



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

Evaluación de una vacuna guiada por anticuerpos para prevenir la
coccidiosis y su efecto en la pigmentación.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

ANAISA AZYADETH LEYVA DÍAZ

Tutor:

Benjamín Fuente Martínez (FMVZ-UNAM)

Comité Tutor:

Xóchitl Hernández Velasco (FMVZ-UNAM)

Guillermo Téllez Isaías (Universidad de Arkansas)



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

*Para mi familia y amigos, que nunca me han dejado sola y me motivan a ser mejor cada día,
gracias por estar en mi vida y dejarme ser parte de la suya.*

Agradecimientos

A la UNAM y FMVZ un orgullo haber sido formada dentro de sus aulas.

Al personal académico del CEIEPAV y del Departamento de Aves de la FMVZ, quienes me brindaron su ayuda para la realización de este proyecto.

Al laboratorio de salud avícola John Kirkpatrick Skeeles, por el apoyo brindado y ser un segundo hogar.

A CONACyT, por el apoyo económico dado durante el programa de posgrado.

A mi tutor el doctor Benjamín Fuente Martínez, quien no solo me ha apoyado durante mi Maestría, si no que me ha acompañado a lo largo de mi formación profesional, gracias por todas su enseñanzas, consejos y palabras de aliento, es un amigo y un gran mentor.

A mi comité tutor la Dra. Xóchitl Hernández Velasco y Dr. Guillermo Téllez Isaías, gracias por todos los conocimientos compartidos, por todas las aportaciones a este trabajo, por todo el apoyo brindado y ser un gran ejemplo a seguir, mi admiración.

A mis padres María Elena y Juan Carlos, sin los cuales no sería la persona que soy. Este logro es gracias a ustedes, por haberme enseñado a ser fuerte, perseverante y a perseguir mis sueños, no hay forma de agradecerles todo lo que han hecho por mí, y doy gracias a la vida y a Dios por tenerlos a ustedes como padres, los amo.

A mis hermanas Nayeli, Areli y Adilene, quienes siempre han estado a mi lado motivándome a ser mejor y siendo un ejemplo de vida. Nada sería lo mismo sin ustedes, las amo.

Anubis gracias por acompañarme en esta aventura, por ser mi apoyo incondicional y ayudarme en todo momento, eres una gran motivación para mí.

A mis amigos los cuales nunca han dejado de creer en mí y siempre han estado para escucharme.

A todas las personas que se cruzaron en mi vida y que se volvieron parte de ella, gracias vida por ponerlas en mi camino.

A mi Chata que me acompañó cada noche y me saco sonrisas en todo momento, eres un gran motor para mi día a día.

A Dios por darme la paciencia, el temple y la fortaleza que a veces me falta, y por acércame a todas estas personas, sin las cuales este trabajo no hubiera sido el mismo.

Gracias por todo.

RESUMEN

Para evaluar la protección de una vacuna guiada por anticuerpos contra coccidia, se realizaron 2 experimentos, cada uno con 200 pollos de engorda sexados de la estirpe Ross 308, durante los 21 a 42 días de edad, en los cuales se evaluaron absorción y depósito de las xantofilas, así como parámetros productivos. Las aves fueron infectadas con *Eimeria maxima* y se distribuyeron en 5 tratamientos con 4 réplicas. El objetivo del primer experimento fue encontrar una dosis desafiante para ser probada con la vacuna de subunidades; y los tratamientos fueron: 1) testigo no infectado; 2) 9.625×10^1 ooquistes esporulados de *E. maxima* (OEEEm)/ave; 3) 9.625×10^2 OEEEm/ave; 4) 9.625×10^3 OEEEm/ave; 5) 9.625×10^4 OEEEm/ave. Los resultados obtenidos de las variables estudiadas se analizaron por medio de una regresión lineal múltiple. Hubo un aumento en el consumo de alimento, el consumo de pigmento se incrementó 4 mg conforme aumentaba el título infectante, la absorción de xantofilas en plasma (XP) disminuyó de 16.98 a 7.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y las unidades de amarillamiento (b^*) disminuyeron hasta 6.1 unidades en promedio, con el título infectante más alto. Los tratamientos infectados no igualaron al testigo en pigmentación cutánea ni en XP al final de la prueba. Las mejores dosis infectantes para el desafío vacunal fueron 9.625×10^3 y 10^4 OEEEm/ave. Objetivo del segundo experimento, evaluar la protección de la vacuna contra coccidia, la dosis infectante se adecuó a 4×10^4 OEEEm y los tratamientos fueron: 1) Vacuna, 50 μg de una mezcla de proteína proteasa micronema (MPP) y proteína anónima relacionada con la trombospondina (TRAP), desafiado con *E. maxima*; 2) Vacuna, 100 μg de una mezcla de MPP y TRAP, desafiado con *E. maxima*; 3) Sin vacuna, con coccidiostato y desafiado con *E. maxima*; 4) Sin Vacuna, desafiado con *E. maxima* y 5) Sin vacuna, no desafiado con *E. maxima*. Por efecto de la vacuna no hubo diferencias en ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimentaria ($p > 0.05$). El tratamiento con coccidiostato presentó los mejores valores de b^* ($p < 0.05$) y no hubo diferencia significativa en las concentraciones de XP. Se concluye que el empleo de la vacuna a base de epítomos aislados de *E. maxima* no generó inmunidad ni afectó los parámetros productivos de los pollos de engorda de 21 a 42 días de edad.

Palabras clave: parámetros productivos, *Eimeria maxima*, xantofilas amarillas, pollo de engorda, Proteína Anónima Relacionada con la Trombospondina, Proteína Proteasa Micronema.

ABSTRACT

To evaluate the protection of an antibody-guided vaccine against coccidia, 2 experiments were performed, each one with 200 sexed broilers of the Ross 308 line, during the 21 to 42 days old, in which absorption and deposition of xanthophylls, as well as productive parameters, were evaluated. The birds were infected with *Eimeria maxima* and were distributed in 5 treatments with 4 replicates. The objective of the first experiment was to find a challenge dose to later be tested with the subunit vaccine; and the treatments were: 1) uninfected control; 2) 9.625×10^1 sporulated oocysts of *E. maxima* (OEEEm)/bird; 3) 9.625×10^2 OEEEm/bird; 4) 9.625×10^3 OEEEm/bird; 5) 9.625×10^4 OEEEm/bird. The results obtained from the variables studied were analyzed by means of a multiple linear regression. There was an increase in food consumption, pigment consumption increased 4mg as the infecting titer increased, the absorption of xanthophylls in plasma (XP) decreased from 16.98 to 7.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the yellowing units (b *) decreased by 6.1 units on average, with the highest infective titer. The infected treatments did not match the control in skin pigmentation or XP at the end of the test. The best infecting doses for the challenge were 9.625×10^3 and 10^4 OEEEm/bird. Objective of the second experiment, to evaluate the protection of the vaccine against coccidia, the infecting dose was adapted to 4×10^4 OEEEm; and the treatments were: 1) Vaccine, 50 μg of a mixture of microneme protease protein (MPP) and thrombospondin-related anonymous protein (TRAP), challenged with *E. maxima*; 2) Vaccine, 100 μg of a mixture of MPP and TRAP, challenged with *E. maxima*; 3) Without vaccine, with coccidiostat and challenged with *E. maxima*; 4) Without vaccine, challenged with *E. maxima* and 5) Without vaccine, not challenged with *E. maxima*. The effect of the vaccine, there were no differences in weight gain, food consumption and food conversion ($p > 0.05$). Treatment with coccidiostat presented the best b * values ($p < 0.05$) and there was no significant difference in XP concentrations. It is concluded that the use of the vaccine based on epitopes isolated from *E. maxima* did not generate immunity or affect the productive parameters of broilers between 21 and 42 days of age.

Key words: productive parameters, *Eimeria maxima*, yellow xanthophylls, microneme protease protein, thrombospondin-related anonymous protein, broiler.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAROTENOIDES	2
METABOLISMO, TRANSPORTE Y ABSORCIÓN	2
TIPOS DE PIGMENTOS UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA AVÍCOLA.....	4
EVALUACIÓN DEL PIGMENTO CUTÁNEO	4
<i>Métodos directos</i>	4
<i>Métodos indirectos</i>	5
FACTORES QUE AFECTAN LA PIGMENTACIÓN.....	5
COCCIDIOSIS	6
EPIDEMIOLOGÍA	8
<i>EIMERIA MAXIMA</i>	8
PATOGENICIDAD	9
CICLO DE <i>EIMERIA MAXIMA</i>	9
LESIONES.....	10
RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCIÓN POR <i>EIMERIA</i>	11
<i>Citoquinas y linfoquinas</i>	13
CONTROL DE LA COCCIDIOSIS	13
CONTROL POR VACUNACIÓN.....	15
<i>Vacunas disponibles</i>	15
VACUNA DE SUBUNIDADES.....	16
EPÍTOPOS TRAP Y MPP	18
JUSTIFICACIÓN	21
METODOLOGÍA GENERAL	22
EXPERIMENTO 1	23
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS PARTICULARES	24
HIPÓTESIS	25
MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
RESULTADOS	32
DISCUSIÓN	39

CONCLUSIÓN	44
EXPERIMENTO 2	45
OBJETIVO GENERAL	45
OBJETIVOS PARTICULARES	46
HIPÓTESIS	47
MATERIAL Y MÉTODOS.....	48
RESULTADOS	54
DISCUSIÓN	59
CONCLUSIÓN	66
REFERENCIAS	67

Lista de Cuadros

CUADRO 1. Composición de las dietas (kg) experimentales empleadas para evaluar el efecto de <i>E. maxima</i> , en pollo de engorda desafiado a los 21 días de edad.	27
CUADRO 2. Parámetros productivos del día 21 al 42 de edad en pollos infectados con una de cuatro dosis diferentes de <i>E. maxima</i>	31
CUADRO 3. Valores de amarillamiento (b*), enrojecimiento (a*) y luminosidad (l*) cutánea medidos con el espectrofotómetro de reflectancia Minolta, así como de xantofilas en plasma en pollo de engorda del día 21 al 42 de edad desafiados con <i>E. maxima</i>	32
CUADRO 4. Resultados semanales de conteo de ooquistes en pollos de engorda desafiados con diferentes títulos de <i>E. maxima</i> al día 21 de edad.	37
CUADRO 5. Composición de las dietas (kg) experimentales empleadas en la evaluación ⁴⁹ de una vacuna guiada por anticuerpos para prevenir la coccidiosis causada por <i>E. maxima</i>	49
CUADRO 6. Respuesta productiva durante 6 semanas de experimentación en pollos inoculados con una vacuna guiada por anticuerpos para prevenir la coccidiosis por <i>E. maxima</i>	54
CUADRO 7. Amarilleamiento cutáneo medido con el espectrofotómetro de reflectancia Minolta, y xantofilas plasmáticas en pollo de engorda, inoculados con una vacuna guiada por anticuerpos para prevenir la coccidiosis por <i>E. maxima</i>	56
CUADRO 8. Resultados del conteo de ooquistes por gramo de excretas en los días 35, 37 y 42 de edad en pollos inoculados con una vacuna guiada por anticuerpos para prevenir la coccidiosis por <i>E. maxima</i>	57
CUADRO 9. Resultados del índice anticoccidial en pollos inoculados con una vacuna guiada por anticuerpos para prevenir la coccidiosis por <i>E. maxima</i>	63

Lista de Figuras

FIGURA 1. Ciclo de vida de <i>Eimeria spp.</i>	10
FIGURA 2. Consumo de pigmento semanal del día 20 al 42 de edad en pollos de engorda desafiados con diferentes títulos de <i>E. maxima</i>	33
FIGURA 3. Concentración de xantofilas plasmáticas (µg/mL) en pollos de engorda desafiados con diferentes títulos de <i>E. maxima</i> a los 21 días de edad.....	34
FIGURA 4. Pigmentación cutánea (b*), del día 0 al día 20 post-inoculación en pollos de engorda desafiados con diferentes títulos de <i>E. maxima</i>	35
FIGURA 5. Promedio de ooquistes excretados por gramo de excretas (en miles), en pollos de engorda inoculados con diferentes títulos de <i>E. maxima</i> a los 21 días de edad.....	36
FIGURA 6. Severidad de lesiones intestinales en intestino medio en pollos de engorda inoculados con diferentes títulos de <i>E. maxima</i> a los 21 días de edad.....	38
FIGURA 7. Frecuencia de la severidad de las lesiones en yeyuno a los 35 días de edad (7 dpi) de acuerdo con la escala de johnson y reid (Johnson & reid, 1970) en pollos desafiados con <i>E. maxima</i> e inoculados con una vacuna guiada por anticuerpos para prevenir la coccidiosis	55
FIGURA 8. Resultados del conteo de ooquistes por gramo de excretas en pollos inoculados con una vacuna guiada por anticuerpos para prevenir la coccidiosis por <i>E. maxima</i> , en los días 35, 37 y 42 de edad.	58
FIGURA 9. Promedio de ooquistes excretados por gramo de excretas en pollos inoculados con una vacuna guiada por anticuerpos para prevenir la coccidiosis, por <i>E. maxima</i>	58

ABREVIATURAS

b*	Unidades de amarilleamiento en piel
chCD40	CD40 de pollo
CPA	Células presentadoras de antígeno
dpi	Días post-inoculación
DON	Deoxinivalenol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error Estándar de la Media
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<i>E. maxima</i>	<i>Eimeria maxima</i>
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
FNT	Factor de necrosis tumoral
g	Gramos
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
kg	Kilogramos
Kcal/kg	Kilocaloría por kilogramo
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
µg	Microgramos
mAb	Anticuerpo monoclonal
mg	Miligramos
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
mL	Mililitro
MPP	Proteína Proteasa Micronema
OEEem	Ooquistes Esporulados de <i>Eimeria maxima</i>
pi	Post-inoculación
ppm	Partes por millón
TRAP	Proteína anónima relacionada con la trombospondina
T-2	Toxina T-2
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
XP	Xantofilas plasmáticas

INTRODUCCIÓN

En etapas iniciales de la producción avícola, la coloración amarilla en piel se lograba con los pigmentos contenidos en ingredientes como el maíz amarillo. Actualmente este ingrediente es utilizado en México principalmente para la alimentación humana, por lo que se ha sustituido en su mayoría por ingredientes como el sorgo, que tiene bajo aporte de carotenoides. A causa de estos cambios en la alimentación, además de cambios en la genética de las aves, se ha optado por integrar pigmentos tanto de naturaleza sintética como natural a las dietas, para lograr un amarillo o amarillo naranja en la piel y grasa del animal. Estos productos pueden representar del 8 al 10% del costo total de la dieta (Ratcliff et al., 1959; Brambila et al., 1961; Becerril, 1988; Muñoz-Díaz et al., 2012;).

Hoy en día hay más países como Perú, España, Francia, Italia y China (Rajput et al., 2013) que prefieren particularmente una coloración intensa y brillante en la piel del ave, volviéndose una característica muy importante que puede determinar la preferencia o rechazo del producto por parte del consumidor (Becerril, 1988; W. D. Williams, 1992). En la industria avícola mexicana, el consumo de pollo con una piel y tarsos amarillos intensos es una característica cultural profundamente arraigada que define la comercialización del producto (Muñoz-Díaz et al., 2012). Hay diferentes factores que pueden afectar la pigmentación cutánea en el pollo de engorda, uno de ellos está relacionado con el estado de salud del ave, enfermedades que lesionen la mucosa intestinal y que afecten los mecanismos de absorción (García, 2008), darán como resultado una pigmentación pobre, un ejemplo de enfermedad es la coccidiosis causada por protozoarios del género *Eimeria spp.* Durante los últimos 50 años se han utilizado diferentes productos anticoccidianos para el control de esta enfermedad, no obstante, el mal uso de estos ha provocado resistencia de los coccidios a todos ellos, sumado a esto, actualmente existen políticas que restringen el uso de quimioterapia profiláctica sobre las aves, por lo que el interés por una alternativa inmunológica ha ido en aumento. Es por esto que el objetivo del presente trabajo es evaluar el uso de una vacuna conformada por dos epítomos inmuno protectores encontrados en *E. maxima*, denominados TRAP y MPP, junto con un adyuvante guiado por anticuerpos (anti- chCD40), que se plantea brindara protección contra *E. maxima*, sin ocasionar lesiones en el epitelio intestinal, ni la concentración de pigmento en plasma, pigmentación cutánea y parámetros productivos.

Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos liposolubles naturales sintetizados por plantas, algas y bacterias fotosintéticas. Estos pigmentos son responsables del color de flores y frutos, así como de algunos animales como crustáceos, peces, anfibios, reptiles y aves (Delgado-Vargas et al., 2000; Meléndez-Martínez et al., 2007; Jáuregui et al., 2011). Se han identificado más de 750 en la naturaleza y algunos de éstos tienen capacidad para actuar como provitamina A (Tunio et al., 2013).

Desde el punto de vista químico, los carotenoides son generalmente pigmentos de polieno isopropenoides amarillo-rojo ampliamente distribuidos en la naturaleza. La mayoría están compuestos de tetraterpenos de ocho unidades de isopreno, con un anillo ciclohexano sustituido e instaurado en cada uno de los extremos (Krinsky et al., 2004; Jáuregui et al., 2011). La característica distintiva de los carotenoides es el extenso sistema de dobles enlaces conjugados, denominado cadena polienica. Esta parte de la molécula conocida como cromóforo es responsable de la capacidad de los carotenoides de absorber luz y transmitir los colores amarillo, naranja o rojo (Teixeira & Meleiro, 2008).

