueden usar diluciones progresivas de los fagotopos o del antígeno nativo para determinar respuestas dosis-dependiente) (Wang et al., 2007; Houimel y Dellagi, 2009). En el presente trabajo decidimos abordar una nueva estrategia, en la cual todos los fagotopos seleccionados específicamente con IgG de conejo fueron analizados usando IgYs de aves *SPF Leghorn White* específicos al mismo inmunógeno (esporozoitos de *E. tenella*) utilizado para la inmunización primaria en un ensayo general de ELISA indirecta. Aunque los sistemas inmunes de conejos y aves son distintos, la información generada contribuye a determinar el grado de inmunidad cruzada de cada fagotopo con respecto a las respectivas inmunoglobulinas de cada especie. En este ensayo se observó que todos los inmunótopos fueron positivos en el mismo orden de reactogenicidad indistintamente de los anticuerpos de la especie evaluada. Sin embargo, una clona con la secuencia CLKFWKPNC que había mostrado el segundo lugar de reactividad utilizando las IgGs de conejo como ligando de reconocimiento (Figura 52), al evaluarla con los anticuerpos policlonales de las aves *SPF* inmunes al esporozoito fue relegada a la quinta posición de reactividad (Figura 54). Esto sugiere que el fagotopo CLKFWKPNC no fue precisamente seleccionado por el sitio de unión al antígeno Fab del anticuerpo del conejo. Por lo cual, esta metodología es una nueva forma de verificar fagotopos verdaderos, y puede ser complementaria al ensayo competitivo inhibitorio de ELISA (*mimicry* ELISA) como única prueba de veracidad, un futuro estudio que considere la evaluación de ambas técnicas sería de gran valor (Wang et al., 2007; Houimel y Dellagi, 2009). Adicionalmente, con base a la experiencia generada y con la finalidad de obtener mejores resultados tanto en veracidad como en grado de inmunodominancia de los mimotopos seleccionados a partir de organismos más complejos como es el caso del presente estudio (*Apicomplexa*) es recomendable seleccionar una mayor cantidad de clonas y probar cada una de ellas por ELISA indirecta simple y de competencia-inhibición (n=60) antes de efectuar su secuenciación, no después de la misma (Wang et al., 2007). La frecuencia de los péptidos seleccionados presumiblemente indica las capacidades de inmunogenicidad y diversidad de

los propios fagotopos. De hecho, los péptidos recombinantes seleccionados de la biblioteca c7c con dos cisteínas circunscritas (adecuada para seleccionar epítomos conformacionales) fueron más diversos que los obtenidos en la biblioteca de 12 aa lineales.

Muchos antígenos de *Eimeria* identificados como candidatos a vacunas diseñadas genéticamente tienen funciones en la interacción huésped/parásito, probablemente porque están expuestos de forma natural a través de los mecanismos de invasión/replicación del parásito durante el proceso de infección, y por lo tanto, son objetivos altamente sugestivos a la respuesta inmune específica del huésped (de Venevelles et al., 2004; Lamarque et al., 2011; Besteiro et al., 2011; Liu et al., 2009, 2017, 2020; Ma et al., 2019; Song et al., 2020). Entre los antígenos candidatos más ampliamente investigados en los parásitos tipo Apicomplexa se encuentran las proteínas secretadas por las micronemas, organelos ubicados en la punta apical de estos protozoarios, cuyo contenido es crítico para la creación del complejo de unión (MJ) que permite el acoplamiento, motilidad y unión del parásito a sus células huésped específicas, así como su entrada a las mismas (Dowse y Soldati, 2004; Besteiro et al., 2011; Tonkin et al., 2011; Guo et al., 2013; Huang et al., 2018; Li et al., 2020; Zhang et al., 2020). Sasai et al (2008) al usar 12 diferentes anticuerpos monoclonales para identificar y determinar la función de antígenos diana en el complejo apical de *Eimeria* sp., pudieron determinar que estos Abs reconocían principalmente antígenos presentes en las micronemas de esporozoitos y merozoitos de diferentes especies de la *Eimeria* de la gallina doméstica. En otro estudio, se encontró que la reactividad de anticuerpos maternos IgY policlonales con una proteína de alto peso molecular de la familia TRAP (*Thrombospondin-Related Adhesive Protein*) denominada EmTFP250 (parte de la familia de proteínas TRAP de *E. maxima*) correlacionaba muy bien con persistencia de la protección inmune pasiva materna a su progenie (Witcombe et al., 2004). De manera análoga a como previamente se ha observado en otros parásitos del *Phyllum* Apicomplexa como *Plasmodium* y *Toxoplasma*, la proteína EmTFP250 contiene un epítomo altamente repetitivo con módulos parecidos al factor de crecimiento epidermal (EGF-like) de unión a calcio y motivos de dominios de trombospondina tipo 1 (TSP-1) que forman parte de la familia TRAP (Morahan et al., 2009). Un vector de $\Delta aroA/\Delta htrA$ *Salmonella enteritidis* expresando EmTFP250 de manera conjunta con la molécula co-estimuladora CD154 (CD 40L) fue utilizado como vacuna experimental en pollos de engorda, mostrando buenas perspectivas de protección ante un desafío con ooquistes esporulados de *E. maxima*, lo cual indica su gran potencial como posible candidato a una vacuna recombinante contra la coccidiosis aviar (Shivaramaiah et al, 2010). Curiosamente EmTFP250 comparte homología con la proteína micronemal 4 de *E.*

tenella (EtMIC4) y la proteína micronemal 12 de *Toxoplasma goondi* (TgMIC12) (Periz et al., 2009). Se descubrió que EtMIC4 junto con EtMIC5 forman parte de un complejo proteico multimolecular que juega un papel muy importante en el proceso de adhesión e invasión a las células huésped (Periz et al., 2007). EtMIC4 es miembro de la familia TRAP, contiene 31 módulos EGF-like, 12 módulos de TSP-1 y una secuencia altamente ácida, rica en prolina y glicina en su región extracelular, además de una cola citosólica y transmembranal altamente conservada que contiene una o más tirosinas, tramos de residuos ácidos y un solo triptófano (Tomley et al., 2001). EtMIC4 contiene uno o más tipos de módulos adhesivos, cada uno compuesto de ocho residuos flanqueados por cisteínas, cada módulo es capaz de hacer un bucle que favorece la adherencia del esporozoito a la superficie de la célula huésped (anclaje) y facilita así la transmisión de fuerzas dinámicas generadas por el citoesqueleto de actina-miosina del parásito durante el proceso de invasión (Tomley et al., 2001; Morahan et al., 2009; Besteiro et al., 2011). EtMIC4 se expresa en esporozoitos y en todas las etapas de merozoitos del parásito, lo que sugiere que este parásito tiene un fuerte requerimiento de módulos TSP-1 que facilitan la adherencia e invasión en diferentes fases de vida del parásito (Tomley et al., 2001; Réfega et al., 2003; Periz et al., 2007; Morahan et al., 2009;). A diferencia de otras proteínas micronemales estudiadas hasta ahora en *E. tenella*, EtMIC4 parece encontrarse constitutivamente en la superficie del esporozoito, así como dentro de las micronemas (Tomley et al., 2001; Réfega et al., 2003; Periz et al., 2007). Curiosamente, el cribado genómico que realizamos en el blast proteína-proteína utilizando como blanco la secuencia del taxido 5802 de *E. tenella* (NCBI-Blast) y como referente la secuencia de nucleótidos de 2 péptidos recombinantes seleccionados en la biblioteca Ph D c7c mer (CMSTGLSSC y CNTGSPYEC) resultaron en múltiples coincidencias (5-10 matches/fagotopo) con péptidos de los módulos EGF-like y TSP-1 de EtMIC4 (presentes en forma de octapéptidos cincuscritos por cisteínas). Estos resultados mostraron que la estrategia de tamizar la biblioteca de Ph D c7c mer con anticuerpos de conejo contra el esporozoito de *E. tenella* incrementa la posibilidad de identificar péptidos conformacionales con motivos de cisteínas restringidos (bucles) (Tomley et al., 2001; Réfega et al., 2003). El haber seleccionado péptidos recombinantes con una alta coincidencia indica que los péptidos nativos muestran gran inmunodominancia cuando los esporozoitos intactos de *E. tenella* se inoculan como antígenos en un animal diferente al huésped natural. Por otra parte, el análisis comparativo del fagotopo CSISLTHC que fue también altamente reactivo en la prueba ELISA reveló coincidencias con una proteína hipotética conservada de *E. tenella*. Blake et al (2015) han indicado previamente que al menos el 70% de los genes de *E. tenella*

se encuentran clasificados como de función desconocida o anotados como proteínas hipotéticas conservadas. Hasta hoy en día, se han estudiado y probado pocos genes de proteínas hipotéticas conservadas en *Eimeria* sp con la finalidad de determinar su función, inmunogenicidad e inmunoprotección (Zhai et al., 2016). La selección en bibliotecas de péptidos aleatorios de una sola familia de dos péptidos de 7 mer que comparten el motivo consenso C-LKLxxxN-C (Tabla 29) con la clona del fago CAKLCLNNC con el motivo C-xKLxxxN-C (Tabla 30) que mostró la mayor reactividad en la prueba de ELISA indirecta (Figura 52), posiblemente indica que son mimotopos de un epítipo inmunodominante. El enfoque de presentación de fagos es un método original para mapear epítipos en este tipo de miembros Apicomplexa (Adda et al., 1999; Coley et al, 2001; Costa et al., 2019). Sin embargo, el mapeo de los epítipos representados por los mimotopos se complica debido a la complejidad en la composición de proteínas de cada etapa zoito del parásito (Tomley, 1994a, 1994b; Dowse y Soldati, 2004; Krücken et al, 2008, Besteiro et al, 2011). Se requieren más estudios que utilicen bibliotecas aleatorias de *Phage display* que involucren el uso de anticuerpos heterólogos contra las diferentes etapas de vida de *E. tenella*.

Al analizar Liu et al (2009) el proteoma de merozoitos de 2ª generación utilizando antisueros de pollos previamente infectados con *E. tenella* con la finalidad de detectar las principales proteínas antigénicas en un *Western blot* bidimensional, detectaron pocos antígenos inmunodominantes de las micronemas en los merozoitos, estos solo pudieron detectarse junto a otras proteínas de mantenimiento y conservación del parásito como enolasa, beta-tubulina y específicamente HSP70 como previamente Réfega et al (2003) ya lo había observado. En un trabajo más reciente, estos mismos autores (Liu et al., 2017) analizaron el proteoma de los esporozoitos de *E. tenella*, *E. acervulina* y *E. maxima* por medio de un WB 2D utilizando antisueros contra cada especie de *Eimeria*, el estudio se complementó con MALDI-TOF. Al analizar *E. tenella*, Liu et al., 2017 identificaron 54 proteínas inmunodominantes, y 18 proteínas ortólogas a las tres especies de *Eimeria* evaluadas, 5 de estas compartían una similitud en secuencia de residuos mayor al 93% y fueron identificadas como antígenos comunes inmunodominantes, estos incluían al factor de elongación 2 (EF-2), la proteína 14-3-3, la proteína con un dominio-contenido del conjugado enzimático de ubiquitina (UCE), la gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y una transhidrogenasa específica. Las secuencias de oligopéptidos deducidas de las clonas seleccionadas por la biblioteca Ph D 12 mer coinciden con algunas de las secuencias de proteínas nativas de *E. tenella* actualmente referidas en el GenBank (NCBI), sin embargo, solo dos de ellas se han identificado previamente como epítipos inmunodominantes de los

esporozoitos de *E. tenella* (Blake et al., 2017; Liu et al. al, 2017). Por ejemplo, el fagotopo AGHTTQFNSKTT mostró alta coincidencia con la proteína putativa homogénea de cullina (*cullin*) de *E. tenella*, proteína que recluta objetivos específicos para la ubiquitina ligasa que es parte de un complejo de proteínas de múltiples subunidades útil para la ubiquitinación dentro de células eucariotas como los parásitos del *Phyllum* Apicomplexa. Hasta ahora solo Wan et al (1999) había determinado previamente la expresión génica dominante de este tipo de proteína (secuencia codificante para ubiquitina) en Mzs de *E. tenella*. Por otra parte, el fagotopo HFAYWWNGVRGP que fue el más reactivo en ELISA indirecta (Figura 51) coincidió significativamente con la secuencia amino peptídica de la cadena beta dineína del brazo externo flagelar, una proteína putativa de *E. tenella*, esta proteína produce fuerza hacia los extremos negativos de los microtúbulos en la membrana interna (Besteiro et al, 2011), la primera proteína es una proteína clave en la invasión de *Eimeria* al enterocito, y la última ha sido identificada previamente también como inmunodominante (Liu et al., 2017). El fagotopo GPNSAFWAGSER mostró el segundo lugar de reactividad en la prueba de ELISA indirecta (Figura 51), al utilizarlo como referente en el análisis bio-informático coincidió mayormente con una proteína putativa que contiene repetidos similares a anquirina (*Ankyrin-like*) de *E. tenella* (Tabla 28), en algunos miembros de Apicomplexa esta proteína contribuye a regular la estabilidad del conoide (complejo apical), participa así en la motilidad y la invasión celular (Long et al., 2017). Sin embargo, no existe evidencia previa de que estas proteínas estén involucradas en la protección contra coccidiosis aviar (Blake et al., 2017; Venkatas y Adeleke, 2019). Por otro parte, el fagotopo GPNSAFWAGSER fue vinculado a la proteína putativa del factor de elongación 2 (EtEF-2) de *E. tenella*, de acuerdo con lo descrito previamente por Liu et al (2017), esta proteína es un antígeno común e inmunodominante en *E. tenella*, *E. acervulina* y *E. maxima*. Curiosamente, 2 arreglos genéticos recombinantes de este tipo de proteína (factor de elongación 1 α de *E. acervulina* y EtEF-1 α de *E. tenella*) han sido evaluados recientemente en diferentes pruebas de potencia (inmunización/desafío) mostrando resultados prometedores de inmunidad cruzada en *Eimeria* sp (Lin et al., 2017; Panebra y Lillehoj, 2019). En la búsqueda e identificación de antígenos inmunodominantes se espera que las clonas de péptidos recombinantes seleccionados representen imitaciones (mimotopos) de epítomos específicos presentes en los antígenos nativos del esporozoito de *E. tenella* (revisado en Adda et al., 2002). Una manera de corroborar que los mimotopos sean imitadores (*mimics*) verdaderos de los antígenos del esporozoito consiste en obtener anticuerpos contra estos péptidos y evaluar la inmunorreactividad de estos anticuerpos hacia los antígenos nativos, en este caso de *E. tenella*. Los datos de ELISA indirecta y *Western*

blot demuestran que cada uno de los sueros de conejo anti-clona detectaron exitosamente antígenos específicos en el esporozoito y merozoito de segunda generación de *E. tenella*. Esto último respalda la idea de que los péptidos recombinantes seleccionados corresponden a verdaderos mimotopos de epítomos del esporozoito evidenciando de esta manera su potencial inmunogénico e inmunoprotectivo en la infección por *E. tenella*. Una observación relevante es que estos mimotopos están aparentemente presentes en más de uno de los antígenos evaluados de *E. tenella*. Los antisueros de los conejos inmunizados con los fagotopos CNTGSPYEC y AGHTTQFNSKTT reconocen más polipéptidos en el esporozoito que en el merozoito. Todos estos polipéptidos reconocidos concatenan bien con antígenos nativos de *E. tenella* identificados previamente por los Abs de los conejos inmunizados con la vacuna experimental EtSz-IMS1313, anticuerpos que fueron utilizados originalmente para el tamizado de ambas bibliotecas de *Phage display* (Figura 34). Los antisueros contra los cuatro fagotopos reconocen más de una banda, esto indica que algunas proteínas de la suspensión cruda de las dos fases zoito asexuales de *E. tenella* previamente estuvieron o bien se encuentran sujetas durante la ejecución de la prueba a una acción proteolítica de manera similar a como sucede *in vivo* en algunos miembros de Apicomplexa (Dowse y Soldati, 2004; Frölich et al., 2012; Ramírez-Flores, 2019), aunado posiblemente también al proceso de desnaturalización *per se* de las muestras utilizadas para el SDS-PAGE. Usualmente las proteínas micronemales y de las roptrias se escinden proteolíticamente durante la biogénesis y la post-exocitosis para permitir el reconocimiento y unión a la membrana de las células huésped por parte del esporozoito (Dowse y Soldati, 2004; Jahn et al., 2009; Besteiro et al., 2011; Frölich et al., 2012; Huang et al., 2018; Ramírez-Flores et al., 2019). Los fragmentos generados a partir de cada SN crudo de proteínas desnaturalizadas de *E. tenella* (Sz y Mz) podrían estar conservando los mismos epítomos de reconocimiento, pero en pequeños trozos dispersos de diferente masa molecular (Sasai et al., 2008). Cada uno de esos fragmentos estaría manteniendo los epítomos en la misma conformación molecular de cómo se encuentran originalmente en la estructura cuaternaria de la proteína nativa de *E. tenella*, esto podría explicar en parte el reconocimiento multivalente observado en las membranas WB donde se probaron los sueros anti-clona. De hecho, Lal et al (2009) en un estudio proteómico utilizando SDS-PAGE 2D y LC-MS/MS en dos fases asexuales de *E. tenella* determinaron que proteínas individuales como el EF-1 α o SO7 del merozoito y esporozoito de *E. tenella* respectivamente, se encontraban en múltiples puntos del gel de acrilamida utilizado para su análisis, observación similar a la efectuada por Zhang et al (2017). Otra posible explicación para estas bandas múltiples sería que el suero anti-clona

reacciona de forma cruzada con el mismo antígeno específico o un antígeno mimético del primero presente en ambas etapas zoito asexuales de *E. tenella* y consecuentemente este antígeno se encuentra en varios polipéptidos de diferente peso molecular. En este contexto se debe considerar que la detección inmune mediada por un mimótopo puede involucrar más de un epítipo, donde un epítipo induce el anticuerpo que selecciona al mimótopo y posteriormente el anticuerpo inducido por este mimótopo puede interactuar con otro epítipo. La reactividad cruzada entre antígenos ocurre cuando un anticuerpo dirigido contra un epítipo específico logra unirse exitosamente a otro epítipo similar al primero que contribuyó a generarlo (mimético). Los dos epítipos en cuestión tienen regiones estructurales tridimensionales similares, lo cual permite que el anticuerpo generado contra un mimotopo reconozca un segundo epítipo debido a que estructuralmente es casi el mismo antígeno. Para poner en relevancia esta afirmación, cuando Kozbor (2010) generó mimotopos (47-LDA) a partir del epítipo del gangliósido GD2 y éste mimotopo se utilizó como inmunógeno, el anticuerpo generado contra el mimotopo reaccionó de forma cruzada con otro epítipo localizado en la glicoproteína de superficie (105 kDa) existente en ambos tipos celulares estudiados: neuroblastoma y melanoma GD2⁺ y GD2⁻ inhibiendo así también el crecimiento de las células GD2⁻. Por lo tanto, para mostrar su efecto inhibitor un anticuerpo inducido vs un mimotopo no necesita interactuar exclusivamente con su epítipo genérico si este presenta inmunidad cruzada hacia otro epítipo de la misma estructura antigénica. En nuestro estudio el fagotopo 15 (HFAYWWNGVRGP) fue el péptido seleccionado con mayor frecuencia en el procedimiento de tamizado (Tabla 26); produjo resultados positivos en ELISA indirecta utilizando los anticuerpos anti-esporozoito de conejo y ave (Figuras 51 y 52) y en los ensayos de inmunización de conejos con el mimótopo (Figura 55C), mostrando los anticuerpos anti-clona reactividad cruzada contra la proteína esporozoíto nativa e incluso contra el merozoíto (Figura 56E). Esto determinó un probable efecto de inmunidad cruzada como el descrito anteriormente. Los anticuerpos vs los fagotopos 1 y 18 revelaron también una alta reactogenicidad en WB hacia ambas fases asexuales zoito de *E. tenella* probadas (Figura 56C, 56F) y alta inmunogenicidad en los conejos inmunizados con ambos fagos (Figura 55A, 55D). Adicionalmente, los análisis informáticos de las tres clonas mostraron un emparejado positivo con proteínas de *E. tenella*. Un examen más detallado de las estructuras biológicas reconocidas *in situ* en el esporozoíto y merozoíto de *E. tenella* (inmunolocalización) por cada suero anti-clona podría ser muy esclarecedor. Nuestro estudio pone en perspectiva tres conceptos interesantes: (i) la identificación positiva del antígeno nativo contribuye a monitorear la apropiada selección de péptidos recombinantes candidatos

a ser considerados verdaderos mimotopos de epítomos; (ii) un péptido recombinante que actúa como un verdadero mimotopo fusionado a partículas virales muestra un aumento significativo de anticuerpos después de su inmunización y la proteína nativa puede ser de esta manera específicamente reconocida y, (iii) a través de Ph D se puede hacer una selección de péptidos recombinantes inmunogénicos desplegados en fagos que pueden funcionar como vacunas subunitarias *per se*. Adicionalmente, se observó que a diferencia del esquema de inmunización donde se utilizaron inmunógenos con antígenos complejos como el esporozoito completo de *E. tenella* (Figura 33A), los péptidos de menor tamaño como los expresados en los inmunótopos pueden requerir de un período adicional de inmunización para alcanzar un título diferenciado (Figura 55). Nuestros datos concuerdan con resultados de otros estudios que han mostrado que los mimotopos empleados como inmunógenos son capaces de inducir anticuerpos específicos o incluso una respuesta inmune celular-mediada (LT CD4+ Th1) hacia antígenos nativos en programas de inmunización contra diferentes agentes patógenos incluyendo parásitos complejos (Denisova et al., 2009; Villa-Mancera et al., 2008; Prudencio, 2010; Gazarian et al, 2011; Meyer et al., 2012; Gu et al., 2013; Costa et al., 2014, 2019). Pudimos constatar además que al exhibir inmunogenicidad específica estos péptidos recombinantes ofrecen *per se* una atractiva oportunidad para el desarrollo de inmunógenos recombinantes contra *E. tenella*. Curiosamente, diferentes sueros anti-fago reaccionaron a una misma banda dominante en el esporozoito, la cual mostró un peso molecular aproximado de ~25-27 kDa (Figura 56). Esta banda antigénica se identificó también en las membranas WB del esporozoito donde se probaron ambos tipos de sueros anti-esporozoito (conejo y pollo) (Figura 34), sin embargo, este polipéptido no se ha observado en transferencias *Western blot* usando antisueros de pollos inmunizados de forma natural (oral) con *E. tenella*, aun cuando en el SDS-PAGE espejo del *Western blot* si se observa presente (Constantinoiu et al, 2008). En otro estudio este polipéptido se pudo observar en transferencias *Western* del merozoito de una cepa atenuada y *wild-type* de *E. tenella* usando antisueros de pollos inmunizados de forma natural (oral) con una cepa vacunal *wild-type* de *E. tenella*, pero, no existió evidencia de esta banda en los *immunoblottings* de ambos antígenos Mz (cepa atenuada y *wild-type*) cuando se utilizó para la inmunización oral la cepa atenuada de *E. tenella* (Constantinoiu et al, 2011), lo que implica el potencial que tiene este componente antigénico en el grado de virulencia vinculado directamente con una mayor capacidad de invasión del parásito (cepa *wild-type*). Evento que posiblemente se refuerza con la observación hecha en el presente trabajo cuando se efectuó la inmunización de forma natural (oral) con la cepa *wild-type* de *E. tenella* a aves híbridas

con la finalidad de evaluar las dos dosis de inmunización primaria óptimas para la producción de ooquistes y antisuero de referencia (5K y 10K) (Capítulo 2.4). Este antígeno de ~25-27 kDa fue identificado con tinción muy débil en el antígeno del esporozoito (Figura 11A, carril 1), y con tinción más fuerte (de hecho fue el más inmunodominante) en el antígeno Mz inmediatamente después de la primer inmunización con 5K (Figura 11A, carril 2), posteriormente, en las dos siguientes evaluaciones de refuerzo de ese mismo programa, este polipéptido se observó únicamente en el SN del Mz, sin embargo, su inmunodominancia se diluyó acorde con la afinidad tintorial mostrada (Figura 11A, carril 4 y 6), esta disminución en la tinción y reconocimiento posiblemente está vinculada a eventos de maduración por afinidad producida por la acción de pseudogenes y mutación somática a nivel de CDR del idiotipo de las IgY séricas de las aves evaluadas en este programa (5K), se ha reportado que esta maduración perfecciona la respuesta inmune seleccionando menos clonas de LB reactogénicas pero con producción de inmunoglobulinas de mucha mayor afinidad que la mostrada por los anticuerpos producidos durante la respuesta primaria (Davidson et al, 2008; Abbas et al., 2012). Este mismo polipéptido (~25-27 kDa) apenas y se observó presente en el programa 10K, únicamente se pudo verificar en el SN de Mz después del primer y segundo refuerzo oral con ooquistes esporulados de *E. tenella* (Figura 11B, carril 4 y 6). En antígenos de superficie de *Eimeria* previamente ya descritos, se menciona que un Ag con masa molecular de 25 kDa mostró cobertura para dos polipéptidos de 17 y 8 kDa, este antígeno fue denominado tempranamente como TA4, el cual fue caracterizado desde principios de la década de 1990 (Blake et al., 2017; Venkatas y Adeleke, 2019). En ese mismo periodo, Karkhanis et al (1991) determinaron una acción inmunoprotectora efectiva por parte de un péptido del Sz con una masa molecular similar al polipéptido identificado (26 kDa). Más tarde, el TA4 se identificó como glicosilfosfatidil-inositol (GPI) anclado que es el antígeno de superficie 1 (SAG 1) específico del esporozoito de *E. tenella* (Tabarés et al, 2004; Reid et al, 2014; Blake et al., 2017), el cual se ha descrito que induce inmunidad protectora parcial cuando se ha empleado como inmunógeno por medio de la generación con ingeniería genética de su proteína recombinante en *E. coli*, ADN plasmídico inductor o bien vectorizado en *Salmonella typhimurium* (Xu et al., 2008; Zimmermann et al., 2009; Jahn et al., 2009; Blake et al, 2017; Venkatas y Adeleke, 2019). Previamente, de Venevelles et al (2004) usando electroforesis bidimensional y espectrometría de masas ya habían identificado el precursor del antígeno TA4 del esporozoito de *E. tenella* que tenía un peso molecular predicho de 25.04 kDa, sin embargo, para este antígeno determinaron experimentalmente un mayor peso molecular (26.86 kDa), que coincidentemente es más similar a la masa

molecular de la banda que nosotros observamos aquí principalmente en el Sz. Esto último nos ayuda a aclarar las diferencias mostradas por varios investigadores a lo largo del tiempo acerca del peso molecular específico de este péptido altamente inmunogénico observado en nuestras transferencias, aún cuando debemos considerar que una investigación reciente sobre la caracterización de SAG10 de *E. tenella* determino que una proteína de superficie exclusiva del esporozoito mostró un peso molecular predictivo de ~27.9 kDa (Liu et al, 2019). Para contextualizar la relevancia de la identificación de este antígeno (SAG1, SAG10), en un estudio de proteómica de esporozoitos, merozoitos y ooquistes tempranos/tardíos de *E. tenella* hecho por Lal et al (2009), ellos detectaron 47 proteínas de superficie SAG en el merozoito, pero únicamente 4 en el esporozoito. Un estudio de reactogenicidad de los anticuerpos anti-esporozoito de *E. tenella* de conejo hacia ambas fases zoito asexuales de *E. tenella* por medio de un *Western blot* con SDS-PAGE de doble dimensión y análisis MS MALDI-TOF sería muy esclarecedor.

Conclusión

- El enfoque de inmunología molecular reversa empleado en este estudio permitió identificar diferentes epítomos inmunodominantes del esporozoito de *E. tenella* y sus respectivas secuencias de ADN codificante.
- Se efectuó un reconocimiento positivo de antígenos en dos etapas zoito asexuales de *E. tenella* utilizando anticuerpos dirigidos contra mimotopos de una sola de las etapas.
- La investigación mostró un nuevo enfoque inmunológico para el descubrimiento exitoso de nuevos candidatos de epítomos de células B del esporozoito de *E. tenella* aptos para el desarrollo a través de ingeniería genética de una vacuna putativa contra *E. tenella*.

4.9 Inmunoprotección de aves *SPF Leghorn White* inmunizadas con clonas individuales de los fagotopos 1 y 7 seleccionados de la biblioteca Ph D c7c, y clonas F.15 y F.18 de la biblioteca Ph D 12 mer, frente a un desafío con una dosis alta de ooquistes esporulados de *E. tenella*

El objetivo de este estudio fue encontrar entre los péptidos recombinantes fusionados a fagos filamentosos mimotopos del esporozoito de *E. tenella*, aquellos que puedan contribuir al desarrollo de una vacuna genómica (ADN), recombinante o subunitaria basada en péptidos molecularmente definidos que sean capaces de generar inmunoprotección contra una infección severa por *E. tenella*. En este estudio en particular, analizamos la inmunogenicidad e inmunoprotección de cuatro inmunótopos seleccionados originalmente en función de su capacidad de respuesta a un ligando generado previamente con base a antígenos específicos de células B presentes en el esporozoito de *E. tenella* (Ph D). Los resultados mostraron que dos inmunótopos el F.7 (restringida) y el F.15 (lineal) generaron protección inmune parcial ante el desafío severo con *E. tenella*, a diferencia de la respuesta exhibida por los otros dos grupos inmunizados con los inmunótopos F.1 y F.18, el fago M13 *wt* y el grupo no inmunizado- desafiado. Los grupos de F.7 y F.15 mostraron ambos un IAC de 31. Aunque se ha sugerido que los péptidos conformacionales comparados con los lineales forman mejores mimótopos antigénicos e inmunogénicos, en este caso, independientemente del tipo de biblioteca de Ph D que se utilizó para la obtención de estos 2 fagotopos destaca que ambos inmunótopos mostraron un IAC idéntico. Por otra parte, la vacuna experimental EtSz-IMS1313 proporcionó una eficacia extraordinaria (IAC=187), mayor que cualquiera de las vacunas individuales basadas en fagotopos. Aunque el nivel de protección inmunológica alcanzado por los dos inmunótopos sobresalientes (F.7 y F.15) fue menor en comparación con el resultado exhibido por esta vacuna (EtSz-IMS1313), aun así, ambos inmunótopos desplegaron inmunoprotección parcial significativa contra el desafío extremadamente severo con *E. tenella* (evidenciado aquí por el valor ampliamente negativo del IAC presentado por el grupo no inmunizado- desafiado).