Debido a su carácter hidrofóbico se encuentran normalmente en ambientes lipófilos, como en membranas, sin embargo, su asociación con proteínas o reacciones de glicosilación, les permiten también estar presentes en medios acuosos (Becerril, 1988; Meléndez-Martínez et al., 2007).

Considerando los elementos químicos presentes en sus moléculas, los carotenoides pueden dividirse en dos grandes grupos: carotenos que son hidrocarburos, y xantofilas que contienen átomos de oxígeno (Meléndez-Martínez et al., 2007). En el área avícola las xantofilas son las moléculas de mayor interés debido a su participación en la pigmentación, ya que son las responsables de pigmentar la piel del pollo, y no son sintetizados de manera natural por las aves.

Metabolismo, transporte y absorción

La absorción de los carotenoides se da por un mecanismo similar al de los lípidos, y se divide en cuatro fases principales: emulsión, hidrólisis, formación de micelas y absorción (Bradley, 2014; Furr & Clark, 1997).

Los carotenoides se liberan en el bolo alimenticio, sin embargo, en las aves no se reporta la acción de la lipasa lingual ni de la lipasa gástrica, por lo tanto, el proventrículo (molleja) y el intestino son los encargados de la emulsificación de los lípidos. Para realizar este proceso, las células intestinales tienen la capacidad de formar una apolipoproteína de tipo III. Esta proteína tiene una estructura terciaria muy compleja con alto contenido de dobles enlaces, que permiten “atrapar” a la molécula de xantofila, junto con colesterol y fosfolípidos, para que ésta pueda mantenerse en emulsión en la sangre. Ésta apolipoproteína es un factor crítico en el proceso de pigmentación, ya que si no se produce correctamente, la cantidad de xantofilas en el sistema no es adecuada y la pigmentación no será la ideal (Cortés, 2005).

Posteriormente se da la formación de vesículas multilaminares o micelas debido a la acción de sales biliares y lipasas pancreáticas. Estas micelas chocan y su contenido se difunde por la mucosa duodenal a través de la membrana del enterocito, por mecanismos que involucran difusión pasiva. Se ha establecido una preferente absorción de las xantofilas respecto a los carotenos, por su mayor polaridad (Parker, 1996; Mínguez et al., 2005).

Para ser transportados, los lípidos hidrolizados en la luz del intestino deben ser reesterificados. En las aves toma el nombre de portomicrón, debido a que las lipoproteínas formadas entran en los vasos sanguíneos a través de las vesículas intracitoplasmáticas endoteliales y son transportados desde las venas pancreático-duodenal y yeyunal hasta la vena porta, debido a que carecen de sistema linfático (Osorio & Flórez, 2011).

Los carotenoides se acumulan en el tejido adiposo tomando su característico color amarillo. El hígado en condiciones normales retiene las xantofilas en forma libre y muy poco esterificadas. Utiliza muy pocas de ellas para su propio metabolismo y en general reintegra a la circulación las mismas lipoproteínas transportadoras: lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Cortés, 2005).

El plasma, al ser el medio de distribución de estos pigmentos, mantiene siempre una reserva de carotenoides circulando, que son transportados por lipoproteínas de baja densidad en el caso de los β -carotenos, y por lipoproteínas tanto de alta densidad como de baja densidad en el caso de las xantofilas (Parker, 1996; Mínguez et al., 2005; Jáuregui et al., 2011).

La eficiencia de los carotenoides en cuanto a su digestibilidad, absorción, metabolismo y depósito dependerá de la estructura química, isomerización, presentación de los carotenoides

(libres o esterificados), tipo de grasa presente en la dieta, entre otros factores (Hencken, 1992; Breithaupt et al., 2003; Montoya, 2015). La tasa de depósito de carotenoides en órganos y tejidos depende de la absorción selectiva a través de la pared intestinal, y de su utilización y excreción (Mínguez et al., 2005).

Tipos de pigmentos utilizados en la industria avícola

En general se utilizan dos tipos de carotenoides para pigmentar de un color amarillo intenso la piel del pollo de engorda.

Naturales: Las principales fuentes de xantofilas empleadas son los carotenoides de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*), que aporta una coloración amarilla y el chile rojo (*Capsicum annuum*) que dan una pigmentación roja (Martinez et al., 2004; Muñoz-Díaz et al., 2012).

Sintéticos: Los pigmentos de síntesis química tienen una alta concentración, mínima variación, estabilidad y respuesta lineal progresiva. Principalmente se utilizan el etil éster del ácido β -apo-8'carotenóico, conocido genéricamente como apo-éster, que proporciona un color amarillo-naranja, y cantaxantina aportando una coloración roja. Los pigmentos sintéticos tienen la desventaja de ser más caros (Martinez et al., 2004; Liu et al., 2008;).

Evaluación del pigmento cutáneo

Se han desarrollado y utilizado varios métodos para la evaluación de la piel del pollo. La selección del método más adecuado estará en función de alguna situación en particular, debido a que un solo método no cubre todo lo que se desea evaluar. Al ser la pigmentación una herramienta para describir el color del producto final, existen varios métodos para evaluarlo, y estos se pueden clasificar en directos e indirectos (Becerril, 1988; Martinez et al., 2004).

Métodos directos

Consisten en la evaluación directa del color de la piel del pollo, mediante la descomposición del haz de luz (reflectancia) o la comparación contra un color conocido, aunque esta apreciación es subjetiva (Fletcher et al., 1986). Las pruebas que se realizan son: Prueba Rank para canales de pollo, abanicos y escalas colorimétricas (Bauernfeind, 1981) y colorimetría de reflectancia.

Métodos indirectos

Se basan en la concentración y perfil de las xantofilas contenidas en la muestra analizada. Estos métodos se consideran indirectos porque pueden “correlacionarse” con el color predicho y observado, pero dicha correlación es solo una estimación.

El análisis químico del pigmento se basa en la extracción y cuantificación de los pigmentos ya sea individual o en grupo. Su análisis cuantitativo requiere un manejo adecuado de los materiales, una atmósfera inerte, reducción de la presión, temperaturas bajas. La cuantificación de los carotenoides está basada en la absorción de luz visible. Dentro de los métodos aplicados está el HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución), cromatografía de gases, espectroscopia de masas, espectroscopia molecular o espectrofotometría de luz VIS-UV (Becerril, 1988; West et al., 2001).

Factores que afectan la pigmentación

Alcanzar niveles adecuados de pigmentación en la piel depende de varios factores, como son los relacionados a la zona geográfica, calidad nutritiva de la dieta, dosis y tiempo de consumo, programa de alimentación, condiciones de procesamiento; además de los relacionados con las aves (Muñoz-Díaz et al., 2012), tales como:

- Genética. No todas las estirpes tienen la misma eficiencia para depositar el pigmento en piel, probablemente relacionado con la cantidad de grasa subcutánea entre estirpe (Bilgili & Hess, 2010).
- Edad. La oxidación de las xantofilas en el tracto digestivo se incrementa con la edad (Avila et al., 1990).
- Sexo. Las hembras alcanzan una mayor pigmentación cutánea en comparación con los machos, característica que va ligada con su mayor capacidad de depósito de grasa (Martinez et al., 2004; Castaneda MP et al., 2005).
- Estado de salud. Cualquier enfermedad que disminuya el consumo de alimento o provoque su rechazo, provocará una disminución en el consumo de la cantidad de pigmento, así como enfermedades que lesionen la mucosa intestinal y que afecten los mecanismos de absorción y transporte de los carotenoides (García, 2008).

Coccidiosis

La coccidiosis aviar es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del Filum Apicomplexa, Familia Eimeriidae y Género *Eimeria*. Afecta a diversas especies de aves, aunque es en la producción intensiva de *Gallus gallus domesticus*, como son pollo de engorda y gallina de postura, donde alcanza la mayor repercusión económica a pesar de los avances en quimioterapia, manejo, nutrición y genética. El gasto actual en medicación preventiva excede los \$90 millones en Estados Unidos y más de \$300 millones anuales en todo el mundo (Larry et al., 2013; Rajput et al., 2013; Torrubia et al., 2014).

El costo de la coccidiosis y el impacto en la producción avícola es debido a la inversión en medicación preventiva y vacunación, y a las pérdidas en productividad ya que predispone a enfermedades secundarias, principalmente Enteritis necrótica causada por *Clostridium perfringens*, que da como resultado un daño intestinal adicional y problemas de mala absorción (Patricia C. Allen, 1987; D. P. Conway et al., 1990) disminuye el crecimiento, causa una conversión alimenticia deficiente y reduce la producción e incrementa la mortalidad (D. P. Conway et al., 1990; Price et al., 2013).

Es una enfermedad que se produce mediante la ingestión de ooquistes esporulados (cuatro esporocistos que contienen dos esporozoítos), que dan lugar a un proceso de carácter clínico causando un incremento en la mortalidad, o subclínico, afectando los parámetros productivos (Cordero del Campillo & Rojo, 2001; Larry et al., 2013).

Actualmente se reconocen nueve especies de *Eimeria* que afectan al pollo de engorda, cinco de estas se consideran las más virulentas (*E. acervulina*, *E. tenella*, *E. brunetti*, *E. necatrix* y *E. maxima*), ya que pueden desarrollar manifestaciones clínicas. La infección con dos o más especies de coccidia es común. Cada especie causa lesiones distintas, reconocibles, independientes de las otras especies (Cordero del Campillo & Rojo, 2001; Donal P Conway & McKenzie, 2008; Larry et al., 2013).

La ingestión viable de ooquistes esporulados es el método natural de transmisión, las aves susceptibles en la misma parvada pueden consumir los ooquistes a través del picoteo de la cama o de la contaminación del alimento. La contaminación de manera indirecta se da por medio de vectores mecánicos o fomites, los cuales solo tiene la función de transportar al agente, ejemplo

de estos son: insectos, equipo contaminado y polvo. Sin embargo el medio mecánico más común es el personal de trabajo que se encuentra desplazándose entre las plumas, casetas y algunas veces entre granjas (Donal P Conway & McKenzie, 2008; Larry et al., 2013).

La severidad de la infección se relaciona con las lesiones intestinales macroscópicas que produce y que se clasifican en una escala de 0 a +4 como lo describen Johnson y Reid (1970), donde 0 es normal y 4+ es la lesión más severa. Es importante tener en cuenta que estos valores se asignan de forma subjetiva y puede variar entre evaluadores. Las infecciones mixtas, frecuentes en condiciones de campo, producirán lesiones más severas a las infecciones provocadas por una sola especie de *Eimeria sp.* (Cordero del Campillo & Rojo, 2001; Larry et al., 2013).

También se pueden realizar evaluaciones microscópicas en excretas e intestino. Las evaluaciones en excretas consisten en estimar la eliminación total de ooquistes por ave en heces, por medio de la técnica de flotación en la cámara de McMaster, para obtener un resultado cuantitativo (Long et al., 1976; Haug et al., 2006). El análisis de muestras fecales se lleva a cabo en los programas de muestreos habituales o cuando se sospecha de una coccidiosis subclínica.

Para hacer la evaluación de las lesiones intestinales de manera microscópica, se deben tomar 2 cm de intestino después del divertículo de Meckel, la muestra es fijada en formalina al 10% amortiguada, y finalmente procesada por las técnicas convencionales de inclusión en parafina y tinción de Hematoxilina y Eosina (Goodwin et al., 1998).

Existen pruebas de PCR específicas para la mayoría de las especies de *Eimeria spp.* en pollos y pavos, pero no para todas, debido a que las excretas y el contenido intestinal constituyen muestras poco fiables (Torrubia et al., 2014).

Esta infección se autolimita y depende en gran medida del número de ooquistes ingeridos y del estado inmunológico del ave (Larry et al., 2013). Los ooquistes en las heces del pollo de engorda usualmente son más numerosos entre la tercera y la quinta semana de edad, y disminuyen a partir de ese momento. Pocos ooquistes son encontrados después de que las aves son removidas de la granja, ya que el parásito muere por el amoníaco o por el calor del compostaje de las excretas.

Los ooquistes generalmente son considerados resistentes a ambientes extremos y a desinfectantes comunes, sin embargo, pueden morir sometiéndolos a temperaturas extremas o

a la desecación, si por otro lado se encuentran con las condiciones óptimas pueden sobrevivir durante muchas semanas incluso meses. La naturaleza ubicua de las coccidias avícolas impide la posibilidad de erradicación y su prevención por medio de cuarentena, desinfección o saneamiento (Cordero del Campillo & Rojo, 2001; Larry et al., 2013; Torrubia et al., 2014).

Epidemiología

Uno de los factores de importancia epidemiológica es la tasa de difusión, que dependerá de la densidad de la población hospedadora, del intervalo de tiempo que se mantienen las heces con ooquistes esporulados viables y de la facilidad que los hospedadores presentan para acceder a las heces infectadas (Cordero del Campillo & Rojo, 2001; Donal P Conway & McKenzie, 2008).

Pollos de engorda de todas las edades y estirpes son susceptibles, sin embargo, se desarrolla inmunidad después de una infección leve, limitando una infección futura. Los pollos recién nacidos reciben altos niveles de anticuerpos maternos, pero no limita su susceptibilidad.

Los conteos de ooquistes en la cama son generalmente bajos durante las primeras dos a tres semanas, aumentan rápidamente alcanzando su máximo, entre las cuatro y seis semanas de edad, y volviendo a disminuir a niveles bajos, en las semanas siete y ocho de edad. Por lo que es común que se presente la enfermedad entre las 3 y 6 semanas de edad que son las edades de mayor riesgo, y es raramente vista en parvadas de menos de 3 semanas (Donal P Conway & McKenzie, 2008; Larry et al., 2013).

Eimeria maxima

Es una especie fácilmente reconocible debido al gran tamaño de sus ooquistes, 29 x 23 μm , con un intervalo de 21.4 μm - 42.5 μm , ya que estos son ovoides. Los ooquistes pueden presentar un distintivo color amarillo y carecer de micrópilo. Infecta la parte media del intestino, en infecciones graves, las lesiones pueden extenderse hacia el duodeno y descender hasta la unión ileocecal. El diagnóstico basado en la morfología del ooquiste de *Eimeria maxima*, es posible debido a su gran tamaño (Donal P Conway & McKenzie, 2008; Larry et al., 2013).

Patogenicidad

La patogenicidad de los coccidias depende en gran medida de la replicación exitosa del parásito dentro del huésped (Lillehoj, 2005), *E. maxima* en general es moderadamente virulenta, la infección con 50 a 200 x 10³ ooquistes esporulados provoca pobre ganancia de peso, diarrea y algunas veces mortalidad. Algunas cepas son capaces de provocar el 30% de mortalidad en la quinta semana de edad con 100,000 ooquistes.

A menudo hay emaciación, palidez, plumas erizadas, diarrea, anorexia, mala uniformidad en el peso de la parvada, además esta especie puede afectar severamente la absorción intestinal de xantofilas y carotenoides en el intestino delgado, que se puede reflejar en una pigmentación deficiente de la piel (Cordero del Campillo & Rojo, 2001; Larry et al., 2013).

Ciclo de *Eimeria maxima*

Después de la ingestión de los ooquistes esporulados y ruptura de la pared del ooquiste en la molleja, son liberados los esporoblastos, posteriormente con la acción de la quimiotripsina y sales biliares, los esporozoítos pueden salir hacia el intestino. La edad del hospedador en el momento de la infección influye en el desenquistamiento de los ooquistes, disminuyendo en pollitos de un día (Cordero del Campillo & Rojo, 2001; Larry et al., 2013).

Los esporozoítos liberados invaden las células epiteliales del tercio medio del intestino (yeyuno e íleon) (Dubey & Jenkins, 2018). Al ingresar a la célula huésped, el esporozoíto se transforma en 12 a 48 horas en trofozoíto una forma vegetativa activada que se alimenta por fagocitosis. Éste comienza a agrandarse, debido a su reproducción de forma asexual por fusión binaria, conocido como esquizogonia o merogonia. Las pequeñas etapas parasitarias que se forman dentro del esquizonte llevan el nombre de merozoítos. Tras romperse los esquizontes, se liberan merozoítos que infectan a su vez nuevas células de la mucosa intestinal, comienzan entonces generaciones sucesivas de esquizogonias, en el caso de *E. maxima* pueden ser de dos a tres generaciones de esquizogonias. Los merozoítos de la última generación ingresan a nuevas células epiteliales para diferenciarse en gametocitos. El merozoíto evoluciona a microgametos biflagelados o macrogameto. Los microgametos se liberan y se unen a los macrogametos, formando un cigoto. El cigoto se transforma a ooquiste, que una vez maduro es liberado desde la mucosa a la luz intestinal y se elimina posteriormente con las excretas. Se necesitan aproximadamente 130 horas para completar la fase interna del ciclo biológico.

Los ooquistes son el estadio exógeno, y encierran mediante una doble membrana una masa llamada esporonte. El proceso de esporulación se inicia cuando las condiciones de aireación, temperatura y humedad son adecuadas. La esporulación no ocurre por debajo de 12°C ni por encima de 39°C (Donal P Conway & McKenzie, 2008; Larry et al., 2013).