Es importante destacar dos hechos observados en la protección inmunitaria parcial conferida por estos dos inmunótopos en comparación con la protección inmune mostrada por la vacuna experimental. Primero, i) la vacuna experimental fue formulada con esporozoitos completos de *E. tenella*, y en ensayos previos se ha observado que este tipo de vacunas experimentales desarrollan respuestas inmunes específicas contra una cantidad mayor de antígenos inmunodominantes (Juárez-Estrada et al., 2021a), no únicamente contra uno solo, como fue el caso de las 4 vacunas basadas en un solo inmunótopo, de hecho, algunos

antígenos proteicos del esporozoito completo de *E. tenella* ya han sido caracterizados y probados mostrando una inmunoprotección significativa bajo diferentes condiciones de evaluación experimental (Kharkanis et al., 1991; Bhogal et al., 1992; Rhalem et al., 1993; García et al., 2008; Bogado et al., 2010). Segundo, ii) la dosis de infección de ooquistes esporulados utilizados en nuestro ensayo de inmunización/desafío fue mayor que la cantidad de ooquistes empleados habitualmente en estudios similares (Subramanian et al., 2008; Sun et al., 2014; Ma et al., 2019; Song et al., 2021; Zhao et al., 2020; Chen et al., 2021), esta dosis superlativa de ooquistes se utilizó para probar verdaderamente si los inmunótopos individuales utilizados como vacunas podrían generar suficiente inmunogenicidad para poder proteger a las aves contra un desafío severo con *E. tenella*, esto en una condición similar muy cercana al peor escenario de brote infeccioso inesperado por *Eimeria* que potencialmente podría estar ocurriendo en una caseta de pollo de engorda cuando las aves están creciendo (Wallach, 2008; Lee et al., 2013). Aparentemente la cantidad de ooquistes usados para el desafío supera la inmunidad generada por cada fagotopo individual, bajo este contexto es evidente que se requiere de un nivel mínimo de inmunidad para poder neutralizar eficientemente una infección tan severa. Los inmunótopos individuales no fueron capaces de generar este nivel mínimo debido a una aparente relación dependiente de concentración inmunógeno: respuesta, y posiblemente también a la complejidad del organismo *per se*.

En el escrutinio genómico **proteína: proteína** del identificador taxonómico (Tax ID) núm. 5802 de *E. tenella* que se halla en el repositorio NCBI-Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), el F.7 concatena con alta homología con una proteína hipotética conservada de *E. tenella*. Hasta la fecha se ha logrado secuenciar por completo el genoma de *E. tenella*, sin embargo, más del 70% de sus genes operativos aún se hallan clasificados como proteínas hipotéticas conservadas de función desconocida, o bien no se ha revelado una homología significativa con proteínas ya conocidas (Klotz et al., 2007; Novaes et al., 2012; Reid et al., 2014; Blake et al., 2015; Zhao et al., 2021b). Muy pocos de estos genes han sido estudiados con la finalidad de conocer su función exacta o su inmunogenicidad (Klotz et al., 2007; Zhai et al., 2016; Zhao et al., 2021b). Recientemente, Zhai et al (2016) clonaron un gen de una proteína hipotética conservada de *E. tenella*, la designaron como EtCHP559, y su ADNc contenía un marco de lectura abierto (ORF) de 1224 pb que codifica un polipéptido de 407 aminoácidos con predicción de masa molecular de 46 kDa. EtCHP559 se expresó a niveles más altos en los esporozoitos que en otras etapas de desarrollo de *E. tenella*. Usando WB, la proteína recombinante fue reconocida por un antisuero de conejo contra esporozoitos de *E. tenella*. La inmunolocalización mostró que EtCHP559 se distribuye principalmente en la superficie del

esporozoito y se focaliza hacia su región anterior. En un ensayo de inmunización/desafío, esta proteína recombinante generó un nivel significativo de protección, lo cual sugiere que esta proteína hipotética conservada juega un papel importante en la invasión de los esporozoitos a las células huésped y podría ser un candidato eficaz para el desarrollo de una nueva vacuna sintética contra *E. tenella*. Con base a los resultados obtenidos por Zhai et al (2016), y la protección parcial conferida por el inmunótopo F.7 en nuestra prueba de desafío, es evidente que existen diversas proteínas hipotéticas conservadas de funciones desconocidas que necesitan ser estudiadas a fondo. Por ejemplo, utilizar un enfoque bioinformático como el descrito por Madlala et al (2021) a partir de la secuencia de la proteína hipotética conservada de *E. tenella* que emparejó en este caso con F.7 sería muy esclarecedor. Por otra parte, ya que la vacunación con F.7 y F.15 se efectuó de manera Sc y ambos inmunótopos fueron capaces de desarrollar una respuesta inmune, aunque parcial, es evidente que los posibles antígenos protectores podrían no estarse identificando con precisión hasta que se haya desarrollado un método de administración adecuado, sin embargo, es posible que no se reconozca cual es el método apropiado de administración hasta que se hayan aislado los antígenos protectores adecuados, el esquema actual para la identificación de epítomos inmunogénicos putativos de *E. tenella* representa una situación clásica redundante conocida como "Catch 22" (Shirley y Lillehoj, 2012; Song et al., 2017; Pastor-Fernández et al., 2018). El F.18 mostró una alta coincidencia de cobertura con la proteína putativa homogénea *cullin* de *E. tenella*, proteína que recluta objetivos específicos para la ubiquitina ligasa en un complejo proteico de múltiples subunidades que es útil para la ubiquitinación tanto en el parásito como en el huésped (Liu et al., 2017; Huang et al., 2018; Zhang et al., 2020). Sin embargo, este inmunótopo no mostró un nivel de protección parcial contra *E. tenella* como el desplegado por el fagotopo 15. En un ensayo ELISA anterior, F.15 mostró la mayor reactogenicidad con antisueros de conejo contra el esporozoito de *E. tenella*. El fagotopo 15 se emparejó bien con la cadena beta de dineína (*Dynein*) brazo externo flagelar, una proteína putativa de *E. tenella*, esta proteína produce fuerza hacia los extremos negativos de los microtúbulos en la membrana interna del esporozoito (Besteiro et al, 2011; Hammarton, 2019). Wan et al (1999) habría determinado previamente la expresión génica dominante de este tipo de proteína (F.18= vinculada a ubiquitina) en Mzs de *E. tenella*, y recientemente Liu et al., (2017) la identifico como antígeno inmunodominante, mientras que la última proteína (F.15) es clave en la invasión de *Eimeria* al enterocito (Besteiro et al., 2011; Huang et al., 2018). Hasta el día de hoy, no existen estudios previos

que involucren ninguna de estas dos proteínas de *Eimeria* como inmunógenos de proteína recombinante o de ADN en ensayos de protección inmune específica contra *E. tenella*.

La proteína micronemal 4 de *E. tenella* (EtMIC4) pertenece a las proteínas de la familia TRAP y contiene dominios adhesivos conservados en eucariotas superiores; estos incluyen módulos tipo EGF y TSP-1 (Tomley et al., 2001, Periz et al., 2009). El escrutinio genómico de *E. tenella* en el NCBI-Blast usando como plantilla el fagotopo F.1 encontró múltiples coincidencias con módulos similares a EGF y TSP-1 de EtMIC4, desafortunadamente, en nuestro ensayo de inmunoprotección este inmunótomo individual no mostró una protección significativa contra *E. tenella*. Esto indica que, aunque EtMIC4 es una proteína clave durante la invasión de los esporozoitos al enterocito y aparentemente también es altamente inmunogénica e inmunodominante (Réfega et al., 2003), este péptido no debe ser considerado candidato para el desarrollo de nuevas vacunas contra *E. tenella* hasta que se haya probado nuevamente como inmunógeno bajo diferentes plataformas de ensayo (vacunas de proteína nativa purificada, recombinante subunitaria, vectorizada o de ADN "Catch 22"). De hecho, a diferencia de EtMIC1/2/3/5/7 no existen estudios previos que utilicen EtMIC4 como proteína recombinante, vacuna de vector subunitario o vacuna de ADN que pueda indicar un papel clave para ella en la inmunoprotección contra *E. tenella* (Lai et al., 2011; Huang et al., 2015, Huang et al., 2018; Venkatas y Adeleke, 2019; Zhang et al., 2020; Song et al., 2021). Sin embargo, habrá que señalar que cuando algunas proteínas recombinantes de *Eimeria* sp., han sido evaluadas como candidatas potenciales a vacunas frente a *Eimeria* sp., la protección inmune observada no ha sido tan eficaz como la conferida por las propias proteínas nativas o inclusive las vacunas ADN (Kopko et al., 2000; Matthews et al., 2002; Witcombe et al., 2004; Belli et al., 2004; Shraman et al., 2010; Ellis et al., 2012; Wiedmer et al., 2017; Yang et al., 2017; Zhao et al., 2020).

Por otra parte, se ha mostrado que un solo péptido recombinante mimotopo de un epítomo inmunodominante utilizado como vacuna puede inducir inmunidad esterilizante frente a algunos patógenos como virus y microbios (Gazarian et al., 2011; Cen et al., 2013; Aghebati-Maleki et al., 2016; Bao et al., 2019; Hess y Jewell, 2019). Actualmente no existen investigaciones previas que indiquen que el uso de inmunótomos como vacunas parasitarias, ya sea individual o multi-epitópicas formuladas con múltiples inmunótomos, sean capaces de generar una respuesta inmune completa bajo los programas de inmunización estándar utilizados de manera rutinaria (Villa -Mancera et al., 2008; Willadsen, 2008; Prudencio et al., 2010; Ellis et al., 2012; Gu et al., 2013; Costa et al., 2014; Buzzati et al., 2018). Diversos estudios diseñados para medir la respuesta inmune humoral y celular contra *Eimeria* sp., han

mostrado que la respuesta inmune del huésped es extremadamente compleja en comparación con la inmunidad desarrollada contra bacterias o virus (Rose y Hesketh, 1979; Dalloul y Lillehoj, 2006; Abbas et al., 2012). Además, a diferencia de los virus y microbios, incluso en los parásitos más simples, sus ciclos de vida son extremadamente complejos, adicionalmente hoy en día existe aún una falta de comprensión general sobre sus interacciones huésped/parásito (Dalloul y Lillehoj, 2006; Abbas et al., 2012; Huang et al., 2018; Geinoro, 2019; López-Osorio et al., 2020). Debido a esta naturaleza compleja, en el caso de *Eimeria* el sistema inmunológico del huésped aviar se enfrenta a un repertorio de antígenos altamente polimórficos y diversos (Blake y Tomley, 2014; Blake et al., 2020b, 2021b). Una serie de diferentes características biológicas preservan esta diversidad: Primero, los protozoarios alguna vez en su ciclo de vida tienen que pasar por una fase de reproducción sexual, con el consecuente intercambio de material genético de ambas cepas parentales, esto da como resultado una progenie de ooquistes con una composición genética y fenotípica diversa (Blake et al., 2015; López-Osorio et al., 2020; Blake et al., 2020b). Segundo, existe una expresión genética diferenciada a lo largo de las sucesivas etapas del ciclo de vida del parásito, es como si el huésped fuera infectado con varios parásitos diferentes al mismo tiempo (Reid et al., 2014; Auld y Tinsley, 2015; Gao et al., 2021). En el caso de coccidiosis es aún más complicado, esto debido a la aparición de diferentes cepas de *Eimeria* sp., que afectan a las aves y cada una puede expresar variantes antigénicas distintas de moléculas específicas de estadio (Reid et al., 2014; Zhang et al., 2017; Blake et al., 2015; Blake et al., 2020; Gao et al., 2021). Esta capacidad les permitiría potencialmente evitar las respuestas innatas/adquiridas del huésped (Zhang et al., 2017; Geinoro, 2019; Blake et al., 2020b). Todos estos factores imponen desafíos considerables en las metodologías de escrutinio para la selección de candidatos de antígenos potenciales para vacunas antiparasitarias de tercera generación (Prudencio et al., 2009; Costa et al., 2019; Liu et al., 2017; Madlala et al., 2020; Gao et al., 2021). Hasta ahora, los mimotopos no han podido demostrar que pueden proteger contra todos los patógenos, especialmente contra patógenos tan diversificados como los parásitos multicelulares o los miembros Apicomplexa (Arnon et al., 2000; Beghetto et al., 2003; Morales et al., 2008; Prudencio et al., 2010; Tonelli et al., 2013; Buzzati et al., 2018). La principal deficiencia de los mimotopos seleccionados en bibliotecas de fagos, es que, aunque pueden inducir anticuerpos que reconocen el epítipo original en el antígeno nativo, estos anticuerpos no siempre poseen la capacidad de neutralizar el patógeno *in vivo* (Matthews et al., 2002; Ellis et al., 2012). Con este propósito, una investigación muy completa sobre este tema llegó a la conclusión de que los péptidos

seleccionados de bibliotecas de secuencias aleatorias carecen de lo que se define como "aptitud inmunogénica" esto en contraste con los péptidos seleccionados de un péptido natural a partir de bibliotecas en las que los fagos presentaban segmentos de polipéptidos nativos de patógenos reales (Matthews et al., 2002; Ellis et al., 2002). Otras investigaciones han atribuido un papel clave a la glicosilación de los epítomos nativos, algo difícil de reproducir en los péptidos recombinantes seleccionados. La cuestión principal en este tipo de estudios es si los mimotopos seleccionados de bibliotecas aleatorias de fagos por anticuerpos específicos anti-patógeno pueden adquirir o no la aptitud para convertirse en verdaderos candidatos a vacunas. Un solo péptido recombinante del esporozoito como SO7 o AMA-1 han probado inducir protección contra *E. tenella* mostrando una reducción significativa en los recuentos de oocistos y en la severidad de lesiones contra el desafío tanto con especies homólogas como heterólogas de *Eimeria* (Crane et al., 1991; Kopko et al., 2000; Klotz et al., 2007; Jiang et al., 2012; Yang et al., 2017; Rafiqi et al., 2018; Pastor-Fernández et al., 2018; Wang et al., 2020). Se ha mostrado además que un solo anticuerpo monoclonal producido contra el antígeno del gametocito 56 de *E. maxima* administrado pasivamente a pollos sin tratamiento previo puede reducir el 78% de la eliminación de oocistos después del desafío (Sharman et al., 2010; Jun et al., 2012; Wiedmer et al., 2017). Sin embargo, parece poco probable que con solo un antígeno B de *Eimeria* pudiera protegerse a los pollos contra una coccidiosis severa. Aunque los pollitos expuestos a una infección natural prolongada desarrollan anticuerpos contra los antígenos B, la inmunización activa de los pollitos jóvenes con una dosis protectora de SO7 o AMA-1 no produce una respuesta humoral evidente de anticuerpos, lo que sugiere que la protección parcial observada se puede deber más bien a una acción efectora conjunta a través de mecanismos celulares inmunomediados (Crane et al., 1991; Kopko et al., 2000; Klotz et al., 2007; Pastor-Fernández et al., 2018; Del Cacho et al., 2016; Rafiqi et al., 2018). Debido a que los epítomos lineales continuos (LT) a menudo tienen una longitud de seis aminoácidos, el tamizaje efectuado con bibliotecas de fagos M13 aleatorios puede seleccionar por afinidad péptidos recombinantes que coincidan exactamente con la estructura primaria del epítomo (Tonelli et al., 2013). Esto podría conducir a que una pequeña porción de un epítomo de células T lineal pudiera ser reconocido parcialmente como un pequeño fragmento de un epítomo de células B y de esta manera seleccionar un inmunotopo específico. De hecho, aunque todas las aves inmunizadas con la vacuna experimental EtSz-IMS1313 mostraron una protección satisfactoria contra el desafío severo con *E. tenella*, su nivel de anticuerpos en ELISA después de dos inmunizaciones fue significativamente menor que la OD mostrada por los

antisueros de referencia positivos (Juárez-Estrada et al., 2021a). Esto indica que, aunque la protección inmune exitosa de la vacuna EtSz-IMS1313 mostró un fuerte componente basado en la estimulación de antígenos específicos de células B (Juárez-Estrada et al., 2021a), en este caso podría también estar involucrado un mecanismo efector mediado por células aún no identificado exactamente (Del Cacho et al., 2016). En una reciente revisión, Pourjafa et al. (2019) resumió que, entre las estrategias de vacunas disponibles actualmente para el tratamiento del cáncer, la vacunación basada en mimotopos es una modalidad de tratamiento atractiva, la cual además de promover los efectos mediados por anticuerpos también activa la respuesta de LT. Por lo cual, los mimotopos reconocidos por anticuerpos clínicamente aprobados podrían ser herramientas efectivas para inducir inmunidad específica del epítipo deseado en un enfoque de vacunación activa (Adda, et al., 2002; Beghetto et al., 2003; Gazarian, 2005; Krüken et al., 2008; Wiedmer et al., 2017).

El ciclo de vida de *E. tenella* involucra diferentes etapas extracelulares, intracelulares, asexuales y sexuales (López-Osorio et al., 2020). Sin embargo, es factible que la inmunidad del huésped a los antígenos específicos de una etapa no se superponga de manera suficiente y eficiente a otras etapas posteriores, aún cuando ambas etapas expresan antígenos comunes, como es el caso por ejemplo de algunos genes de la familia SAG compartidos entre esporozoitos y merozoitos de *E. tenella* (Tabarés et al., 2004; Reid et al., 2004). Por lo tanto, desarrollar una vacuna inmutópica basada en un solo antígeno de una sola etapa de desarrollo del parásito es un enfoque demasiado optimista (Villa-Mancera et al., 2008; Prudencio et al., 2009; Tonelli et al., 2013). La mayoría de los investigadores han concluido que una vacuna eficaz contra la coccidiosis aviar debe contener antígenos de varias etapas de desarrollo del parásito, y además esta vacuna debe contar con suficientes epítomos de células B y T (Khalafalla y Dausgchies, 2011; Song et al, 2015; Blake et al., 2017; Venkatas y Adeleke, 2019). Algunas vacunas subunitarias recombinantes y de ADN multi-etapa de *Plasmodium*, *Leishmania*, *Schistosoma*, *Eimeria* y *Entamoeba* han mostrado buena protección en las pruebas de inmunización y desafío en comparación con vacunas construidas con una sola etapa (Tang et al., 2004; Ivory y Chadee, 2004; Draper et al., 2015; Song et al., 2015; Costa et al., 2014). Los experimentos con animales han mostrado que las vacunas de ADN multi-epitópicas son más efectivas para estimular la respuesta inmune que las hechas con un solo fragmento. A si mismo, las vacunas de ADN compuestas por antígenos de al menos dos etapas de desarrollo han sido más efectivas que las vacunas de ADN de una sola etapa (Song et al., 2015). Para la selección de vacunas de inmunótopos individuales realizada en este estudio seleccionamos la primera etapa del ciclo de vida del

parásito; sin embargo, los antígenos de merozoitos y gametocitos también han mostrado desarrollar una protección inmune significativa contra la infección por *Eimeria* sp (Witcombe et al., 2004; Jang et al., 2010; Sharman et al., 2010; Xu et al., 2013b; Blake y Tomley, 2014; Wiedmer et al., 2017; Song et al., 2021). Por lo tanto, en estudios posteriores, cualquiera de estos antígenos podría incluirse mezclado con otros para construir vacunas multi-epítomos que contengan antígenos de etapas del ciclo de desarrollo completo de *Eimeria* sp (esporozoitos, merozoitos, gametocitos y cigoto) las cuales podrían probablemente ser más efectivas. Hasta la fecha a excepción de los antígenos subunitarios incluidos en la vacuna CoxAbic® es poco común que los antígenos de *Eimeria* evaluados exhiban protección cruzada (Wallach, 2010), sin embargo al evaluar varios inmunógenos de este tipo se ha observado que inducen entre 40 y 70% de protección inmune contra la exposición de la cepa de *Eimeria* homóloga, esto cuando han sido probadas experimentalmente utilizando diferentes plataformas de administración (Blake y Tomley, 2014; Blake et al., 2017; Venkatas y Adeleke, 2019). Por lo tanto, el estudio actual sobre los antígenos sobresalientes de diferentes especies de *Eimeria* ofrece nuevas oportunidades para el desarrollo de vacunas multivalentes de múltiples epítomos contra todas las especies de *Eimeria* de importancia para la industria avícola (Pastor-Fernández et al., 2018; Tang et al., 2018; Liu et al., 2020a). Varias investigaciones han indicado que una de las principales limitantes para obtener un amplio uso de las vacunas de tercera generación está relacionada con poder lograr una administración adecuada de las mismas. De acuerdo con el calendario de vacunación utilizado habitualmente en la avicultura convencional, es evidente que se debe obtener una adecuada administración de la vacuna para poder lograr así su completa eficacia (Song et al., 2015; Tang et al., 2018; Pastor-Fernández et al., 2018). La diversidad de enfermedades infecciosas en las aves de corral ha requerido el desarrollo de diversos vehículos de distribución para atacar diferentes patógenos. Los antígenos de *Eimeria* administrados solos inducen una protección limitada en aves; y tanto la inmunidad celular como la humoral parecen operar juntas sólo durante un período muy corto de tiempo (Gilbert et al., 1988; Smith et al., 1993; Talebi y Mulcahy, 1995). Con la finalidad de superar estas limitantes se ha recomendado ampliamente el uso de adyuvantes. Por ejemplo, Garg et al (1999) compararon el efecto de dos tipos comunes de adyuvantes (gel de hidróxido de aluminio, GHA+ y adyuvante completo de Freund, ACF) administrados junto con 25 µg de antígeno del esporozoito de *Eimeria*. Los pollos se vacunaron Sc con vacunas experimentales a los 2 y 18 días de edad. Garg et al (1999) observaron que los pollos inmunizados con el antígeno emulsionado en ACF mostraron la mejor protección contra el desafío homólogo, con un

número reducido de OPGH (< 57.4%), sin mortalidad y la calificación promedio de lesiones más baja (+1.9). Por otra parte, Karkhanis et al (1991) lograron una reducción significativa de lesiones cecales (< +2.0) ante un desafío severo utilizando menos de 10 µg de antígeno del esporozoíto adsorbido en GHA+ por vía intramuscular a los 2, 9 y 16 días de edad de los pollos. La diferencia atribuida a la cantidad de antígeno utilizado en ambas investigaciones podría deberse a la mayor cantidad de inoculaciones repetidas del último caso. Es recomendable que en los estudios enfocados a eficientizar una mejor protección contra la coccidiosis aviar se empleen los antígenos de *Eimeria* o péptidos recombinantes junto con adyuvantes. Nosotros utilizamos en este estudio un moderno adyuvante junto con 100 µg de cada uno de los fagotopos (Jang et al., 2011b) y nuestro esquema de inmunización fue más parecido al utilizado por Garg et al (1999) que al de Kharkhanis et al (1991). Sin embargo, a los 28 días observamos una tercera parte de las aves con vacuna no absorbida en el tejido subcutáneo, esto finalmente indicaría un buen desempeño para este adyuvante, y de esta forma podemos descartar cualquier efecto negativo por falta de acción inmunológica atribuida exclusivamente al adyuvante. Por lo tanto, con el fin de obtener mejores resultados, además de la cantidad de antígeno y el tipo de adyuvante empleado, se debe evaluar también la edad del ave en cada inmunización y la cantidad de refuerzos requeridos.

La respuesta inmune a las vacunas de inmunótopos individuales en aves *SPF Leghorn* se midió a través de la reactividad de sus sueros hacia dos estadios zoito asexuales de *E. tenella* mediante ELISA indirecto. Nuestros resultados concuerdan con los hallazgos de Constantinoiu et al. (2007), quienes analizaron 1 µg/pozo de cada antígeno en un ELISA experimental y mostraron que las respuestas de anticuerpos contra ambos antígenos eran bastante similares, lo que proporciona una fuerte evidencia de que ambas etapas del ciclo de vida comparten muchos antígenos. Se observó que a los 21 días de edad no hubo una respuesta significativa de anticuerpos hacia ambos estadios asexuales zoitos de *E. tenella* por parte de las aves de los grupos inmunizados con los inmunótopos individuales, del grupo inmunizado con el fago M13 wt y del grupo control no inmunizado, aún cuando los pollitos no inmunes de 3 días de edad previamente mostraron un título alto de anticuerpos maternos específicos a *E. tenella*. De acuerdo con Wallach (2010), la inmunidad pasiva de los pollitos es un elemento importante a considerar en el desarrollo posterior de la inmunidad mediada por células contra las diferentes especies de *Eimeria*. De hecho, a los 21 días de edad, las aves *SPF Leghorn White* inmunizadas con la vacuna experimental EtSz-IMS1313 mostraron títulos de anticuerpos significativamente mucho más altos que cualquier otro grupo experimental. Aparentemente, los anticuerpos positivos detectados en los pollitos no

inmunes no mostraron interferencia en el desarrollo de inmunidad contra el esporozoito de *E. tenella* en el grupo vacunado experimentalmente, es notable también que las aves inmunizadas con inmunótopos no pudieron montar una respuesta humoral suficientemente distinguible contra ambos ciclos de vida de *E. tenella*. Con respecto a los fagos 7 y 15, dado que ambos inmunótopos mostraron protección parcial contra el desafío severo con *E. tenella*, su incapacidad para exhibir un título sérico evidente sería simplemente por una razón de cantidad. En última instancia, bajo una apreciación académica, F.7 y F.15 son solo un péptido recombinante mimotopo de un solo epítipo del esporozoito de *E. tenella* y de acuerdo con Reid et al (2014) *E. tenella* puede expresar entre 6.000 y 7.000 proteínas a lo largo de todo su ciclo de vida. De esta forma, es posible que, aunque ambos inmunótopos son inmunodominantes y pudieran generar cierta cantidad de anticuerpos en las aves después de solo dos inmunizaciones, estos anticuerpos no serían suficientes para mostrar una señal de absorbancia detectable, esto debido a que solo estarían reconociendo un epítipo de la fase de *Eimeria* entre miles, por lo que las aves necesitarían aún más refuerzos de la vacuna aunada a la subsecuente maduración por afinidad de los anticuerpos primarios.

Conclusión

- A medida que mejoran los métodos para el desarrollo de vacunas recombinantes de *Eimeria* sp, también evolucionan las herramientas que utilizamos para descubrir nuevos antígenos para su diseño.
- La inmunización de pollos con inmunotopos individuales de las bibliotecas Ph D 12 mer y c7c link, en experimentos con un desafío severo (*crowded dose*) de *E. tenella* inducen niveles de mayor protección parcial comparados al grupo de aves No Inmunizadas – Desafiadas.
- Aún cuando los péptidos recombinantes fusionados a fagos mimótopos del esporozoito de *E. tenella* utilizados como vacunas no fueron lo suficientemente potentes para lograr un control eficaz de los signos clínicos y la presión debida a una infección severa con *E. tenella*, el descubrimiento inesperado de nuevos antígenos de células-B renueva el interés en el uso de la tecnología de presentación de fagos con péptidos sintéticos aleatorios para mapear todas las etapas zoito inmunogénicas del ciclo de vida de *E. tenella* con el fin de identificar nuevos candidatos a vacunas putativas anticoccidiales.

4.10 Inmunoprotección de aves *SPF Leghorn White* inmunizadas con inmunógenos mixtos compuestos por los inmutopos F.1, F.6 y F10´ de la biblioteca de Ph D c7c, F.11, F.15 y F.18 de Ph D 12 mer, frente a un desafío patógeno con *E. tenella*

Eimeria tenella es una de las especies de *Eimeria* más prevalentes que causa pérdidas económicas significativas en todo el mundo (Blake et al., 2020a). Debido a su persistencia, el desarrollo de nuevas estrategias con base a vacunas profilácticas para prevenir la infección y disminuir la enfermedad se ha convertido en una alta prioridad (Juárez-Estrada et al., 2021a). Recientemente, varios estudios han prestado atención a las vacunas de ADN, vectorizadas y subunitarias de proteínas recombinantes como una estrategia novedosa para el control eficiente de la coccidiosis aviar (Tang et al., 2020; Zhao et al., 2020; Pastor-Fernández et al., 2020; Song et al., 2021). La investigación actual sobre medidas anticoccidiales está dirigida a la búsqueda e identificación de nuevos antígenos protectores de *Eimeria* que podrían utilizarse para la producción de vacunas recombinantes efectivas (Zhang et al., 2015; Liu et al., 2017, 2020a; Huang et al., 2018; Song et al., 2020; Gao et al., 2021). Por lo tanto, el enfoque en el uso de péptidos de *Eimeria* sp para diseñar vacunas subunitarias específicas contra la coccidiosis aviar parece prometedor (Ma et al., 2019; Chen et al., 2021). Adicionalmente, los péptidos muestran varios beneficios en comparación con otro tipo de antígenos, son de baja complejidad antigénica, no contienen componentes adjuntos potencialmente dañinos, presentan buena estabilidad y un bajo costo de producción (Gazarian et al., 2005; Costa et al., 2019; Torres-Abosta et al., 2020; González-Mora et al., 2021). El escrutinio de bibliotecas de péptidos recombinatorios fusionados a fagos es una metodología sencilla que en los últimos años ha llevado al descubrimiento de nuevos péptidos, antígenos e inmunógenos con numerosas aplicaciones, incluidos mimotopos de péptidos de epítomos inmunodominantes de diversos parásitos de tipo metazoario, artrópodos y protozoarios (Villa-Mancera et al., 2008; Prudencio et al., 2010; Ellis et al., 2012; Gu et al., 2013; Costa et al., 2014; Chen et al., 2021; González-Mora et al., 2021).

El objetivo de este estudio fue analizar seis péptidos recombinantes fusionados a fagos que fueron originalmente seleccionados en función de la capacidad de respuesta a su ligando generado para reconocer antígenos de células B específicos del esporozoito de *E. tenella* (Ph D), y encontrar de esta manera la mejor mezcla de inmunótopos que pudiera inducir inmunidad protectora contra el desafío animal *in vivo* con *E. tenella*. Los resultados mostraron que ambas vacunas F.c7c o F.12mer proporcionaron una protección inmunitaria significativa contra la exposición a *E. tenella* en comparación con las aves inmunizadas solo con el fago M13 irrelevante o el grupo no-inmunizado desafiado. La vacuna F.c7c

proporcionó mayor protección inmunológica con un IAC de 126 en comparación a la vacuna F.12 mer con un IAC de 120. Varios reportes previos han sugerido que los péptidos restringidos (vacuna F.c7c) comparados con los péptidos lineales (vacuna F.12mer) forman mejores mimotopos antigénicos e inmunogénicos (Adda et al., 2002; Gazarian, 2005; Pande et al., 2010). Los datos obtenidos respaldan esta observación, sin embargo, a pesar de la mínima diferencia del IAC exhibida entre ambas vacunas, es evidente que las dos preparaciones lograron desarrollar una respuesta inmunoprotectora contra el desafío experimental con *E. tenella*. Los resultados mostraron que la vacuna experimental EtSz-IMS1313 proporcionó mayor protección inmunológica (IAC = 146) con relación a cualquiera de las dos vacunas basadas en inmunótopos múltiples. Si bien el nivel de protección inmunológica alcanzado para las dos vacunas multi-inmunótopos (F.c7c y F.12mer) fue menor en comparación con la mostrada por la vacuna experimental EtSz-IMS1313, aún así, ambas vacunas multi-inmunótopos mostraron un valor de IAC no lejano al valor del IAC mostrado por la vacuna experimental basada en esporozoitos completos. Es importante destacar un hecho acerca de la protección inmunitaria conferida por estos dos tipos de vacunas basadas en múltiples inmunótopos en comparación con la protección otorgada por la vacuna experimental EtSz-IMS1313. En una investigación previa, este tipo de vacuna basada en esporozoitos completos inactivados desarrolla respuestas inmunes específicas contra una mayor cantidad de antígenos tipo B inmunodominantes (Juárez-Estrada, et al., 2021a), no únicamente contra seis de ellos como es el caso de las dos vacunas inmunotópicas mixtas evaluadas aquí. Aunque las dos vacunas basadas en inmunótopos mixtos no pudieron generar un nivel de inmunoprotección similar al mostrado por la vacuna experimental EtSz-IMS1313, ambas vacunas multi- inmunotópicas si fueron capaces de montar una respuesta inmunitaria específica efectiva contra *E. tenella*. Por lo tanto, es claro que cada fagotopo imita un epítipo del esporozoito de *E. tenella* que podría ser clave para la inmunoprotección contra este protozoario.

Durante el escrutinio genómico **proteína:proteína** del identificador taxonómico (Tax ID) núm. 5802 de *E. tenella* del repositorio NCBI-Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) se encontraron múltiples coincidencias de los fagotopos conformacionales F.1 y F.6 con módulos (c8c) del factor similar de crecimiento epidermal (EGF-like) y trombospondina tipo 1 (TSP-1) de la proteína micronemal 4 de *E. tenella* (EtMIC4). Esta proteína pertenece a la familia de proteínas TRAP y contiene dominios adhesivos conservados en Eukariotas superiores que incluyen los módulos tipo EGF-like y TSP-1 (Tomley et al., 2001; Morahan, 2009). Un análisis de máxima parsimonia y verosimilitud mostró que EtMIC4 comparte una alta

homología con la proteína EmTFP250 de *Eimeria maxima* y con TgMIC12, una proteína predicha de las micronemas de *Toxoplasma gondii* (Periz et al., 2009). En la prueba de potencia inmunológica, ambos inmunótopos (F.1 y F.6) constituían las 2/3 partes de la vacuna mixta basada en multi-epítomos que mostró la mejor protección contra la exposición a *E. tenella*. Por lo cual, esto indicaría que EtMIC4 es una proteína clave durante la adhesión e invasión de los esporozoitos al enterocito, y además es altamente inmunogénica cuando se utiliza como ligando un anticuerpo heterólogo para su reconocimiento (Talebi y Mulcahy, 1995; Réfega et al., 2003; Periz et al., 2009; Morahan, 2009). Aunque no existen estudios previos que utilicen EtMIC4 como vacuna de proteína recombinante, vector subunitario o de ADN (Lai et al., 2011; Huang et al., 2015, Zhang et al., 2017; Huang et al., 2018; Venkatas y Adeleke, 2019; Song et al., 2021), se han evaluado varias proteínas recombinantes relacionadas con EtMIC4 por sus características de inmunogenicidad, sin embargo, todas ellas han protegido únicamente de forma parcial (Du y Wang, 2005; Subramanian et al., 2008; Shivaramaiah et al., 2010; Song et al., 2015; Zhao et al., 2021a). Se requieren más estudios que evalúen el papel de EtMIC4 en la respuesta inmune específica contra *E. tenella*. Esta proteína deberá considerarse bajo sus diferentes características como vacuna nativa, recombinante, de vectores activos y de ADN. El tercer péptido recombinante conformacional fusionado a un fago (F.10´) usado en la vacuna de múltiples epítomos F.c7c emparejó genómicamente bien con la enzima Asparaginil-tRNA sintetasa, putativo de *E. tenella*. A pesar de que algunas investigaciones han indicado que este tipo de proteínas podrían estar involucradas en interacciones del heterocomplejo Hsp90 / p23 que participa en el ciclo de propagación Hsp70 / Hsp90 de algunos miembros de Apicomplexa (Echeverria et al., 2010), no existen trabajos previos que hayan probado específicamente esta proteína en ensayos de respuesta inmune anticoccidial aún cuando HSP70 ha sido determinada como inmunodominante previamente (Réfega et al., 2003; Liu et al, 2017). En una investigación previa utilizando un ensayo ELISA, el fagotopo F.10´ mostró la mayor OD utilizando sueros de conejo y pollos Leghorn SPF inmunizados con el esporozoito completo de *E. tenella*, lo que indica que este inmunótopo genera una reactividad significativa particular contra este péptido específico. Goel et al (2019) sugirieron que la familia de enzimas aminoacil-tRNA sintetasa presentes en varios parásitos pueden ser un objetivo apropiado para impulsar nuevas medidas de control inmune. Recientemente, Liu et al (2020a) descubrieron que varias proteínas de la familia de enzimas internas de *Eimeria* sp., podrían ser candidatas a vacunas anticoccidiales adecuadas ya que una cantidad significativa de ellas se identificaron como antígenos protectivos comunes en diferentes especies de *Eimeria*. En el

cribado genómico, el fagotopo lineal F.18 mostró una coincidencia de alta cobertura con la proteína putativa homologa *cullin* de *E. tenella*, proteína que recluta objetivos específicos para la ubiquitina ligasa en un complejo de proteínas de múltiples subunidades que es útil para la ubiquitinación tanto en el parásito como en el huésped (Liu et al., 2017; Huang et al., 2018; Zhang et al., 2015, 2020). En un ensayo ELISA previo, F.18 no mostró la magnitud de respuesta inmune humoral contra *E. tenella* como la mostrada por el F.15, este último fagotopo mostró la mayor reactogenicidad con sueros de conejo y aves *SPF Leghorn* inmunizados con el esporozoito de *E. tenella*. F.15 coincidió con la cadena beta dineína, el brazo externo flagelar, una proteína putativa de *E. tenella*, esta proteína produce fuerza hacia los extremos negativos de los microtúbulos en la membrana interna del esporozoito (Besteiro et al, 2011; Hammarton, 2019), la primera proteína ha sido ya identificada como antígeno inmunodominante (Liu et al., 2017), y la última es una proteína clave en la invasión de *Eimeria* al enterocito (Zhang et al., 2015; Huang et al., 2018). El fagotopo 11 ocupó el segundo lugar en reactogenicidad con sueros de conejo y aves *SPF Leghorn* inmunizados contra el esporozoito de *E. tenella*, este inmunotopo concatenó significativamente con una proteína hipotética conservada de *E. tenella*. Hoy en día, el genoma completo de *E. tenella* ha sido ya secuenciado, pero más del 70% de los genes se clasifican actualmente como de función desconocida o se han anotado como proteínas hipotéticas conservadas de función desconocida (Klotz et al., 2007; Novaes et al., 2012; Reid et al., 2014; Blake et al., 2015; Zhao et al., 2021b). De hecho, pocos genes de este tipo se han estudiado para conocer su función o propiedades inmunogénicas (Klotz et al., 2007; Zhai et al., 2016; Zhao et al., 2021b). Recientemente, Zhai et al (2016) clonaron un gen de proteína hipotética conservada de *E. tenella*, y en un ensayo de inmunogenicidad/desafío, la proteína recombinante obtuvo un nivel significativo de protección, lo que sugiere que esta proteína hipotética conservada juega un papel importante en la invasión de los esporozoitos y podría ser candidato para el desarrollo de una nueva vacuna contra *E. tenella*. De acuerdo con los resultados observados por Zhai et al (2016) queda claro que existen varias proteínas hipotéticas conservadas de *E. tenella* que necesitan ser estudiadas más a fondo. Hasta la fecha, no existen estudios de inmunidad previos que involucren a los péptidos específicos de *Eimeria* de los cuales son mimótopos los tres inmunótopos incluidos en la vacuna multi-epítipo F.12 mer. Hoy en día, la necesidad de lograr una mayor eficacia de las vacunas contra parásitos complejos como *Eimeria* aviar se ha vuelto imperativa (Blake et al., 2021b). Se han propuesto dos enfoques generales para lograrlo, en primer lugar, debe optimizarse la respuesta inmunitaria protectora por parte del sistema inmunológico del huésped y, en segundo lugar, se recomienda el uso

de vacunas de múltiples antígenos. De acuerdo con varios estudios sobre la protección de la inmunidad contra *Eimeria* sp., se ha observado que la respuesta inmune del huésped es excepcionalmente compleja en comparación con la inmunidad desarrollada contra bacterias o virus (Rose y Hesketh, 1979; Dalloul y Lillehoj, 2006; Abbas et al., 2012; Geinoro, 2019). Por ejemplo, Cen et al (2013), al evaluar la inmunogenicidad e inmunoprotección de mimotopos inmunodominantes (Ph D 12mer) de la proteína de membrana externa U (OmpU) de *Vibrio mimicus*, mostraron que únicamente 4 clonas de fagos positivos (la mayoría con un motivo central de consenso único) lograron obtener el 100% de efecto inmunoprotector frente a una fuerte dosis de desafío. Por otra parte, se observó que un solo péptido recombinante (12mer) mimótopo de un epítipo inmunodominante de catepsina L1 de *Fasciola hepatica* usado como vacuna pudo inducir una protección inmunitaria significativa contra un desafío, sin embargo, esta protección nunca alcanza el 100%, además, en el mismo ensayo, 5 clonas de fagos positivos utilizadas como vacuna mixta no mostraron ningún tipo de protección (Villa-Mancera et al., 2008). Esto último no es nuevo, ya que Piacenza et al (1999) observaron que la vacunación con dos proteinasas de catepsina L proporcionaban mayor protección contra la fascioliasis en ovejas que utilizar ambas enzimas por separado, sin embargo, al incluir leucina aminopeptidasa (LAP) en la vacuna la protección observada fue mucho más baja que la proporcionada cuando se inmunizó con LAP sola. En otra investigación, Prudencio et al (2010) observaron que una “vacuna cóctel” de múltiples inmunótopos contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no fue eficaz en generar respuestas de inmunidad eficiente, mientras que las vacunas de inmunótopos individuales sí lo hicieron lo que concuerda con lo observado más recientemente por González-Moran et al (2021). En un análisis de resultados de vacunas contra *Plasmodium* en humanos, Richie (2006) señaló que había resultado difícil identificar una protección aditiva o sinérgica contra la malaria utilizando combinaciones de antígenos. La lista de resultados decepcionantes en el uso de vacunas de antígenos múltiples es tan grande o incluso mayor al uso de vacunas de antígenos individuales. Esta breve lista de resultados negativos probablemente subestima la situación real, ya que es menos probable que se publiquen resultados negativos. Esto sugiere que los casos en los que una mezcla de antígenos aumenta significativamente la eficacia protectora serán la excepción y no la regla, sobre todo si, como parece probable, no se informa o publican los ensayos fallidos o desalentadores. Esto se agudiza más debido a que por razones económicas y bioéticas, usualmente los antígenos experimentales se estudian en forma mixta. Estos antígenos múltiples o fragmentos antigénicos se han probado en ensayos de vacunación, pero en ausencia de una evaluación simultánea de los antígenos

de manera individual, es imposible medir el beneficio de la mezcla. Es necesario realizar más pruebas para comprender mejor la respuesta inmune generada por mimotopos individuales y mixtos. Los fagotopos más inmunodominantes de las bibliotecas Ph D c7c o Ph D 12mer se seleccionaron por separado en las dos vacunas basadas en múltiples inmunótopos, se necesitan más estudios que mezclen fagotopos restringidos y no restringidos en una sola vacuna. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio de tamizaje de *Phage display* diseñado para generar una vacuna basada en inmunótopos que considera como ligandos antisueros heterólogos generados contra una etapa asexual zoito de *E. tenella*. Por lo tanto, para obtener una vacuna multi-epítopo más amplia que contenga antígenos de todas las etapas de desarrollo de *Eimeria* (esporozoítos, merozoítos, gametocitos y cigoto), se requieren más estudios tamizando bibliotecas aleatorias de Ph D con ligandos de antígenos de células-B generados contra todas las etapas principales del ciclo de vida de *E. tenella*, las cuales previamente ya han sido identificadas como inmunogénicas e inmunoprotectoras.

Por lo cual del presente estudio se desprenden dos hechos importantes, i) aún no se han descubierto los epítopos clave suficientemente capaces de bloquear al 100% la replicación del parásito cuando se usan como inmunógenos individuales o en grupo, ii) la prospectiva de que al superar el famoso “Catch 22” y cuando estos epítopos hayan sido eficazmente identificados tendrán que ser probados tanto de forma individual como mixta, esto con la finalidad de poder discernir si presentan efectos aditivos, sinérgicos o nulos.

Li et al (2008) mostraron que la proteína OmpU recombinante de *V. mimicus* administrada como vacuna genera entre 60% y 73% de efecto protector en ratones y peces contra dosis de desafío severos, mientras que el efecto inmunoprotector producido por únicamente 4 inmunótopos de la proteína OmpU de *V. mimicus* utilizados como vacuna era del 100% (Cen et al., 2013), estos últimos autores afirman que aunque los mimotopos tienen solo una pequeña secuencia inmunodominante de la proteína OmpU completa son mucho más efectivos en la inmunoprotección específica que utilizando la proteína OmpU recombinante completa. Adicionalmente, se debe considerar que los fagos que sirven como portadores macromoleculares potencian la inmunogenicidad e inmunoprotección *per se* (Adda et al., 2002; Gazarian et al., 2005; Pande et al., 2010), como es el caso de los péptidos recombinantes mimotopos de la proteína OmpU antes referida (Cen et al., 2013). Se debe considerar que la opción del uso de mimotopos para la vacunación contra coccidia es una idea novedosa y viable con relación al uso único de vacunas basadas en proteínas recombinantes, las cuales por cierto han mostrado consistentemente una inconsistencia en sus resultados inmunoprotectores (Kopko et al., 2000; Matthews et al., 2002; Witcombe et

al., 2004; Belli et al., 2004; Ellis et al., 2012; Wiedmer et al., 2017; Yang et al., 2018; Zhao et al., 2020). En un estudio donde se utilizaron mimotopos de *R. microplus* como vacunas, Prudencio *et al* (2010) no observaron ningún efecto benéfico utilizando adyuvantes junto con las vacunas basadas en fagotopos, incluso en algunos casos el adyuvante contribuyó a un efecto negativo, en un estudio similar González-Moran et al (2021) determinó que los fagotopos de *R. microplus* pueden funcionar muy bien sin el adyuvante. Por lo cual, en estudios adicionales que involucren fagotopos como vacunas, se podría considerar evitar el uso de adyuvantes. En cualquier caso, debe investigarse más a fondo la probable potenciación de las respuestas inmunes hacia una vacuna basada en fagotopos mediante el uso de adyuvantes apropiados.

Desde los primeros estudios de Rose (1967) hasta la fecha se ha llevado a cabo una gran cantidad de investigaciones en todo el mundo para tratar de dilucidar el mecanismo específico de inmunidad protectora inducida con las infecciones de *Eimeria*. Después de una ardua investigación, se ha vislumbrado que la inmunidad celular es clave para la protección contra las infecciones por *Eimeria*, mientras que la inmunidad humoral se consideró en ese tiempo que desempeñaba un papel secundario en el desarrollo de inmunidad activa contra la infección. Sin embargo, diversas investigaciones recientes han mostrado que los antígenos de clase B están presentes en las siete especies de coccidias de aves, lo que indica que esta clase de antígenos podrían contribuir a proteger a los pollos contra la coccidiosis aviar (Crane et al., 1988; Talebi y Mulcahy, 1994, 2006; Wallach, 2010; Zimmermann et al., 2009; Jun et al., 2012; Wiedmer et al., 2017). Actualmente, existe un consenso general acerca de que las células B desempeñan un papel complementario junto a la respuesta celular inmune mediada en la inmunidad protectora contra la infección por *Eimeria* a través de un mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Wallach, 2010; Gadde et al., 2015; Del Cacho et al., 2011, 2016; Wiedmer et al., 2017; Geinoro, 2019). Todos los inmunótopos probados aquí se seleccionaron originalmente en función de la capacidad de respuesta de su ligando contra antígenos de células B específicos del esporozoito de *E. tenella*. Por lo tanto, para desarrollar una respuesta inmune celular completa exitosa, una vacuna de tercera generación eficaz contra *E. tenella* deberá contar con suficiente cantidad de epítomos de células B y T previamente seleccionados y validados. A los 21 días de edad, no se observó una respuesta de anticuerpos significativa hacia las dos etapas zoito asexuales de *E. tenella* por parte de los grupos inmunizados con multi-inmunótopos, el grupo M13 wt y el grupo control no-inmunizado desafiado, incluso cuando las aves testigo de 3 días de edad previamente habían mostrado un nivel alto de anticuerpos

maternos específicos al parásito. Wallach (2010) comenta que la inmunidad pasiva transmitida a las crías tiene un papel clave en la inmunoprotección temprana a las infecciones por *Eimeria*, incluso, Smith et al., (1994) previamente ya habían establecido que existe una fuerte correlación entre los anticuerpos maternos y el nivel de protección contra *E. tenella*. Por lo cual debe considerarse este efecto de inmunidad pasiva materna heredada sobre el desarrollo posterior de la respuesta inmune mediada por células después de la inmunización. De hecho, a los 21 días de edad, el único grupo que mostró títulos de anticuerpos notablemente altos contra los antígenos de ambas etapas asexuales de *E. tenella* fue el grupo previamente inmunizado con la vacuna experimental EtSz-IMS1313. Aparentemente, los anticuerpos positivos detectados en aves pre-inmunes no muestran interferencia en el desarrollo de inmunidad contra *E. tenella* en el grupo vacunado experimentalmente, pero también es notable que todas las aves *SPF Leghorn* inmunizadas con las dos vacunas de múltiples inmunótopos no fueron capaces de montar una respuesta humoral suficientemente detectable contra ambas etapas del ciclo de vida de *E. tenella* durante el mismo período. Independientemente al número de inmunizaciones realizadas con las vacunas evaluadas, en la prueba de ELISA la dinámica de las respuestas de los anticuerpos contra las preparaciones de antígenos de esporozoítos y merozoítos fue similar, lo que proporciona evidencia de que las dos etapas comparten una gran cantidad de antígenos comunes (Tomley, 1994; Constantinoiu et al., 2007; Juárez-Estrada et al., 2021a). Nuestros resultados concuerdan con los de Constantinoiu et al. (2007), quienes analizaron 1 µg/pozo de cada etapa zoito del ciclo de vida asexual de *E. tenella* y mostraron que los antisueros de aves inmunizadas criadas en jaulas y posteriormente reinmunizadas dos veces reaccionaron un poco más con merozoítos que con esporozoítos. Esto último fue evidente para todos los antisueros evaluados PD, incluso para el grupo M13 wt y el grupo control no-inmunizado desafiado. De forma general, estudios previos han indicado que el desafío de las aves con altas dosis aumenta significativamente los niveles de anticuerpos, como pudimos comprobar al observar la respuesta humoral del grupo de la vacuna experimental, antes y después del desafío. Mientras que las inmunizaciones iniciales con ambas vacunas basadas en inmunótopos múltiples mostraron poco o ningún efecto en la respuesta humoral a la tercera semana de vida. La dinámica de las respuestas de anticuerpos contra esporozoítos y merozoítos en ambos grupos de vacunas multiepítopo aumentó de manera significativa después de la exposición, pero inesperadamente ambas respuestas humorales fueron menores a los niveles OD observados en los grupos de control no inmunizado- desafiado y el grupo inmunizado con el fago M13 wt. Esto podría deberse al período refractario del sistema

inmunológico que sigue a la estimulación antigénica (Gilbert et al., 1988; Davidson et al., 2008; Constantinoiu et al., 2008). Se ha observado que las aves vacunadas con ooquistes vivos vía oral aumentan significativamente sus niveles de Abs después de un desafío experimental (Constantinoiu et al., 2008). Sin embargo, cuando se permite que los ooquistes vacunales recirculen en la cama al menos por tres semanas después de un desafío, en esa fecha no muestran ningún tipo de incremento humoral y los títulos bajan paulatinamente a un nivel similar al de las aves control no desafiadas, sin embargo, un incremento significativo (1 semana PD) ocurre inmediatamente después de un segundo desafío, siempre y cuando exista un periodo de al menos 3 semanas entre ambos eventos, después hay una meseta y luego el título declina (Constantinoiu et al., 2008). Nuestro hallazgo entra en conflicto con reportes anteriores, los cuales determinaron que los niveles de anticuerpos de las aves inmunizadas no se afectan después del desafío (siempre y cuando se detectaran Abs positivos previamente, a diferencia de lo observado en el presente estudio), y sugieren que otros factores como el tipo de vacuna, permitir o no la recirculación de ooquistes vacunales, magnitud de la dosis de desafío y el grado de sensibilidad de los inmunoensayos podrían estar involucrados en estos resultados (Gilbert et al., 1988; Smith et al., 1993; Constantinoiu et al., 2008). Otra explicación para los diferentes niveles de OD observados entre los grupos inmunizados con multi- epítomos y los grupos control está relacionada con la magnitud y el isotipo específico de las inmunoglobulinas presentes durante una respuesta inmune clásica primaria y secundaria. Por ejemplo, Smith et al (1993) en un ensayo de desafío con pollos no-inmunes como fue el caso de los grupos control, mostraron que las concentraciones séricas de IgM dirigidas contra el esporozoito aumentan significativamente 9 días después de la infección primaria con 1×10^4 ooquistes de *E. tenella/ave*. En contraste, los niveles de IgY sólo aumentaron ligeramente después de la infección primaria, pero se produjeron aumentos significativos de este isotipo después del desafío, 9 después de este, los niveles de IgY específicos a Szs fueron mucho más altos que los antisueros previos a la exposición, esto aunado al periodo refractario del sistema inmune podría explicar los títulos observados aquí en los grupos inmunizados con las vacunas multi-inmunótopos. Por lo cual, es posible discriminar entre pollos recién infectados con *Eimeria* (indicado por los altos niveles de IgM anti-*Eimeria*) (factible para nuestros grupos control), pollos que han estado previamente expuestos a *Eimeria* o sus componentes antigénicos (como lo indican los altos niveles de IgY anti-*Eimeria*) (factible para nuestros grupos vacunados), y aves no inmunizadas-no desafiadas. Hubo evidentes diferencias entre la inmunidad desarrollada en aves inmunizadas con los fagotopos mixtos y la vacuna experimental de esporozoitos, ambas se reflejaron en

su nivel de respuesta humoral antes y después de la exposición, y su respectivo IAC a los 7 días PD. Curiosamente, la OD promedio mostrada por la vacuna F.c7c a los 9 días PD fue ligeramente superior a la OD mostrada por las aves inmunizadas con la vacuna F.12mer, correlacionando aparentemente sus niveles de OD con sus respectivos IAC.

Los datos mostrados aquí y en un estudio previo (Juárez-Estrada et al., 2021a), sugieren que las pruebas serológicas para determinar anticuerpos específicos a parásitos Apicomplexa podrían ser una herramienta muy apropiada para monitorear el desarrollo de inmunidad luego de una exposición natural o después de una vacunación.

Nuestros resultados destacan la importancia de descubrir los epítomos más inmunodominantes presentes en los esporozoitos de *E. tenella* a través de un sistema inmune heterólogo (conejo). Los resultados sugieren que las diferentes etapas de un parásito complejo se pueden cribar funcionalmente en busca de antígenos candidatos a vacuna en un modelo ave-conejo para revelar nuevas clases de antígenos candidatos a vacuna que pueden tener eficacia terapéutica en la especie huésped, en las manifestaciones de la enfermedad y en las diferentes plataformas de administración usadas. El descubrimiento de nuevos antígenos a través de nuevos métodos ofrece un rumbo prometedor. Los datos obtenidos muestran que los mimotopos seleccionados indujeron una respuesta inmune positiva frente al desafío con *E. tenella*. Estos resultados son alentadores en términos de desarrollo de vacunas sintéticas o basadas en Fagos (Fagémidos) debido a la relativa simplicidad de la selección ejecutada y la corta longitud de los péptidos encontrados, sin embargo, aún deben realizarse más pruebas y valoraciones. Los antígenos identificados podrían contribuir a descubrir nuevos candidatos para el desarrollo de una vacuna putativa contra *E. tenella*.

Conclusión

- Las dos formulaciones mixtas de péptidos recombinantes fusionados a fagos dominantes generan una respuesta inmune al imitar antígenos del esporozoito de *E. tenella*.
- Las dos vacunas basadas en inmunótopos se utilizaron en la vacunación experimental de pollitos *SPF Leghorn*, y ambas fueron capaces de generar inmunoprotección específica contra la infección por *E. tenella*.
- Esta investigación muestra una manera original para el desarrollo de vacunas subunitarias contra la coccidiosis aviar y el descubrimiento de nuevos antígenos de células B.
- Los resultados proporcionan evidencia de que es posible elaborar una vacuna putativa para la prevención de la infección con un parásito tan complejo como lo es *Eimeria tenella*.

5.0 REFERENCIAS

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., (2012). Cellular and Molecular Immunology. 7th ed. Ed. Elsevier Saunders Inc. Philadelphia, PA. U.S.A.
- Abbas, R.Z., Iqbal, Z., Blake, D., Khan, M.N., Saleemi, M.K., (2011). Anticoccidial drug resistance in fowl coccidia: the state of play revisited. World's. Poult. Sci. J. 67, 337–350. doi: [10.1017/S004393391100033X](https://doi.org/10.1017/S004393391100033X)
- Abi-Ghanem, D., Waghela, S.D., Caldwell, D.J., Danforth, H.D. Berghman, L.R., (2008). *Phage display* selection and characterization of single-chain recombinant antibodies against *Eimeria tenella* sporozoites. Vet. Immunol. Immunopathol. 121(1–2), 58–67. doi: [10.1016/j.vetimm.2007.08.005](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.08.005)
- Abu-Akkada, S.S., Awad, A.M., (2012). Isolation, propagation, identification and comparative pathogenicity of five Egyptian field strains of *Eimeria tenella* from broiler chickens in five different provinces in Egypt. Res. Vet. Sci. 92(19), 92–95. doi: [/10.1016/j.rvsc.2010.10.023](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.10.023)
- Adda, C.G., Tilley, I., Anders, R.F., Foley, M., (1999). Isolation of peptides that mimic epitopes on a malarial antigen from random peptide libraries displayed on phage. Infect. Immun. 67(9), 4679–4688. doi: [10.1128/IAI.67.9.4679-4688.1999](https://doi.org/10.1128/IAI.67.9.4679-4688.1999)
- Adda, C.G., Anders, R.F., Tilley, I., Foley, M., (2002). Random sequence libraries displayed on phage: identification of biologically important molecules. Comb. Chem. High. Through. Scr. 5(1), 1–14. doi: [10.2174/1386207023330561](https://doi.org/10.2174/1386207023330561)
- Aghebati-Maleki, L., Bakhshinejad, B., Baradaran, B., Motalebnezhad, M., Aghebati-Maleki, A., Nickho, H., Yousefi, M., (2016). *Phage display* as a promising approach for vaccine development. J. Biomed. Sci. 23(1), 66. doi: [10.1186/s12929-016-0285-9](https://doi.org/10.1186/s12929-016-0285-9)
- Ahmad, T.A., El-Sayed, B.A., El-Sayed, L.H., (2016) Development of immunization trials against *Eimeria* spp. Tr. Vaccinol. 5, 38–47. doi: [10.1016/j.trivac.2016.02.001](https://doi.org/10.1016/j.trivac.2016.02.001)
- Akita, E.M., Nakai, S., (1993). Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. J. of Immunol. Methods. 160(2), 207–214. doi: [10.1016/0022-1759\(93\)90179-b](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90179-b)
- Allen, P.C., Fetterer, R.H., (2002). Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. Clin. Microbiol. Rev. 15(1), 58–65. doi: [10.1128/CMR.15.1.58-65.2002](https://doi.org/10.1128/CMR.15.1.58-65.2002)
- Al-Idreesi, S.R., Kweider, M., Katranji, M.M., (2013). Immunization of broiler with dead sporozoites as vaccine against *Eimeria tenella* parasite. Intern. J. Poult. Sci. 12, 280–288.