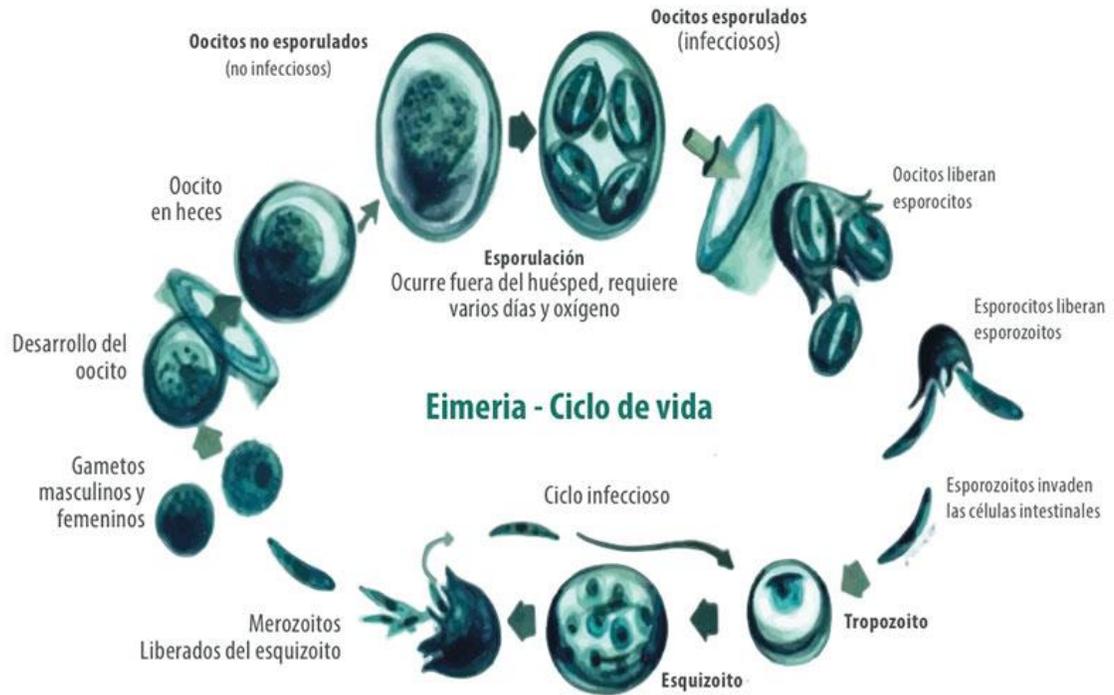


Figura 1. Ciclo de vida de *Eimeria spp.* (Cori, 2015)

Lesiones

El daño mínimo al tejido ocurre con el primero de los dos o tres ciclos asexuales los cuales se desarrollan en la superficie de las células epiteliales de la mucosa. En la etapa sexual (gametocitos) el daño se observa subepitelial, en los días 5 a 8 post-infección, causando congestión, edema, infiltración celular y engrosamiento de la mucosa.

El intestino puede verse flácido o en infecciones más graves se puede observar “abalonamiento”, en el lumen puede verse fluido y moco amarillento-naranja. Microscópicamente, se caracteriza por edema e infiltración celular y la observación de diferentes etapas de desarrollo dentro de los tejidos (Donal P Conway & McKenzie, 2008; Larry et al., 2013).

En la escala de Johnson y Reid (1970), la cual es un sistema de calificaciones de lesiones que van de 0 a 4+, se toman en cuenta los siguientes aspectos para evaluar lesiones macroscópicas en *E. maxima*:

- Grado 0: Cuando no hay cambios significativos.
- Grado 1+: Las lesiones se localizan en intestino medio, teniendo aspecto de hemorragias puntiformes pequeñas y rosadas, esparcidas por la pared del intestino aparentemente es normal y el contenido intestinal puede contener moco anaranjado.
- Grado 2+: La pared del intestino medio se encuentra engrosada, hay presencia de moco anaranjado en el contenido. En este grado el color anaranjado ha sido asociado a la presencia de hemorragias petequiales.
- Grado 3+: El intestino medio posterior ya se encuentra afectado, la pared intestinal está áspera, engrosada, se observa abundante moco de color rojo.
- Grado 4+: Las aves afectadas en este grado mueren, el intestino medio está adelgazado, presenta color rojo y olor desagradable.

Respuesta inmune en la infección por *Eimeria*

Se ha comprobado que la receptividad de un ave a una infección por coccidia no está relacionada con la edad de las aves, si no con el funcionamiento del sistema inmunológico (Cordero del Campillo & Rojo, 2001).

La infección con *Eimeria* spp. induce inmunidad protectora tras dos o más ciclos de infección. Después de la infección primaria, las coccidias siguen presentes en las aves a niveles bajos y por tanto la inmunidad se renueva constantemente (Torrubia et al., 2014). Si bien generalmente se requiere una gran cantidad de ooquistes para generar una buena respuesta inmune contra *Eimeria* spp., *E. maxima* es altamente inmunogénica y requiere un menor número de ooquistes para inducir una inmunidad casi completa. Las etapas tempranas del ciclo de vida de *Eimeria* spp. se consideran más inmunogénicas que las etapas sexuales posteriores (Rose & Hesketh, 1976; H. Chapman et al., 2002). Sin embargo, se ha demostrado que los antígenos de los gametos de *E. maxima* son inmunogénicos e inducen protección contra una infección ocasionada por este parásito (M. Wallach et al., 1990, 1992; Cordero del Campillo & Rojo, 2001; Lillehoj, 2005;).

Dado que el ciclo biológico de *Eimeria spp.* comprende etapas intra y extracelulares con estadios asexuales y sexuales, las respuestas inmunitarias del huésped son bastante diversas y complejas (Lillehoj, 2005; Torrubia et al., 2014). La inmunidad específica del antígeno está mediada por anticuerpos, linfocitos y citoquinas. Mientras que los anticuerpos responden a la presencia extracelular de parásitos en sangre y fluidos corporales, los parásitos intracelulares desencadenan una respuesta mediada por células (Cordero del Campillo & Rojo, 2001; Lillehoj, 2005).

Los animales infectados con *Eimeria spp.* producen anticuerpos específicos para los parásitos en la circulación y en secreciones de las mucosas. Los anticuerpos circulantes son de tipo IgM, IgG e IgA. En bilis se detecta IgM y predominantemente IgA; esta última además se encuentra en la luz del intestino junto a IgG entre la segunda y la tercera semana post- infección, y en bajas concentraciones luego de re-infecciones. Los anticuerpos específicos presentes en la luz intestinal pueden producirse y secretarse localmente o provenir de la circulación sanguínea, como es el caso de la IgG (Lillehoj, 2005; Yuño & Gogorza, 2008).

La participación de la respuesta inmune humoral en la protección contra coccidias no es clara. Los anticuerpos actúan contra el desarrollo de estadios extracelulares, solos o en conjunto con las células del huésped, facilitando la fagocitosis o por citotoxicidad, así como en los estadios intracelulares dado que la infección incrementa la permeabilidad de la célula huésped (M. Wallach et al., 1992). La eficacia de los anticuerpos transferidos por la madre contra infecciones de campo debe verificarse, teniendo en cuenta la corta vida útil de los anticuerpos maternos en pollos jóvenes (Lillehoj, 2005).

Los linfocitos T residentes en el tejido linfoide asociado a mucosas son las principales células efectoras en la respuesta inmune contra coccidias. Las especies de *Eimeria spp.* son muy selectivas y los esporozoitos reconocen diferentes estructuras de células hospedadoras durante el proceso de invasión. Tanto las células del bazo como los linfocitos de sangre periférica son capaces de transferir resistencia pasiva sin exposición previa a antígenos de coccidias (Yuño & Gogorza, 2008).

Citoquinas y linfoquinas.

Las principales citoquinas descritas en pollo son las siguientes: IFN- γ , TGF, TNF, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15 IL-16, IL-17, IL-18 y citoquinas de tipo Th2 tales como IL-3, IL-4, IL-13 y GM-CSF (Lillehoj, 2005). Se producen muchos tipos diferentes de quimiocinas y citoquinas después de la infección primaria y secundaria con *Eimeria spp.* (Lillehoj et al., 2003). Se ha demostrado que los interferones tienen diversos efectos inmunomoduladores en una amplia variedad de tejidos. Los interferones se clasifican en tipo I (IFN- α , - β , - ω y - τ) y tipo II (IFN- γ) (Lillehoj, 2005).

Los macrófagos producen varias citoquinas post-infección. Los esporozoitos y merozoítos de *E. tenella* inducen *in vitro* la producción de un factor similar al factor de necrosis tumoral (FNT) por parte de macrófagos que provienen de sangre periférica. Adicionalmente, los macrófagos muestran producción de interleuquina-1 y FNT- α de forma bifásica, el primer pico se asoció con la patogénesis de la enfermedad y el segundo con el desarrollo de inmuno protección, en forma consecutiva a una infección por *E. tenella* o *E. maxima*. La producción de cantidades significativamente mayores de FNT durante el día 3 a 6 después de la inoculación se correlacionó con la aparición de los cambios fisiopatológicos locales y sistémicos más característicos inducidos por coccidias (Torrubia et al., 2014).

La producción de interferón (IFN) en aves ha sido usada para medir la respuesta de linfocitos T a antígenos coccidiales. Se ha observado que las diferentes especies de *Eimeria spp.* inducen la producción de IFN- γ y, además, su actividad está asociada a la alteración de las células hospedadoras y no sobre los parásitos. También se encuentra un incremento del número de células natural killer (NK), lo cual sugiere que las células NK intraepiteliales pueden estar involucradas en la defensa ante la invasión de coccidios a la mucosa. La inmunidad no previene la invasión de esporozoitos a las células, pero sí puede prevenir continuar con su desarrollo (Yúño & Gogorza, 2008).

Control de la coccidiosis

Distintos métodos se han investigado para la prevención y el control de la coccidiosis aviar (Yúño & Gogorza, 2008; H. D. Chapman, 2011). Dentro de estos manejos encontramos:

- a) Selección genética (capacidad de resistencia). Como ejemplo se tienen dos cepas genéticamente divergentes de líneas de pollo endogámicas, SC (B2B2) y TK (B15B21) (Lillehoj, 2005).
- b) Productos anticoccidianos (ionóforos y químicos)
- c) Vacunación

La profilaxis de la coccidiosis se basa principalmente en el uso de anticoccidianos, que son agentes que se adicionan a los alimentos, con el fin de prevenir el problema (Garcia, 2008). Se pueden clasificar por sus efectos sobre los parásitos en: “coccidiostático” en el cual se observa que el crecimiento intracelular de coccidias se detiene, pero su desarrollo puede continuar después de retirar el medicamento generando inmunidad; y “coccidicida”, donde las coccidias mueren durante su desarrollo al exponerse al fármaco, por lo que inhibe la inmunidad (Torrubia et al., 2014). Otra clasificación es por su origen:

- a) Ionóforos poliéteres: Son los más utilizados y producidos por la fermentación de varias especies de *Streptomyces* spp., y *Actinomadura* spp. Estos fármacos forman complejos liposolubles con cationes, que alteran la permeabilidad de la membrana, facilitan el flujo de iones hacia ella y comprometen el equilibrio osmótico y electrolítico de los microorganismos, lo que conduce a su turgencia y degradación (Nogueira et al., 2009; Sumano et al., 2015). Estos se clasifican en:
 - Ionóforos monovalentes: monensina, narasina, salinomicina, maduramicina y semduramicina.
 - Ionóforos divalentes: lasolacid.

Este grupo afecta a las fases externas (esporozoítos y merozoítos) aunque algunos actúan inhibiendo el desarrollo de la primera generación de esquizontes.

- b) Químicos que son sintéticos, como halofuginona, nicarbazina, dilclazuril.

Hace tres décadas que no se generan nuevos medicamentos anticoccidianos en la industria avícola (Anderson et al., 2005). Se cuenta con 15 drogas disponibles en el mercado, pero la resistencia de las coccidias a todos ellos ha aumentado por su uso prolongado (H. D. Chapman, 2005). Se considera un fenómeno que ocurre habitualmente manifestándose de diferentes formas, resistencia adquirida, cruzada o múltiple (Abbas et al., 2011). Para evitar esto no se

debe usar el mismo coccidiostato durante un periodo prolongado de tiempo, procurando alternarlo con otros, es decir, un programa de rotación de drogas o bien la inmunización (Yuño & Gogorza, 2008; Torrúbia et al., 2014).

Investigaciones actuales, están más enfocadas al desarrollo de vacunas. Hay una serie de factores que contribuye a esta tendencia, como las políticas que restringen el uso de antibióticos en alimentos, el costo de nuevas drogas (Martin W. Shirley et al., 2004), el mal uso de los fármacos, hace que el desarrollo de nuevos anticoccidianos sea poco probable (Torrúbia et al., 2014). Las políticas europeas sobre medicación de animales para consumo son cada vez más estrictas en cuanto al uso de quimioterapia profiláctica y en consecuencia hay un creciente interés en el control inmunológico de la coccidias (Yuño & Gogorza, 2008; Martin W. Shirley et al., 2004;).

Control por vacunación

La idea de vacunar a los pollos contra coccidia se propuso y se probó a mediados y finales de la década de 1920. En 1952, se comercializó la primera vacuna (R. B. Williams, 1998) desde entonces se han comercializado en distintos países un total de casi 20 vacunas vivas diferentes (Torrúbia et al., 2014). Su eficiencia depende de la presencia continua de las reinfecciones sucesivas con ooquistes vacunales producidos tras la infección inicial.

Todas las vacunas disponibles en el mercado, incluida la vacuna de subunidades, se producen en aves. Esto es obligatorio, pues el ciclo biológico completo de *Eimeria spp.* no se puede reproducir en cultivos celulares y solo unas especies son capaces de completarlo en huevos de gallina embrionados.

Para producir vacunas los ooquistes son purificados a partir de las excretas y posteriormente son esterilizados y esporulados, finalmente son conservados en dicromato de potasio (D. P. Conway et al., 1990).

Vacunas disponibles

Vacunas de primera generación, aún ocupan buena parte del mercado, contienen ooquistes no atenuados, totalmente virulentos. Estas vacunas no causan la enfermedad ya que se administra en pequeñas dosis, por lo que es de vital importancia una administración de forma precisa, de lo contrario puede verse afectado el índice de crecimiento y de conversión alimentaria, incluso

pueden aparecer signos clínicos causados por un daño temporal al intestino. Por el otro lado, si no ingieren la cantidad suficiente, el ave quedará desprotegida frente a la infección. Anteriormente el periodo de vacunación estaba asociado con una profilaxis farmacológica, con el fin de limitar consecuencias negativas.

Vacunas de segunda generación, disponibles desde 1989, contienen ooquistes de cepas atenuadas de *Eimeria spp.* La atenuación se logra mediante la selección de cepas precoces o mediante pases seriados en huevos de gallina embrionados. Al usar cepas en su mayoría precoces redundan en menor daño intestinal dando como resultado la atenuación. El principal inconveniente que estas cepas tienen, es una menor capacidad reproductora, por lo que se liberan menos ooquistes, lo que conlleva mayores gastos de producción (McDonald & Shirley, 2009; Torrubia et al., 2014).

Vacuna de subunidades, disponibles desde el año 2000. Esta vacuna contiene antígenos de gametocitos purificados por afinidad a partir del intestino de pollos infectados con *E. maxima* (M. G. Wallach et al., 2008). Su producción se enfrenta a los mismos desafíos que las vacunas vivas. No conocer los antígenos, no ha permitido avanzar en el desarrollo de este tipo de vacunas. Parece que es necesaria una mezcla de antígenos para conferir una inmunidad; dicha mezcla, que en el campo se produce de manera natural, es difícil reproducir en el laboratorio (Blake & Tomley, 2014).

La dificultad radica en la identificación de los antígenos o genes responsables de inmunidad protectora y en el desarrollo de métodos más eficientes de distribución y presentación al sistema inmunitario (Yuño & Gogorza, 2008).

Vacuna de subunidades

Para provocar una respuesta IgG específica rápida y fuerte en pollos contra los antígenos peptídicos, el uso de adyuvantes inmunológicos se considera una de las formas más prometedoras entre las estrategias de inmunización; debido a que los métodos de vacunación tradicionales, típicamente requieren una vacuna de refuerzo, antes de conferir protección total (Kaiser, 2010). Tal plazo es casi imposible en la producción comercial de aves de corral, ya que los pollos de engorda salen a rastro entre las 6 o 7 semanas de edad.

Se han evaluado en mamíferos muchos métodos para mejorar y acelerar las respuestas de anticuerpos contra el antígeno inyectado. Un método consiste en dirigir el antígeno

directamente a CD40 o CD205 en la superficie de las células presentadoras de antígeno (CPA) mediante el uso de anticuerpos *in vivo* (Berry et al., 2003; Hatzifoti & Heath, 2007).