- Al-Idreesi, S.R., Kweider, M., Katranji, M.M., (2016). Evaluation of humoral and cellular immune response to *Eimeria tenella* oocyst protein as vaccine to broiler. *Basrah J. Vet. Res.* 15 (3), 363–378.
- Arakawa, A., Ohe, O., (1975). Reduction of *Clostridium perfringens* by feed additives in the ceca of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Poult. Sci.* 54(4),1000–1007. doi: [10.3382/ps.0541000](https://doi.org/10.3382/ps.0541000)
- Arap, M.A., 2005. *Phage display* technology- Applications and innovations. *Gen. Mol.Biol.* 28(1), 1–9. doi: [10.1590/S1415-47572005000100001](https://doi.org/10.1590/S1415-47572005000100001)
- Arnon, R., Tarrab-Hazdai, R., Steward, M., (2000). A mimotope peptide-based vaccine against *Schistosoma mansoni*: synthesis and characterization. *Immunology.* 101(4), 555–562. doi: [10.1046/j.1365-2567.2000.00139.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00139.x)
- Auld, S.K.J.R., Tinsley, M.C., (2015). The evolutionary ecology of complex lifecycle parasites: linking phenomena with mechanisms. *Heredity.* 114(2), 125–132. doi: [10.1038/hdy.2014.84](https://doi.org/10.1038/hdy.2014.84)
- Baba, E., Kawamoto, K., Fukata, T., Arakawa, A., (1990). Possibilities of bacteremia and toxemia in death of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Avian. Dis.*, 34(3), 566–570. PMID: 2241681. <https://doi.org/10.2307/1591245>
- Bao, Q., Li, X., Han, G., Zhu, Y., Mao, C., Yang, M., (2019). Phage-based vaccines. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 145(40) 40–56. doi: [10.1016/j.addr.2018.12.013](https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.12.013)
- Basak, S.C., Lee, S., Barta, J.R., Fernando, M.A., (2006). Differential display analysis of gene expression in two immunologically distinct strains of *Eimeria maxima*. *Parasitol. Res.* 99(1), 28–36. doi: [10.1007/s00436-005-0087-6](https://doi.org/10.1007/s00436-005-0087-6)
- Barta, J.R., Coles, B.A., Schito, M.L., Fernando, M.A., Martin, A., Danforth, H.D., (1998). Analysis of infraspecific variation among five strains of *Eimeria maxima* from North America. *Int. J. Parasitol.* 28(3), 485–492. doi: [10.1016/s0020-7519\(97\)00211-7](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(97)00211-7)
- Barbas C.F., Burton D.R., Scott J.K., Silverman G.J.; (2000). *Phage display: A Laboratory Manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. United States of America.
- Barclay, A.N., Hatherley, D., (2008). The counterbalance theory for evolution and function of paired receptors. *Immun. Perspective.* 29(5), 675–478. doi: [10.1016/j.immuni.2008.10.004](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.10.004)
- Beghetto, E., Spadoni, A., Buffolano, W., Del Pezzo, M., Minenkova, O., Pavoni, E., Pucci, A., Cortese, R., Felici, F., Gargano, N., (2003). Molecular dissection of the human B-cell response against *Toxoplasma gondii* infection by lambda display of cDNA libraries. *Int. J. Parasitol.* 33(2), 163–173. doi: [10.1016/s0020-7519\(02\)00256-4](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00256-4)

- Belli, S.I., Mai, K., Skene, C.D., Gleeson, M.T., Witcombe, D.M., Katrib, M., Finger, A., Wallach, M.G., Smith, N.C., (2004). Characterisation of the antigenic and immunogenic properties of bacterially expressed, sexual stage antigens of the coccidian parasite, *Eimeria maxima*. *Vaccine*. 22, 4316–4325. doi: [10.1016/j.vaccine.2004.04.019](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.04.019)
- Belli, S.I., Smith, N.C., Ferguson, D.J.P. (2006). The coccidian oocyst: a tough nut to crack!. *Trends. Parasitol.* 22(9), 416–423. doi: [10.1016/j.pt.2006.07.004](https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.07.004)
- Belli, S.I., Ferguson, D.J.P., Katrib, M., Slapetova, I., Mai, K., Slapeta, J., Flowers, S.A., Miska, K.B., Tomley, F.M., Shirley, M.W., et al. (2009). Conservation of proteins involved in oocyst wall formation in *Eimeria maxima*, *Eimeria tenella* and *Eimeria acervulina*. *Inter. J. Parasitol.* 39(10), 1063–1070. doi: [10.1016/j.ijpara.2009.05.004](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.05.004)
- Besteiro, S., Dubremetz, J.F., Lebrun M., (2011). The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cell. Microbiol.* 13(6): 797–805. doi: [10.1111/j.1462-5822.2011.01597.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01597.x)
- Bhogal, B.S., Miller, G.A., Anderson, A.C., Jessee, E.J., Strausberg, S., McCandliss, Nagle, J., Strausberg, R.L., (1992). Potential of a recombinant antigen as a prophylactic vaccine for day-old broiler chickens against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 31(3–4), 323–335. doi: [10.1016/0165-2427\(92\)90019-m](https://doi.org/10.1016/0165-2427(92)90019-m)
- Blake, D.P., Hesketh, P., Andrew, A., Carroll, F., Martin W., Shirley, M.W., Smith, A.L., (2005). The influence of immunizing dose size and schedule on immunity to subsequent challenge with antigenically distinct strains of *Eimeria maxima*. *Avian. Pathol.*, 34(6), 489–494. doi: [10.1080/03079450500368292](https://doi.org/10.1080/03079450500368292)
- Blake, D.P., Tomley, F.M., (2014). Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. *Trend, Parasitol.* 30(19), 12-19. doi: [10.1016/j.pt.2013.10.003](https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.10.003)
- Blake, D.P., Clark, E.L., Macdonald, S. E., Thenmozhi, V., Kundu, k., Garg, R., Jatau, I.D., Ayoade, S., Kawahara, F., Moftah, A., et al. (2015). Population, genetic, and antigenic diversity of the apicomplexan *Eimeria tenella* and their relevance to vaccine development. *Proc. Natl.Abad. Sci. U.S.A.* 112(38), E5343–5350. doi: [10.1073/pnas.1506468112](https://doi.org/10.1073/pnas.1506468112)
- Blake, D.P., Pastor-Fernández, I., Nolan, M.J., Tomley, F.M., (2017). Recombinant anticoccidial vaccines – a cup half full? *Infect. Genet. Evol.* 55, 358–365. doi: [10.1016/j.meegid.2017.10.009](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.009)
- Blake, D.P., Knox, J., Dehaeck, B., Huntington, B., Rathinam, T., Ravipati V., Ayoade, S., Gilbert, W., Adebambo, A.O., Jatau, I.D., et al. (2020a). Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. *Vet. Res.* 51(1), 115. doi: [10.1186/s13567-020-00837-2](https://doi.org/10.1186/s13567-020-00837-2)
- Blake, D.P., Worthinh, K., Jenkins, M.A., (2020b). Exploring *Eimeria* genomes to understand

population biology: Recent progress and future opportunities. *Genes*. 11, 1103. doi: [10.3390/genes11091103](https://doi.org/10.3390/genes11091103)

- Blake, D.P., Vrba, V., Xia, D., Jatau, I.D., Spiro, S., Nolan, M.J., Underwood, G., Tomley, F.M., (2021a). Genetic and biological characterisation of three cryptic *Eimeria* operational taxonomic units that infect chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Int. J. Parasitol.* 51, 621–634. doi: [10.1016/j.ijpara.2020.12.004](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.12.004)

- Blake, D.P., Marugan-Hernandez, V., Tomley, F.M., (2021b). Spotlight on avian pathology: *Eimeria* and the disease coccidiosis, *Avian. Pathol.* 50(3), 209–213, doi: [10.1080/03079457.2021.1912288](https://doi.org/10.1080/03079457.2021.1912288)

- Bogado, A.L.G., Garcia, J.L., Fernandes, N.D.P., Stipp, B.M.R., Guimarães J.J.D., (2010). Post-challenge hematological evaluation with virulent strain of *Eimeria tenella* in broilers immunized with attenuated strain or sporozoite proteins from homologous strain. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19(1), 1-6. doi: [10.1590/s1984-29612010000100002](https://doi.org/10.1590/s1984-29612010000100002)

- Breed, D.G.J., Schetters, T.P.M., Verhoeven, N.A.P., Boot-Groenink, A., Dorrestein, J., Vermeulen, A.N., (1999). Vaccination against *Eimeria tenella* infection using a fraction of *E. tenella* sporozoites selected by the capacity to activate T cells. *Int. J. Parasitol.* 29, 1231–1240. doi: [10.1016/s0020-7519\(99\)00110-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00110-1)

- Brun, A., Bárcena, J., Blanco, E., Borrego, B., Dory, D., Escribano, J.M., Gall-Reculé, G.L., Ortego, J., Dixon, L.K., (2011). Current strategies for subunit and genetic viral veterinary vaccine development. *Virus. Res.* 157(1), 1–12. doi: [10.1016/j.virusres.2011.02.006](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.02.006)

- Bumstead, N., Millard, B., (1987). Genetics of resistance to coccidiosis: Response of inbred chicken lines to infection by *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima*. *Brit. Poult. Sci.* 28(4), 705–715. doi: [10.1080/00071668708417006](https://doi.org/10.1080/00071668708417006)

- Buzatti, A., Diaz, F.A., Arenal, A., Pereira, E., Gomes, M.A.L., Molento, M.B., (2018). Sheep polyclonal antibody to map *Haemonchus contortus* mimotopes using *Phage display* library. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 27(2), 183–190. doi: [10.1590/s1984-296120180023](https://doi.org/10.1590/s1984-296120180023)

- Caldwell, D.J., Danforth, H.D. Morris, B.C. Ameiss, K.A. McElroy A.P., (2004). Participation of the intestinal epithelium and mast cells in local mucosal immune responses in commercial poultry. *Poult. Sci.* 83(4), 591–599. doi: [10.1093/ps/83.4.591](https://doi.org/10.1093/ps/83.4.591)

- Castelló, L.M.A., (2009). Caracterización parcial de las proteínas de ooquistes de *Eimeria tenella* identificados por anticuerpos policlonales de yema de huevo. Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Fac, de Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M.

- Cen, J., Liu, X., Li, J., Zhang, M., Wang, W., (2013). Identification and immunogenicity of immunodominant mimotopes of outer membrane protein U (OmpU) of *Vibrio mimicus* from

Phage display peptide library. *Fish. Selfish. Immunol.* 34(1), 291–295. doi: [10.1016/j.fsi.2012.11.015](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.015)

- Constantinoiu, C.C., Lillehoj, H.S., Matsubayashi, M., Hosoda, Y., Tani, H., Matsuda, H., Sasai, K., Baba, E., (2003). Analysis of cross-reactivity of five new chicken monoclonal antibodies which recognize the apical complex of *Eimeria* using confocal laser immunofluorescence assay. *Vet. Parasitol.* 118(1–2), 29–35. doi: [10.1016/j.vetpar.2003.09.011](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.09.011)

- Constantinoiu, C.C., Molloy, J.B., Jorgensen, W.K., Coleman, G.T., (2007). Development and validation of an ELISA for detecting antibodies to *Eimeria tenella* in chickens. *Vet. Parasitol.* 150(4), 306–313. doi: [10.1016/j.vetpar.2007.09.019](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.09.019)

- Constantinoiu, C.C., Molloy, J.B., Jorgensen, W.K., Coleman, G.T., (2008). Antibody response against endogenous stages of an attenuated strain of *Eimeria tenella*. *Vet. Parasitol.* 154(3–4), 193–204. doi: [10.1016/j.vetpar.2008.03.029](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.029)

- Constantinoiu, C.C., Molloy, J.B., Jorgensen, W.K., Coleman, G.T., (2011). Characterization of the antibody response in birds following infection with wild-type and attenuated strains of *Eimeria tenella* and *Eimeria necatrix*. *Vet. Parasitol.* 175(1–2), 47–51. doi: [10.1016/j.vetpar.2010.09.025](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.025)

- Cong, H., Yuan, Q., Zhao, Q., Zhao, L., Yin, H., Zhou, H., He, S., Wang, Z., (2014). Comparative of a multi-epitope DNA vaccine intranasal, peroral, and intramuscular delivery against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Parasit. Vectors.* 7, 145.1–8. doi: [10.1186/1756-3305-7-145](https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-145)

- Conway, D.P., Sasai, K., Gaafar, S. M. Smothers, C. D., (1993). Effects of different level of oocyst inocula of *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, and *E. maxima* on plasma constituents, packed cell volume, lesion scores, and performance in chickens. *Avian. Dis.* 37(1), 118–123. doi: [10.2307/1591464](https://doi.org/10.2307/1591464)

- Coley, A.M., Campanle, N.V., Casey, J.L., Hodder, A.N., Crewther, P.E. Anders, R.F., Tilley, L.M. Foley, M., (2001). Rapid and precise epitope mapping of monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* AMA1 by combined *Phage display* of fragments and random peptides. *Prot. Eng.* 14(9), 691–698. doi: [10.1093/protein/14.9.691](https://doi.org/10.1093/protein/14.9.691)

- Costa, L.E., Goulart, L.R., Pereira, N.C., Lima, M.I., Duarte, M.C., Martins, V.T., Lage, P.S., Menezes-Souza, D., Ribeiro, T.G., Coelho, E.A., et al. (2014). Mimotope-based vaccines of *Leishmania infantum* antigens and their protective efficacy against visceral leishmaniasis. *PLoS. ONE.* 9(10), e110014. doi: [10.1371/journal.pone.0110014](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110014)

- Costa, L.E., Alves, P.T., Carneiro, A.P., Dias, A.C.S., Fujimura, P.T., Araujo, G.R., Tavares,

- G.S.V., Ramos, F.F., Duarte, M.C., Menezes-Souza, D., et al. (2019). Leishmania *infantum* β -Tubulin identified by reverse engineering technology through *Phage display* applied as theranostic marker for human visceral Leishmaniasis" Int. J. Mol. Sci. 20(8), 1812. <https://doi.org/10.3390/ijms20081812>
- Cowper, B., Matthews, S., Tomley, F., (2012). The molecular basis for the distinct host and tissue tropisms of coccidian parasites. Mol. Biochem. Parasitol. 186(1), 1–10. doi: [10.1016/j.molbiopara.2012.08.007](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.08.007)
 - Cha, J.O., Talha, A.F.S.M., Lim, C.W., Kim, B., (2014). Effects of glass bead size, vortexing speed and duration on *Eimeria acervulina* oocyst excystation. Exp. Parasitol. 138, 18–24. doi: [10.1016/j.exppara.2014.01.001](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.01.001)
 - Cha, J.O., Shim, K.S., Lee, H.W., Kim, H.C., (2021). Statistical prediction of the peak point (time) required for release of maximum number of sporocysts after *Eimeria tenella* oocyst excystation. Braz. J. Poult. Sci. 23(3), 001–006. doi: [10.1590/1806-9061-2020-1415](https://doi.org/10.1590/1806-9061-2020-1415)
 - Chapman, H.D., Cherry, T.E., Danforth, H.D., Richards, G., Shirley, M.W., Williams, R.B., (2002). Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. Int. J. Parasitol. 32(5), 617–629. doi: [10.1016/s0020-7519\(01\)00362-9](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00362-9)
 - Chapman, H. D., Roberts, B., Shirley, M. W., Williams, R. B., (2005a). Guidelines for evaluating the efficacy and safety of live anticoccidial vaccines, and obtaining approval for their use in chickens and turkeys. Avian. Pathol. 34(4), 279–290. doi: [10.1080/03079450500178378](https://doi.org/10.1080/03079450500178378)
 - Chapman, H.D., Matsler, P.L., Muthavarapu, V.K., Chapman, M.E., (2005b). Acquisition of immunity to *Eimeria maxima* in newly hatched chickens given 100 oocysts. Avian. Dis. 49(3), 426–429. doi: [10.1637/7359-032805R1.1](https://doi.org/10.1637/7359-032805R1.1)
 - Chapman, H. D., Rayavarapu, S., (2007). Acquisition of immunity to *Eimeria maxima* in newly hatched chickens reared on new or reused litter. Avian. Pathol. 36(4), 319–323, doi: [10.1080/03079450701460773](https://doi.org/10.1080/03079450701460773)
 - Chapman, H.D., Barta, J.R., Hafeez, M.A., Matsler, P., Rathinam, T., Raccoursier, M., (2016). The epizootiology of *Eimeria* infections in commercial broiler chickens where anticoccidial drug programs were employed in six successive flocks to control coccidiosis. Poult. Sci. 49(3), 1774–1778. doi: [10.3392/ps/pew091](https://doi.org/10.3392/ps/pew091)
 - Chasser, K.M., Duff, A.F., Briggs, W.N., Latorre, J.D., Barta, J.R., Bielke, L.R., (2020). Research Note: Evaluating fecal shedding of oocysts in relation to body weight gain and lesion scores during *Eimeria* infection. Poult. Sci. 99(2), 886–892. doi: [10.1016/j.psj.2019.10.028](https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.028)

- Chen, C., Abi-Ghanem, D., Waghela, S.D., Chou, W., Farnell, M.B., Mwangi, W., Berghman, L.R., (2012). Immunization of chickens with an agonistic monoclonal anti-chicken CD40 antibody-hapten complex: Rapid and robust IgG response induced by a single subcutaneous injection. *J. Immunol. Methods.* 378, 116-120. doi: [10.1016/j.jim.2012.02.006](https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.02.006)
- Chen, P., Lv, J., Zhang, J., Sun, H., Chen, Z., Li, H., Wang, F., Zhao, X., (2015). Evaluation of immune protective efficacies of *Eimeria tenella* EtMic1 polypeptides with different domain recombination displayed on yeast surface. *Exp. Parasitol.* 155, 1–7. doi: [10.1016/j.exppara.2015.04.020](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.04.020)
- Chen, H.L. Zhao, X.Y., Zhao, G.X., Huang, H.B., Li, H.R., Shi, W., Yang, W.T., Jiang, Y.L., Wang, J.Z., Ye, L.P., et al., (2020) Dissection of the cecal microbial community in chickens after *Eimeria tenella* infection. *Parasit. Vectors.* 13(56), doi: [10.1186/s13071-020-3897-6](https://doi.org/10.1186/s13071-020-3897-6)
- Chen w., Ma, C., Li, G., Jia, Z., Yang, X., Pan, X., Ma, D., (2021). Specific EtMIC3-binding peptides inhibit *Eimeria tenella* sporozoites entry into host cells. *Vet. Rec.* 52, 24. doi: [10.1186/s13567-020-00873-y](https://doi.org/10.1186/s13567-020-00873-y)
- Chou, W.K., Chen, C.H., Christine, N., Vuong, C.N., Abi-Ghanem, D., Suryakant D., Waghela, S.D., Mwangi, W. Bielke, L.R., Hargis, B.M., et al. (2016). Significant mucosal sIgA production after a single oral or parenteral administration using *in vivo* CD40 targeting in the chicken. *Res. Vet. Sci.* 108, 112–115. doi: [10.1016/j.rvsc.2016.08.013](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.08.013)
- Clark, E. L., Tomley, F.M., Blake, D.P. (2017). Are *Eimeria* genetically diverse, and does it matter?. *Trends. Parasitol.* 33(3), 231–241. doi: [10.1016/j.pt.2016.08.007](https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.08.007)
- Crane, M.S., Murray, P.K., Gnozzio, M.J., MacDonald, T.T., (1988). Passive protection of chicken against *Eimeria tenella* infection by monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 56(4), 972-976. doi: [10.1128/iai.56.4.972-976.1988](https://doi.org/10.1128/iai.56.4.972-976.1988)
- Crane, M.S., Goggin, B., Pellegrino, R.M., Ravino, O.J., Lange, C., Karhanis, Y.D., Kirk, K.E., Chakraborty, P.R., (1991). Cross-protection against four species of chicken coccidia with a single recombinant antigen. *Infect. Immun.* 59(4), 1271–1277. doi: [10.1128/iai.59.4.1271-1277.1991](https://doi.org/10.1128/iai.59.4.1271-1277.1991)
- Crowe, S.R., Miller, S.C., Woodland, D.L., (2006). Identification of protective and non-protective T cell epitopes in influenza. *Vaccine.* 24(4), 452–456. doi: [10.1016/j.vaccine.2005.07.090](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.07.090)
- Da Silva, Jr. A., Kawazoe, U., Freitas, F.F.T., Gatti, M.S.V., Dolder, H., Shumacher, R. I., Juliano, M.M., da Silva, M.J., Leite, A., (2002). Avian anticoccidial activity of a novel membrane-interactive peptide selected from *Phage display* libraries. *Mol. Biochemm. Parasitol.* 120(1): 53–60. doi: [10.1016/s0166-6851\(01\)00439-x](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(01)00439-x)

- Danforth, H.D., (1983). Use of monoclonal antibodies directed against *Eimeria tenella* sporozoites to determine stage specificity and *in vitro* effect on parasite penetration and development, Am. J. Vet. Res. 44(9), 1722–1727. PMID: 6684890.
- Danforth, H.D., McAndrew, S.J., (1987). Hybridoma antibody characterization of stage specific and stage-cross-reactive antigens of *Eimeria tenella*. J. Parasit. 73(5), 985–992. PMID: 2443634. <https://doi.org/10.2307/3282522>
- Danforth, H.D., (1998). Use of live oocyst vaccines in the control of avian coccidiosis: experimental studies and field trials. Inter. J. Parasitol. 28(7), 1099–1109. doi: [10.1016/s0020-7519\(98\)00078-2](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00078-2)
- Dalloul, R.A., Lillehoj, H.S., Klinman, D.M., Ding, X., Min, W., Heckert RA., (2005). *In ovo* administration of CpG oligodeoxynucleotides and the recombinant microneme protein MIC2 protects against *Eimeria* infections. Vaccine. 23(24), 3108–3113. doi: [10.1016/j.vaccine.2005.01.073](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.073)
- Dalloul, R.A., Lillehoj, H.S., (2006). Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. Exp. Rev.Vaccines. 5(1), 143–163. doi: [10.1586/14760584.5.1.143](https://doi.org/10.1586/14760584.5.1.143)
- Davies, J.M., Rowley, M.J., Mackay, I.R., (1999). Phagotopes derived by antibody screening of phage-displayed random peptide libraries vary in immunoreactivity: Studies using an exemplary monoclonal antibody, CII-C1, to type II collagen. Immunol. Cell. Biol. 77(6), 483–490. doi: [10.1046/j.1440-1711.1999.00846.x](https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.1999.00846.x)
- Davis, P.J., Parry, S.H. Porter, P., (1978). The role of secretory IgA in anti-coccidial immunity in the chicken. Immunology. 34(5), 879–888. PMID: 350761. PMCID: [PMC1457199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/350761/) s <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1457199/>
- Davila V, Juarez MA, Gonzalez G, Rios F, Avila E., (2003). Performance of broilers vaccinated with Nobilis Cox ATM® and challenged with a Mexican coccidial isolates. Abst: 23rd Annual Meeting (SPSS) January 14–15, p.52 (221).
- Davidson, F., Kaspers, B., Schat, K.A., (2008). Avian Immunology. Elsevier, New York, USA.
- de Venevelles, P., Chich, J.F., Faigle, W., Loew, D., Labbé, M., Girard-Misguich, F., Péry, P., (2004). Towards a reference map of *Eimeria tenella* sporozoite proteins by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. Int. J. Parasitol. 34(12), 1321–1331. doi: [10.1016/j.ijpara.2004.08.002](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.08.002)
- Del Cacho, E., Gallego, M. Lee, S.H., Lillehoj, H.S., Quilez, J., Lillehoj, E.P., Sánchez-Abedo, C., (2011). Induction of protective immunity against *Eimeria tenella* infection using

- antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes. *Vaccine*. 29(21), 3818–3825. doi: [10.1016/j.vaccine.2011.03.022](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.022)
- Del Cacho, E., Gallego, M. Lee, S.H., Lillehoj, H.S., Quilez, J., Lillehoj, E.P. Sánchez-Abedo, C., (2012). Induction of protective immunity against *Eimeria tenella*, *Eimeria maxima*, and *Eimeria acervulina* infections using dendritic cell-derived exosomes. *Infect. Immun.* 80(5), 1909–1916. doi: [10.1128/IAI.06413-11](https://doi.org/10.1128/IAI.06413-11)
 - Del Cacho, E., Gallego, M. Lillehoj, H.S., Quilez, J., Lillehoj, E.P. Sánchez-Abedo, C., (2016). Induction of protective immunity against experimental *Eimeria tenella* infection using serum exosomes. *Vet. Parasitol.* 224, 1–6. doi: [10.1016/j.vetpar.2016.04.043](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.04.043)
 - Denisova, G., Denisov, D., Evelegh, C., Weissgram, M., Beck, J., Foley, S.R., Bramson, J.L., (2009). Characterizing complex polysera produced by antigen-specific immunization through the use of affinity-selected mimotopes. *PLoS One* 4, e5309. doi: [10.1371/journal.pone.0005309](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005309)
 - Ding, X., Lillehoj, H.S., Quiroz, M.A., Bevenssee, E., Lillehoj, E.P., (2004). Protective immunity against *Eimeria acervulina* following *in ovo* immunization with a recombinant subunit vaccine and cytokine genes. *Infect. Immun.* 72(12), 6939–6944. doi: [10.1128/IAI.72.12.6939-6944.2004](https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.6939-6944.2004)
 - Ding, X., Lillehoj, H.S., Dalloul, R.A., Min, W., Sato, T. Yasuda, A. Lillehoj, E.P., (2005). *In ovo* vaccination with the *Eimeria tenella* EtMIC2 gene induces protective immunity against coccidiosis. *Vaccine*. 23(28), 3733–3740. doi: [10.1016/j.vaccine.2005.01.144](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.144)
 - Dowse, T., Soldati, D., (2004). Host cell invasion by the apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. *Curr. Opin. Microbiol.* 7(4), 388–396. doi: [10.1016/j.mib.2004.06.013](https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.06.013)
 - Draper, S.J., Angov, E., Horii, T., Miller, L.H., Srinivasan, P., Theisen, M., Biswas, S., (2015). Recent advances in recombinant protein-based malaria vaccines. *Vaccine*. 33(52), 7433–7443. doi: [10.1016/j.vaccine.2015.09.093](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.093)
 - Du, A., Wang, S., (2005). Efficacy of a DNA vaccine delivered in attenuated *Salmonella typhimurium* against *Eimeria tenella* infection in chickens. *Int. J. Parasitol.* 35(7), 777–785. doi: [10.1016/j.ijpara.2005.03.005](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.005)
 - Dulski, P., Turner, M., (1988). The purification of sporocysts and sporozoites from *Eimeria tenella* oocysts using percoll density gradients. *Avian Dis.* 32, 235–239. PMID: 2840881. <https://doi.org/10.2307/1590810>
 - Echeverria, P.C., Figueras, M.J., Vogler, M., Kriehuber, T., De Miguel, N., Deng, B., Dalamasso, M.C., Matthews, D.E., Matrajt, M., Hasbeck, M., et al., (2010). The Hsp90 co-

chaperone p23 of *Toxoplasma gondii*: Identification, functional analysis and dynamic interactome determination. Mol. Biochem. Parasitol. 172(2), 129–140. doi: [10.1016/j.molbiopara.2010.04.004](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.04.004)

- El-Ashram, S., Yin, Q., Liu, H., Al Nasr, I., Liu, X., Suo, X., Barta, J.R., (2015). From the macro to the micro: Gel mapping to differentiate between sporozoites of two immunological distinct strains of *Eimeria maxima* (strains M6 and Guelph). PLoS One. 10(12), e0143232 doi: [10.1371/journal.pone.0143232](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143232)

- Ellis, S.E., Newlands, G.F.J., Nisbet, A.J., Matthews, J.B., (2012). Phage-display library biopanning as a novel approach to identifying nematode vaccine antigens. Parasite. Immunol. 34(5), 285–295. doi: [10.1111/j.1365-3024.2011.01317.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01317.x)

- Finlay, B.B., McFadden, G., (2006). Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. Cell. 124(4), 767–782. doi: [10.1016/j.cell.2006.01.034](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.034)

- Frölich, S., Entzeroth, R., Wallach, M., (2012). Comparison of protective immune responses to apicomplexan parasites. 2012, 852591. doi: [10.1155/2012/852591](https://doi.org/10.1155/2012/852591)

- Gadde, U., Rathinam, T., Lillehoj, H.S., (2015). Passive immunization with hyperimmune egg-yolk IgY as prophylaxis and therapy for poultry diseases – A review. Anim. Health. Res. Rev.16(2), 163–176. doi: [10.1017/S1466252315000195](https://doi.org/10.1017/S1466252315000195)

- Gao, Y., Suding, Z., Wang, L., Liu, D., Su, S., Xu, j., Hu, J., Tao., J., (2021).. Full-length transcriptome sequence analysis of *Eimeria necatrix* unsporulated oocysts and sporozoites identifies genes involved in cellular invasion. Vte. Parasitol. 296, 109480. doi: [10.1016/j.vetpar.2021.109480](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109480)

- Gazarian, K., (2005). Drug discovery and design via high throughput screening of combinatorial phage-display protein- peptide libraries. Front. Drug. Disc. 1(1), 29–67. doi: [10.2174/1574088054583372](https://doi.org/10.2174/1574088054583372)

- Gazarian, K., Gazarian, T., Sánchez, B.J., Alonso, M.R., (2011). Immunogenic peptides from *Phage display* libraries with potential of protecting mice against the Pseudorabies virus. Vet. Microbiol. 154(1–2), 29–36. doi: [10.1016/j.vetmic.2011.06.020](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.06.020)

- Garcia, J.L., Da Silva, G.J., Headley, S.A., Gomel, B.A.L., Bugni, F.M., Ramalho, D.C., de Souza, L.M., (2008). *Eimeria tenella*: Utilization of a nasal vaccine with sporozoite antigens incorporated into Iscom as protection for broiler breeders against a homologous challenge. Exp. Parasitol. 120, 185–190. doi: [10.1016/j.exppara.2008.07.007](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.07.007).

- Garg, R., Banerjee, D.P., Gupta, S.K., (1999). Immune responses in chickens against *Eimeria tenella* sporozoite antigen. 81(1), 1–10. doi: [10.1016/s0304-4017\(98\)00231-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(98)00231-3)

- Geinoro, T., (2019). An Overview of Role of Immunity on Parasitic Infections. Int. J. Adv.