CD40 es una glicoproteína integral de membrana de la super familia de receptores de Factor de Necrosis Tumoral (TNF), es expresada principalmente en las CPA profesionales: macrófagos linfocitos B, y células dendríticas que son responsables de iniciar y amplificar las respuestas inmunes (van Kooten & Banchereau, 1997). El ligando natural para CD40 es CD154 (CD40L) que se expresa transitoriamente en células T CD4+ activadas. La función de CD154 con el receptor CD40 en CPA proporciona la señal crítica necesaria para la activación óptima de éstas, lo que da como resultado una regulación positiva de las moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y CD40, expresión de CD80 / 86 y secreción de citocinas. Estos pasos son fundamentales para el cebado y la expansión óptimos de las células T efectoras y de memoria específicas de antígeno, la respuesta de las células B y el cambio de clase de inmunoglobulina (Chang Hsin Chen et al., 2012).

Tregaskes y col. (2005) identificaron CD40 de pollo (chCD40) y caracterizaron la ligación de chCD40 / chCD40L usando chCD40L recombinante. Chen y col. (2012) describieron por primera vez el desarrollo y caracterización de un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-chCD40 agonista o 2C5, que al igual que un anticuerpo anti-CD40mAb agonista análogo contra CD40 de mamífero, es funcionalmente activo cuando se une específicamente a CD40 en CPA de pollo, lo que causa efectos inmunológicos. El mAb 2C5 estimuló una síntesis significativa de óxido nítrico (NO) en macrófagos HD11 de pollo y estimuló dramáticamente la proliferación de células B DT40 de pollo en suero. El anticuerpo monoclonal 2C5, por lo tanto, es capaz de unirse a estos receptores e iniciar funciones inmunes biológicas, mejorando la respuesta inmune en términos de tiempo, cambio de isotipo (IgA e IgG en cambio de IgM), magnitud y memoria inmunológica, lo que da como resultado una protección más prolongada (Chang Hsin Chen et al., 2012).

Estudios previos han demostrado que el uso de coadyuvantes guiados con anticuerpos anti CD40 de pollo (chCD40) para la vacunación, aumentan en la inmunogenicidad de vacunas de subunidades en aves de corral, con respuestas IgG e IgA significativas de 4 a 7 días después de una administración única de la vacuna (C. H. Chen et al., 2010; Chang Hsin Chen et al., 2012).

Los anticuerpos anti-CD40 se combinan fácilmente con epítomos del péptido de interés para dirigir la respuesta inmune del huésped a un antígeno específico. Este complejo se crea usando streptavidina que es una proteína tetramérica caracteriza por su elevada afinidad por la biotina, como un almacén, lo que permite la formación de dos complejos: uno compuesto de 2 anticuerpos diana y el otro de 2 moléculas peptídica (Barta et al., 2017; Bottje et al., 2013) que previenen la infección por coccidiosis debido a *E. maxima*. Este enfoque representa una vía prometedora para eliminar la necesidad de anticoccidianos químicos.

Epítomos TRAP y MPP

Dirigir los epítomos TRAP y MPP (Barta et al., 2017; Bottje et al., 2013) hacia las CPA del huésped tiene el potencial de dar como resultado un método de inmunización capaz de inducir una respuesta inmune rápida y fuerte, que se requiere para el desarrollo de una vacuna anti-coccidial eficaz.

Una característica morfológica definitiva del Filum Apicomplexa es la presencia de organelos secretores especializados ubicados en la prominencia apical del parásito. Estos organelos son nombrados: micronemas, roptrías y gránulos densos, y contienen muchas de las proteínas clave que median la motilidad del parásito y la invasión celular (Kats et al., 2008).

Todos los Apicomplexa invaden las células del huésped mediante una forma de locomoción dependiente del sustrato, llamada motilidad deslizante, que es impulsada por el motor actina-miosina del parásito ubicado entre la membrana plasmática del parásito y el complejo de la membrana interna (Sibley, 2004). Este motor está conectado a los receptores de la célula huésped a través de proteínas de transmembrana pertenecientes a la familia de proteínas definida por la proteína anónima relacionada con trombospondina (TRAP). La proteína TRAP se almacena dentro de las micronemas de los esporozoítos, se libera sobre la superficie celular en la punta anterior al entrar en contacto con la célula huésped y se transloca al polo posterior del esporozoíto a lo largo de su superficie durante la penetración (Ménard, 2000; Witcombe et al., 2004; Shivaramaiah et al., 2010).

La unión de TRAP a los ligandos del huésped permitiría a los esporozoítos interactuar con sustratos biológicos, proporcionando así al parásito anclajes moleculares. La región transmembrana y la cola citoplasmática podrían unir los dominios extracelulares adhesivos de TRAP con componentes de la maquinaria de locomoción del parásito, como actina y / o

miosina. A medida que el parásito avanza, las moléculas TRAP unidas a los ligandos del huésped son empujadas hacia el extremo posterior del parásito. Un mayor progreso en el deslizamiento requeriría que los complejos TRAP-ligando que se acumulan en el extremo posterior se desprendan de la membrana superficial del parásito (Wengelnik et al., 1999). Mientras que el motor actina-miosina se conserva a través de los parásitos apicomplexan, las proteínas transmembrana son específicas de la especie y del estadio de vida, lo que permite a los parásitos infectar diferentes células huésped utilizando los mismos mecanismos moleculares (Carruthers et al., 1999; Soldati et al., 2001; Morahan et al., 2009; Tyler et al., 2011).

TRAP es una proteína transmembrana de tipo I que contiene un dominio de repetición de trombospondina tipo I (TSR), un dominio A similar al factor de von Willebrand (vWF) y un dominio de cola citoplasmático (CTD) ácido corto. Se encontró por primera vez en *Plasmodium falciparum*, y posteriormente se identificaron homólogos en todas las demás especies de Plasmodium (Robson et al., 1998).

La importancia de TRAP durante la invasión de esporozoitos se demostró en estudios donde se había alterado el gen TRAP, afectando la motilidad de deslizamiento de los esporozoitos y su capacidad de infectar. Es debido a esto, que TRAP se ha investigado con el objetivo de generar inmunidad protectora, ya que los anticuerpos contra TRAP podrían dañar principalmente la motilidad de los esporozoitos y su capacidad para invadir las células huésped (Wengelnik et al., 1999). La presencia de esta familia de proteínas en todo el Filum Apicomplexa los convierte en un elemento potencial para vacunas. Sin embargo, hay informes contradictorios sobre el efecto inhibitorio de los anticuerpos TRAP sobre la invasión de esporozoitos, que van desde fuerte, moderada o ninguna actividad inhibitoria (Morahan et al., 2009).

En *Eimeria* se identifican dos proteínas típicas de la familia TRAP: EtMIC1 en *E. tenella* y EmTFP250 en el caso de *Eimeria maxima* (Jung et al., 2003). EtMIC1 es expresada en esporozoitos y merozoitos, mientras que la expresión de EmTFP250 se limita a las etapas asexuales con ambas proteínas localizadas en las micronemas.

Cuando la proteína del micronema ha sido traslocada al extremo posterior del parásito, debe ser segmentada y liberada de la superficie del parásito con el fin de completar con éxito el proceso de invasión. Esta función es realizada por una familia de proteasas que se expresan de manera constitutiva dentro o sobre la membrana celular del parásito, implicadas en la motilidad en la etapa de esporozoitos/merozoitos. El proceso de clivaje tiene lugar intracelularmente y es

un requisito absoluto para la propagación de la infección. La familia de proteasas involucrada en este proceso se denominan proteasas romboides y están descritas para especies de *Toxoplasma* con homólogos en *Eimeria* y otros Apicomplexa. Las proteasas romboides: ROM4 y ROM5, y MPP (Proteína Proteasa Micronema) están implicadas centralmente en el clivaje de las proteínas de micronema y comparten una buena homología entre los diferentes parásitos de Apicomplexa. La hipótesis es que al emplear la proteasa como blanco inmunológicamente, la unión al anticuerpo podría interferir con el proceso de clivaje y de esa manera alterar la movilidad de los esporozoítos/merozoítos. Una ventaja de usar la MPP como blanco es que la naturaleza conservada de esta proteína entre muchas especies de Apicomplexa la convierte en un blanco adecuado no sólo para *Eimeria*, sino también para otros Apicomplexa (Fetterer et al., 2007; Díaz-Martín & Mondragón-Flores, 2017).

Estudios indican que los anticuerpos de pollo reconocen epítomos que se encuentran altamente conservados (Chang Hsin Chen et al., 2012).

JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia que la coccidiosis tiene sobre la pigmentación cutánea, la producción del pollo de engorda y su comercialización, el uso de anticoccidianos se ha empleado como método de control, sin embargo, con el paso del tiempo la resistencia a todos ellos se ha presentado. Aunado a esto, algunos consumidores de carne se preocupan por el uso de fármacos empleados en las dietas para aves, ejerciendo presión para disminuir o erradicar su uso. De ello surge la necesidad de buscar alternativas a su empleo, como son las vacunas. Recientemente se ha comenzado el uso de vacunas elaboradas con subunidades inmunogénicas de *Eimeria spp.* capaces de generar inmunidad y mantener un intestino sano.

Con base en estos antecedentes, se propone evaluar el uso de una vacuna conformada por dos epítomos inmuno protectores encontrados en *E. maxima*, denominados TRAP y MPP, junto con un adyuvante guiado por anticuerpos (anti- chCD40), que se plantea brindara protección contra *E. maxima*.

METODOLOGÍA GENERAL

Manejo de los animales y dietas

Los procedimientos de manejo a los que se sometieron las aves de los presentes experimentos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y el Uso de los Animales Experimentales (CICUAE-FMVZ-UNAM) con el número de protocolo: MC-2018/2-10 y con base en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Análisis de suero, plasma y heces

El análisis de las muestras de suero para medir IgA e IgG, cantidad de xantofilas en plasma, y examen cuantitativo de ooquistes en excretas se realizaron en el laboratorio de diagnóstico del Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves (DMZA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM.

EXPERIMENTO 1

Objetivo general

Evaluar el efecto de la infección de *E. maxima* en diferentes dosis, sobre los parámetros productivos, la concentración de xantofilas plasmáticas y la pigmentación cutánea en pollos de engorda machos, para seleccionar una dosis desafío que permita evaluar la eficacia de una vacuna de subunidades.

Objetivos particulares

- Evaluar la ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia del pollo de engorda después de la infección con cuatro diferentes títulos infectantes de *E. maxima*.
- Analizar el efecto de la infección con *E. maxima* con cuatro diferentes títulos infectantes y su efecto en la pigmentación del pollo de engorda macho, mediante la evaluación de la concentración plasmática de xantofilas, la pigmentación cutánea, el conteo de ooquistes en excretas y la severidad de lesiones macroscópicas en el intestino.
- Seleccionar una dosis desafío para evaluar el prospecto de vacuna.

Hipótesis

Al incrementar las concentraciones de ooquistes de *E. maxima* inoculadas, se afectarán más los parámetros productivos, la concentración de xantofilas plasmáticas, la pigmentación cutánea; y se incrementará la severidad de las lesiones en intestino medio. Al observar este comportamiento se podrá evaluar la mejor dosis de desafío para evaluar el prospecto de vacuna.

MATERIAL Y MÉTODOS

La prueba se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (C.E.I.E.P.Av.) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizado en la calle de Manuel M. López s/n, Colonia Santiago Zapotitlán, Delegación Tláhuac, Ciudad de México, México. El centro está ubicado a una altura de 2250 msnm en el paralelo 19°18'15" latitud norte y el meridiano 99° 03'15" longitud oeste. El clima es de tipo templado subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media ($C(w_1)$), el mes más frío es enero y mayo el más caluroso, su temperatura promedio anual es de 16°C y la precipitación pluvial anual media de 747 mm (INEGI, 2017).

Manejo de los animales y dietas

Se utilizaron 200 pollos de engorda machos de la estirpe Ross 308 de 21 a 42 días de edad, con un peso promedio de $750 \pm 194.38\text{g}$, los cuales se distribuyeron aleatoriamente en 5 tratamientos, cada uno con 4 réplicas de 10 aves. Las aves fueron alojadas en jaulas de finalización en batería (Petersime brood-unit®) de 4 niveles con tres jaulas cada nivel, (12 jaulas por batería), proporcionando $0.441\text{m}^2/\text{ave}$ ($14.08\text{kg}/\text{m}^2$) nombrada como "batería A" y en jaulas con $0.70\text{m}^2/\text{ave}$ ($14.08\text{kg}/\text{m}^2$) con 10 jaulas individuales nombrada como "batería B".

Las aves se alimentaron con una dieta con base en sorgo + pasta de soya durante la fase de iniciación (días 0 a 10 días), crecimiento (11 a 20 días) y finalización (21 a 42 días), las dietas se formularon cubriendo las necesidades nutricionales que marca la estirpe Ross 308 (Aviagen, 2019) (Cuadro 1). En la dieta de crecimiento se agregaron 20 ppm (partes por millón) y en la de dieta de finalización 80 ppm de pigmento, brindando un total de 100 ppm. El alimento y el agua se ofrecieron a libre acceso durante todo el experimento.

Los tratamientos fueron:

- 1) Testigo.
- 2) Inoculación con 9.625×10^1 de ooquistes esporulados de *E. maxima*.
- 3) Inoculación con 9.625×10^2 de ooquistes esporulados de *E. maxima*.
- 4) Inoculación con 9.625×10^3 de ooquistes esporulados de *E. maxima*.
- 5) Inoculación con 9.625×10^4 de ooquistes esporulados de *E. maxima*.

Cuadro 1. Composición de las dietas (kg) experimentales empleadas para evaluar el efecto de *E. maxima*, en pollo de engorda desafiado a los 21 días de edad.

Ingrediente	Iniciación (0-10 d)	Crecimiento (11-20 d)	Finalización con coccidiostato	Finalización sin coccidiostato
Sorgo	566.200	620.049	657.079	657.579
Pasta de soya	378.714	317.933	270.982	270.982
Aceite vegetal	15.839	23.919	34.278	34.278
Carbonato de calcio	13.543	12.172	11.177	11.177
Monofosfato de calcio	10.286	8.673	6.748	6.748
Sal	3.800	3.830	2.034	2.034
DL-Metionina 99	3.343	3.379	2.997	2.997
Vitaminas y minerales ¹	2.500	2.500	2.500	2.500
L-Lisina HCl	2.286	2.928	2.967	2.967
Secuestrante	2.000	2.000	2.000	2.000
L- treonina	0.686	0.782	0.568	0.568
Bacitracina BMD	0.550	0.550	0.550	0.550
Antioxidante	0.150	0.150	0.150	0.150
Fitasa ²	0.100	0.100	0.100	0.100
Pigmento amarillo natural ³	0	0.770	2.230	2.230
L-Arginina	0	0.267	0.310	0.310
Salinomicina sódica	0	0	0.500	0
Bicarbonato de sodio	0	0	2.582	2.582
Total	1000	1000	1000	1000
		Análisis calculado		
Energía Metabolizable, Kcal/kg	3000	3100		3200
Proteína cruda, %	24	21.5		19.5
Lisina Digestible, %	1.310	1.213		1.101
Triptófano Digestible, %	0.278	0.267		0.240
Metionina Digestible, %	0.642	0.618		0.558
Grasa cruda, %	3.433	4.322		5.408
Fibra cruda, %	3.064	2.862		2.697

¹Vitaminas (cantidad por kg): Vitamina A 4,667,000 kUI, vitamina D₃ 1,500,000 kUI, vitamina E 23,333,500 mg, vitamina K₃ 1,333,275 mg, vitamina B₁ 1,000,040 mg, vitamina B₂ 3,666,400 mg, vitamina B₆ 1,333,320 mg, vitamina B₁₂ 8,330 mg, nicotinamida 26,667,000 mg, ácido pantoténico 8,333,100 mg, ácido fólico 666,400 mg, biotina 66,700 mg, cloruro de colina 199,999,800 mg, cobre 5,000,000 mg, hierro 26,666,800 mg, manganeso 41,333,540 mg, yodo 400,000 mg, zinc 36,666,720 mg, selenio 100,000 mg, carbonato de calcio 216,000 g, aceite mineral 5,000 g.

²Fitasa Ronozyme® Hyphos (GT).

³Florafil 93 powder Vepinsa 30g/kg mínimo de xantofilas totales.

Toma de muestras basales

El día 20 de edad se tomaron muestras basales para medir xantofilas en plasma, se tomaron dos mililitros de sangre con 10% de etilendiaminotetracetato (EDTA) de la vena yugular derecha a dos aves por réplica; además se midió amarilleamiento en piel (b^*) de la zona aptérica lateral derecha en las mismas dos aves, y muestra de excretas de al menos 5 aves por réplica para confirmar ausencia de ooquistes de *Eimeria* spp. en heces por medio de la técnica de McMaster (Haug et al., 2006).

Inoculación

Al día 21 de edad las aves de los tratamientos 2 al 5 fueron desafiadas individualmente con diferentes títulos de *E. maxima* (9.625×10^1 OEEEm, 9.625×10^2 OEEEm, 9.625×10^3 OEEEm, 9.625×10^4 OEEEm) utilizando una sonda esofágica que llegó al buche de las aves, con un volumen total de 1 mL/ave, el tratamiento testigo no fue inoculado.

Variables productivas

Se llevaron registros semanales de las principales variables productivas durante 6 semanas. Se determinaron los valores promedio por réplica de las variables: ganancia de peso (g), consumo de alimento ave (g) y conversión alimentaria (kg:kg). Todas las variables fueron corregidas por la mortalidad.

Colección de muestras de sangre

Las muestras se tomaron a los 26, 28, 30, 32, 35, 39, 42 días de edad. Se seleccionaron al azar tres aves por réplica a las cuales, se les tomaron dos mL de sangre con 10% de EDTA de la vena yugular derecha. Las muestras se depositaron en tubos forrados de papel aluminio para protegerlos de la luz, se colocaron y transportaron en refrigeración hasta su análisis. La evaluación de la concentración de xantofilas amarillas en plasma se realizó de acuerdo con la técnica de Allen (1987).

Medición de pigmento en piel

Se midió el amarillamiento cutáneo (b^*) *in vivo* en la zona aptérica lateral derecha (vena de la grasa), con un colorímetro de reflectancia Minolta CR 400® (Martínez, 1997) los días 26, 28, 30, 32, 35, 39, 42 de edad a tres aves por réplica.

Colección de heces

Se colectaron muestras de excretas de al menos 5 aves a los 26, 28, 30, 32 y 35 días de edad, de todos los tratamientos y réplicas, para el conteo de ooquistes por medio de la técnica de McMaster (Haug et al., 2006).

Evaluación de lesiones

La evaluación de la severidad de las lesiones macroscópicas en el intestino medio (yeyuno) asociadas a coccidiosis por *E. maxima*, se llevó a cabo con base en la escala de Johnson y Reid (1970) a dos aves por réplica. Estas fueron sacrificadas de acuerdo con lo mencionado por la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres, a los 28 y 35 días de edad.

Tratamientos

Se dio tratamiento con toltrazuril al 2.5% al grupo testigo, en agua de bebida a una dosis de 1 mL por litro (25 mg/l) a los 27, 28, 34, 35, 41 y 42 días de edad para evitar contaminación con coccidias durante la fase experimental.

Análisis estadístico

Al final del estudio las variables productivas: consumo de alimento (g), ganancia de peso (g), conversión alimentaria (kg:kg) se analizaron con un diseño completamente al azar empleando como covariable el peso inicial (peso a la 3^{ra} semana de edad), y como bloque, el lugar donde finalizaron los pollos (lugar). Mediante el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + b(x_i - X) + Z_j + \varepsilon_{ij} \quad i=1, 2, 3, 4 \text{ y } 5 \quad j= 1, 2, 3 \text{ y } 4$$

Donde:

Y_{ij} = Variables productivas

μ = media general

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

$b(x_i - X)$ = Covariable peso inicial de los pollos

Z_j = lugar de crianza de los pollos

ε_{ij} = Error experimental

El amarilleamiento a los 42 días de edad se evaluó mediante un diseño completamente al azar, conforme al siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij} \quad i=1, 2, 3, 4 \text{ y } 5 \quad j= 1, 2, 3 \text{ y } 4$$

Donde:

Y_{ij} = Amarilleamiento (b^*), enrojecimiento (a^*) y luminosidad (l^*)

μ = media general

T_i = Efecto la i-esima dosis infectante de *Eimeria maxima*

ε_{ij} = Error experimental

Las diferencias entre medias de los tratamientos se determinaron con la prueba de Tukey con una $P < 0.05$ con el programa computacional SPSS versión 21.0 para Windows (Kuehl, 2001).

Antes de hacer el análisis de las regresiones lineales múltiples, las dosis infectantes de *E. maxima* se transformaron mediante la siguiente fórmula:

$$\log N (\text{dosis infectante} + 1)$$

A los datos obtenidos de los parámetros productivos y el amarilleamiento de la piel *in vivo* obtenidos al final de la prueba (42 días de edad) se les realizó una regresión lineal múltiple.

Mediante la siguiente ecuación:

$$Y = b_0 + b_1 * DI + b_2 * DI^2 + b_3 * L$$

Donde:

Y= parámetro productivo, amarilleamiento (b^*), enrojecimiento (a^*) y luminosidad (l^*)

$b_0, b_1, b_2,$ y b_3 = Coeficientes de regresión

DI= Dosis infectante transformada

L= Lugar crianza (0= batería A; 1= batería B)

Los datos semanales de amarilleamiento, enrojecimiento, luminosidad de piel *in vivo* y XP, se evaluaron conforme al siguiente modelo:

$$Y = b_0 + b_1 * DI + b_2 * DI^2 + b_3 *$$

Donde:

Y= parámetro productivo, amarilleamiento (b^*), enrojecimiento (a^*) y luminosidad (l^*), XP

$b_0, b_1, b_2,$ y b_3 = Coeficientes de regresión

DI= Dosis infectante transformada

No se incluyó en el modelo al lugar debido a que este no fue estadísticamente significativo.

Para analizar la severidad de las lesiones observadas en intestino medio, solo se utilizó la moda, y el número de ooquistes en excretas se analizó por medio de la prueba de Kruskal-Wallis mediante una ji-cuadrada, como método no paramétrico con un $p < 0.05$.

Se utilizó el programa JMP™ *Design of Experiment*, versión 8.0 para el análisis estadístico.

RESULTADOS

El desempeño productivo acumulado de las aves durante el periodo de experimentación (21 a 42 días de edad) se muestra en el Cuadro 2. No se encontró diferencia estadística significativa en la ganancia de peso para ninguno de los niveles de infección ($p=0.073$). Efecto que también se observó en conversión alimentaria ($p=0.073$). Se encontró una correlación (R^2) de 48.63% entre las diferentes dosis de *E. maxima*.

El promedio del consumo acumulado de los tratamientos 2, 3, y 4 fue de 3559.6g por ave, sobrepasando el consumo del tratamiento testigo (3019.8g) en un 17.9%, mientras que el tratamiento con la dosis inoculada más alta (9.625×10^4 OEEEm) se mantuvo por debajo del grupo testigo un 7% (2809.7g). Se observó que los tratamientos 2 (9.625×10^1 OEEEm) y 4 (9.625×10^3 OEEEm), presentaron el mayor consumo de alimento con 3589.1g y 3559.1g, respectivamente; el tratamiento 5 (9.625×10^4 OEEEm) fue el que consumió menos alimento (2809.7 g) y el tratamiento testigo y el tratamiento 3 (9.625×10^2 OEEEm) mostraron un consumo similar (3019.8g y 3530.1g respectivamente) ($p>0.05$). Se encontró una correlación entre la dosis de infección de *E. maxima* y el consumo de alimento/ave donde al ir incrementando el título de OEEEm el consumo se disminuyó ($R^2= 59.73\%$; $p=0.001$).

El consumo de pigmento acumulado presentó el mismo comportamiento que la variable consumo de alimento, por lo tanto, también fue estadísticamente diferente ($p=0.024$). Se observó un consumo parecido en los tratamientos 1 (testigo), 2 (9.625×10^1 OEEEm) y 3 (9.625×10^2 OEEEm), con un promedio de 290 mg. El grupo 4 (9.625×10^3 OEEEm) se mantuvo con el mayor consumo (306mg), contrario al tratamiento 5 (9.625×10^4 OEEEm) el cual mostró el menor consumo de pigmento (246 mg). La correlación que hay entre el título de infección con *E. maxima*, y el consumo de pigmento, está relacionada directamente con el consumo de alimento, el cual se ve afectado por el título de ooquistes de *E. maxima*, por lo que al disminuir el consumo de alimento de igual forma disminuye el pigmento ingerido ($R^2 = 64.08\%$; $p=0.0008$).

No se encontró diferencia estadísticamente significativa en las unidades de luminosidad (l^*) ($p=0.12$) y de enrojecimiento (a^*) ($p=0.38$). En cuanto al amarilleamiento cutáneo *in vivo* (b^*), la mejor pigmentación se observó en el grupo testigo con 15.8 unidades, todos los demás

Cuadro 2. Parámetros productivos del día 21 al 42 de edad en pollos infectados con una de cuatro dosis diferentes de *E. maxima*.

Tratamientos	Ganancia de peso, g	Consumo de alimento/ave, g	Conversión alimentaria, kg:kg	Consumo de pigmento, mg
1) Testigo	1864.7	3019.8 ^{ab}	1.589	258 ^{ab}
2) 9.625 x 10 ¹	2437.0	3589.6 ^{ab}	1.224	309 ^{ab}
3) 9.625 x 10 ²	1751.2	3530.1 ^{ab}	2.058	304 ^{ab}
4) 9.625 x 10 ³	1691.8	3559.1 ^a	2.121	306 ^a
5) 9.625 x 10 ⁴	1182.7	2809.7 ^b	2.243	246 ^b
EEM	195.99	181.4	0.148	14
P=	0.073	0.035	0.073	0.024
R ²	48.63	59.73	26.87	64.08
EEM	211.56	191.82	0.198	15
P=	0.011	0.001	0.160	0.0008

Se utilizó el peso a la 3ra semana como covariable (750 ± 194.38g)

Diferente letra en una misma columna muestra diferencia estadística significativa (p<0.05)

EEM= Error estándar de la media

Cuadro 3. Valores de amarillamiento (b*), enrojecimiento (a*) y luminosidad (I*) cutánea medidos con el espectrofotómetro de reflectancia Minolta, así como de xantofilas en plasma en pollo de engorda del día 21 al 42 de edad desafiados con *E. maxima*

Tratamiento	I*	a*	b*	Plasma (µg/mL)
1) Testigo	70.0	3.0	15.8 ^a	31.291 ^a
2) 9.625 x 10 ¹	67.0	2.3	11.6 ^b	23.543 ^b
3) 9.625 x 10 ²	69.0	2.2	11.3 ^b	22.044 ^b
4) 9.625 x 10 ³	69.6	2.7	10.7 ^b	18.183 ^c
5) 9.625 x 10 ⁴	69.1	3.3	10.7 ^b	14.963 ^d
EEM	2.49	1.6	2.8	0.97
P=	0.12	0.38	<0.0001	<0.0001
Correlación				
R ²	0.02	0.03	14.28	0.67
EEM	2.6	1.59	2.36	1.36
P=	0.67	0.54	0.017	<0.0001

Diferente letra en columna muestra diferencia estadística (p<0.05)

EEM= Error estándar de la media

tratamientos pigmentaron de forma similar manteniendo valores en un rango de 11.6 unidades en el tratamiento 2, hasta 10.7 unidades en tratamiento 5 (p<0.0001) (Cuadro 3).

En la Figura 2 se puede apreciar el comportamiento que tuvo el consumo de pigmento a lo largo del experimento. El consumo de pigmento en el tratamiento testigo al final del experimento fue de 81mg. Al hacer la comparación con los demás grupos se observó que en los tratamientos 2 (9.625 x 10¹ OEEem), 3 (9.625 x 10² OEEem) y 4 (9.625 x 10³ OEEem) aumentaron el consumo de pigmento en 13mg, 14mg y 15mg, respectivamente, mientras tanto el grupo 5 (9.625 x 10⁴ OEEem) solo incrementó 10mg (p<0.001). Al medirse el consumo por día en cada tratamiento, en promedio se consumían 4mg (R²= 86.93, EEM= 0.012, P<0.001).

$$\text{Consumo de pigmento (mg)} = -0.27 + 0.0040 * \text{Dosis infectante} - 0.0002 * \text{Dosis infectante}^2 + 0.018 * \text{Edad} - 0.00023 * \text{Edad}^2$$

$$R^2 = 86.93, \text{ EEM} = 0.012, P < 0.001$$

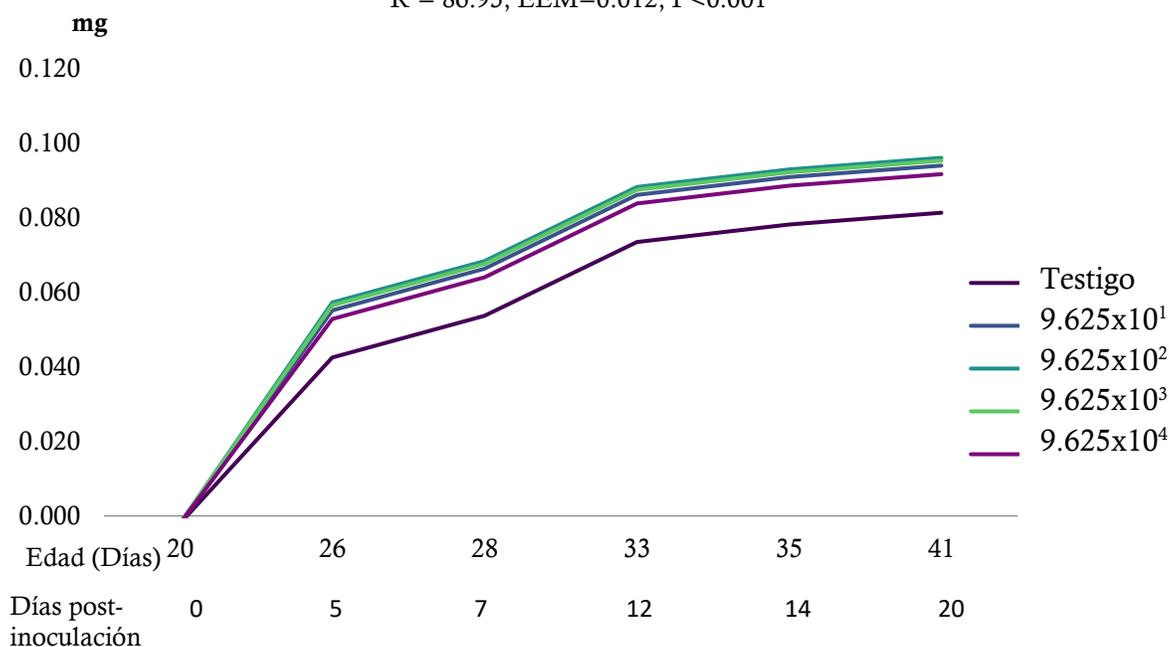


Figura 2. Consumo de pigmento semanal del día 20 al 42 de edad en pollos de engorda desafiados con diferentes títulos de *E. maxima*.

La concentración de xantofilas plasmáticas en el tratamiento testigo presentó un comportamiento lineal, con un incremento promedio de 0.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por día. Los tratamientos infectados presentaron una disminución en la concentración de xantofilas plasmáticas durante los primeros 4 dpi, de 0.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el grupo con 9.625×10^1 OEEem, hasta 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con 9.625×10^4 OEEem. Posteriormente a partir del día 25 hasta el 42 de edad las aves mostraron una recuperación en la concentración de las xantofilas, donde en promedio absorbían 0.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por día. A pesar de que se aprecia un aumento en la concentración de XP en los tratamientos infectados, ninguno logró alcanzar al tratamiento testigo a los 42 días de edad (16.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs 9.47 - 7.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ($R^2=61.50$. EEM= 1.06, $P<0.01$) (Figura 3).

Al final de la prueba las aves del tratamiento testigo absorbieron 254.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el grupo 2 (9.625×10^1 OEEem) 138.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$, grupo 3 (9.625×10^2 OEEem) 119.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, grupo 4

(9.625×10^3 OEEem) 107.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y finalmente el grupo 5 (9.625×10^4 OEEem) 95.28 $\mu\text{g}/\text{mL}$, los grupos desafiados dejaron de absorber 5.97 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por día (Figura 3).

$$\begin{aligned} \text{Xantofilas plasmáticas} &= 68.43 - 2.18 * \text{Dosis transformada} + 0.91 * \text{Dosis transformada}^2 - \\ & 6.67 * \text{Edad} + 0.223 * \text{Edad}^2 - 0.0023 * \text{Edad}^3 \\ & R^2=61.505, \text{ EEM}=1.06, P<0.01 \\ \text{Xantofilas plasmáticas} &= -15.0 + 1.19 * \text{Edad} - 0.01 * \text{Edad}^2 \\ & R^2=59.8, \text{ EEM}=1.07, P<0.0001 \end{aligned}$$

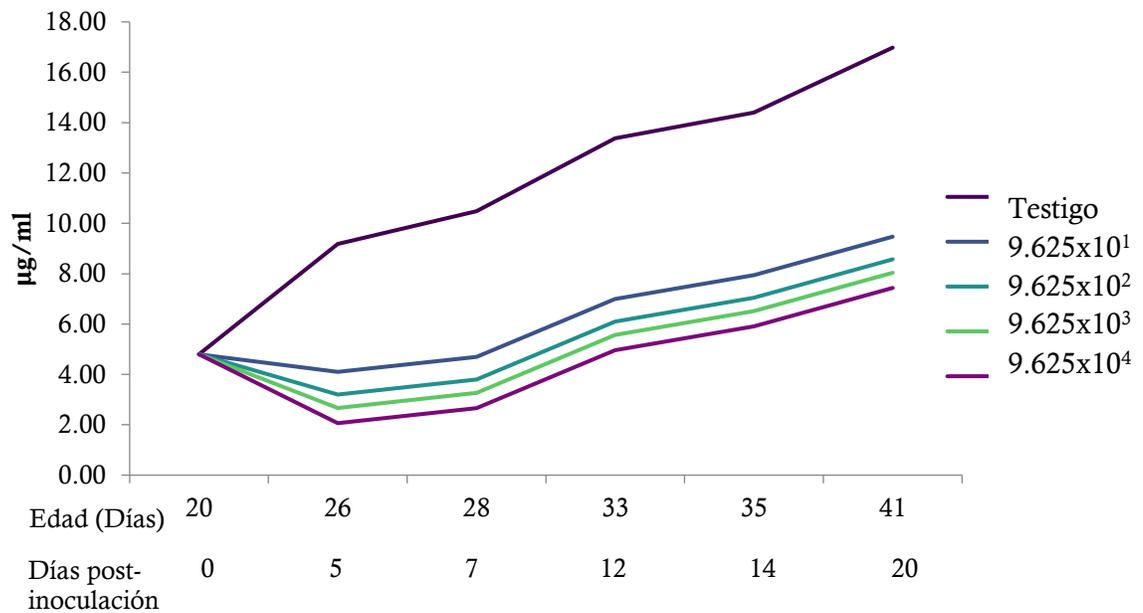


Figura 3. Concentración de xantofilas plasmáticas ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en pollos de engorda desafiados con diferentes títulos de *E. maxima* a los 21 días de edad.