Multidisc. Res. 6(3), 33–47. doi: [10.22192/ijamr.2019.06.03.006](https://doi.org/10.22192/ijamr.2019.06.03.006)

- Geysen, J., Ausma, J., Bossche, H.V., (1991). Simultaneous purification of merozoites and schizonts of *Eimeria tenella* (Apicomplexa) by percoll flotation and assessment of cell viability with a double fluorescent dye assay. J. Parasitol. 77(6), 989–993. PMID: 1779304. <https://doi.org/10.2307/3282754>
- Geysen H.M., Rodda S.J., Mason T.J., (1986). The delineation of peptides able to mimic assembled epitopes. Ciba. Found. Symp. 119, 130–49. doi: [10.1002/9780470513286.ch8](https://doi.org/10.1002/9780470513286.ch8)
- Gill, J.L. (1978). Design and analysis of experiments in the animal and sciences. The Iowa State University Press, Ames, Iowa. U.S.A.
- Gilbert, J.M., Bhanushall, J.K., McDougald, L.R., (1988). An enzyme-linked immunosorbent assay for coccidiosis in chickens: Correlation of antibody levels with prior exposure to coccidia in the laboratory and in the field. Avian. Dis. 32(4), 688–694. PMID: 3202766. <https://doi.org/10.2307/1590986>
- Goel, P., Parvez, S., Sharma, A., (2019). Genomic analyses of aminoacyl tRNA synthetases from human-infecting helminths. MBC. Genom. 20(1), 333. doi: [10.1186/s12864-019-5679-0](https://doi.org/10.1186/s12864-019-5679-0)
- González-Mora, A., Calvillo-Rodríguez, K.M., Hernández-Pérez, J., Rito-Palomares, M., Martínez-Torres, A.C., Benavides, J., (2021). Evaluation of the immune response of a candidate Phage-based vaccine against *Rhipicephalus microplus* (cattle tick). Pharmaceutics. 13, 2018. doi: [10.3390/pharmaceutics13122018](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122018)
- Gu, Y., Wei, J., Yang, J., Huang, J., Yang, X., Zhu, X., (2013). Protective Immunity against *Trichinella spiralis* infection induced by a multi-epitope vaccine in a murine model. PLoS. ONE. 8(10), e77238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077238>
- Guo, A., Cai, J., Gong, W., Yan, H., Luo, X., Tian, G., Zhang, S., Zhang, H., Zhu, G., Cai, X., (2013). Transcriptome analysis in chicken cecal epithelia upon Infection by *Eimeria tenella* *in vivo*. PLoS. One. 8(5), e64236. doi: [10.1371/journal.pone.0064236](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064236)
- Guzman, V.B., Silva, D.A.O., Kawazoe, U. Mineoa, J.R., (2003). A comparison between IgG antibodies against *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, and *E. tenella* and oocyst shedding in broiler-breeders vaccinated with live anticoccidial vaccines. Vaccine. 21(27–30), 4225–4233. doi: [10.1016/s0264-410x\(03\)00462-6](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00462-6)
- Greenfield, E.A., (2014). Antibodies. A Laboratory Manual. Second edition. Cold spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. U.S.A.
- Hammarton, T.C., (2019). Who needs a contractile actomyosin ring? the plethora of alternative ways to divide a protozoan parasite. Front. Cell. Infect. Microbiol. 21(9), 397. doi: [10.3389/fcimb.2019.00397](https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00397)

- Hamzic, E., Bed'Hom, B., Juin, H., Hawken, R., Abrahamsen, M.S., Elsen, J.M., Servin, B., Pinard-van der Laan, M.H. Demeure, O., (2015). Large scale-investigation of the parameters in response to *Eimeria maxima* challenge in broilers. J. Anim. Sci. 93(4), 1830–1840. doi: [10.2527/jas2014-8592](https://doi.org/10.2527/jas2014-8592)
- Haug, A., Thebo, P. Mattsson, J.G., (2007). A simplified protocol for molecular identification of *Eimeria* species in field samples. Vet. Parasitol. 146, 35–45. doi: [10.1016/j.vetpar.2006.12.015](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.12.015)
- Haug, A., Gjevre, A.G., Skjerve, E., Kaldhusdal, M., (2008). A survey of the economic impact of subclinical *Eimeria* infections in broiler chickens in Norway, Avian Pathol. 37(3), 333–341, doi: [10.1080/03079450802050705](https://doi.org/10.1080/03079450802050705)
- Hilleman, M. R., (2004). Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (Suppl 2), 14560–14566. doi: [10.1073/pnas.0404758101](https://doi.org/10.1073/pnas.0404758101)
- Hinsu, A.T., Thakkar, J.R., Koringa, P.G., Vrba, V., Jakhesara, S.J., Psifidi, A., Guitian, J., Tomley, F.M., Rank, D.N., Raman, M., et al. (2018). Illumina next generation sequencing for the analysis of *Eimeria* populations in commercial broilers and indigenous chickens. Front. Vet. Sci. 5, 176. doi: [10.3389/fvets.2018.00176](https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00176)
- Hernández, V.X., Juárez, E.M.A., Calderón, A.N., Téllez, I.G., (1999). Hallazgo de *Eimeria tenella* en células epiteliales de la bolsa de Fabricio. Vet. Méx. 30(4), 285–288. <https://www.redalyc.org/pdf/423/42330403.pdf>
- Hess, K.L., Jewell, C. M., (2019). *Phage display* as a tool for vaccine and immunotherapy development. Bioeng. Transl. med. 18(5), e10142. doi: [10.1002/btm2.10142](https://doi.org/10.1002/btm2.10142)
- Houimel, M., Dellagi, K., (2009). Peptide mimotopes of rabies virus glycoprotein with immunogenic activity. Vaccine. 27(34), 4648-4655. doi: [10.1016/j.vaccine.2009.05.055](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.05.055)
- Hornef, M.W., Jo Wick, M., Rhen, M., Normark, S., (2002). Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. Nat. Immunol. 3(11), 1033–1040. doi: [10.1038/ni1102-1033](https://doi.org/10.1038/ni1102-1033)
- Huang, J., Zhang, Z., Li, M., Song, X., Yan, R., Xu, L., Li, X., (2015). *Eimeria maxima* microneme protein 2 delivered as DNA vaccine and recombinant protein induces immunity against experimental homogenous challenge. Parasitol. Int. 64(5), 408–416. doi: [10.1016/j.parint.2015.06.002](https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.06.002)
- Huang, J., Liu, T., Li, K., Song, X., Yan, R., Li, X., (2018). Proteomic analysis of protein interactions between *Eimeria maxima* sporozoites and chicken jejunal epithelial cells by shotgun LC-MS/MS. Parasit. Vectors. 11(1), 226. doi: [10.1186/s13071-018-2818-4](https://doi.org/10.1186/s13071-018-2818-4)

- Huang, J., Chen, S., Zhou, Z., Sun, X., Haseeb, M., Lakho, S.A., Zhang, Y., Liu, J., Muhammad Ali A. Shah, M.A.A., Song, X., et al., (2021). Poly (D, L-lactide-co-glycolide) delivery system improve the protective efficacy of recombinant antigen TA4 against *Eimeria tenella* infection. *Poult. Sci.* 100, 101083 doi: [10.1016/j.psj.2021.101083](https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101083)
- Ivory C., Chadee, K., (2002). DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. *Genet. Vaccines. Ther.* 2(1), 17. doi: [10.1186/1479-0556-2-17](https://doi.org/10.1186/1479-0556-2-17)
- Jang, S.I., Lillehoj, H.S., Lee, S.H., Lee, K.W., Lillehoj, E.P., Bertrand, F., Dupuis, L., Deville, S., et al. (2011a). Montanide™ ISA 71 VG adjuvant enhances antibody and cell-mediated immune responses to profilin subunit antigen vaccination and promotes protection against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. *Exp. Parasitol.* 127(1), 178–183. doi: [10.1016/j.exppara.2010.07.021](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.07.021)
- Jang, S.I., Lillehoj, H.S., Lee, S.H., Lee, K.W., Lillehoj, E.P., Bertrand, F., Dupuis, L., Deville, S., et al. (2011b). Montanide IMS 1313 N VG PR nanoparticle adjuvant enhances antigen-specific immune responses to profilin following mucosal vaccination against *Eimeria acervulina*. *Vet. Parasitol.* 182(2–4), 163–170. doi: [10.1016/j.vetpar.2011.05.019](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.019)
- Jahn, D.; Matros, A.; Bakulina, A.Y.; Tiedemann, J.; Shubert, U.; Giersberg, M.; Haehnel, S.; Zoufal, K.; Mock, H.P. Kipriyanov, S.M., (2009). Model structure of the immunodominant surface antigen of *Eimeria tenella* identified as a target for sporozoite neutralizing monoclonal antibody. *Parasitol. Res.* 105(3), 655–668. doi: [10.1007/s00436-009-1437-6](https://doi.org/10.1007/s00436-009-1437-6)
- Jeffers, T.K., (1975). Attenuation of *Eimeria tenella* through selection for precociousness. *J. Parasitol.* 61(6), 1083–1090. PMID: 1195070. <https://doi.org/10.2307/3279381>
- Jenkins, M.C., Parker, C., Klopp, S., O'Brien, C., Miska, K., Fetterer, R., (2012). Gel-bead delivery of *Eimeria* oocysts protects chickens against coccidiosis. *Avian. Dis.* 56(2),306–309. doi: [10.1637/9940-092111-Reg.1](https://doi.org/10.1637/9940-092111-Reg.1)
- Jiang, I., Lin, J., Han, H., Dong, H., Zhao, Q., Zhu, S., Huang, B., (2012). Identification and characterization of *Eimeria tenella* apical membrane antigen-1 (AMA1). *PLoS. One.* 7(7), e41115. doi: [10.1371/journal.pone.0041115](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041115)
- Jorgensen, W.K., Anderson, G.R., Jeston, P.J., Blight, G.W., Molloy, J.B., (2006). Selection and characterisation of two attenuated vaccine lines of *Eimeria tenella* in Australia. *Aust. Vet. J.* 84(3), 89–94. doi: [10.1111/j.1751-0813.2006.tb12236.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2006.tb12236.x)
- Joyner LP., (1969). Immunological variation between two strains of *Eimeria acervulina*. *Parasitology* 59(3), 725–732. doi: [10.1017/s0031182000031243](https://doi.org/10.1017/s0031182000031243)
- Joyner, L.P., Norton, C.C. The immunity arising from continuous low-level infection with *Eimeria tenella*. *Parasitol.* 67, 333–340. doi: [10.1017/s0031182000046552](https://doi.org/10.1017/s0031182000046552)

- Joyner L.P., Patterson, D.S.P., Berrett, S., Boarer, C.D.H., Cheong, F.H., Norton C.C., (1975) Amino-acid malabsorption and intestinal leakage of plasma-proteins in young chicks infected with *Eimeria acervulina*. Avian. Pathol. 4(1), 17–33, doi: [10.1080/03079457509353847](https://doi.org/10.1080/03079457509353847)
- Johnson, J., Reid, W.M., (1970). Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. Exp. Parasitol. 28(1), 30–36. doi: [10.1016/0014-4894\(70\)90063-9](https://doi.org/10.1016/0014-4894(70)90063-9)
- Johnson, J., Reid, W.M., Jeffers, T.K., (1979). Practical immunization of chickens against coccidiosis using an attenuated strain of *Eimeria tenella*. Poult. Sci. 58(1): 37–41. doi: [10.3382/ps.0580037](https://doi.org/10.3382/ps.0580037)
- Johnston, W.T., Shirley, M.W., Smith, A.L. Gravenor, M.B., (2001). Modelling host cell availability and the crowding effect in *Eimeria* infections. Int. J. Parasitol. 31: 1070–1081. doi: [10.1016/S0020-7519\(01\)00234-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00234-X)
- Juárez E.M.A., (1998). Determinación de Interferón Gamma durante la infección experimental con *Eimeria tenella* en pollo de engorda. Tesis de Maestría en Ciencias Veterinarias. Fac. de Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M.
- Juárez, E.M.A., Hernández, V.X., Téllez, I.G., (1999). Actividad de interferón durante la infección experimental primaria con *Eimeria tenella* en linfocitos esplénicos de pollo de engorda después de la estimulación *in vitro* con concanavalina-A. Vet. Mex. 30(4), 297–305. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42330405>
- Juárez, E.M.A., Cabriales, J.J.J., Petrone, G.V.M., Téllez, I.G., (2002). Evaluation of *Eimeria tenella* oocyst total count carried out with both the McMaster camera and the Neubauer haemocytometer from faeces or caecal tissue samples. Vet. Mex. 33(1), 73–79. <https://www.redalyc.org/pdf/42333108>
- Juarez, M.A., Davila, V., Martinez, F., Gonzalez, G., Rios, F., Avila, E., (2003). Performance improvement with Nobilis Cox ATM® and Sacox® in broilers challenged with Mexican coccidial isolates. Abst: 23rd Annual Meeting (SPSS) January 14–15, Pp. 54(232).
- Juarez, E.M.A., Fehervari, T.L., (2006). Splenic lymphocytes interferon pattern during a secondary response in *Eimeria tenella* infected broiler chickens. 27th Annual Meeting (SPSS) 47th (SCAD) Int. Poult. Scient. Forum; 2006 January 23&24; Atlanta (Georgia) U.S.A.: The SPSS, SCAD and U.S. Poult & Egg Ass., 50 (157).
- Juárez, E.M.A., Guzmán, M.R., Nava, M.G.M., (2007). Anticoccidial vaccine effect on physiological and immunological parameters in broiler chickens. Vet. Mex. 38(3), 303–318. www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2007/vm073e.pdf

- Juárez-Estrada, M.A., Gayosso-Vázquez, A., Tellez-Isaias, G., Alonso-Morales, R.A., (2021a). Protective immunity induced by an *Eimeria tenella* whole sporozoite vaccine elicits specific B-cell antigens. *Animals*. 11(5), 1344. doi: [10.3390/ani11051344](https://doi.org/10.3390/ani11051344)
- Juárez-Estrada, M.A., Tellez-Isaias, G., Sánchez-Godoy, F.D. Alonso-Morales, R.A., (2021b). Immunotherapy with egg yolk *Eimeria* sp.-Specific immunoglobulins in SPF Leghorn chicks elicits successful protection against *Eimeria tenella* infection. *Front. Vet. Sci.* 8:758379. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.758379>
- Jun, D., Qiao-Rong, L., Jing-Peng, H., Wei-Feng, Q., Qun, L., (2012). Anti-recombinant gametocyte 56 protein IgY protected chicken from homologous coccidian infection. *J. Integr. Agricult.* 11(10), 1721–1728. doi: [10.1016/S2095-3119\(12\)60176-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60176-2)
- Khalafalla, R.E., Dauschies, A., (2010a). In vivo evaluation of anticoccidial effect of antibody fragments expressed in pea (*Pisum sativum*) on *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitol. Res.* 107, 983-986. doi: [10.1007/s00436-010-1964-1](https://doi.org/10.1007/s00436-010-1964-1)
- Khalafalla, R.E., Dauschies, A., (2010b). Single oocyst infection: a simple method for isolation of *Eimeria* spp. from the mixed field samples. *Parasitol. Res.* 107, 187-8. doi: [10.1007/s00436-010-1840-z](https://doi.org/10.1007/s00436-010-1840-z)
- Karkhanis, Y.D., Nollstadt, K.A., Bhogal, B.S., Ravino, O., Pellegrino, R., Crane, M.S., Murray, P.K., Turner, M.J., (1991). Purification and characterisation of protective antigen from *Eimeria tenella*. *Infect. Immun.* 59(3), 983–989. doi: [10.1128/iai.59.3.983-989.1991](https://doi.org/10.1128/iai.59.3.983-989.1991)
- Kawazoe, U., Tomley, F.M., Frazier, A., (1992). Fractionation and antigenic characterization of organelles of *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitology.* 104(Pt 1), 1–9. doi: [10.1017/s003118200006073x](https://doi.org/10.1017/s003118200006073x)
- Kawazoe, U., Bordin, E.L., de Lima, C. A., Dias, L.A.V., (2005). Characterisation and histopathological observations of a selected Brazilian precocious line of *Eimeria acervulina*. *Vet. Parasitol.* 131(1–2), 5–14. doi: [10.1016/j.vetpar.2005.03.038](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.03.038)
- Kim, K.S., Jenkins, M.C., Lillehoj, H.S., (1989). Immunization of chickens with live *Escherichia coli* expressing *Eimeria acervulina* merozoite recombinant antigen induces partial protection against coccidiosis. *Infect. Immun.* 57(8), 2434–2440. doi: [10.1128/iai.57.8.2434-2440.1989](https://doi.org/10.1128/iai.57.8.2434-2440.1989)
- Keizer, D.W., Miles, L.A., Li, F., Nair, M., Anders, R.F., Coley, A.M., Foley, M., Norton, R.S., (2003). Structures of phage-display peptides that bind to the malarial surface protein, apical membrane antigen 1, and block erythrocyte invasion. *Biochemistry.* 42(33), 9915–9923. doi: [10.1021/bi034376b](https://doi.org/10.1021/bi034376b)
- Kimura, W., Mimura, F., Nishida, S., Kobayashi, A., Mitsuoka, T., (1976). Studies on the

relationship between intestinal flora and caecal coccidiosis in chickens. *Poult. Sci.* 55(4):1375–1383. doi: [10.3382/ps.0551375](https://doi.org/10.3382/ps.0551375)

- Klotz, C., Hehre, F., Lucius, R., Pogonka, T., (2007). Identification of *Eimeria tenella* genes encoding for secretory proteins and evaluation of candidates by DNA immunisation studies in chickens. *Vaccine*. 25, 6625–6634. doi: [10.1016/j.vaccines.2007.06.048](https://doi.org/10.1016/j.vaccines.2007.06.048)

-Ko, C., Smith, C.K., McDonell, M., (1990). Identification and characterization of a target antigen of a monoclonal antibody directed against *Eimeria tenella* merozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41(19, 53–63. doi: [10.1016/0166-6851\(90\)90096-5](https://doi.org/10.1016/0166-6851(90)90096-5)

- Kopko, S.H., Martin, D.S., Barta, J.R., (2000). Responses of chickens to a recombinant refractile body antigen of *Eimeria tenella* administered using various immunizing strategies. *Poult. Sci.* 79(3), 336–342. doi: [10.1093/ps/79.3.336](https://doi.org/10.1093/ps/79.3.336)

- Kowalik, S., Zahner, H., (1999). *Eimeria separata*: method for the excystation of sporozoites. *Parasitol. Res.* 85: 496–499.

- Kozbor, D., (2010). Cancer vaccine with mimotopes of tumor-associated carbohydrate antigens. *Immunol. Res.* 46(1–3), 23–31. doi: [10.1007/s12026-009-8120-y](https://doi.org/10.1007/s12026-009-8120-y)

- Kundu, K., Garg, R., Kumar, S., Mandal, M., Tomley, F., Blake, D.P., Banerjee, P.S., (2017). Humoral and cytokine response elicited during immunisation with recombinant Immune Mapped protein-1 (EtiMP-1) and oocysts of *Eimeria tenella*. *Vet. Parasitol.* 244, 44–53. doi: [10.1016/j.vetpar.2017.07.025](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.025)

- Krücken, J., Hosse, R.J., Mouafo, A.N., Entzeroth, R., Bierbaun, S., Marinovski, P., Hain, K., Greif, G., Wunderlich, F., (2008). Excystation of *Eimeria tenella* sporozoites impaired by antibody recognizing gametocyte(oocyst antigens GAM22 and GAM 56. *Eukaryot. Cell.* 7(2), 202–211. doi: [10.1128/EC.00292-07](https://doi.org/10.1128/EC.00292-07)

- Kurth, M., Entzeroth, R. (2008). Improved excystation protocol for *Eimeria nieschulzi* (Apicomplexa, Coccidia). *Parasitol. Res.* 102, 819–822. doi: [10.1007/s00436-007-0868-1](https://doi.org/10.1007/s00436-007-0868-1)

- Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., Roques, M., Vulliez-Le Normand, B., Morlon-Guyot, J., Dubremetz, J.F., Fauquenoy, S., Tomavo, S., Faber, B.W., et al., (2011). The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Pathog* 7(2): e1001276. doi: [10.1371/journal.ppat.1001276](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001276)

- Lai L., Bumstead, J., Liu, Y., Garnetti, J., Campanero-Rhodesi, M.A., Blake, D.P., Palma, A.S., Chai, W., Ferguson, D.J.P., Simpson, P., et al., (2011). The role of sialyl glycan recognition in host tissue tropism of the avian parasite *Eimeria tenella*. *Plos. Pathog.* 7(10) e1002296. doi: [10.1371/journal.ppat.1002296](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002296)

- Lal, K., Bromley, E., Oakes, R., Prieto, J.H., Sanderson, S.J., Kurian, D., Hunt, L., Yates III,

- J.R., Wastling, J.M., Sinden, R.E., et al., (2009). Proteomic comparison of four *Eimeria tenella* life-cycle stages: Unsporulated oocyst, sporulated oocyst, sporozoite and second-generation merozoite. *Proteomics*. 9(19), 4566-4576. doi: [10.1002/pmic.200900305](https://doi.org/10.1002/pmic.200900305)
- Landers, E.J. (1960). Studies on excystation of coccidial oocysts. *J. Parasitol.* 46,195-200. doi: [10.2307/3275169](https://doi.org/10.2307/3275169)
- Lawn, A.M. Rose, M.E., (1982). Mucosal transport of *Eimeria tenella* in the cecum of the chicken. *J. Parasitol.* 68(6), 1117–1123. PMID: 7175614. <https://doi.org/10.2307/3281101>
- Lee, E.N., Sunwoo, H.H., Menninen, K., Sim, J.S., (2002). *In vitro* studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *Poult. Sci.* 81(5):632–641. doi: [10.1093/ps/81.5.632](https://doi.org/10.1093/ps/81.5.632)
- Lee, S.H., Lillehoj, H.S., Park, D.W., Jang, S.I., Morales, A., García D., Lucio, E., Larios, R., Victoria, G., Marrufo, D., et al. (2009a). Induction of passive immunity in broiler chickens against *Eimeria acervulina* by hyperimmune egg yolk immunoglobulin Y. *Poult. Sci.* 88(3), 562–566. doi: [10.3382/ps.2008-00340](https://doi.org/10.3382/ps.2008-00340)
- Lee, S.H., Lillehoj, H.S., Park, D.W., Jang, S.I., Morales, A., García D., Lucio, E., Larios, R., Victoria, G., Marrufo, D., et al. (2009b). Protective effect of hyperimmune egg yolk IgY antibodies against *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infections. *Vet. Parasitol.* 163(1–2), 123–126. doi: [10.1016/j.vetpar.2009.04.020](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.04.020)
- Lee, D.Y., Chun, J.H., Ha, H.J., Park, J., Kim, B.S., Oh, H.B., Rhie, G.E., (2009c). Poly-c-D-glutamic acid and protective antigen conjugate vaccines induce functional antibodies against the protective antigen and capsule of *Bacillus anthracis* in guinea-pigs and rabbits. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 57(2), 165–172. doi: [10.1111/j.1574-695X.2009.00595.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00595.x)
- Lee, S.H., Lillehoj, H.S., Jang, S.I., Hong, Y.H., Min, W. Lillehoj, E.P., Yancey, R.J., Dominowski, P., (2010). Embryo vaccination of chickens using a novel adjuvant formulation stimulates protective immunity against *Eimeria maxima* infection. *Vaccine.* 28(49); 7774–7778. doi: [10.1016/j.vaccine.2010.09.051](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.09.051)
- Lee, K.W., Lillehoj, H.S., Jang, S.I., Pagés, M., Bautista, D.A., Pope, C.R., Ritter, G.D., Lillehoj, E.P., Neumann, A.P., et al. (2012). Effects of *in ovo* vaccination and anticoccidials on the distribution of *Eimeria* spp. in poultry litter and serum antibody titers against coccidia in broiler chickens raised on the used litters. *Res. Vet. Sci.* 93(1), 177–182. doi: [10.1016/j.rvsc.2011.05.005](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.05.005)
- Lineamientos para la Operación Orgánica de las Actividades Agropecuarias (LPOAA). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Diario Oficial de la Federación. Estados Unidos Mexicanos. 29 de octubre de 2013. 66 pp.

- Lillehoj, H.S., (1986). Immune response during coccidiosis in SC and FP chickens. I. *In vitro* assessment of T-cell proliferation response to stage-specific parasite antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 13(4), 321–330. doi: [10.1016/0165-2427\(86\)90025-5](https://doi.org/10.1016/0165-2427(86)90025-5)
- Lillehoj, H.S., (1987). Effects of immunosuppression on avian coccidiosis cyclosporin A but not hormonal bursectomy abrogates host protective immunity. *Infect. Immun.* 55(7), 1616–1621. doi: [10.1128/iai.55.7.1616-1621.1987](https://doi.org/10.1128/iai.55.7.1616-1621.1987)
- Lillehoj, H.S., (1988). Influence of inoculation dose, inoculation schedule, chicken age, and host genetics on disease susceptibility and development of resistance to *Eimeria tenella* infection. *Avian. Dis.* 32(3), 437–444. doi: [10.2307/1590909](https://doi.org/10.2307/1590909)
- Lillehoj, H.S., Kang, S.Y., Keller, L., Sevoian, M., (1989). *Eimeria tenella* and *E. acervulina*: lymphokines secreted by an avian T cell lymphoma and sporozoite-stimulates immune T lymphocytes protect chickens against avian coccidiosis. *Exp. Parasitol.* 69(1), 54–64. doi: [10.1016/0014-4894\(89\)90171-9](https://doi.org/10.1016/0014-4894(89)90171-9)
- Lillehoj, H.S., Trout, J.M., (1993). Coccidia: A review of recent advances on immunity and vaccine development, *Avian. Pathol.* 22(1), 3–31, doi: [10.1080/03079459308418897](https://doi.org/10.1080/03079459308418897)
- Lillehoj, H.S., Trout, J.M., (1996). Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 9(3), 349–360. doi: [10.1128/CMR.9.3.349](https://doi.org/10.1128/CMR.9.3.349)
- Lillehoj, H.S., (1998). Role of T lymphocytes and cytokines in coccidiosis. *Int. J. Parasitol.* 28, 1071–1081. doi: [10.1016/s0020-7519\(98\)00075-7](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00075-7)
- Lillehoj, H.S., - Lillehoj, E.P., (2000). Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian. Dis.* 44(2), 408–425. doi: [10.2307/1592556](https://doi.org/10.2307/1592556)
- Li, G.Q., Kanu, S., Xiang, F.Y., Xiao, S.M., Zhang, L., Chen, H.W., Ye, H.J., (2004). Isolation and selection of ionophore-tolerant *Eimeria* precocious lines: *E. tenella*, *E. maxima* and *E. acervulina*. *Vet. Parasitol.* 119(4), 261–276. doi: [10.1016/j.vetpar.2003.12.009](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.12.009)
- Li, G.Q., Kanu, S., Xiao, S.M., Xiang, F.Y., (2005). Responses of chickens vaccinated with a live attenuated multi-valent ionophore-tolerant *Eimeria* vaccine. *Vet. Parasitol.* 129(3–4), 179–186. doi: [10.1016/j.vetpar.2004.09.034](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.034)
- Li, X.F., Li, J.N., Ji, J.J., Yu, W.Y., (2008). Prokaryotic expression of outer membrane protein U gene of *Vibrio mimicus* and its immunoprotection. *J Fish. Sci. Chin.* 15(2), 308e13.
- Li, W., Wang, M., Chen, Y., Chen, C., Liu, X., Sun, X., Jing, C., Xu, L., Yan, R., Li, X., et al (2020). EtMIC3 and its receptors BAG1 and ENDOUL are essential for site-specific invasion of *Eimeria tenella* in chickens. *Vet. Res.* 51, 90. doi: [10.1186/s13567-00809-6](https://doi.org/10.1186/s13567-00809-6)

- Lin, R.Q., Lillehoj, H.S., Lee, S.K., Oh, S.T., Panebra, A., Lillehoj, E.P., (2017). Vaccination with *Eimeria tenella* elongation factor-1 α recombinant protein induces protective immunity against *E. tenella* and *E. maxima* infections. *Vet. Parasitol.* 243, 79–84. doi: [10.1016/j.vetpar.2017.06.003](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.06.003)
- Liu, L., Xu, L., Yan, F., Yan, R., Song, X., Li, X., (2009). Immunoproteomic analysis of the second generation merozoite proteins of *Eimeria tenella*. *Vet. Parasitol.* 164(2–4), 173–182. doi: [10.1016/j.vetpar.2009.05.016](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.016)
- Liu, Y., Zheng, J., Li, J., Gong, P., Zhang, X., (2013). Protective immunity induced by a DNA vaccine encoding *Eimeria tenella* rhomboid against homologous challenge. *Parasitol. Res.* 112, 251–257. doi: [10.1007/s00436-012-3132-2](https://doi.org/10.1007/s00436-012-3132-2)
- Liu, L., Huang, X., Liu, J., Li, J., Tian, D., Tian, L. Yang, X., Xu, L., Yan, R., Li, X., et al. (2017). Identification of common immunodominant antigens of *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima* by immunoproteomic analysis. *Oncotarget.* 8(21), 34935–34945. doi: [10.18632/oncotarget.16824](https://doi.org/10.18632/oncotarget.16824)
- Liu, J., Liu, L., Li, L., Tian, D., Li, W., Xu, L., Yan, R., Li, X., Song, X., (2018). Protective immunity induced by *Eimeria* common antigen 14–3–3 against *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima*. *BMC. Vet Res.* 14, 337. doi: [10.1186/s12917-018-1665-z](https://doi.org/10.1186/s12917-018-1665-z)
- Liu, G., Zhu, S., Zhao, Q., Dong, H., Huang, B., Zhao, H., Li, Z., Wang, L., Han, H., (2019). Molecular characterization of surface antigen 10 of *Eimeria tenella*. *Parasitol. Res.* 118(10), 2989–2999. doi: [10.1007/s00436-019-06437-0](https://doi.org/10.1007/s00436-019-06437-0)
- Liu, J., Tuo, W., Wu, X., Xiong, J., Yu, E., Yin, C., Ma, Z., Liu, L., (2020a). Immunoproteomic and mass spectrometric analysis of *Eimeria acervulina* antigens recognized by antisera from chickens infected with *E. acervulina*, *E. tenella* or *E. necatrix*. *Parasit. Vectors.* 13, 93. doi: [10.1186/s13071-020-3965-y](https://doi.org/10.1186/s13071-020-3965-y)
- Liu Q, Jiang Y, Yang W, Liu Y Shi C, Liu J., Gao, X., Huang, H., Niu, T., Yang, G., et al. (2020b). Protective effects of a food-grade recombinant *Lactobacillus plantarum* with surface displayed AMA1 and EtMIC2 proteins of *Eimeria tenella* in broiler chickens. *Microb. Cell. Fact.* 19(1), 28. doi: [10.1186/s12934-020-1297-4](https://doi.org/10.1186/s12934-020-1297-4)
- Long, P.L., Rowell, J.G., (1958). Counting oocysts of chicken coccidia. *Lab. Pract.* 7, 515–518.
- Long, P.L., Rose, E., (1972). Immunity to coccidiosis: effect of serum antibodies on cell invasion by sporozoites of *Eimeria in vitro*. *Parasitol.* 65(3), 437–445 doi: [10.1017/S0031182000044061](https://doi.org/10.1017/S0031182000044061)
- Long, P.L., Rowell, J.G., (1975). Sampling broiler house litter for coccidial oocysts. *Br. Poult.*