El consumo de pigmento y las xantofilas en plasma afectan de forma directa las unidades de amarilleamiento; observando un comportamiento ascendente en las unidades b* en el tratamiento testigo, aumentando 0.10 unidades b* con cada día de edad transcurrido, llegando a un valor de 13 unidades b* (R²=74.39, EEM= 1.53, P<0.001).

Sin embargo, este comportamiento se ve modificado al estar presente una infección causada por *E. maxima*, al término de la prueba se encontró que en promedio se pueden perder desde 4.47 unidades b* con una dosis de 9.625x10¹ OEEem, hasta 6.1 unidades b* con una dosis de 9.625x10⁴ OEEem, tal efecto se aprecia mejor hasta el día 33 de edad (Figura 4) (R²=51%; EEM=2.00; P<0.0001).

$$b^* = 292.90 + 1360.4 * \text{Consumo de pigmento} - 6.13 * \text{Dosis} - 15.4 * \text{Edad} + 0.408 * \text{Dosis}^2 - 0.00065 * \text{Dosis}^3 + 0.0034 * \text{Edad}^3 + 0.39 * \text{Xantofilas plasmáticas}$$

R²=51%; EEM=2.00; P<0.0001

$$b^* = 8.23 + 0.10 * \text{Edad} + 77.5 * \text{Consumo de pigmento} - 0.58 * \text{Xantofilas plasmáticas}$$

R²= 74.39%, EEM= 1.53, P<0.001

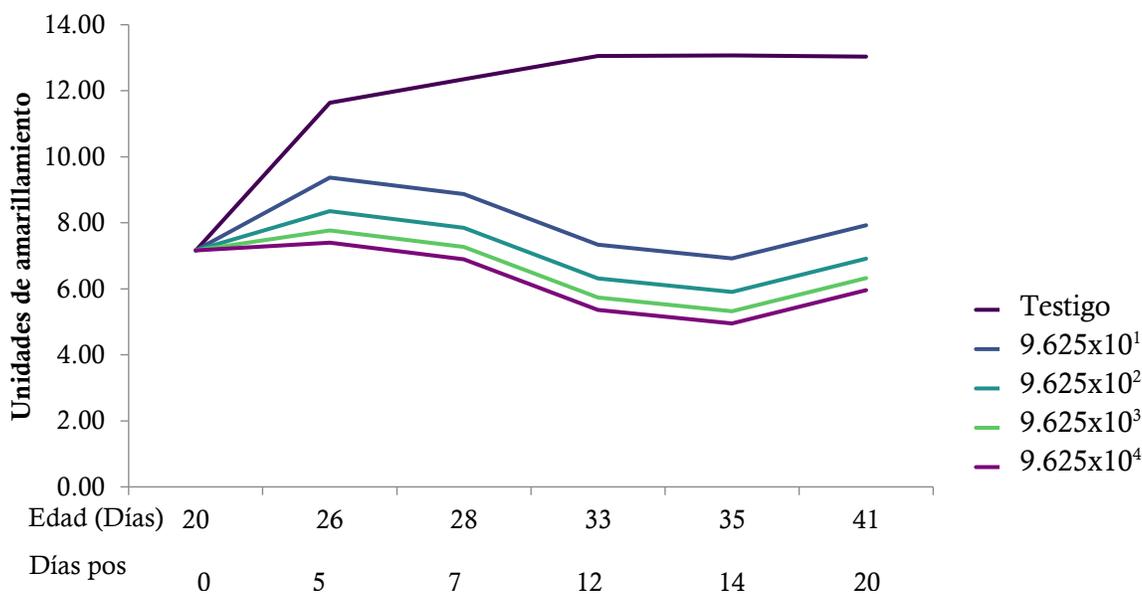


Figura 4. Pigmentación cutánea (b*), del día 0 al día 20 post-inoculación en pollos de engorda desafiados con diferentes títulos de *E. maxima*.

Se observa una tendencia en la recuperación de la pigmentación cutánea *in vivo* de las aves, sin embargo, ninguno de los tratamientos desafiados logra igualar al tratamiento testigo (13 vs 7.93 a 5.96 unidades b*) ($R^2=51\%$, EEM=2.00, $P<0.0001$).

En el conteo de ooquistes en heces es evidente observar que el día 7 post-inoulación (28 de edad) hubo en promedio una mayor excreción de ooquistes por gramo de heces en los tratamientos con 9.625×10^3 OEEem y 9.625×10^4 OEEem (276,975 OEEem/g), en comparación con los tratamientos 2 (147, 025 OEEem/g) y 3 (238,388 OEEem/g). Al día 12 post-inoculación, la eliminación de ooquistes en excretas disminuyó de forma abrupta, este comportamiento continuo hasta el día 20 de post-inoculación llegando a ser casi nula (Cuadro 4 y Figura 5).

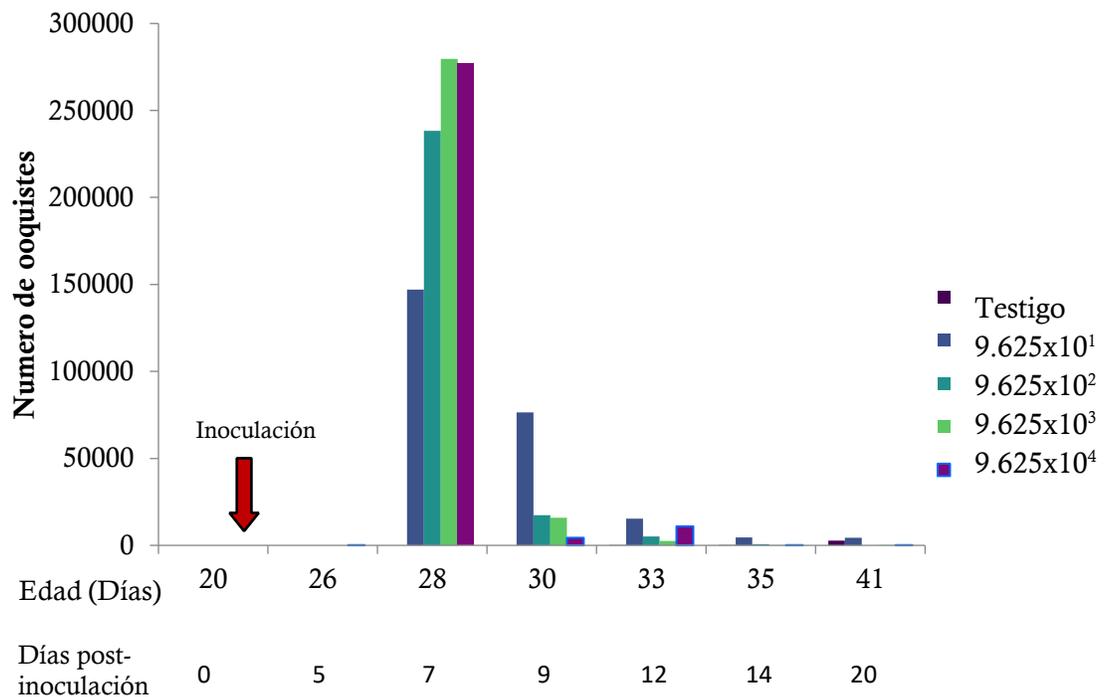


Figura 5. Promedio de ooquistes excretados por gramo de excretas (en miles), en pollos de engorda inoculados con diferentes títulos de *E. maxima* a los 21 días de edad.

Cuadro 4. Resultados semanales de conteo de ooquistes en pollos de engorda desafiados con diferentes títulos de *E. maxima* al día 21 de edad.

Tratamiento	Días post-inoculación							Promedio
	0 (20)	5 (26)	7 (28)	9 (30)	12 (33)	14 (35)	21 (42)	
Testigo	0	0	0 ^a	0 ^a	200 ^a	25 ^a	2650 ^a	411 ^a
9.625x10 ¹	0	0	147025 ^b	76406 ^b	15375 ^b	4575 ^b	4375 ^a	35394 ^b
9.625x10 ²	0	0	238387 ^b	17437 ^b	5119 ^a	731 ^a	0 ^b	37382 ^b
9.625x10 ³	0	0	279675 ^b	15825 ^b	2569 ^b	187 ^a	75 ^b	42619 ^b
9.625x10 ⁴	0	50	276975 ^b	4444 ^b	10950 ^a	100 ^a	12 ^b	41790 ^b
EEM			4.168	4.168	4.182	4.161	3.914	4.183
P=			0.034	0.003	0.028	0.007	0.013	0.048

Diferente letra en columna muestra diferencia estadística (p<0.05)

EEM=Error estándar de la media.

Los valores entre paréntesis equivalen a los días de edad del pollo de engorda.

Las lesiones macroscópicas observadas en intestino medio del día 28 al 41 de edad en los pollos de engorda inoculados con diferentes títulos de *E. maxima* se muestran en la Figura 6. Los únicos tratamientos que mostraron diferentes grados de lesiones fueron los grupos con 9.625x10³ OEE m y 9.625 x10⁴ OEE m. Ambos tratamientos presentaron lesiones con una moda de 1+ y 2+ en escala de Johnson y Reid (1970) y para el día 14 post-inoculación se observó en mayor proporción lesiones de tipo 2+. Solo en el tratamiento con mayor número de ooquistes inoculados (9.625x10⁴ OEE m) persistieron lesiones de tipo 1+ hasta el día 20 post-inoculación (41 días de edad).

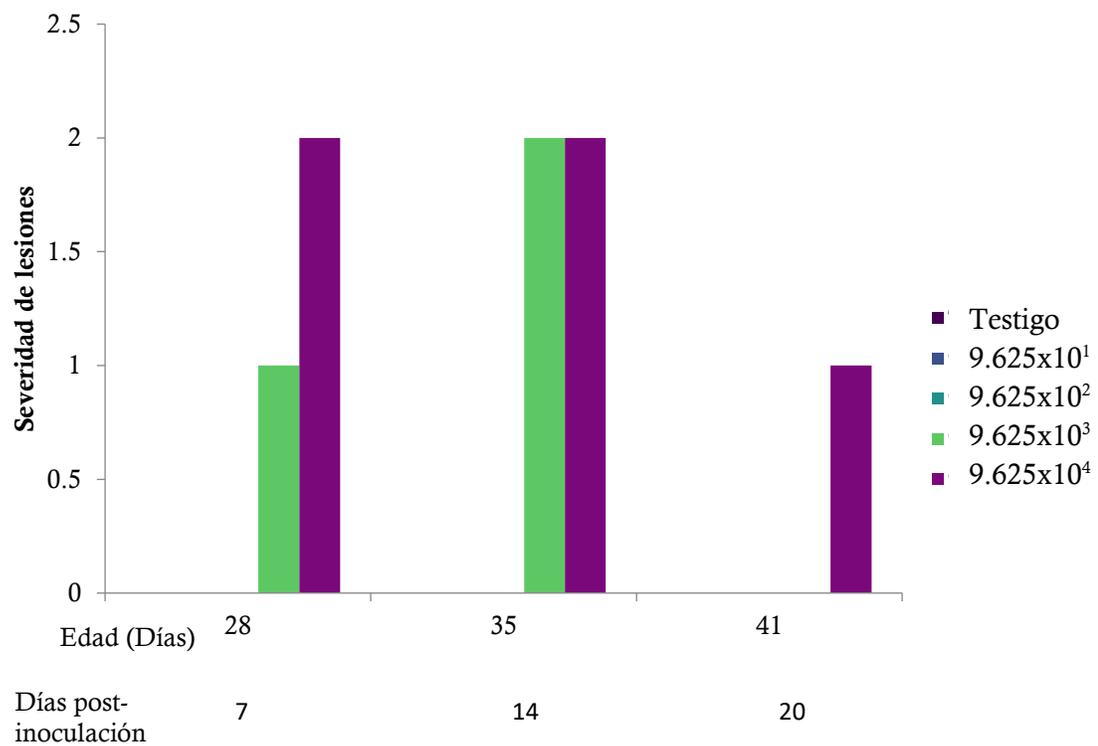


Figura 6. Severidad de lesiones intestinales en intestino medio en pollos de engorda inoculados con diferentes títulos de *E. maxima* a los 21 días de edad.

DISCUSIÓN

En la prueba realizada los animales que fueron desafiados con *E. maxima* incrementaron su consumo de alimento un 17.9% en comparación al grupo testigo, afectando probablemente de forma positiva a la ganancia de peso, como en la prueba realizada por Kipper y col.(2013) en donde mostraron que al aumentar un 5.9% el consumo de alimento en aves infectadas con *E. maxima*, la ganancia de peso se puede recuperar y no verse tan afectada. Por lo que, debido a esto no se observó diferencia estadística en las variables ganancia de peso y conversión alimentaria (Cuadro 2). A este efecto se le suma el hecho de que *E. maxima* puede auto limitarse, y al pasar los primero 8 dpi (días post-inoculación) hay un crecimiento compensatorio de los animales infectados (Chapman et al., 1982). Los resultados obtenidos en ganancia de peso y conversión alimentaria fueron similares a los obtenidos por otros autores (Allen, 1997; Zulpo et al., 2007; Pollock et al., 2014).

El consumo de pigmento depende directamente del consumo de alimento (Cuadro 2). Los grupos 2, 3 y 4, consumieron 21.4% más pigmento que el grupo testigo, esto debido a la mala absorción de los nutrientes resultado del daño ejercido por *E. maxima* sobre la mucosa del intestino medio, y como respuesta se aprecia el incremento en el consumo de alimento para compensar lo no absorbido (Larry et al., 2013). Contrario a lo observado en el tratamiento 5 mostrando un menor consumo de pigmento que el testigo, debido a la mayor cantidad de ooquistes esporulados de *E. maxima* inoculados, que provocaron un daño más severo sobre el segundo tercio del intestino ocasionando malestar en las aves, lo que contribuyó a que se encontraran deprimidas, y bajara su consumo de alimento (Conway et al., 1993; Larry et al., 2013) (2809.7 vs 3019.8) (Figura 2).

Los resultados obtenidos del consumos de pigmento en la prueba se encontraban en un rango de 246 a 309 mg/ave hallándose dentro de los valores normales que menciona Muñoz-Díaz y col. (2012), por lo que aparentemente el consumo de pigmento no fue completamente alterado.

Los valores de XP que se obtuvieron en el tratamiento testigo (Figura 2) (16.9 µg/mL) fueron muy similares a los obtenidos en los tratamientos testigos de Hernández y col. (2014) (15 µg/mL), lo cual nos habla de un buen estado de salud en las aves que se encontraban en el grupo testigo.

A partir del día 6 hasta el día 12 post-inoculación se apreció una reducción en la presencia de XP en los diferentes grupos desafiados, mismo comportamiento que se observó en la prueba realizada por Stephens y col. (1976) donde hubo pérdidas de XP del día 6 al 14 post- inoculación (Figura 3). La absorción de XP se vio afectada en un 46% con el título más bajo inoculado (9.625×10^1 OEE_m), y hasta un 63% con el título más alto inoculado (9.625×10^4 OEE_m), resultados que coinciden con los obtenidos por Ruff y col. (1974) quienes utilizaron un título de ooquistes esporulados de *E. maxima* similar (10×10^2) (Figura 3). En otra prueba realizada por Bletner y col. (1966) obtuvieron una reducción de hasta un 38% en las XP el mismo rango de días con una dosis mayor que la empleada en el presente experimento (10×10^4 vs 9.625×10^4 OEE_m). Esta diferencia entre el presente estudio y los resultados obtenidos por Bletner y col. (1966) podría deberse a la diferencia entre las cepas empleadas (Teixeira & Meleiro, 2008). Esta alteración en la absorción de las XP se debe al daño ocasionado por la coccidia, principalmente por las fases de esquizogonia y merogonia que se llevan a cabo dentro de los enterocitos, produciendo descamación, daño en la mucosa y submucosa intestinal, por lo que se pierde la correlación entre la proporción de vellosidades y criptas que afecta directamente en la digestión y absorción de nutrientes y pigmento (Montagne et al., 2003; Freitas, 2014).

No solo fue el evidente daño sobre la mucosa intestinal el que influyo para que no se logaran igualar las concentraciones de xantofilas plasmáticas entre el tratamiento testigo y los tratamientos que fueron desafiados (Figura 2), este daño está acompañado de una cascada de eventos que se desencadenan a partir de las lesiones en el intestino. Se ha visto una ligera hipoproteinemia en la fase aguda de la enfermedad (4-11 dpi) en aves infectadas con *E. maxima* (Chapman et al., 1982; Freitas, 2014), ésta disminución en la absorción de proteínas, se relaciona con una reducción en el pH intestinal provocado por la coccidia, lo que hace que se retarde la acción de las enzimas hidrolasas (Ruff & Wilkins, 1980), o provoque cambios en la expresión de enzimas digestivas y transportadores de nutrientes en yeyuno; afectando la síntesis de proteínas transportadoras y la absorción de lípidos, por lo que se tendrá un déficit en la absorción de xantofilas (Fernando & McCraw, 1973; Su et al., 2015). Una de las principales lipoproteínas afectadas por estos cambios son las HDL la cuales contienen una fracción conocida como apolipoproteína A-I (Apo A-1) a la cual se unen las xantofilas; ésta lipoproteína se ve disminuida durante los primeros 3 a 7 dpi (Allen, 1987; Freitas et al., 2008). También es afectada en menor grado las LDL involucradas en el transporte de xantofilas, provocando una disminución en las fracciones de portomicrones pre- β , β y α , estos cambios en las fracciones β

y α pueden reflejar alteraciones en la síntesis de lípidos o lipoproteínas en el hígado e intestinos (Ileri-Büyükoğlu & Güldür, 2005). Añadiendo a lo anterior la reproducción sexual de *E. maxima* al ser subepitelial daña a los organelos y sus funciones, entre ellos el aparato de Golgi quien sintetiza lipoproteínas de alta densidad y al retículo endoplásmico que es el encargado de producir apolipoproteínas (Schaefer et al., 1978; Banerjee & Redman, 1983;). Por lo tanto, la disminución en la absorción de las XP, también es debido a la forma en cómo se afectan las moléculas involucradas en el transporte de éstas.

La pigmentación cutánea es una forma subjetiva para valorar la integridad intestinal, ya que es la última estructura donde se depositan las xantofilas después de su absorción en el intestino. El grupo testigo obtuvo un promedio de 15.8 b* (Cuadro 3), valor similar a los obtenidos por Castañeda y col. (2005), Sirri y col. (2010) y Frade y col. (2016), en sus tratamientos testigos. Indicando que las aves del grupo testigo mantuvieron una pigmentación cutánea como se espera en aves sanas. Por el contrario, las aves de los tratamientos 2, 3, 4 y 5 presentaron valores inferiores que iban desde los 11.6 hasta los 10.7 unidades de b* (Cuadro 2), y fue al día 5 post-inoculación (Figura 4), que se apreció una disminución en la pigmentación cutánea, coincidiendo con el descenso en las concentraciones de xantofilas en plasma (Figura 3). Ésta disminución en las diferentes variables es resultado de la liberación de los merozoitos aproximadamente al día 5 post-inoculación que a su vez provoca la caída de hasta un 30% de las proteínas del valor normal, y por consecuencia la deficiencia de factores lipotrópicos que son esenciales para la síntesis de lipoproteínas o la síntesis de apoproteínas (Schaefer et al., 1978), por lo que no habrá una adecuada absorción ni transporte de las xantofilas.

Después del daño ocasionado sobre el epitelio, al organismo le toma recuperarse aproximadamente 20 dpi o hasta que la tasa de absorción de las xantofilas se encuentra en niveles normales (Ruff & Wilkins, 1980; Frade-Negrete et al., 2016), sin embargo desde el día 10 post-inoculación se ha encontrado un retorno a la normalidad en los niveles de proteínas y lípidos que tienen un papel importante para el transporte y depósito del pigmento. En la prueba realizada se observa que los niveles de xantofilas plasmáticas comienzan a recuperarse hasta el día 12 post-inoculación en los tratamientos infectados (Figura 3), y se empieza a reflejar en piel al día 14 post-inoculación (Figura 4), manteniéndose la pigmentación cutánea ascendente hasta el día 20 post-inoculación. Éste periodo de recuperación coincide con lo encontrado por Turk y col. (1981) y Juárez y col. (2002), quienes mencionaron una afectación en la pigmentación desde el día 7 hasta los 21 post-inoculación.

A pesar de que se aprecia esta recuperación en la absorción de xantofilas y amarilleamiento en piel, todo el daño ocurrido sobre el epitelio, provoca que la mucosa regenerada sea menos capaz para producir HDL (Allen, 1987), y es por eso los tratamientos infectados nunca igualan al tratamiento testigo.

La excreción de ooquistes a los 7 dpi, presentó el mayor volumen de eliminación en todos los tratamientos desafiados, lo que indicaría que el primer ciclo de *E. maxima* se había llevado a cabo, al mismo tiempo las concentraciones de XP iniciaban su recuperación, pues la tasa de reproducción de las generaciones siguientes son menores, habiendo menor daño.

El tratamiento con 9.625×10^4 OEEm comenzó a eliminar ooquistes desde el 5° dpi (Cuadro 4); lo que posiblemente correspondan a ooquistes con un comportamiento precoz, es decir, que presentan ciclos de vida más cortos que el promedio y no alcanzan a causar la enfermedad, para la confirmación de este evento era necesario un raspado epitelial (Goodwin et al., 1998).

Durante el experimento se observó la presencia de ooquistes en heces hasta los 20 dpi (Figura 5 y Cuadro 4), posiblemente debido a la presencia de hasta 5 generaciones de esquizontes, este último ciclo se ha registrado a las 120h post-inoculación, y se sospecha que puede haber más ciclos, cada uno con menor presencia de esporozoitos y de merozoitos (Dubey & Jenkins, 2018). La excreción de ooquistes y la severidad de lesiones macroscópicas encontradas en yeyuno (Figura 4 y 5) disminuyeron rápidamente en los tratamientos 3, 4 y 5 mientras el grupo con el desafío más bajo (9.625×10^1), requirió mayor tiempo para generar inmunidad, prolongando la excreción de ooquistes en heces (Figura y Cuadro 4). Esto se debió a que al ser una especie muy inmunogénica a mayores niveles de ooquistes inoculados habrá desarrollo de inmunidad en menor tiempo (Larry et al., 2013).

En este experimento el periodo de prepatencia que comprende desde la inoculación del agente hasta su detección en tejidos, secreciones y excretas, comenzó a los 7 dpi (Figura 5), coincidiendo con el trabajo de Long (1959), mientras que el periodo de patencia que inicia desde la eliminación de los ooquistes hasta el término de la infección, comprende los siguientes 13 dpi. Sin embargo, este periodo puede variar por un par de días, lo cual dependerá del número de ooquistes inoculados (Brito et al., 2014).

En el presente experimento se empleó la medida de tendencia central moda, la cual nos representa el valor que más se repite para el análisis de las lesiones macroscópicas en intestino

medio, ya que la variable que estamos empleando es una variable ordinal en donde damos un grado de lesión (1+, 2+, 3+ y 4+) y no es afectado por valores extremos.

Los tratamientos con una escala mayor de lesiones en el intestino medio, fueron el tratamiento 4 (9.625×10^3 OEE_m) y 5 (9.625×10^4 OEE_m), con una moda de 1+ y 2+ en la escala de Johnson y Reid (1970) dentro de los 14 dpi (Figura 6), lesiones similares a las que obtuvo Fitz-Coy (Fitz-Coy, 1992) el cual inoculó 12.8×10^3 ooquistes; y Allen y col.(2002) que inocularon 4×10^4 ooquistes. En caso, de los tratamientos 2 (9.625×10^1 OEE_m) y 3 (9.625×10^2 OEE_m), no hubo lesiones aparentes, sin embargo, Idris y col. (1997) quien inóculo titulaciones similares 0.5×10^3 y 1×10^4 ooquistes, obtuvo lesiones +1. Por lo que varios autores (Allen et al., 2005; Johnson & Reid, 1970) han concluido que no siempre existe correlación entre la dosis de ooquistes inoculada o excretada, con el grado de la lesión que se pueden observar en el intestino ya que va a depender de la virulencia de la cepa de *E. maxima* que se esté empleando.

En las lesiones 1+ y 2+ se encontró abundante presencia de moco amarillo anaranjado los días 7 y 14 dpi, en los tratamientos 4 y 5, este se relacionó con la presencia de xantofilas atrapadas en el moco como lo menciona Juárez y col.(2002).

CONCLUSIÓN

De los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales empleadas, se puede concluir que el mejor título de ooquistes esporulados de *E. maxima* para ser utilizada como dosis desafío se encuentra entre 9.625×10^3 y 9.625×10^4 OEEEm, ya que fue en estos títulos donde se observaron más afectados los parámetros productivos, la concentración de xantofilas plasmáticas y la pigmentación cutánea en pollos de engorda.

EXPERIMENTO 2

Objetivo general

Evaluar el grado de protección de una vacuna guiada por anticuerpos contra coccidiosis, con base en una dosis titulada y probada de *E. maxima*.

Objetivos particulares

- Analizar el efecto de una vacuna guiada por anticuerpos contra la coccidiosis provocada por *E. maxima*, sobre la concentración plasmática de xantofilas, pigmentación cutánea, conteo de ooquistes en heces y severidad de las lesiones macroscópicas en intestino.
- Evaluar el efecto de la vacuna guiada por anticuerpos contra coccidiosis sobre los parámetros productivos: peso corporal, consumo alimento y conversión alimentaria.
- Evaluar el efecto de la vacuna guiada por anticuerpos contra coccidiosis sobre los niveles de inmunoglobulinas tipo A y G.

Hipótesis

La inmunización con una vacuna de subunidades elaborada con dos epítomos de *Eimeria maxima*: Proteína anónima relacionada con la trombospondina (TRAP) y Proteína Proteasa Micronema (MPP), utilizando un coadyuvante guiado por anticuerpos (CD40), será capaz de inducir una respuesta inmune, sin ocasionar lesiones en el epitelio intestinal, por lo que no se verá afectada la concentración de pigmento en plasma, pigmentación cutánea, ni los parámetros productivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de salud avícola de la Universidad de Arkansas, localizado en Fayetteville al noroeste del estado de Arkansas, en los Estados Unidos. El clima es subtropical húmedo (Cfa), agosto es el mes más caluroso, con un promedio de 31.2°C máximo y 19.9°C mínimo, mientras que enero es el mes más frío con una temperatura máxima de 8.0 ° C y una mínima de -3.2 ° C. Su precipitación pluvial anual media es de 1151mm.

Se emplearon 200 pollitos mixtos (50% machos y 50% hembras), de la estirpe Ross 308 de 1 día de edad con un peso promedio de 39.5 ± 0.51 g, los cuales se distribuyeron en un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 3 x 3 en cinco tratamientos con cuatro réplicas de 10 aves.

Las aves se alimentaron con una dieta con base en maíz amarillo + pasta de soya durante la fase de iniciación y crecimiento, mientras que, en fase de finalización, se alimentaron con una dieta con base en sorgo + pasta de soya. Las dietas se formularon con base al concepto de proteína ideal cubriendo las necesidades del pollo Ross 308 (Aviagen, 2019) y brindado un total de 85.5 ppm de pigmento (Cuadro 5).

A los 7 días de edad las aves se sometieron a un tratamiento con totrazuril al 2.5% durante dos días en el agua de bebida a una dosis de 1mL por litro (25mg/L), con el propósito de evitar alguna infección por coccidia antes del desafío con *Eimeria maxima*.

Posteriormente a los 35 días de edad se volvió a suministrar totrazuril en el agua de bebida a la misma dosis, exclusivamente al tratamiento 5, por dos días con el propósito de mantenerlo negativo durante toda la prueba.

Los tratamientos experimentales fueron:

- 1.- Vacuna, 50 µg de una mezcla de MPP y TRAP, desafiado con *E. maxima*.
- 2.- Vacuna, 100µg de una mezcla de MPP y TRAP, desafiado con *E. maxima*.
- 3.- Sin vacuna, coccidiostato desafiado con *E. maxima*.
- 4.- Sin Vacuna, desafiado con *E. maxima* (Testigo positivo).
- 5.- Sin vacuna, no desafiado con *E. maxima* (Testigo negativo).

Cuadro 5. Composición de las dietas (kg) experimentales empleadas en la evaluación de una vacuna guiada por anticuerpos para prevenir la coccidiosis causada por *E. maxima*.

Ingrediente	Iniciador	Crecimiento	Finalización
Maíz amarillo	600.627	585.635	0
Sorgo	0	0	595.965
Pasta de soya	360.467	362.74	322.012
Carbonato de calcio	13.652	12.284	10.322
Monofosfato de calcio	11.194	9.027	5.700
Sal	3.501	3.511	5.312
Vitaminas pollo ¹	3.000	3.000	3.000
DL-Metionina 99	2.852	2.988	2.791
L-Lisina HCl	2.526	2.510	2.038
Cloruro de Colina 60%	1.000	1.000	1.000
Aceite vegetal	0.920	17.588	44.826
Bacitracina BMD	0.550	0.550	0.550
L- Treonina	0.362	0.382	0.434
Salinomicina sódica	0.250	0.250	0.250
Fitasa ²	0.100	0.100	0.100
Pigmento amarillo natural ³	0	0	5.700
Total	1000	1000	1000
		Análisis calculado	
Energía Metabolizable, Kcal/kg	3000	3100	3225
Proteína cruda, %	23	23	21.5
Lisina digestible, %	1.31	1.31	1.15
Triptófano digestible, %	0.264	0.264	0.247
Metionina digestible, %	0.612	0.624	0.559
Grasa cruda, %	2.55	4.17	6.36
Fibra cruda, %	3.580	3.545	2.84

¹Vitaminas (cantidad por kg): Vitamina A 4,667,000 kUI, vitamina D₃ 1,500,000 kUI, vitamina E 23,333,500 mg, vitamina K₃ 1,333,275 mg, vitamina B₁ 1,000,040 mg, vitamina B₂ 3,666,400 mg, vitamina B₆ 1,333,320 mg, vitamina B₁₂ 8,330 mg, nicotinamida 26,667,000 mg, ácido pantoténico 8,333,100 mg, ácido fólico 666,400 mg, biotina 66,700 mg, cloruro de colina 199,999,800 mg, cobre 5,000,000 mg, hierro 26,666,800 mg, manganeso 41,333,540 mg, yodo 400,000 mg, zinc 36,666,720 mg, selenio 100,000 mg, carbonato de calcio 216,000 g, aceite mineral 5,000 g.

²Fitasa Ronozyme® Hyphos (GT).

³Avelul 15: pigmento avícola hecho a base de extractos saponificados de flor de Cempasúchil o Marigold (*Tagetes erecta*), 15g/kg.

Variables productivas

Se llevaron registros semanales durante 6 semanas, por réplica de las siguientes variables: ganancia de peso por ave (g), consumo de alimento ave (g) e índice de conversión alimentaria (kg:kg). Todas las variables fueron corregidas por la mortalidad.

Inmunización

Las aves se inmunizaron vía subcutánea, al día 14 de edad con una vacuna compuesta de una mezcla de epítomos aislados de *Eimeria maxima* denominados TRAP y MPP. El día 28 de edad las aves fueron desafiadas con un título de 4×10^4 OEEEm (cepa OM=185 con 100% de pureza) a una dosis de 1mL/ave utilizando una sonda esofágica que llegó al buche de las aves.

Medición de la pigmentación

Se midió la pigmentación de la piel *in vivo* de todas las aves en la zona aptérica lateral derecha (vena de la grasa), con un colorímetro de reflectancia marca Minolta CR 400 (Martínez, 1997) los días 21, 28, 35 y 42 de edad .

A partir de los 21 días de edad, se seleccionaron dos aves por réplica a las cuales se les tomó 2mL sangre con 10% de EDTA de la vena yugular derecha para obtener plasma y medir la concentración de pigmento de acuerdo con la técnica de Allen (1987).

Evaluación de la respuesta inmune humoral

Para dicha evaluación se tomaron 3mL de sangre sin EDTA de la vena yugular derecha a dos aves de todos los tratamientos, para recolectar suero y determinar niveles de IgG.

De cada tratamiento fueron eutanasiadas dos aves por réplica, mediante el corte de la médula espinal a nivel del foramen oval con un estilete tratando de evitar lesionar la tráquea los días 21, 28, 35 y 42 de edad.

La tráquea se colectó desde la unión orofaríngea hasta la carina (cresta interna situada en la bifurcación de la tráquea) colocándola en solución salina tamponada, posteriormente se refrigeraron a 4°C para la determinación de títulos de anticuerpos IgA por medio de la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Evaluación de lesiones

A los 28, 35 y 41 dpi, se evaluó la severidad de las lesiones macroscópicas en yeyuno asociadas a *E. maxima* de acuerdo con la escala de Johnson y Reid (1970) en los tratamientos infectados.

Colección de heces.

Se tomaron muestras de excretasa los 32 días de edad (4^{to} dpi) al tratamiento cinco para corroborar que no haya habido contaminación. También se tomaron los días 35, 37 y 42 de edad para conteo de ooquistes a los tratamientos inoculados con *E. maxima*.