- Sci. 16(6), 583–592. doi: [10.1080/00071667508416233](https://doi.org/10.1080/00071667508416233)
- Long, P.L., Millard, B.J., Joyner, L.P., Norton, C.C., (1976). A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Vet. Lat.* 6(3), 200–217. PMdi: 1010500
 - Long, P.L., Millard, B.J., (1979). Immunological differences in *Eimeria maxima*: effect of a mixed immunizing inoculum on heterologous challenge. *Parasitology.* 79(3), 451–457. doi: [10.1017/s0031182000053841](https://doi.org/10.1017/s0031182000053841)
 - Long, P.L., Joyner, L.P., (1984). Problems in the identification of species of *Eimeria*. *J. Protozool.* 31(4), 535–541. doi: [10.1111/j.1550-7408.1984.tb05498.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1984.tb05498.x)
 - Long, P.L., Johnson, J., McKenzie, M.E., Perry, E., Crane, M.S., Murray, P.K., (1986). Immunization of young broiler chickens with low level infections of *Eimeria tenella*, *E. acervulina*, or *E. maxima*. *Avian. Pathol.* 15, 271–278. doi: [10.1080/03079458608436287](https://doi.org/10.1080/03079458608436287)
 - Long, S., Anthony, B., Drewry, L.L., Sibley, L.D., (2017). A conserved ankyrin repeat-containing protein regulates conoid stability, motility and cell invasion in *Toxoplasma gondii*. *Nat. Commun.* 8(1), 2236. doi: [10.1038/s41467-017-02341-2](https://doi.org/10.1038/s41467-017-02341-2)
 - López-Osorio S, Chaparro-Gutiérrez JJ and Gómez-Osorio LM (2020) Overview of poultry *Eimeria* life cycle and host-parasite interactions. *Front. Vet. Sci.* 7, 384. doi: [10.3389/fvets.2020.00384](https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00384)
 - Ma, D., Hunag, Y., Ma, C., Zhang, L., Wang, J., Wang, D., Li, J., Dalloul, R.A., (2019). *Eimeria tenella*: specific EtAMA1-binding peptides inhibit sporozoite entry into host cells. *Poult. Sci.* 98, 4480–4491. doi: [10.3382/ps/pez298](https://doi.org/10.3382/ps/pez298)
 - Madlala, T., Adeleke, V. T., Fatoba, A.J., Okpeku, M., Adeniyi, A.A., Adeleke, M.A., (2021). Designing multiepitope-based vaccine against *Eimeria* from immune mapped protein 1 (IMP-1) antigen using immunoinformatic approach. *Sci. Rep.* 11(1), 18295. doi: [10.1038/s41598-021-97880-6](https://doi.org/10.1038/s41598-021-97880-6)
 - Martin, A., Lillehoj, H.S., Kaspers, B., Bacon, L.D., (1993). Antigen-specific T cell proliferation following coccidia infection. *Poult. Sci.* 72(11), 2084–2094. doi: [10.3382/ps.0722084](https://doi.org/10.3382/ps.0722084)
 - Martin, A. G., Danforth, H. D., Barta, J. R., Fernando, M. A., (1997). Analysis of immunological cross-protection and sensitivities to anticoccidial drugs among five geographical and temporal strains of *Eimeria maxima*. *Int. J. Parasitol.* 27(5), 527–533. doi: [10.1016/s0020-7519\(97\)00027-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(97)00027-1)
 - Matthews, L., Davis, R., Smith, G.P., (2002). Immunogenically fit subunit vaccine components via epitope discovery from natural peptide libraries. *J. Immunol.* 169(2), 837–

846. doi: [10.4049/jimmunol.169.2.837](https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.2.837)

- Matsubayashi, M., Kimata, I., Iseki, M., Lillehoj, H.S., Matsuda, H., Nakanishi, T. Tani, H., Sasai, K., Baba, E., (2005). Cross-reactivities with *Cryptosporidium* spp. by chicken monoclonal antibodies that recognize avian *Eimeria* spp. *Vet. Parasitol.* 128(1-2), 47–57. doi: [10.1016/j.vetpar.2004.11.004](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.004)
- Macdonald, S.E., Nolan, M.J., Harman, K., Boulton, K., Hume, D.A., Tomley, F.M., Stabler, R.A., Blake, D.P., (2017). Effects of *Eimeria tenella* infection on chicken caecal microbiome diversity, exploring variation associated with severity of pathology. *PLoS One.* 12(9), e0184890. doi: [10.1371/journal.pone.0184890](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184890)
- McDonald, V., Ballingall, S., (1983). Further investigation of pathogenicity, immunogenicity and stability of precocious *Eimeria acervulina*. *Parasitology.* 86(Pt3), 361–369. doi: [10.1017/s0031182000050551](https://doi.org/10.1017/s0031182000050551)
- McDonald, V., Shirley, M.W., Bellati, M.A., (1986). *Eimeria maxima*: Characteristics of attenuated lines obtained by selection for precocious development in the chicken. *Exp. Parasitol.* 61(2), 192–200. doi: [10.1016/0014-4894\(86\)90152-9](https://doi.org/10.1016/0014-4894(86)90152-9)
- McDonald, V., Shirley, M.W., (1987). The endogenous development of virulent strains and attenuated precocious lines of *Eimeria tenella* and *E. necatrix*. *J. Parasitol.* 73(5), 993–997. doi: [10.2307/3282523](https://doi.org/10.2307/3282523)
- McDonald, V., Wisher, M.H., Rose, M.E., Jeffers, T.K., (1988). *Eimeria tenella*: Immunological diversity between asexual generations. *Paras. Immunol.* 10(6), 649–660. doi: [10.1111/j.1365-3024.1988.tb00251.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1988.tb00251.x)
- McManus, E.C., Campbell, W.C., Cuckler, A.C., (1968). Development of resistance to quinoline coccidiostats under field and laboratory conditions. *J. Parasitol.* 54(6), 1190–1193. PMID: 5757693.
- MacDonald, S.E.; Nolan, M.J.; Harman, K.; Boulton, K.; Hume, D.A.; Tomley, F.M.; Stabler, R.A.; Blake, D.P., (2017). Effects of *Eimeria tenella* infection on chicken caecal microbiome diversity, exploring variation associated with severity of pathology. *PLoS. ONE.* 12(9), e0184890, doi: [10.1371/journal.pone.0184890](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184890).
- McDonald, V., Shirley, M.W., Millard, B.J., (1986). A comparative study of two lines of *Eimeria tenella* attenuated either by selection for precocious development in the chicken or by growth in chicken embryos. *Avian Pathol.* 15(3), 323–335. doi: [10.1080/03079458608436296](https://doi.org/10.1080/03079458608436296)
- Melby, P., Yang, J., Zhao, W., Perez, L., Cheng, J., (2001). *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental

- visceral Leishmaniasis. *Infect. Immun.* 69(8), 4719–4725. doi: [10.1128/IAI.69.8.4719-4725.2001](https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.4719-4725.2001)
- Meyer, T., Schirmann, T., Frenzel, A., Miethe, S., Stratmann-Seike, J., Gerlach, G.F., Struzberg-Minder, K., Dübel, S., Hust, M., (2012). Identification of immunogenic proteins and generation of antibodies against *Salmonella typhimurium* using *Phage display*. *BMC. Biotechnol.* 12, 29. doi: [10.1186/1472-6750-12-29](https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-29)
 - Mesa, C., Gómez-Osorio, L.M., López-Osorio, S., Williams, S.M., Chaparro-Gutiérrez, J.J. (2021). Survey of coccidia on commercial broiler farms in Colombia: frequency of *Eimeria* species, anticoccidial sensitivity, and histopathology. *Poult. Sci.* 100.101239. doi: [10.1016/j.psj.2021.101239](https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101239)
 - Michael, A., (2002). The practical use of a maternal vaccine against coccidiosis. *World. Poult.* 19, 24–26.
 - Mitshali, s.A., Adeleke, M.A., A review of adaptive immune responses to *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* challenge in chickens. *W. Poult. Sci. J.* 76(4), 1–16. doi: [10.1080/00439339.2020.1833693](https://doi.org/10.1080/00439339.2020.1833693)
 - Morahan, B.J., Wang, L., Coppel, R.I., (2009). No TRAP, no invasion. *Trends. Parasitol.* 25(2), 77–84. doi: [10.1016/j.pt.2008.11.004](https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.11.004)
 - Morales, J., Martinez, J.J., Manoutcharian, K., Hernandez, M., Fleury, A., Gevorkian, G., Abero, G., Blancas, A., Toledo, A., Cervantes, J., et al. (2008). Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cysticercosis. *Vaccine.* 26, 2899–2905. doi: [10.1016/j.vaccine.2008.03.042](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.042)
 - Morales, G.J.A., Lucio, D.E. Composition for prevention and treatment of infections caused by coccidia in chickens. U.S. Patent 8,110,188B2. 7 February 2012. <https://patents.google.com/patent/US8110188B2/en>
 - Moreno, D.R. V. (1980). Determinación del grado de patogenicidad de algunas cepas de *Eimeria* aisladas de pollos en México. *Vet. Mex.* 2, 1–7.
 - Moreno, D.R., Ibarra, V.F., Ochoa, G.P. (2001). Frecuencia de *Eimeria* spp en algunas granjas de la zona avícola de Tehuacán, Puebla, México. *Vet. Mex.* 32(2), 103–108.
 - Moreno, D.R., Ibarra, V.F. (2002). Some aspects on poultry coccidiosis in the area of Coahuila de Zaragoza in the state of Veracruz in Mexico. *Vet. Mex.* 33(1), 63–71.
 - Morgan, R.E., Evans, K.M., Patterson, S., Catti, F., Ward, G.E. Westwood, N.J., (2007). Targeting invasion and egress: From tools to drugs? *Curr. Drug. Targets.* 8(1), 61–74. doi: [10.2174/138945007779315678](https://doi.org/10.2174/138945007779315678)

- Mockett, A.P.A., Rose, M.E., 1986. Immune responses to *Eimeria*: quantification of antibody isotypes to *Eimeria tenella* in chicken serum and bile by means of the ELISA. *Parasite. Immunol.* 8(5), 481–489. doi: [10.1111/j.1365-3024.1986.tb00863.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1986.tb00863.x)
- Murray, P.K., Galuska, S. (1987). Coccidiosis vaccine. Patent num. US 4639372 A. <https://patents.google.com/patent/US4639372>
- Mtshali, S.A., Adeleke, M.A., (2020). A review of adaptive immune responses to *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* challenge in chickens, *Worlds. Poult. Sci. J.* 76(4), 827–841. doi: [10.1080/00439339.2020.1833693](https://doi.org/10.1080/00439339.2020.1833693)
- Novaes, J., Rangel L.T.L.D., Ferro M., Abe, R.Y, Alessandra P.S. Manha, A.P.S., de Mello, J.C.M., Varuzza, L., Durham, A.M., Madeira, A.M., et al. (2012). A comparative transcriptome analysis reveals expression profiles conserved across three *Eimeria* spp. of domestic fowl and associated with multiple developmental stages. *Int. J. Parasitol.* 42(1), 39–48. doi: [10.1016/j.ijpara.2011.10.008](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.10.008)
- Ogedengbe, M.E., Ogedengbe, J.D., Whale, J.C., Elliot, K., Juárez-Estrada, M.A., Barta, J.R., (2016). Molecular phylogenetic analyses of tissue coccidian (sarcocystidae; apicomplexa) based on nuclear 18s RDNA and mitochondrial COI sequences confirms the paraphyly of the genus *Hammondia*. *Parasitol. Open.* 2, 1–16. doi: [10.1017/pao.2015.7](https://doi.org/10.1017/pao.2015.7)
- Ogedengbe, M.E., El-Sherry, S., Ogedengbe, J.D., Chapman, H.G., Barta, J.R., (2018). Phylogenies based on combined mitochondrial and nuclear sequences conflict with morphologically defined genera in the eimeriid coccidia (Apicomplexa). *Inter. J. Parasitol.* 48(1), 59–69. doi: [10.1016/j.ijpara.2017.07.008](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.07.008)
- Onaga, H., Saeki, H., Hoshi, S., Ueda, S., (1986). An enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of coccidiosis in chickens: use of a single serum dilution. *Avian Dis.* 30(4), 658–661. PMdi: 3814003. doi: [10.2307/1590564](https://doi.org/10.2307/1590564)
- Onaga, H.; Togo, M.; Kudo, Y.; Motohashi, T.; Ishii, T., (1989). The use of an enzyme-linked immunosorbent assay for estimation of the immune status of chicken artificially immunized against coccidiosis. *Vet. Parasitol.* 33(3–4), 199–205. doi: [10.1016/0304-4017\(89\)90129-5](https://doi.org/10.1016/0304-4017(89)90129-5)
- Panebra, A., Lillehoj, H.S., (2019). Retracted: *Eimeria tenella* elongation factor-1 α (EF-1 α) coadministered with chicken IL-7 (chIL-7) DNA vaccine emulsified in Montanide Gel 01 adjuvant enhanced the immune response to *E. acervulina* infection in broiler chickens. *Avian. Dis.* 63(2), 342–350. doi: [10.1637/11976-092418-Reg.1](https://doi.org/10.1637/11976-092418-Reg.1)
- Pande, J., Szewczyk, M.M., Ashok K. Grover, A., (2010). *Phage display*: Concept, innovations, applications and future. *Biotech. Adv.* 28(6), 849–858. doi: [10.1016/j.biotechadv.2010.07.004](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.004)

- Paschke, M., 2006. *Phage display* systems and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70(1), 2–11. doi: [10.1007/s00253-005-0270-9](https://doi.org/10.1007/s00253-005-0270-9)
- Pastor-Fernández, I., Kim, S., Billington, K., Bumstead, J., Marugán-Hernández, V., Küster, T., Ferguson, D.J.P. Vervelde, L., Blake, D.P., Tomley, F.M., (2018). Development of cross-protective *Eimeria*-vectored vaccines based on apical membrane antigens. *Inter. J. Parasitol.* 48, 505–518. doi: [10.1016/j.ijpara.2018.01.003](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.01.003)
- Pastor-Fernández, I., Kim, S., Marugán-Hernández, Soutter, F., Tomley, F.M., Blake, D.P., (2020). Vaccination with transgenic *Eimeria tenella* expressing *Eimeria maxima* AMA1 and IMP1 confers partial protection against high-level *E. maxima* challenge in a broiler model of coccidiosis. *Parasit. Vectors.* 13(1), 343. doi: [10.1186/s13071-020-04210-2](https://doi.org/10.1186/s13071-020-04210-2)
- Periz, J., Gill, A.C., Hunt, L., Brown, P., Tomley, F.M., (2007). The microneme proteins EtMIC4 and EtMIC5 of *Eimeria tenella* form a novel, ultra-high molecular mass protein complex that binds target host cells. *J. Biol. Chem.* 282(23), 16891–16898. doi: [10.1074/jbc.M702407200](https://doi.org/10.1074/jbc.M702407200)
- Periz, J., Ryan, R., Blake, D.P. Tomley, F.M., (2009). *Eimeria tenella* microneme protein EtMIC4: capture of the full-length transcribed sequence and comparison with other microneme proteins. *Parasitol. Res.* 104, 717–721. doi: [10.1007/s00436-008-1301-0](https://doi.org/10.1007/s00436-008-1301-0)
- Piacenza, L., Abosta, D., Basmadjian, I., Dalton, J.P. Carmona, C., (1999). Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against Fascioliasis in sheep. *Infect. Immun.* 67(4), 1954-1961. doi: [10.1128/IAI.67.4.1954-1961.1999](https://doi.org/10.1128/IAI.67.4.1954-1961.1999)
- Pinard, V.D.L., Monvoisin, J.L., Pery, P., Hamet, N., Thomas, M., (1998). Comparison of outbred lines of chickens for resistance to experimental infection with coccidiosis (*Eimeria tenella*). *Poult. Sci.* 77(2), 185–191. doi: [10.1093/ps/77.2.185](https://doi.org/10.1093/ps/77.2.185)
- Pourfajar, M., Samadi, P., Khoshinani, H. M., Saidijam, M., (2019). Are mimotope vaccines a good alternative to monoclonal antibodies? *Immunotherapy.* 11(9), 795–800. doi: [10.2217/imt-2018-0213](https://doi.org/10.2217/imt-2018-0213)
- Prakashbabu, B.C., Thenmozhi, V., Limon, G., Kundu, K., Kumar, S., Garg, R., Clark, E.L. Rao, A.S.R.S., Raj, D.G., Raman, M., et al. (2017). *Eimeria* species occurrence varies between geographic regions and poultry production systems and may influence parasite genetic diversity. *Vet Par.* 233, 62–72. doi: [10.1016/j.vetpar.2016.12.003](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.12.003)
- Prudencio, C.R., Nascimento, R., Filho, M.M. Marra, A.O.M., Rocha, L.G., Almeida, J.F., Cardoso, R., Juan, S.M.P., Goulart, L.R., (2009). In silico analysis for identification of tick

- phagotopes selected by phage-displayed libraries. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 18(1), 39–41. doi: [10.4322/rbpv.01801007](https://doi.org/10.4322/rbpv.01801007)
- Prudencio, C.R., Marra, A.O.M., Cardozo, R., Goulart, L.R., (2010). Recombinant peptides as new immunogens for the control of the bovine tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.* 172, 122–131. doi: [10.1016/j.vetpar.2010.04.012](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.012)
 - Prowse, S.J., (1991). Cell-mediated immunity to *Eimeria* in the fowl: the absence of cross-species protection is not due to the lack of cross-reactive T cells. *Int. J. Parasitol.* 21(1), 133–135. doi: [10.1016/0020-7519\(91\)90134-s](https://doi.org/10.1016/0020-7519(91)90134-s)
 - Rafiqi, S.I., Garg, R., Ram, H., Reena, K.K., Ram, H., Singh, M., Banerjee, P.S. (2018). Immune response and protective efficacy of *Eimeria tenella* recombinant refractile body protein, EtSO7, in chickens. *Vet. Parasitol.* 258, 108–113. doi: [10.1016/j.vetpar.2018.06.013](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.06.013)
 - Rafiqi, S.I., Garg, R., Ram, H., Reena, K.K., Asari, M., Kumari, P., Kundave, V.R., Singh, M., Banerjee, P.S. (2019). Immunoprophylactic evaluation of recombinant gametocyte 22 antigen of *Eimeria tenella* in broiler chickens. *Parasitol. Res.* 118(3), 945–953. doi: [10.1007/s00436-018-06198-2](https://doi.org/10.1007/s00436-018-06198-2)
 - Rappuoli, R., Miller, H.I., Falkow, S., (2002). The intangible value of vaccination. *Science.* 297(5583), 937–939. doi: [10.1126/science.1075173](https://doi.org/10.1126/science.1075173)
 - Rahman, S., Nguyen, S.V., Icatlo, F.C., Umeda, K., Kodama, Y., (2013). Oral passive IgY-based immunotherapeutics: A novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. *Hum. Vaccin. Immunother.* 9(5), 1039–1048. doi: [10.4161/hv.23383](https://doi.org/10.4161/hv.23383)
 - Ramírez-Flores, C.J., Cruz-Mirón, R., Arroyo, R., Mondragón-Castelán, M.E, Nopal-Guerrero, T., González-Pozos, S., Ríos-Castro, E., Mondragón-Flores, R., (2019). Characterization of metalloproteases and serine proteases of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and their effect on epithelial cells. *Parasitol. Res.* 118, 289–306. doi: [10.1007/s00436-018-6163-5](https://doi.org/10.1007/s00436-018-6163-5)
 - Réfega, S., Misguich, F.G., Bourdieu, C., Péry, P., Labbé, M., (2003). Gene discovery in *Eimeria tenella* by immunoscreening cDNA expression libraries of sporozoites and schizonts with chicken intestinal antibodies. *Vet. Parasitol.* 113(1), 19–33. doi: [10.1016/s0304-4017\(03\)00033-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(03)00033-5)
 - Reid, A.J., Blake, D.P., Ansari, H.R., Billington, K., Browne, H.P. Bryant, J., Dunn, M., Hung, S.S., Kawahara, F., Miranda-Saavedra, D., et al (2014). Genomic analysis of the causative agents of coccidiosis in domestic chickens. *Genome Res.* 24(10), 1676–1685. doi: [10.1101/gr.168955.113](https://doi.org/10.1101/gr.168955.113)

- Rhalem, A., Sahibi, H., Dakkak, A., Laurent, F., Kazanji, M., Yvoré, P., Péry, P., (1993). Protective oral immunization of chicken against *Eimeria tenella* with sporozoite surface antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 38, 327–340. doi: [10.1016/0165-2427\(93\)90091-h](https://doi.org/10.1016/0165-2427(93)90091-h)
- Richie, T., (2006). High road, low road? Choices and challenges on the pathway to a malaria vaccine. *Parasitol.* 133(Suppl113), 144. doi: [10.1017/S0031182006001843](https://doi.org/10.1017/S0031182006001843)
- Ryley, J.F., Meade, R., Hazelhurst, J., Robinson, T.E., (1976) Methods in coccidiosis - research: separation of oocysts from faeces. *Parasitol.* 73, 311–326. doi: [10.1017/s0031182000046990](https://doi.org/10.1017/s0031182000046990)
- Rose, M., Long, P., (1962). Immunity to four species of *Eimeria* in fowls. *Immunology* 5(1), 79–92. PMID: 14493839. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1424172/>
- Rose, M.E., (1967). Immunity to *Eimeria tenella* and *Eimeria necatrix* infections in the fowl. I. Influence of the site of infection and the stage of the parasite. II. Cross-protection. *Parasitol.* 57(3), 567–583. doi: [10.1017/s0031182000072449](https://doi.org/10.1017/s0031182000072449)
- Rose, M.E., Long, P.L., (1971). Immunity to coccidiosis: protective effects of transferred serum and cells investigated in chick embryos infected with *Eimeria tenella*. *Parasitol.* 63(2), 299–313. doi: [10.1017/S0031182000079610](https://doi.org/10.1017/S0031182000079610)
- Rose, M., Hesketh, P., (1976). Immunity to coccidiosis: stages of the life-cycle of *Eimeria maxima* which induce and are affected by the response of the host. *Parasitol.* 73(1), 25–57. doi: [10.1017/s0031182000051295](https://doi.org/10.1017/s0031182000051295)
- Rose, M.E., Hesketh, P., (1979). Immunity to coccidiosis: T-lymphocyte- or B-lymphocyte-deficient animals. *Infect. Immun.* 26(2), 630–637. doi: [10.1128/iai.26.2.630-637.1979](https://doi.org/10.1128/iai.26.2.630-637.1979)
- Rose, M.E., Hesketh, P., (1982). Immunity to coccidia in chickens: adoptive transfer with peripheral blood lymphocytes and spleen cells. *Parasitol. Immunol.* 4(3), 171–185. doi: [10.1111/j.1365-3024.1982.tb00429.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1982.tb00429.x)
- Rose, M.E., Mockett, A.P.A., (1983). Antibodies to coccidia: detection by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Parasite. Immunol.* 5(5), 479–489. doi: [10.1111/j.1365-3024.1983.tb00762.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1983.tb00762.x)
- Rose, M.E., Peppard, J.V., Hobbs, S.M., (1984). Coccidiosis: characterization of antibody responses to infection with *Eimeria nieschlzi*. *Parasite Immunol.* 6(1), 1–12. doi: [10.1111/j.1365-3024.1984.tb00777.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1984.tb00777.x)
- Rose, M.E., (1987). Immunity to *Eimeria* infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 17(1-4), 333–343. doi: [10.1016/0165-2427\(87\)90152-8](https://doi.org/10.1016/0165-2427(87)90152-8)
- Rose, M.E., Hesketh, P., (1987). *Eimeria tenella*: effects of immunity on sporozoites within the lumen of the small intestine. *Exp. Parasitol.* 63(3), 331–344. doi:

[10.1016/0014-4894\(87\)90181.0](https://doi.org/10.1016/0014-4894(87)90181.0)

- Rose, M.E., Smith, A.L. Wakelin, D., 1991. Gamma Interferon-mediated inhibition of *Eimeria verniformis* growth in cultured fibroblast and epithelial cells. *Infect. Immun.* 59(2), 580–586. doi: [10.1128/iai.59.2.580-586.1991](https://doi.org/10.1128/iai.59.2.580-586.1991)
- Rose, M.E., Millard, B., Hesketh, P., (1992). Intestinal changes associated with expression of immunity to challenge with *Eimeria vermiformis*. *Infec. Immun.* 60(12), 5283–5290. doi: [10.1128/iai.60.12.5283-5290.1992](https://doi.org/10.1128/iai.60.12.5283-5290.1992)
- Sambrook, J., Russell, D.W., (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (3rd ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. U.S.A.
- Sasai, K., Lillehoj, H.S., Matsuda, H., Wergin, W.P., (1996). Characterization of a chicken monoclonal antibody that recognizes the apical complex of *Eimeria acervulina* sporozoites and partially inhibits sporozoite invasion of CD8+ T lymphocytes *in vitro*. *J. Parasitol.* 82(1), 82–87. PMdi: 8627507. <https://doi.org/10.2307/3284120>
- Sasai, K., Fetterer, R.H., Lillehoj, H., Matusra, S., Constantinoiu, C.C., Matsubayashi, M., Tani, H., Baba, e., (2008). Characterization of monoclonal antibodies that recognize the *Eimeria tenella* microneme protein MIC2. *J. Parasitol.* 94(6), 1432–1434. doi: [10.1645/GE-1558.1](https://doi.org/10.1645/GE-1558.1)
- Sakkas, P., Oikeh, I., Blake, D.P., Nolan, M.J., Bailey, R.A., Oxley, A., Rychlik, I., Lietz, G., Kyriazakis, I., (2018). Does selection for growth rate in broilers affect their resistance and tolerance to *Eimeria maxima*?. *Vet. Parasitol.* 258, 88–98. doi: doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.06.014
- Sathish, K., Sriraman, R., Suramanian, B.M., Rao, N.H., Kasa, B., Donikeni, J., Narasu, M.L. Srinivasan, V.A., (2012). Plant expressed coccidial antigens as potential vaccine candidates in protecting chicken against coccidiosis. *Vaccine.* 30, 4460–4464. doi: [10.1016/j.vaccine.2012.04.076](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.076)
- Sette, A., Fikes, J., (2003). Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery. *Curr. Opin. Immunol.* 15(4), 461–470. doi: [10.1016/s0952-7915\(03\)00083-9](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(03)00083-9)
- Shah, A.A.M., Yan R., Xu, L., Song, X., Li, X., (2010). A recombinant DNA vaccine encoding *Eimeria acervulina* cSZ-2 induces immunity against experimental *E. tenella* infection. *Vet. Parasitol.* 169(1–2), 185–189. doi: [10.1016/j.vetpar.2009.12.035](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.035)
- Sharman, P.A., Smith, N.C., Wallach, M.G., Katrib, M., (2010). Chasing the golden egg: vaccination against poultry coccidiosis. *Parasite, Immunol.* 32, 590–598. doi: [10.1017/s0031182000047144](https://doi.org/10.1017/s0031182000047144)

- Shirley, M.W., (1975). Enzyme variation in *Eimeria* species of the chicken. *Parasitol.* 71(03), 369–376. doi: [10.1017/s0031182000047144](https://doi.org/10.1017/s0031182000047144)
- Shirley, M.W., (1995). *Eimeria* species and strains of chickens. In: Eckert, J., Braun, R., Shirley, M.W., Coudert, P. (Eds.), *Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research*. European Commission, pp. 1–25.
- Shirley, M.W., Bedrník, P., (1997). Live attenuated vaccines against avian coccidiosis: Success with precocious and egg-adapted lines of *Eimeria*. *Parasitol. Today.* 13(12), 481–487. doi: [10.1016/s0169-4758\(97\)01153-8](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(97)01153-8)
- Shirley, M.W., Smith, A.L., Tomley, F.M., (2005). The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. *Adv. Parasitol.* 60, 285–330. doi: [10.1016/S0065-308X\(05\)60005-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)60005-X)
- Shirley, M.W., Smith, A.L., Blake, D.P., (2007). Challenges in the successful control of avian coccidia. *Vaccine.* 25(30), 5540–5547. doi: [10.1016/j.vaccine.2006.12.030](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.12.030)
- Shirley, M.W., Millard, B.J., (2007). Studies on the immunogenicity of seven attenuated lines of *Eimeria* given as a mixture to chickens. *Avian. Pathol.* 15(4), 629–638. doi: [10.1080/03079458608436326](https://doi.org/10.1080/03079458608436326)
- Shirley, M.W., Lillehoj, H.S., (2012). The long view: a selective review of 40 years of coccidiosis research. *Avian. Pathol.* 41(2), 111–121. doi: [10.1080/03079457.2012.666338](https://doi.org/10.1080/03079457.2012.666338)
- Shi W., Liu, Q., Zhang, J., Sun, J., Jiang, X., Geng, J., Wang, F., Xiao, Y., Li, H., Zhao, X., (2014). Co-expression of EtMic2 protein and chicken interleukin-18 for DNA vaccine against chicken coccidiosis. *Res. Vet. Sci.* 97(1), 64–70. doi: [10.1016/j.rvsc.2014.05.001](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.05.001)
- Shivaramaiah, S., Barta, J.R., Layton, S.L., Lester, C., Kwon, Y.M., Berghman, L.R., Hargis, B.M. Tellez, I.G., (2010). Development and evaluation of an $\Delta aroA/\Delta htrA$ *Salmonella enteritidis* vector expressing *Eimeria maxima* TRAP family protein EmTFP250 with CD 154 (CD 40L) as candidate vaccines against coccidiosis in broilers. *Int. J. Poult. Sci.* 9 (11), 1031–1037.
- Song, K.D., Lillehoj, H.S., Choi, K.D., Yun, C.H., Parcels, M.S., Huynh, J.T., Han J.Y., (2001). A DNA vaccine encoding a conserved *Eimeria* protein induces protective immunity against live *Eimeria acervulina* challenge. *Vaccine.* 19(2–3), 243–252. doi: [10.1016/s0264-410x\(00\)00169-9](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(00)00169-9)
- Song, X., Xu, L., Yan, R., Huang, X., Li, X., (2015). Construction of *Eimeria tenella* multi-epitope DNA vaccine and their protective efficacies against experimental infection. *Vet. Immunol. Immunopathol* 166(3–4), 79–87. doi: [10.1016/j.vetimm.2015.05.005](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.05.005)

- Song, A., Zhao, X., Xu, L., Yan, R., Li, X., (2017). Immune protection duration and efficacy stability of DNA vaccine encoding *Eimeria tenella* TA4 and chicken IL-2 against coccidiosis. Res. Vet. Sci. 111, 31–35. doi: [0.1016/j.rvsc.2016.11.012](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.11.012)
- Song, X., Yang, X., Zhang, T., Liu, J., Liu, Q., (2020). A novel rhoptry protein as candidate vaccine against *Eimeria tenella* infection. Vaccines. 12;8(3), 452. doi: [10.3390/vaccines8030452](https://doi.org/10.3390/vaccines8030452)
- Song, X., Yang, X., Zhang, T., Liu, J., Liu, Q., (2021). Evaluation of 4 merozoite antigens as candidate vaccines against *Eimeria tenella* infection. Poult. Sci. 100(3), 100888. doi: [10.1016/j.psj.2020.12.001](https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.12.001)
- Soutter, F., Werling, D., Tomley, F. M., Blake, D. P., (2020). Poultry coccidiosis: Design and interpretation of vaccine studies. Front. Vet. Sci. 7, 101. doi: [10.3389/fvets.2020.00101](https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00101)
- Soutter, F., Werling, D., Kim, S., Pastor-Fernández, I., Marugán-Hernández, V., Tomley, F.M., Blake, D.P., (2021). Impact of *Eimeria tenella* oocyst dose on parasite replication, lesion score and cytokine transcription in the caeca in three breeds of commercial layer chickens. Front. Vet. Sci. 8, 640041. doi: [10.3389/fvets.2021.640041](https://doi.org/10.3389/fvets.2021.640041)
- Smith, G.P., (1985). Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science. 228(4705), 1315–1317. doi: [10.1126/science.4001944](https://doi.org/10.1126/science.4001944)
- Smith, N.C., Bucklar, H., Muggli, E., Hoop, R.K., Gottstein, B., Eckert, J. (1993). Use of IgG- and IgM-specific ELISAs for the assessment of exposure status of chickens to *Eimeria* species. Vet. Parasitol. 51, 13–25. doi: [10.1016/0304-4017\(93\)90191-o](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90191-o)
- Smith, N.C., Wallach, M., Petracca, M., Braun, R., Eckert, J., (1994). Maternal transfer of antibodies induced by infection with *Eimeria maxima* partially protects chickens against challenge with *Eimeria tenella*. Parasitology 109(Pt 5), 551-557. doi: [10.1017/s0031182000076423](https://doi.org/10.1017/s0031182000076423)
- Smith, A.L., Hesketh, P., Archer, A., Shirley, M.W., (2002). Antigenic diversity in *Eimeria maxima* and the influence of host genetics and immunization schedule on cross-protective immunity. Infect Immunity 70(5), 2472–2479. doi: [10.1128/IAI.70.5.2472-2479.2002](https://doi.org/10.1128/IAI.70.5.2472-2479.2002)
- Snyder, R. P. Guerin, M. T. Hargis, B. M. Page, G. Barta J. R., (2021). Monitoring coccidia in commercial broiler chicken flocks in Ontario: comparing oocyst cycling patterns in flocks using anticoccidial medications or live vaccination. Poult. Sci. 100, 110–118. doi: [10.1016/j.psj.2020.09.072](https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.072)
- Su, S., Miska, K.B., Fetterer, R.H., Jenkins, M.C., Wong, E.A., (2014). Expression of digestive enzymes and nutrient transporters in *Eimeria acervulina*-challenged layers and

- broilers. Poultry Sci. 93(5), 1217–1226. doi: [10.3382/ps.2013-03807](https://doi.org/10.3382/ps.2013-03807)
- Subramanian, B.M., Sriraman, R., Rao, N.H., Raghul, J., Thiagarajan, D., Srinivasan, V.A., (2008). Cloning, expression and evaluation of the efficacy of a recombinant *Eimeria tenella* sporozoite antigen in birds. Vaccine. 26(27–28), 3489–3496. doi: [10.1016/j.vaccine.2008.04.024](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.04.024)
 - Sun, H., Wang, L., Wang, T., Zhang, J., Liu, Q., Chen, P., Chen, Z., Wang, F., Li, H., Xiao, Y., et al., (2014). Display of *Eimeria tenella* EtMic2 protein on the surface of *Saccharomyces cerevisiae* as a potential oral vaccine against chicken coccidiosis. Vaccine. 32(16), 1869–1876. doi: [10.1016/j.vaccine.2014.01.068](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.01.068)
 - Suprihati, E., Yunus, M., (2018). Evaluation of the antigenicity and immunogenicity of *Eimeria tenella* by reproductive index and histopathological changes of cecal coccidiosis virulent live vaccine in broiler chickens. Afr. J. Infect. Dis. 12(1Suppl), 104–110. doi: [10.2101/Ajid.12v1S.15](https://doi.org/10.2101/Ajid.12v1S.15)
 - Stephan, B., Rommel, M., Daughies, A., Haberkorn, A., (1997). Studies of resistance to anticoccidials in *Eimeria* field isolates and pure *Eimeria* strains. Vet. Parasitol. 69(1–2), 19–29. doi: [10.1016/s0304-4017\(96\)01096-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(96)01096-5)
 - Stiff, M.I., Bafundo, K.W., (1993). Development of immunity in broilers continuously exposed to *Eimeria* sp. Avian. Dis, 37(2), 295–301. PMID: 8363495. <https://doi.org/10.2307/1591652>
 - Stober, C.B., Lange, U.G., Roberts, M.T., Gilmartin, B., Francis, R., Almeida, R., Peacock, C.S., McCann, S., Blackwell, J.M., (2006). From genome to vaccines for Leishmaniasis: Screening 100 novel vaccine candidates against murine *Leishmania major* infection. Vaccine. 24(14), 2602–2616. doi: [10.1016/j.vaccine.2005.12.012](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.12.012)
 - Tabarés, E., Ferguson, D., Clark, J., Soon, P.E., Wan, K.L., Tomley, F., (2004). *Eimeria tenella* sporozoites and merozoites differentially express glycosylphosphatidylinositol-anchored variant surface proteins. Mol. Bioch. Parasitol. 135(1), 123–132. doi: [10.1016/j.molbiopara.2004.01.013](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.01.013)
 - Tian, L., Li, W., Huang, X., Tian, D., Liu, J., Yang, X., Liu, L., Yan, R., Xu, L., Li, X., Song, X., (2017). Protective efficacy of coccidial common antigen glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) against challenge with three *Eimeria* species. Front. Microbiol. 8, 1245. doi: [10.3389/fmicb.2017.01245](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01245)
 - Talaat, A.M., Stemke-Hale, K., (2005). Expression library immunization: a road map for discovery of vaccines against infectious diseases. Infect. Immun. 73(11), 7089. doi: [10.1128/IAI.73.11.7089-7098.2005](https://doi.org/10.1128/IAI.73.11.7089-7098.2005)

- Talebi, A., Mulcahy, G., (1994). High-resolution mapping of B-cell epitopes within an antigenic sequence from *Eimeria tenella*. *Infect. Immun.* 62(10), 4202–4207. doi: [10.1128/iai.62.10.4202-4207.1994](https://doi.org/10.1128/iai.62.10.4202-4207.1994)
- Talebi, A., (1995). Protein profiles of five avian *Eimeria* species. *Avian. Pathol.* 24(4), 731–735. doi: [10.1080/03079459508419112](https://doi.org/10.1080/03079459508419112)
- Talebi, A., Mulcahy, G., (1995). Cross-reactivity among antisera raised against five avian *Eimeria* species in the natural host and in rabbits. *Avian. Pathol.* 24(3), 533–544. doi: [10.1080/03079459508419092](https://doi.org/10.1080/03079459508419092)
- Talebi, A., (2001). Inhibition of *Eimeria acervulina* sporozoites invasion by rabbit and chicken antisera using ISI assay. *Arch. Razi. Inst.* 52, 49–59. <https://www.sid.ir/en/Journal/ViewPaper.aspx?ID=31283>
- Talebi, A., Mulcahy, G., (2006). *Eimeria tenella*: B-cell epitope mapping following primary and secondary infections. *Exp. Parasitol.* 113(4), 235–238. doi: [10.1016/j.exppara.2006.01.005](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.01.005)
- Tang, D.C., DeVit, M., Johnston, S.A., (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 356(6365), 152–154. doi: [10.1038/356152a0](https://doi.org/10.1038/356152a0)
- Tang, L.F., Yi, X.Y., Zeng, X.F., Wang, L.Q., Zhang, S.K., (2004). *Schistosoma japonicum*: Isolation and identification of peptides mimicking ferritin epitopes from *Phage display* library. *Abta. Biochim. Biophys. Sin.* 36(3), 206–210. doi: [10.1093/abbs/36.3.206](https://doi.org/10.1093/abbs/36.3.206)
- Tang, X., Suo, J., Li, C., Du, M., Wang, C., Hu, D., Duan, C., Lyu, Y., Liu, X., Suo, X., (2018). Transgenic *Eimeria tenella* expressing profilin of *Eimeria maxima* elicits enhanced protective immunity and alters gut microbiome of chickens. *Infect Immun* 86:e00888–17. doi: [10.1128/IAI.00888-17](https://doi.org/10.1128/IAI.00888-17).
- Tang, X., Liu, X., Suo, X., (2020). Towards innovative design and application of recombinant *Eimeria* as a vaccine vector. *Infect. Immun.* 88(5), e00861–19. doi: [10.1128/IAI.00861-19](https://doi.org/10.1128/IAI.00861-19)
- Tennyson, S.A., Barta, J.R., (2000). Localization and immunogenicity of a low molecular weight antigen of *Eimeria tenella*. *Parasitol. Res.* 86(6), 453–460. doi: [10.1007/s004360050693](https://doi.org/10.1007/s004360050693)
- Tomley, F., (1994a). Antigenic diversity of the asexual developmental stages of *Eimeria tenella*. *Parasite. Immunol.* 16(8), 407–413. doi: [10.1111/j.1365-3024.1994.tb00368.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1994.tb00368.x)
- Tomley, F.M., (1994b). Characterization of rhoptry proteins of *Eimeria tenella* sporozoites: antigenic diversity of rhoptry epitopes within species of the genus *Eimeria* and among three asexual generations of a single species, *E. tenella*. *Infect. Immun.* 62(10), 4656–4658. doi: [10.1128/iai.62.10.4656-4658.1994](https://doi.org/10.1128/iai.62.10.4656-4658.1994)

- Tomley, F., (1997). Techniques for isolation and characterization of apical organelles from *Eimeria tenella* sporozoites. *Methods: A Comp. Methods. Enzymol.* 13(2), 171–176. doi: [10.1006/meth.1997.0509](https://doi.org/10.1006/meth.1997.0509)
- Tonelli, R.R., Colli, W., Alves, M.J.M., (2013). Selection of binding target in parasites using phage-display and aptamer libraries *in vivo* and *in vitro*. *Front. Immunol.* 3, 419. doi: [10.3389/fimmu.2012.00419](https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00419)
- Tonkin, M.L., Roques, M., Lamarque, M.H., Pugnère, M., Douguet, D., Crawford, J., Lebrun, M., Boulanger, M.J., (2011). Host cell invasion by apicomplexan parasites: insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide. *Science.* 333(6041), 463–467. doi: [10.1126/science.1204988](https://doi.org/10.1126/science.1204988)
- Torres-Abosta, M., González-Mora, A., Ruiz-Ruiz, F., Rito-Palomares, M., Benavides, J., (2020). Economic evaluation of M13 bacteriophage production at large-scale for therapeutic applications using aqueous two-phase systems. *J. Chem. Tech. Biotech.* 95(11), 2822–2833. doi: [10.1002/jctb.6526](https://doi.org/10.1002/jctb.6526)
- Tsubokura, K., Berndtson, E., Bogstedt, A., Kaijser, B., Kim, M., Ozeki, M., Hammarström, L., (1997). Oral administration of antibodies as prophylaxis and therapy in *Campylobacter jejuni* infected chickens. *Clin. Exp. Immunol.* 108(3):451–455. doi: [10.1046/j.1365-2249.1997.3901288.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1997.3901288.x)
- Turunen L., Takkinen K., Söderlund, H., Pulli, T., (2009). Automated panning and screening procedure on microplates for antibody generation from *Phage display* libraries. *J Biomol Screen.* 14(3), 282–293. doi: [10.1177/1087057108330113](https://doi.org/10.1177/1087057108330113)
- Trout, J.M., Lillehoj, H.S., (1993). Evidence of a role for intestinal CD8+ lymphocytes and macrophages in transport of *Eimeria acervulina* sporozoites. *J. Parasitol.* 79(5), 790–792. doi: [10.2307/3283625](https://doi.org/10.2307/3283625)
- Trout, J.M., Lillehoj, H.S., (1995). *Eimeria acervulina* infection: evidence for the involvement of CD8+ T lymphocytes in sporozoite transport and host protection. *Poult. Sci.* 74(7), 1117–1125. doi: [10.3382/ps.0741117](https://doi.org/10.3382/ps.0741117)
- UNA. Compendio de indicadores económicos del sector avícola. Unión Nacional de Avicultores. Cd. México. 2021. 221 pp.
- Vandeputte, J., Martel, A., Canessa, S., Van Rysselberghe, N., De Zutter, L., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F., Pasmans, F., Garmyn, A., (2019). Reducing *Campylobacter jejuni* colonization in broiler chickens by in-feed supplementation with hyperimmune egg yolk antibodies. *Sci. Rep.* 9(1), 8931. doi: [10.1038/s41598-019-45380-z](https://doi.org/10.1038/s41598-019-45380-z)

- Venkatas, J., Adeleke, M.A., (2019). A review of *Eimeria* antigen identification for the development of novel anticoccidial vaccines. *Parasitol. Res.* 118(6), 1701–1710. doi: [10.1007/s00436-019-06338-2](https://doi.org/10.1007/s00436-019-06338-2)
- Villa-Mancera, A., Quiroz-Romero, H., Correa, D., Ibarra, F., Reyes-Pérez, H., Reyes-Vivas, H. López-Velázquez, G., Gazarian, K., Gazarian, T. Alonso, R.A., (2008). Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a *Phage display* library. *Parasitology* 135(12), 1437–1445. doi: [10.1017/S003118200800471X](https://doi.org/10.1017/S003118200800471X)
- Villa-Mancera, A., Quiroz-Romero, H., Correa, D., Alonso, R.A., (2011). Proteolytic activity in *Fasciola hepatica* is reduced by the administration of cathepsin L mimotopes. *J. Helminthol.* 85(1), 51–55. doi: [10.1017/S0022149X1000026X](https://doi.org/10.1017/S0022149X1000026X)
- Visco, R., Burns, W., (1972a). *Eimeria tenella* in bacteria-free and conventionalized chicks. *J. Parasitol.* 58(2), 323–331. doi:[10.2307/3278096](https://doi.org/10.2307/3278096)
- Visco, R., Burns, W., (1972b). *Eimeria tenella* in monoflora and diflora chicks. *J. Parasitol.* 58(3), 576–585. doi:[10.2307/3278208](https://doi.org/10.2307/3278208)
- Wagenbach, G.E., (1969). Purification of *Eimeria tenella* sporozoites with glass bead columns. *J. Parasitol.* 55: 833–838. doi: [10.2307/3277226](https://doi.org/10.2307/3277226)
- Wan, K.L., Chong, S.P., Ng, S.T. Shirley, M.N., Tomley, F.M., Jangi, M.S., (1999). A survey of genes in *Eimeria tenella* merozoites by EST sequencing. *Int. J. Pasitol.* 12, 1885–1892. doi: [10.1016/s0020-7519\(99\)00160-5](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00160-5)
- Wang, H., Gao, Y., Gong, Y., Chen, X., Liu, C., Zhou, X., Blackall, P.J., Zhang, P., Yang, H., (2007). Identification and immunogenicity of an immunodominant mimotope of *Avibacterium paragallinarum* from a *Phage display* peptide library. *Vet. Microbiol.* 119: (2–4), 231–239. doi: [10.1016/j.vetmic.2006.08.034](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.08.034)
- Wang, Q., Zhao, Q., Zhu, S., Huang, B., Yu, S., Liang., Wang, H., Zhao, H., Han, H., Dong., (2020). Further investigation of the characteristics and biological function of *Eimeria tenella* apical membrane antigen 1. *Parasite.* 27, 70. doi: [10.1051/parasite/2020068](https://doi.org/10.1051/parasite/2020068)
- Wallach, M., Pillemer, G., Yarus, S., Halabi, A., Pugatsch, T., Mencher, D., (1990). Passive immunization of chickens against *Eimeria maxima* infection with a monoclonal antibody developed against a gametocyte antigen. *Infect. Immun.* 58(2), 557–562. doi: [10.1128/iai.58.2.557-562.1990](https://doi.org/10.1128/iai.58.2.557-562.1990)
- Wallach, M., Smith, N.C., Petracca, M., Miller, C.M., Eckert, J., Braun, R., (1995). *Eimeria maxima* gametocyte antigens: potential use in a subunit maternal vaccine against coccidiosis in chickens. *Vaccine* 13, 347–354. doi: [10.1128/iai.58.2.557-562.1990](https://doi.org/10.1128/iai.58.2.557-562.1990)

- Wallach, M., (1997). The importance of transmission-blocking immunity in the control of infections by apicomplexan parasites. *Int. J. Parasitol.* 27(10),1159–1167. doi: [10.1016/s0020-7519\(97\)00113-6](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(97)00113-6)
- Wallach, M., Ashash, U., Michael, A., Smith, N.C., (2008). Field application of a subunit vaccine against an enteric protozoan disease. *Clin. Trial. PLoS One.* 3(12), e3948.. doi: [10.1371/journal.pone.0003948](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003948)
- Wallach, M., (2010). Role of antibody in immunity and control of chicken coccidiosis. *Trends. Parasitol.* 26(8), 382–387. doi: [10.1016/j.pt.2010.04.004](https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.04.004)
- Wiedmer, S., Alnassan, A. A., Volke, B., Thabet, A., Dausgchies, A., Lendner, M., Kurth, M., (2017). Passive immunization with *Eimeria tenella* gametocyte antigen 56 (EtGam56) specific antibodies and active immunization trial with the epitope containing peptide. *Vet. Parasitol.* 247:100–107. doi: [10.1016/j.vetpar.2017.09.019](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.09.019)
- Wisher, M.H., (1986). Identification of the sporozoite antigens of *Eimeria tenella*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21(1), 7–15. doi: [10.1016/0166-6851\(86\)90073-3](https://doi.org/10.1016/0166-6851(86)90073-3)
- Willadsen, P., (2008). Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope?. *Trends. Parasitol.* 24(4), 164–167. doi: [10.1016/j.pt.2008.01.005](https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.01.005)
- Williams, R.B., (1973). Effects of different infection rates on the oocysts production of *Eimeria acervulina* or *Eimeria tenella* in the chicken. *Parasitology.* 67(3), 279–288. doi: [10.1017/s0031182000046515](https://doi.org/10.1017/s0031182000046515)
- Williams, R.B., (1995). Epidemiological studies of coccidiosis in the domesticated fowl (*Gallus gallus*): IV. Reciprocity between the immune status of floor-reared chickens and their excretion of oocysts. *Appl. Parasitol.* 36(4), 290–298. PMID: 20821864
- Williams, R.B., (1998). Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. *Intern. J. Parasitol.* 28(7), 1089–1098. doi: [10.1016/s0020-7519\(98\)00066-6](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00066-6)
- Williams, R.B., (1999). A compartmentalized model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *Intern. J. Parasitol.* 29(8), 1209–1229. doi: [10.1016/s0020-7519\(99\)00086-7](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00086-7)
- Williams, R.B., (2001). Quantification of crowding effect during infection with the seven *Eimeria* species of the domesticated fowls: its importance for the experimental designs and the production of oocyst stocks. *Inter. J. Parasitol.* 31(10), 1056–1069. doi: [10.1016/s0020-7519\(01\)00235-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00235-1)
- Williams, R.B., (2002a). Anticoccidial vaccines for broilers: pathways to success. *Avian. Pathol.* 31(4), 317–353. doi: [10.1080/03079450220148988](https://doi.org/10.1080/03079450220148988)

- Williams R., (2002b). Fifty years of anticoccidial vaccines for poultry (1952–2002). *Avian Dis.* 46(4), 775–802. doi: [10.1637/0005-2086\(2002\)046\[0775:FYOAVF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0775:FYOAVF]2.0.CO;2)
- Witcombe, D.W., Ferguson, D.J.P., Belli, S.I., Wallach, M.G., Smith, N.C., (2004). *Eimeria maxima* TRAP family protein EmTFP250: subcellular localisation and induction of immune responses by immunization with a recombinant C-terminal derivative. *Int. J. Parasitol.* 34(7), 861–872. doi: [10.1016/j.ijpara.2004.03.006](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.03.006)
- Whitlock, G.C, Robida, M.D., Judy, B.M. Qazy, O., Brown, K.A., Deeraksa, A., Taylor, K., Massey, S., Loskutov, A., Borovkov, A.Y., et al., (2011). Protective antigens against glanders identified by expression library immunization. *Front. Microbiol.* 21(2), 227. doi: [10.3389/fmicb.2011.00227](https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00227)
- Wu, S.Q., Wang, M., Liu, Q., Zhu, Y.J., Suo, X., Jiang, J.S., (2004). Construction of DNA vaccines and their induced protective immunity against experimental *Eimeria tenella* infection. *Parasitol. Res.* 94(5), 332–336. doi: [10.1007/s00436-004-1185-6](https://doi.org/10.1007/s00436-004-1185-6)
- Xie, M.Q., Gilbert, J.M. Fuller, A.L., McDougald, L.R., (1990). A new method for purification of *Eimeria tenella* merozoites. *Parasitol. Res.* 76(6), 566–569. doi: [10.1007/BF00932562](https://doi.org/10.1007/BF00932562)
- Xu, Q., Song, X., Xu, L., Yan, R., Shah, M.A., Li, X., (2008). Vaccination of chickens with a chimeric DNA vaccine encoding *Eimeria tenella* TA4 and chicken IL-2 induces protective immunity against coccidiosis. *Vet. Parasitol.* 156(3–4), 319–323. doi: [10.1016/j.vetpar.2008.05.025](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.05.025)
- Xu, Y., Li, X., Jin, L., Zhen, Y., Lu, Y., Li, S., You, J., Wang, L., (2011). Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: A review. *Biotechnol. Adv.* 29(6), 860–868. doi: [10.1016/j.biotechadv.2011.07.003](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.003)
- Xu, J.J., Ren, C.Z., Wang, S.S., Liu, D.D., Cao, L.Q., Tao, J.P., (2013a). Protection efficacy of multivalent egg yolk immunoglobulin against *Eimeria tenella* infection in chickens. *Iran. J. Parasitol*, 8, 449–458. PMID: 24454440.
- Xu, J., Zhang, Y., Tao, J., (2013b). Efficacy of a DNA vaccine carrying *Eimeria maxima* Gam56 antigen gene against coccidiosis in chickens. *Korean. J. Parasitol.* 51(2), 147–154. doi: [10.3347/kjp.2013.51.2.147](https://doi.org/10.3347/kjp.2013.51.2.147)
- Yin, G., Qin, M., Liu, X., Suo, J., Tang, X., Tao, G., Han, Q., Suo, X., Wu, W., (2013). An *Eimeria* vaccine candidate based on *Eimeria tenella* immune mapped protein 1 and the TLR-5 agonist *Salmonella typhimurium* FlhC flagellin. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 440, 437–442. doi: [10.1016/j.bbrc.2013.09.088](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.09.088)

- Yang, X., Li, M., Liu, J., Ji, Y., Xu, L., Yan, R., Song, X., (2017). Identification of immune protective genes of *Eimeria maxima* through cDNA expression library screening. Parasit. Vectors. 10, 85. doi: [10.1186/s13071-017-2029-4](https://doi.org/10.1186/s13071-017-2029-4)
- You, M.J., (2014). Effects of different sizes of glass beads on the release of sporocysts from *Eimeria tenella* oocysts. Korean. J. Parasitol. 52(3), 317–319. doi: [10.3347/kjp.2014.52.3.317](https://doi.org/10.3347/kjp.2014.52.3.317)
- Yun, C.H., Lillehoj, H.S., Lillehoj, E.P., (2000). Intestinal immune responses to coccidiosis. Dev. Comp. Immunol. 24, 303–324. doi: [10.1016/s0145-305x\(99\)00080-4](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(99)00080-4)
- Zimmermann, J., Saalbach, I., Jahn, D., Giersberg, M., Haehnel, S., Wedel, J., Macek, J., Zoufal, K., Glünder, G., Falkenburg, D., et al. (2009). Antibody expressing pea seeds as fodder for prevention of gastrointestinal parasitic infections in chickens. BMC. Biotechnol. 9, 79. doi: [10.1186/1472-6750-9-79](https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-79)
- Ziomko, R., Karamon, J., Cencek, T., Gornowicz, E., Skoracki, A., Ashash, U., (2005). Prevention of broiler chick coccidiosis using the inactivated subunit vaccine CoxAbic. Bull. Vet. Inst. Pulawy. 49. 299–302. http://www.piwet.pulawy.pl/doc/biuletyn_49-3/08_ziomko.pdf
- Zhai, Q., Huang, B., Dong, H., Zhao, Q., Zhu, S., Liang, S., Li, S., Yang, S., Han, H., (2016). Molecular characterization and immune protection of a new conserved hypothetical protein of *Eimeria tenella*. PLoS. One. 11(6):e0157678. doi: [10.1371/journal.pone.0157678](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157678)
- Zhang, S., Lillehoj, H.S., Ruff, M.D., (1995). Chicken tumor necrosis-like factor. I. *In vitro* production by macrophages stimulated with *Eimeria tenella* or bacterial lipopolysaccharide. Poult. Sci. 74, 1304–1310. doi: [10.3382/ps.0741304](https://doi.org/10.3382/ps.0741304)
- Zhang, L., Ma, L., Liu, R. Zhang, Y., Zhang, S., Hu, C. Song, M., Cai, J., Wang, M., (2012). *Eimeria tenella* heat shock protein 70 enhances protection of recombinant microneme protein MIC2 subunit antigen vaccination against *E. tenella* challenge. Vet. Parasitol. 188(3–4), 239–246. doi: [10.1016/j.vetpar.2012.03.025](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.025)
- Zhang, Z., Huang, J., Liu, L., Lu, M., Sui, Y., Xu, L., Yan, R., Song, X., Li, X., (2015). Proteomic analysis of *Eimeria acervulina* sporozoite proteins interaction with duodenal epithelial cells by shotgun LC–MS/MS. Mol. Biochem. Parasitol. 202(2), 29–33. doi: [10.1016/j.molbiopara.2015.09.006](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.09.006)
- Zhang, Z.C., Liu, I.R. Huang, J.W., Wang, S., Lu, M.M., Song, X.K., Xu, L.X., Yan, R.F., Li, X.R., (2016). The molecular characterization and immune protection of microneme 2 of *Eimeria acervulina*. Vet. Parasitol. 15, 96–105. doi: [10.1016/j.vetpar.2015.10.028](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.10.028)
- Zhang, Z., Wang, S., Li, C., Liu, L., (2017). Immunoproteomic analysis of the protein repertoire of unsporulated *Eimeria tenella* oocysts. Parasite. 24, 48. doi: [10.1051/parasite/2017047](https://doi.org/10.1051/parasite/2017047)

- Zhang, Z., Zhou, Z., Huang, J., Sun, X., Haseeb, M., Ahmed, S., Shah, M.A.A., Yan, R., Song, X., Xu, L., et al., (2020). Molecular characterization of a potential receptor of *Eimeria acervulina* microneme protein 3 from chicken duodenal epithelial cells. *Parasite*. 27, 18. doi: [10.1051/parasite/2020014](https://doi.org/10.1051/parasite/2020014)
- Zhao, Y., Amer, S., Wang, J., Wang, C., Gao, Y., Kang, G., Bao, Y., He, H., Qin, J., (2010). Construction, screening and identification of a *Phage display* antibody library against the *Eimeria acervulina* merozoite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393(4), 703–707. doi: [10.1016/j.bbrc.2010.02.063](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.063)
- Zhao, P., Li, Zhou, Y., Zhao, J., Fang, R., (2020). *In vivo* immunoprotective comparison between recombinant protein and DNA vaccine of *Eimeria tenella* surface antigen 4. *Vet. Parasitol.* 278, 109032. doi: [10.1016/j.vetpar.2020.109032](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109032)
- Zhao, P., Wang, C., Ding, J., Zhao, C., Xia, Y., Hu, Y., Zhang, L., Zhou, Y., Zhao, J., Fang, R., (2021a). Evaluation of immunoprotective effects of recombinant protein and DNA vaccine based on *Eimeria tenella* surface antigen 16 and 22 *in vivo*. *Parasitol. Res.* 1-11. doi: [10.1007/s00436-021-07105-y](https://doi.org/10.1007/s00436-021-07105-y)
- Zhao, H., Zhu, S., Zhao, Q., Huang, B., Liu, G., Li, Z., Wang, L., Dong, H., Han, H., (2021b). Molecular characterization and protective efficacy of a new conserved hypothetical protein of *Eimeria tenella*. *Parasite*. 28, 40. doi: [10.1051/parasite/2021037](https://doi.org/10.1051/parasite/2021037)
- Zhou, B.H., Jia, L.S., Wei, S.S., Ding, H.Y., Yang, J.Y., Wang, H.W., (2020). Effects of *Eimeria tenella* on the barrier damage and microbiota diversity of chicken cecum. *Poult. Sci.* 99(3), 1297–1305. doi: [10.1016/j.psj.2019.10.073](https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.073)

6.0 ANEXOS

6.1 ANEXO 1.- Protocolo de limpieza de los ooquistes de *E. tenella*

1.- Los oocistos provenientes de la esporulación y suspendidos en $\text{Cr}_2\text{K}_2\text{O}_7$ al 2.5% se centrifugan a 2000 rpm 10' a 4°C, se descarta la porción superior de $\text{Cr}_2\text{K}_2\text{O}_7$.

2.- Se añade al *pellet* de ooquistes cloro (Cl) comercial al 6% (c.b.p. 40 mL en tubo FALCON de 50 mL), se mezcla con vortex y se deja reposar la mezcla en hielo frappe de 20 a 30 minutos, la mezcla debe agitarse continuamente cada 5 minutos y se vuelve a colocar en hielo. Después de 10 minutos el color de la mezcla de ooquistes y el Cl se debe volver ligeramente de color verde.

3.- Los lavados varían de acuerdo con el tipo de *Eimeria* sp., de la cual se trate el procedimiento, en el presente caso como se trata de *E. tenella* se sigue el protocolo específico para esta especie.

a) Al tener el cultivo con cloro se emplean tubos CLP™ de 50 mL (centrifuga), se transfiere el cultivo clorado a este tipo de tubo añadiendo una delgada capa de H_2O destilada estéril (dH_2O) en la parte superior (1 mL), se centrifuga a 2000 rpm 10' a 4°C con frenado lento del rotor.

b) Los ooquistes formarán una capa blanquecina en la parte acuosa superior de la fracción, esta se debe transferir a un tubo limpio (De acuerdo a cuantos ooquistes se requieran, se puede tomar toda la fracción de la solución con cloro, se debe notar, que la mayoría de los ooquistes se encuentran en la parte superior de la fracción acuosa).

4.- En tubos cónicos para centrifuga, los ooquistes con Cl se diluyen con H_2O destilada estéril (Diluir 1 vol de ooquistes clorados en cuatro volúmenes de dH_2O estéril).

5.- Los ooquistes se centrifugan a 2000 rpm 10' a 4°C, para formar el *pellet* con los ooquistes esporulados.

6.- Los ooquistes del *pellet* se lavan varias veces en dH_2O estéril hasta que el olor a cloro no se percibe más. Ayuda transferir el *pellet* de oocistos a tubos nuevos-limpios cónicos después de los dos primeros lavados, después se puede continuar en los siguientes pasos de lavado con los nuevos tubos.

7.- Los ooquistes desinfectados se suspenden en PBS 1X estéril, estos se pueden almacenar a 4°C. Los ooquistes que ya pasaron por el proceso de cloración se pueden mantener viables hasta por una semana, un almacenaje prolongado más allá de este lapso puede comprometer la viabilidad de los ooquistes. *

*Es mejor no clorar los ooquistes si estos no se van a necesitar inmediatamente.

6.2 ANEXO 2.- Protocolo de ruptura de los ooquistes de *E. tenella* para obtener esporocistos

El protocolo original de agitación y ruptura de ooquistes de *Eimeria* sp., para obtener esporoblastos, provisto por el Dr. John R. Barta al MVZ MC Marco A. Juárez Estrada contempla originalmente la utilización de 50×10^6 ooquistes esporulados en volúmenes parciales con 0.9 mL de PBS 1X que se agregan a un vial especial con 3.33 g de perlas de vidrio de 250 μm Θ , vial diseñado para el desintegrador Mickle (Brinkman Instruments, Westbury, NY. USA), protocolo en el cual se recomienda aplicar tiempos de ruptura de 8-15 segundos, después del cual se verifica el porcentaje de rompimiento y si faltan ooquistes por romper, se puede prolongar el proceso hasta un minuto.

Ante la carencia del aparato desintegrador y los viales especiales recomendados en este protocolo, después de pruebas preliminares y con base a los resultados de Cha et al (2014) y You (2014), se decidió ajustar a 1200 μL de PBS 1X el *pellet* con 2.0×10^7 ooquistes esporulados, los cuales regularmente se colocaban en un tubo de 1.8 mL con 0.9 g de perlas de vidrio de 1 mm Θ , el *pellet* de ooquistes se mezcló con el PBS 1X y las perlas de vidrio manteniendo el cultivo tan grueso como era posible (pero no tan grueso), se observó que el cultivo mantenido en forma gruesa se rompía mejor, la mezcla se agitó en el vortex a 2000 rpm durante un periodo de 1:10 a 1:20, no más, después de este procedimiento las perlas se lavan con PBS 1X (pH 7.4) varias veces con la finalidad de recolectar los esporocistos liberados (cada ooquiste rinde 4 esporocistos) en un volumen aproximado de 10 mL. Se observa una muestra de los ooquistes en el microscopio, si hay muchos esporoblastos, pocos ooquistes completos y casi ningún esporozoito, es una maniobra apropiada, si ocurre otra situación (Muchos ooquistes completos o la presencia de muchos esporozoitos libres) se tiene que investigar que sucedió y resolver el problema. Se toma el vial de los esporoblastos y se recupera el *pellet*, de acuerdo con Dulski y Turner (1988) hasta este paso deberá haber al menos 4.08×10^7 de esporoblastos (51% de recuperación).

Los esporocistos se pueden colar a través de una pantalla de malla apropiada de Nitex con la finalidad de remover los ooquistes no rotos y los cascarones de los que si se rompieron. Los esporocistos se colectaron en un vaso de precipitado sobre hielo frappe.

Centrifugar los esporocistos para obtener el *pellet* a 2,000 rpm (Puede ser a 2,500 rpm) 4°C por 10 minutos (IEC) (Se puede añadir al *pellet* medio para congelamiento, ponerlo a -70°C por un periodo de 24 horas, después de esto los viales se pueden colocar en nitrógeno líquido N₂). Los esporocistos se suspenden en tubos Falcon de 50 mL con 15-25 mL de PBS 1X (pH7.4) y se almacenan a 4°C.

Tamaño de la malla Nitex de acuerdo a la especie de *Eimeria* de donde se obtendrán los esporocistos

Especie	Tamaño de la malla
Esporocistos de <i>E. tenella</i> Esporocistos de <i>E. necatrix</i> Esporocistos de <i>E. acervulina</i>	10 µm
Esporocistos de <i>E. maxima/E. brunetti</i>	15 µm
Esporocistos de <i>E. maxima</i>	6 µm

Después de efectuar este procedimiento en por lo menos 10 pruebas preliminares, se determinó que la purificación de esporoblastos efectuado de esta manera producía una gran merma del material biológico los esporoblastos obtenidos se sujetaron a un proceso de purificación por medio de un gradiente continuo de Percoll al 50% (Se abandono la práctica del filtrado, debido a que no se obtuvo buena cantidad de esporoblastos, es posible que afinando la técnica esta sea apropiada, pero lo que se ha visto es que muchos esporoblastos se retienen y pasa mucha basura e incluso ooquistes completos a través del filtro adquirido en México [filtro BHP de 10 µm, Tlalnepantla de Baz, Edo. de México]), hasta aquí, después de lavar el *pellet* obtenido con el Percoll isotónico al 50%, de acuerdo a Dulski y Turner (1988), se deben obtener 3.52×10^7 de esporoblastos (44% de recuperación). Los esporoblastos después de contarlos y aforarlos con PBS 1X se pueden guardar en refrigerador, a 4°C (máximo 24 hrs) o bien se sujetan inmediatamente al siguiente proceso que consiste en el desenquistamiento químico de los esporozoitos.

La purificación de los esporoblastos se realizó subsecuentemente utilizando gradientes de Percoll al 50%, técnica utilizada para la obtención de esporoblastos puros que se emplearon para obtener los esporozoitos requeridos para las pruebas planteadas en el presente estudio.

6.3 ANEXO 3.- Protocolo para la obtención y purificación de los esporozoitos de *E. tenella*

La liberación de los esporozoitos a partir de los esporoblastos purificados previamente se efectúa centrifugando el contenido de esporocistos a 2,500 rpm 10' a 4°C, el *pellet* se resuspende con aproximadamente 100 mL de fluido de desenquistamiento, el cual se preparará de la siguiente manera:

Reactivo	Cantidad
Ácido taurocólico (De bilis de buey)	0.75%
Tripsina (Tipo II-S de páncreas porcino)	0.25%
PBS 1 X (pH 7.4) estéril	Cuanto sea necesario

Nota: El pH final del fluido de desenquistamiento se deberá ajustar a pH 7.4 utilizando NaOH o HCL a 25°C.

Los esporocistos resuspendidos en los 100 mL del fluido se agregan en una proporción de 50×10^6 esporocistos/100 mL de fluido de desenquistamiento. El desenquistamiento se efectúa a 42°C en un baño-maría con agitador a 200 rpm. Los tiempos de desenquistamiento varían de acuerdo a la especie de *Eimeria* involucrada:

Especie	Tiempo de desenquistamiento
<i>E. acervulina</i>	15 minutos
<i>E. brunetti</i>	90 minutos a 2 horas
<i>E. maxima</i>	45 minutos a 90 minutos
<i>E. mitis</i>	30 minutos a 45 minutos
<i>E. necatrix</i>	45 minutos a 90 minutos
<i>E. tenella</i>	90 minutos a 2 horas 30 minutos

Microscópicamente se debe confirmar que el 80 al 90% de los esporozoitos han sido desenquistados. La reacción se detiene al añadir inhibidor de tripsina de soya en una concentración equivalente a la actividad de la tripsina utilizada. Para concentrar los esporozoitos el fluido ya inactivado se centrifuga a 2,500 rpm 10' a 4°C. El *pellet* se resuspende en un pequeño volumen de PBS 1 X (pH 7.4) estéril.

Se lava tres ocasiones con PBS 1 X (pH 7.4) estéril, antes de efectuar el último lavado, deberá tomarse una muestra para contabilizar con el hemocitómetro de Neubauer los esporozoitos obtenidos. **

El porcentaje de recuperación de acuerdo con Dulski y Turner (1988) en la cuantificación de esporozoitos deberá ser del 40% a partir del conteo original de los ooquistes sujetos a ruptura.

Posteriormente de acuerdo con Dulski y Turner (1988) los esporozoitos obtenidos se someten a un proceso de purificación por medio de un gradiente continuo de Percoll isotónico al 60% al terminar este procedimiento el Percoll se elimina por medio de 4

centrifugaciones, El porcentaje de recuperación de esporozoitos ya purificados deberá ser del 39% a partir del conteo original de los ooquistes.

La purificación de los esporozoitos también se puede efectuar a través de una columna de dietil- amino- etil celulosa (DEAE 52) (opción descartada debido a que este producto está discontinuado en México). Posteriormente el *pellet* obtenido se suspende en PBS 1X + inhibidor de proteasas (Roche®) y se congela a -20°C (opción recomendada para la obtención de antígenos solubles). Otra opción para conservar los esporozoitos íntegros que se utilizarán en los programas de inmunización es agregar medio de congelación y gradualmente congelarlos en un periodo de 24 horas hasta -70°C.

** Como contar: Número de esporozoitos o esporocistos (En 10 cuadros de ambas celdas) x 1000 x factor dilución/mL

6.4 ANEXO 4.- Análisis de puntos críticos de control durante el proceso de obtención de los antígenos solubles provenientes de esporozoitos de *E. tenella*

- 1.- Efectuar el procesamiento por etapas, no retardar más de 72 horas, desde el inicio de esterilización de los ooquistes hasta la obtención de los esporozoitos.
- 2.- Estandarizar el proceso de acuerdo a las condiciones y equipo disponible en el laboratorio, la cantidad y proporción de ooquistes-perlas de vidrio en el proceso de ruptura es importante.
- 3.- Verificar exactamente las condiciones de obtención de los ooquistes, su número y volumen, el tiempo requerido y las r.p.m. exactas del vortex para la ruptura de los ooquistes, ligeros desvíos provocan grandes pérdidas.
- 4.- Efectuar una recuperación de ooquistes no rotos, para un re-proceso de ruptura previo a su separación por *Percoll* al 50% con flotaciones de sucrosa al 1 M.
- 5.- Estandarizar la proporción soluto:solvente, tiempo, temperatura y r.p.m. de agitación para la digestión química de los esporoblastos (cualquier desvío de los parámetros genera grandes pérdidas del material biológico).
- 6.- Optimizar el método de obtención de antígenos solubles a partir de los esporozoitos por medio de congelación- descongelación, sonicación o a través de buffer de lisis.

6.5 Anexo 5. Purificación de IgGs de conejo versus esporozoitos de *E. tenella* por medio de cromatografía de afinidad (*Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow*, GE HLS)

Este protocolo es una adaptación a las condiciones del laboratorio de Genética Molecular de la F.M.V.Z.- U.N.A.M a partir del protocolo original (GE HLS). La proteína G sepharosa 4 de flujo rápido (FF) es una proteína G recombinante que está unida a la sepharosa 4 FF por medio del método de inmovilización de ligandos que contienen aminos primarios a través de la activación que utiliza Cianógeno de Bromuro (CNBr).

La proteína G se une a la región Fc de la IgG de una amplia variedad de especies de mamíferos entre ellos el conejo. La proteína G sepharosa 4 FF se puede utilizar para aislar y purificar diferentes clases y subclases, o fragmentos de inmunoglobulinas de cualquier tipo de fluido biológico o medios de cultivo celular. Debido a que en la unión a la matriz de sepharosa solo está implicada la región Fc, la región Fab de la inmunoglobulina fijada a la proteína G se encuentra disponible para la unión al antígeno. Por lo cual la proteína G sepharosa 4 FF es extremadamente útil para el aislamiento de complejos inmunes. Las aplicaciones potenciales para la proteína G incluyen prácticamente todas las aplicaciones propuestas y probadas para la proteína A. Sin embargo, la proteína G y la proteína A, tienen diferentes sitios de unión a las IgGs, y distintas especificidades de acuerdo al origen de las IgGs.

Comparada a la proteína A, la proteína G se une de manera más fuerte a IgGs de tipo policlonal, por ejemplo, de vacas, ovejas y caballos. Adicionalmente a diferencia de la proteína A, la proteína G se une policlonalmente a la IgG de la rata, el Koala, la Llama; a la IgG3 humana y a la IgG1 del ratón. Si bien la proteína A se une fuertemente a las IgGs del conejo (++++), su unión a la proteína G es también altamente aceptable (+++).

La proteína recombinante G, Mr 17,000, de GE Healthcare se produce en *E. coli* y contiene dos regiones de unión a la IgG. En este producto recombinante se ha delectado genéticamente la región de unión a la albúmina que tiene la proteína G nativa, esto, con la finalidad de evitar interferencias indeseables con la albúmina presente en las muestras. El punto isoeléctrico de la proteína G es 4.1, y muestra una estabilidad de pH entre 2 y 10.

El proceso de purificación por separación en la cromatografía de afinidad depende del fenómeno de adsorción reversible de las biomoléculas de interés a través de una interacción bioespecífica con un ligando fijado previamente en una matriz semipermeable.

Principios básicos de la cromatografía de afinidad

La mayor parte de los procesos de cromatografía de afinidad se desarrollan en cuatro etapas principales:

(1) Equilibrio, **(2)** Aplicación de la muestra y lavado, **(3)** Elución y lavado, **(4)** Regeneración y estabilidad de la columna.

1.- Preparación previa de la proteína G sefarosa 4 Fast Flow para el medio de cromatografía

La proteína G sefarosa 4 de flujo rápido (1 mL), se suministra comercialmente embebida y expandida en 20% de etanol. La suspensión de proteína G sefarosa 4 de flujo rápido utilizada para armar la columna de purificación se debe preparar decantando la solución de etanol al 20% y reemplazándola con el buffer de unión en una proporción de 75% del medio de sefarosa y 25% del buffer.

El buffer de unión no deberá contener ningún tipo de agente que pueda incrementar significativamente la viscosidad. La columna puede equilibrarse con un buffer más viscoso a una tasa de flujo lento únicamente después de que el proceso de empaquetamiento se ha completado.

El primer paso del procedimiento después del empacamiento de la proteína G sefarosa 4 de flujo rápido es equilibrar la fase estacionaria del gel o la matriz a las condiciones de inicio de operación requeridas.

2.- Empaquetamiento de la proteína G sefarosa 4 de Flujo Rápido

1.- Todo el material se equilibra a la temperatura a la cual la cromatografía se va a realizar (25°C)

2.- El medio utilizado para la mezcla de empacamiento con la sefarosa 4 se debe desgasificar previamente (buffer de unión).

3.- Se selecciona una columna con capacidad de 2.5 mL de empaquetamiento de la mezcla de sefarosa (1.3 cm diámetro) con una altura total de la columna de al menos 10-15 cm (esto asegura una buena tasa de filtrado cuando se utiliza para el flujo solo la fuerza de la gravedad), la columna se fija a un soporte universal, se debe asegurar que el eje longitudinal de la columna se encuentre exactamente en posición vertical en un ángulo de 90° con relación al plano horizontal, el ingreso del buffer y del medio es por la parte superior y la extracción o salida se encuentra en la parte inferior.

4.- El aire de los espacios muertos de la columna se elimina perfundiendo el fondo de la columna con buffer de unión. Antes de la aplicación de la muestra debe asegurarse que no

quede atrapado aire bajo la redcilla de filtrado de la columna (próxima al pivote de salida, tela organza o lana de nylon). La salida de la columna se debe cerrar dejando unos centímetros remanentes de buffer de unión dentro de la columna.

5.- La suspensión de la sefarosa 4B con proteína G y buffer de unión se vacía dentro de la columna en una sola operación de forma continua. Con la finalidad de minimizar la posibilidad de introducir burbujas de aire se debe vaciar la suspensión colocando el borde de la boca del frasco de vidrio contra la pared interna de la columna.

6.- Inmediatamente después de llenar la columna con la suspensión se debe llenar el resto con el buffer de unión.

7.- Si el equipo de empaquetamiento de la columna no incluye un medidor de presión, se debe utilizar una tasa de flujo de empaquetamiento de al menos 400 cm/h (15 cm de altura de la capa, 25°C, buffer de baja viscosidad). Si la presión recomendada (la sefarosa 4 B *fast flow* se empaqueta a una presión constante que no exceda 1 bar (0.1 MPa en columnas de tipo XK) o la tasa de flujo no se logra obtener, se deberá usar la máxima tasa de flujo que una bomba o el llenado completo de la columna (*gravity flow*) pueda lograr. Esto deberá dar un gel razonablemente bien empaquetado.

Nota: *Es importante que en los procedimientos de purificación subsecuentes no se exceda el 75% de la tasa del flujo de empaquetamiento del gel.*

8.- Después que se alcanza una altura contante de la capa del gel, se debe mantener una tasa de flujo que mantenga al menos 3 volúmenes de la capa del gel por arriba de la línea superior de este.

9.- Se abre la columna por la parte del pivote de salida y se inicia el flujo del buffer de unión. Se pasa el buffer a través de la columna a una tasa de flujo de empaquetamiento hasta que el medio de la capa de gel se observa estable (no vaciar nunca abruptamente el buffer o la muestra sobre la capa de la columna, ya que esto altera el nivel superior del empaquetamiento y por lo tanto la funcionalidad del sistema, el vertido debe hacerse con cuidado y de preferencia pegado a la pared interna de la columna). La columna ya empacada y equilibrada, se encuentra lista para su uso.

3.- Unión

En la aplicación de la muestra y el lavado de la columna; el objetivo primordial es que las IgGs se unan a la proteína G, después de esto, por el efecto de arrastre del lavado se debe retirar todo el material que no se une a la proteína G sefarosa 4 de flujo rápido. Las biomoléculas que no se unen pasan a través del flujo hacia la salida de la columna durante el lavado con el buffer de unión. Las IgGs de muchas especies se unen a la proteína G

sefarosa 4 de flujo rápido a un pH neutro y fuerza iónica fisiológica. Como metodología general se recomienda un buffer de unión de 20 mM de fosfato de sodio a un pH de 7.0 (el cual previo a su uso debe ser desgasificado y filtrado a través de filtro Millipore® de 0.45 µm). La capacidad de unión de la proteína G sefarosa 4 de flujo rápido depende del origen particular de cada inmunoglobulina.

La muestra se prepara previamente diluyendo en este caso 2.5 mL (en la presente operación se determinaron 44 mg de proteína sérica total aproximada por mL de suero utilizado) de una mezcla de suero hiperinmune de 2 conejos (1.25 mL c/uno, 110 mg totales de proteína sérica aproximada) en 2.5 mL de 40 mM fosfato de sodio a un pH de 7.0, el volumen de muestra se filtró a 0.45 µm (MF-Millipore™). Se deja vaciar un tanto la columna sin que esta llegue jamás a un nivel de riesgo de secado (siempre deben conservarse 2-3 volúmenes de buffer por arriba del menisco del gel empaquetado). Se debe recolectar la muestra por la salida, cerrar el pivote de esta y nuevamente verter la misma muestra a la columna por tres ocasiones previo al lavado de esta.

Tabla 1. Capacidad total de IgG de la proteína G sefarosa 4 de flujo rápido para diferentes especies, bajo condiciones definidas¹ (Trabajo de GE Healthcare)

Especies	Capacidad total de IgG (mg/mL del medio drenado)
Humano	17
Rata	7
Conejo	19
Oveja	18
Cabra	19
Cuyo	17
Vaca	23
Ratón ²	6

¹ La capacidad total se determinó con 1 mL de medio drenado empaquetado en una columna de 1 x 10 cm a una tasa de flujo lineal aproximada de 11 cm/h. Se aplicaron aproximadamente 40 mg de IgG. El buffer de unión utilizado fue 20 mM de fosfato de sodio a un pH de 7.0 y el buffer de elusión empleado fue 0.1 M glicina-HCl a un pH de 2.7

² Valores extrapolados de un experimento llevado a cabo a una escala de 1/5th

Nota: Los valores de unión listados antes son específicos para las especies referidas. Sin embargo, pueden existir amplias desviaciones en la capacidad de unión para diferentes

inmunoglobulinas derivadas de las mismas especies, incluso si estas son de la misma subclase.

4. Lavado

Después de pasar la muestra por la columna en tres ocasiones, esta se lava con 5-10 volúmenes utilizando buffer de unión. En la fracción de lavado están contenidas las proteínas no absorbidas o las unidas de forma inespecífica, dicha fracción se encuentra enriquecida principalmente con albúmina. Se recolectan suficientes fracciones de 1.5 mL c/una, las cuales se analizan por medio de espectrofotometría a 280 nm (Epoch Microplate Spectrophotometer®), el objetivo es determinar la última fracción del lavado que indique un contenido de proteínas con una lectura cercana o igual a cero, lo cual indicará que se efectuó un lavado eficiente de la columna y por lo cual ésta se encuentra lista para efectuar el proceso de elusión. En el procedimiento efectuado se recolectaron 8 fracciones de 1.5 mL cada una, las cuales mostraron diferentes lecturas espectrofotométricas, adicionalmente, se efectuó el análisis electroforético de al menos 4 fracciones.

5.- Elusión

En este paso, las bio- moléculas se liberan del ligando bio- específico (Proteína G sefarosa 4 de flujo rápido) dentro del buffer de elución debido al cambio de composición del mismo.

Para eluir las IgGs de la proteína G sefarosa 4 de flujo rápido es necesario bajar el pH cerca de 3.0 a 2.5, lo cual depende de la IgG a purificar.

Cómo metodología general se recomienda el uso de buffer de elusión 0.1 M glicina-HCl a un pH de 2.7 (el cual previo a su uso debe ser desgasificado y filtrado a 0.45 μ m [MF-Millipore™]).

Como medida de seguridad para preservar la actividad biológica de las IgGs mismas que son lábiles a condiciones ácidas, se recomienda recibir al eluido con 60 a 200 μ L de 1 M Tris-HCl a un pH de 9.0/ mL con la finalidad de neutralizar las fracciones ya eluidas.

Con base a pruebas preliminares se determinó que con 50 μ L de 1 M Tris-HCl a un pH de 9.0 / mL se logró neutralizar eficientemente el buffer de eluido alcanzando un pH de 7.0. Por lo cual durante el procedimiento de aplicación del buffer de eluido en el cual se utilizaron 5 volúmenes del mismo (5 mL), se recibieron 5 fracciones de 1 mL aproximadamente, cada una se recibió con 50 μ L de 1 M Tris-HCl a un pH de 9.0/mL, cada fracción obtenida se verificó por espectrofotometría a 280 nm.

Si bien se recomienda en forma general una tasa de flujo de 1 mL/minuto, se ha observado que con una tasa de 0.8 mL/minuto se obtiene mayor cantidad de inmunoglobulinas con un

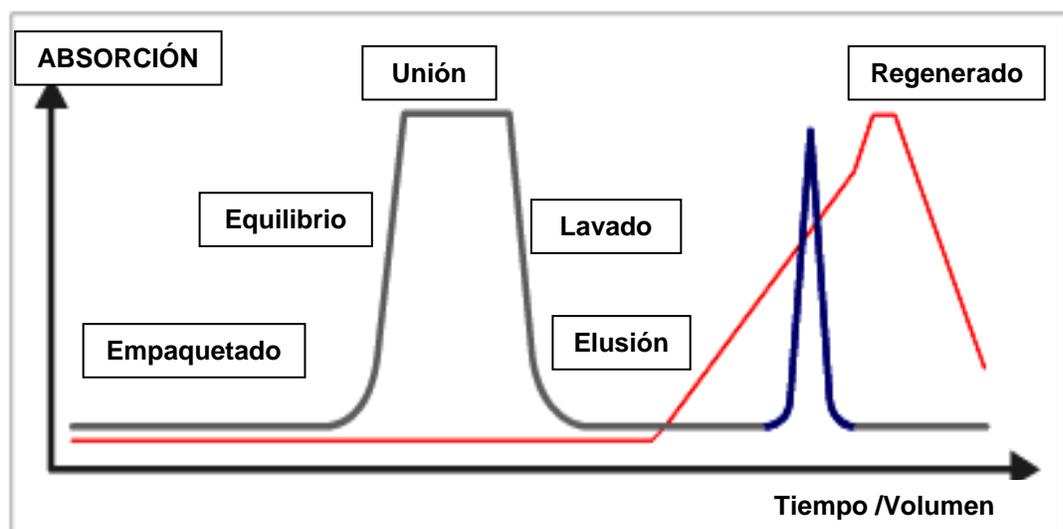
alto grado de pureza. Bajo las condiciones en que se montó la columna del presente reporte se observó una tasa de flujo de 0.750 mL/minuto (Determinada *in situ* por la MSc Angélica Lizeth Toiber Estrella, ayudante honorífica asignada).

6.- Regeneración

Después de la elusión, la columna de la proteína G sefarosa 4 de flujo rápido debe ser lavada inmediatamente con 2 a 3 volúmenes del buffer de elusión seguido de una re-equilibración con 2 a 3 volúmenes del buffer de unión. Lo cual se efectuó puntualmente durante el procedimiento de purificación efectuado.

7.- Sanitización

La sanitización reduce la contaminación microbiana del medio de cromatografía a un nivel mínimo. Después de re-equilibrar la columna con el buffer de unión, se abrió el pivote de salida y se llenó la columna con etanol al 20%, se cerró la parte superior de la columna y se agito gentilmente hasta solubilizar por completo la proteína G sefarosa 4 de flujo rápido, después se vertió cuidadosamente en el frasco de origen, se agregó más etanol al 20% a la columna vacía y se agito para resuspender el resto de proteína G sefarosa 4 de flujo rápido que pudiera quedar, después se vertió al frasco con la proteína G sefarosa 4 de flujo rápido, se dejó reposar hasta que la proteína G sefarosa 4 de flujo rápido se asentó en el fondo, después con una pipeta se retiró el exceso de etanol al 20% dejando solamente un 25% de este con relación al 75% del volumen de la proteína G sefarosa 4 de flujo rápido, se cerró herméticamente el frasco y éste se colocó dentro de un desecador, el cual se almaceno a 4°C.



Gráfica 1. Ejemplificación de la cromatografía de afinidad utilizando la Proteína G

Se recomienda realizar diálisis debido a que las IgGs quedan suspendidas en un buffer de elusión ácido (pH 2.7), el cual, aunque fue neutralizado (buffer pH 9.0) a pH 7.0, este medio de suspensión puede contener aún actividad residual nociva para las IgGs, se recomienda dializar contra PBS.

Es recomendable realizar un estudio electroforético utilizando un gel SDS-PAGE al 12%, con la finalidad de verificar la eficiencia de la purificación de las inmunoglobulinas obtenidas (tres fracciones ajustada cada una de ellas a 30 µg/pozo), y una mezcla de las tres fracciones efectuada a partes iguales (pool de 30 µg/pozo). En la misma corrida electroforética efectuada bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS y β-mercaptoetanol) se deben incluir los perfiles de electroforesis de al menos 4 fracciones de lavado obtenidas progresivamente. Posteriormente se puede efectuar una prueba de inmunoblotting directo, para lo cual, un gel espejo de la corrida electroforética en SDS-PAGE al 12% se transfiere a una membrana de PVDF y esta se incuba con IgG de cabra anti-IgG de conejo marcada enzimáticamente (dilución 1:1,500), la unión antígeno- anticuerpo se revela a través del sistema DAB- UREA.

La caracterización de la reactividad inmunológica de las IgGs purificadas se efectúa por medio de una prueba de ELISA indirecta de acuerdo con un protocolo estándar como el descrito previamente en el presente estudio (subcapítulo 2.4.7).