Análisis estadístico

Al final del estudio los datos obtenidos como respuesta a los diferentes tratamientos sobre las variables productivas, fueron analizadas con forme al diseño experimental empleado, con el siguiente modelo:

$$Y_{eijk} = \mu + \alpha_d + \beta_i + \delta_j + (\alpha\beta)_{di} + (\beta\delta)_{ij} + (\alpha\delta)_{dj} + e_{ijk}$$

Donde: d = 1, 2, 3 (efecto del e-ésima vacuna)

i = 1, 2, 3 (efecto del i-ésima sexo)

j = 1, 2, 3 (efecto del j-ésima edad)

k = 1, 2, 3, 4 (ka-ésima error de la observación)

Y_{eijk} = Ganancia de peso (g), consumo de alimento (g), conversión alimentaria (kg:kg), consumo de pigmento (g), xantofilas plasmáticas ($\mu\text{g}/\text{mL}$) y amarilleamiento en piel (b^*)

μ = media general

α_d = efecto del e-ésima vacuna

β_i = efecto del i-ésima sexo

δ_j = efecto del j-ésima edad

$(\alpha\beta)_{di}$ = efecto de la interacción del d-ésima vacuna y i-ésima sexo

$(\beta\delta)_{ij}$ = efecto de la interacción del i-ésima sexo y j-ésima edad

$(\alpha\delta)_{dj}$ = efecto de la interacción del d-ésima vacuna y j-ésima edad

e_{dijk} = error experimental

La comparación múltiple de medias después de que el ANDEVA detecto diferencias, se realizó mediante la prueba de Tukey con un valor de error tipo I propuesto de una $p < 0.05$, con el paquete computacional SPSS ver. 17.

El número de ooquistes en heces se analizó conforme a una prueba de Dunnett donde se empleó como testigo al tratamiento con coccidiostato con una $p < 0.05$.

Y para analizar la severidad de las lesiones observadas en intestino medio, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis mediante una ji-cuadrada, como método no paramétrico con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

El desempeño productivo de las aves durante 6 semanas de experimentación, se muestra en el Cuadro 6. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en ninguna de las variables productivas (peso final, ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimentaria), entre las aves que fueron vacunadas y desafiadas, y las aves no vacunadas y no desafiadas ($p>0.05$).

Cuadro 6. Respuesta productiva durante 6 semanas de experimentación en pollos inoculados con una vacuna guiada por anticuerpos para prevenir la coccidiosis por *E. maxima*.

Tratamientos	Peso final, g	Ganancia de peso/ave, g	Consumo de alimento/ave, g	Conversión alimentaria, kg:kg	Consumo de pigmento, mg
VACUNA					
Mezcla MPP y TRAP (50 μ g)	2582	2543	3613	1.424	259
Mezcla MPP y TRAP (100 μ g)	2347	2307	3476	1.507	243
Coccidiostato*	2476	2437	3583	1.475	249
Testigo positivo**	2340	2300	3474	1.512	238
Testigo negativo T	2308	2269	3328	1.468	233
EEM	142	142	210.7	0.06	0.01
SEXO					
Hembra	2334 ^b	2295 ^b	3456	1.507	0.242
Macho	2482 ^a	2447 ^a	3534	1.447	0.247
EEM	47.6	47.6	70.6	0.02	0.006
PROBABILIDAD					
Vacuna	0.11	0.11	0.45	0.38	0.41
Sexo	0.04	0.04	0.46	0.08	0.62
Vacuna * Sexo	0.73	0.73	0.58	0.60	0.55

Diferente letra en columna muestra diferencia estadística ($p<0.05$)

* Sin vacuna solo coccidiostato.

** Sin vacuna desafiado con *E. maxima*

T Sin vacuna no desafiado con *E. maxima*

MPP = (Proteína Proteasa Micronema)

TRAP= (Proteína Anonima Relacionada con la Trombospondina)

El efecto del sexo se observó en ganancia de peso y peso final (Cuadro 6), donde los machos mostraron el mayor peso final (2482g) con respecto a la hembra (2334g) ($p < 0.05$).

Los resultados de pigmentación cutánea y XP por tratamiento, edad y sexo se muestran en el Cuadro 7. El grupo que obtuvo el mayor valor en unidades de amarilleamiento fue el grupo con coccidiostato (10.08 b*) respecto a los demás tratamientos (8.39 promedio) ($p < 0.05$).

Los valores de enrojecimiento (a*) y luminosidad (l*) no mostraron ningún efecto, como resultado de los tratamientos empleados ($p > 0.05$), pero si se encontraron diferencias por el efecto de la edad y del sexo ($p < 0.05$). En cuanto a la concentración de XP no se encontró efecto a la edad, y al sexo, así como a los tratamientos empleados ($p > 0.05$).

En las mediciones de IgG's e IgA's no se encontraron diferencias para ninguno de los tratamientos con vacuna guiada por anticuerpos y sin vacuna ($p > 0.05$).

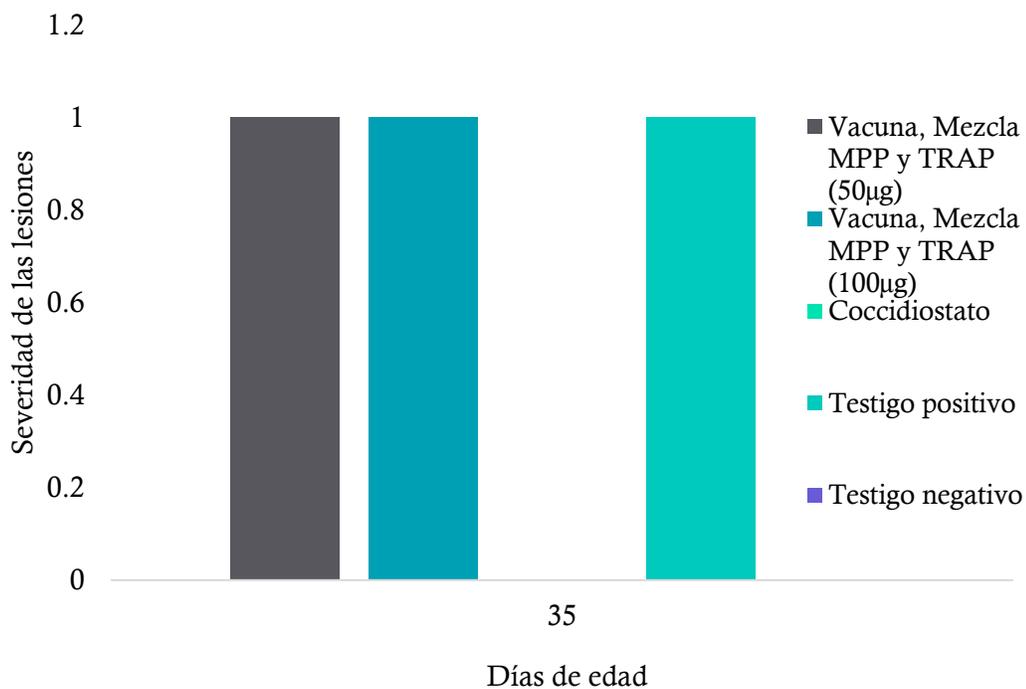


Figura 7. Frecuencia de la severidad de las lesiones en yeyuno a los 35 días de edad (7 dpi) de acuerdo con la escala de Johnson y Reid (Johnson & Reid, 1970) en pollos desafiados con *E. maxima* e inoculados con una vacuna guiada por anticuerpos para prevenir la coccidiosis.

Solo se encontraron lesiones macroscópicas en el intestino medio de grado 1+ en la escala de Johnson y Reid (Johnson & Reid, 1970), en los tratamientos inmunizados con la mezcla de los epítomos TRAP y MPP, así como en el grupo que sirvió como testigo positivo (Figura 7), no se encontró diferencia estadísticamente significativa para ninguno de los tratamientos ($p>0.05$).

Cuadro 7. Amarilleamiento cutáneo medido con el espectrofotómetro de reflectancia minolta, y xantofilas plasmáticas en pollo de engorda, inoculados con una vacuna guiada por anticuerpos para prevenir la coccidiosis por *E. maxima*.

Tratamiento	I*	a*	b*	Plasma ($\mu\text{g/mL}$)
VACUNA				
Mezcla MPP y TRAP (50 μg)	61.63	4.17	8.79 ^b	9.58
Mezcla MPP y TRAP (100 μg)	62.06	4.17	7.96 ^b	10.66
Coccidiostato*	61.69	3.89	10.08 ^a	9.45
Testigo positivo**	61.37	4.31	8.05 ^b	9.10
Testigo negativo T	61.63	4.14	8.77 ^b	9.45
EEM	0.36	0.18	0.32	0.93
EDAD (días)				
21	60.92 ^a	5.02 ^a	2.45 ^a	ND
29	61.92 ^a	4.28 ^b	7.35 ^b	4.60 ^a
34	61.43 ^a	4.57 ^b	10.67 ^c	19.05 ^b
41	63.20 ^b	2.68 ^c	14.94 ^d	5.29 ^a
EEM	0.36	0.18	0.33	0.70
SEXO				
Macho	61.28 ^a	4.26	8.26 ^b	10.17
Hembras	62.10 ^b	4.01	9.20 ^a	9.13
EEM	0.22	0.11	0.20	0.59
PROBABILIDAD				
Vacuna	0.70	0.58	<0.0001	0.77
Edad	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Sexo	0.009	0.12	0.001	0.24
Vacuna*Sexo	0.24	0.29	0.94	0.93
Vacuna*Edad	0.72	0.004	0.08	0.94
Edad*Sexo	0.37	0.17	0.46	0.18
Vacuna*Edad*Sexo	0.005	0.12	0.47	0.75

Diferente letra en columna muestra diferencia estadística ($p<0.05$)

* Sin vacuna solo coccidiostato.

** Sin vacuna desafiado con *E. maxima*

T Sin vacuna no desafiado con *E. maxima*

MPP = (Proteína Proteasa Micronema)

TRAP= (Proteína Anonima Relacionada con la Trombospondina)

ND= no determinado

Finalmente, el conteo de ooquistes a los 7 dpi en los tratamientos inmunizados, con coccidiostato y el testigo negativo, se comportaron de manera similar con un promedio de 1758 ooquistes eliminados por gramo de heces; mientras que el tratamiento positivo tuvo la mayor eliminación de ooquistes (4860). En el día 9 pi todos los grupos excepto el grupo testigo negativo se comportaron como el grupo desafiado sin vacunar ($p < 0.05$) y al 14 dpi, hubo contaminación del grupo testigo negativo por lo que no hubo diferencia significativa en ninguno de los tratamientos (Cuadro 8, Figura 7 y 8). La vacuna no fue mejor que el coccidiostato.

Cuadro 8. Resultados del conteo de ooquistes por gramo de excretas en los días 35, 37 y 42 de edad en pollos inoculados con una vacuna guiada por anticuerpos para prevenir la coccidiosis por *E. maxima*.

Tratamiento	Días post-inoculación			Promedio
	7 (35)	9 (37)	14 (42)	
Vacuna, Mezcla MPP y TRAP (50 μ g)	2575 ^a	6950 ^a	138	3221
Vacuna, Mezcla MPP y TRAP (100 μ g)	1888 ^a	6050 ^a	2003	3313
Coccidiostato	813 ^a	6063 ^a	100	2325
Testigo positivo	4860 ^b	5708 ^a	113	3560
Testigo negativo	0 ^a	0 ^b	475	158
EEM	1748	2853	997	1554
P=	0.017	0.017	0.017	

Prueba de Dunnett utilizando como grupo control al tratamiento con coccidiostato

Diferente letra en columna muestra diferencia estadística ($p < 0.05$)

Los valores entre paréntesis son los días de edad del pollo.

EEM=Error estándar de la media

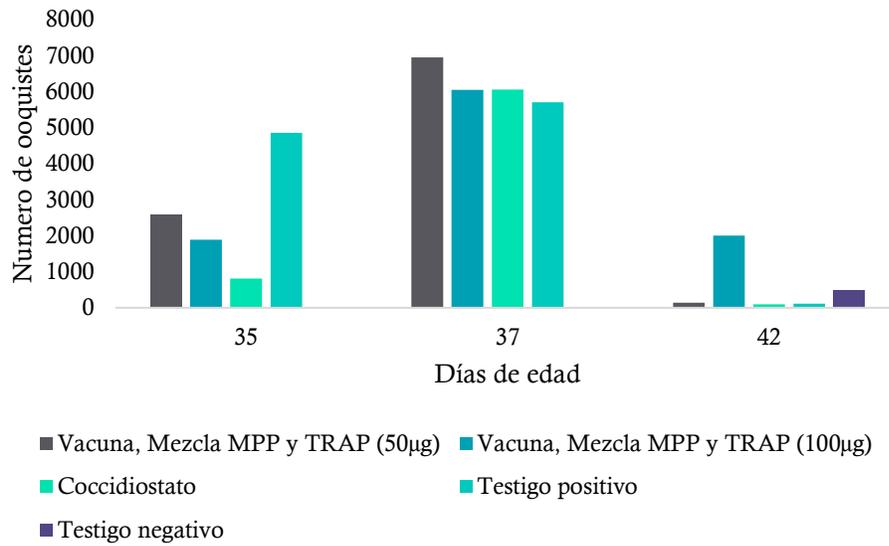


Figura 8. Resultados del conteo de ooquistes por gramo de excretas en pollos inoculados con una vacuna guiada por anticuerpos para prevenir la coccidiosis por *E. maxima*, en los días 35, 37 y 42 de edad.

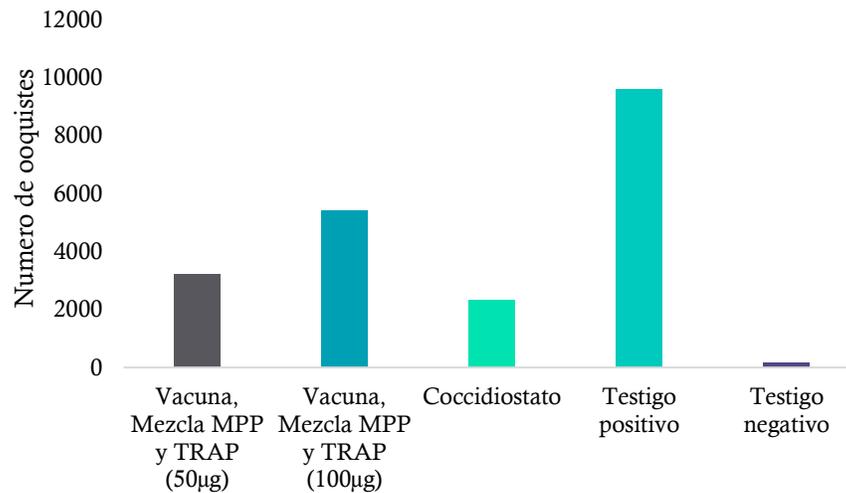


Figura 9. Promedio de ooquistes excretados por gramo de excretas en pollos inoculados con una vacuna guiada por anticuerpos para prevenir la coccidiosis por *E. maxima*.

DISCUSIÓN

En la prueba se observó que los tratamientos que funcionaban como testigos, no tuvieron un comportamiento esperado. El grupo testigo negativo no fue diferente a los grupos desafiados, presento bajos niveles en las unidades de amarilleamiento en piel (Cuadro 6), por lo que se sospecharía de un daño ocasionados por *E. maxima*, ya que hubo contaminación del tratamiento aproximadamente a los 8 dpi, sin embargo, las consecuencias del daño en el epitelio se comenzarían a notar hasta el día 12 pi (post-inoculación), por lo que la causa de la falta de pigmento cutáneo debió ser otra. Posiblemente lo que provocó bajas en éstas variable, sea la presencia de micotoxinas en el alimento, que se apreció al día 7 después de la inoculación de los ooquistes esporulados de *E. maxima*, sospechando de la presencia de la Toxina-2 (T-2) y Deoxinivalenol (DON) por los signos clínicos que se encontraron en la mayoría de las aves, (no se mandó a analizar el alimento) (Murugesan et al., 2015). Uno de los daños que llega a ejercer T-2 en el organismo, es la reducción de las defensas antioxidantes de éste (Wang et al., 2005), al verse disminuidos estos recursos, se puede comenzar a hacer uso de antioxidantes provenientes del alimento, en este caso de la luteína (xantofila presente en la flor de cempasúchil) que presenta actividad antioxidante (Krinsky, 2001; Meléndez-Martínez et al., 2007), por lo que se observaría una disminución en los pigmentos que se encuentran circulando en plasma, y sería menor la cantidad que llegaran hasta piel. Este efecto también puede estar presente en los demás tratamientos, por lo que es posible que parte de la baja en el amarilleamiento cutáneo, podría no ser solo a causa de la infección por coccidias.

En el caso del tratamiento testigo positivo, a pesar de estar desafiado con un volumen que fuera casi la mitad del grupo con 9.625×10^4 OEEEm del experimento anterior, su comportamiento fue similar al tratamiento 3 con 9.625×10^3 OEEEm (Cuadro 2 y 6), tanto en las variables productivas como en lesiones macroscópicas y eliminación de ooquistes. Con los antecedentes del primer experimento se esperaba que con una dosis de 4×10^4 OEEEm, el grupo positivo tuviera una pérdida de peso de al menos un 30% cerca de lo observado en el grupo con 9.625×10^4 , pero solo presentó una pérdida de al menos un 5%. El consumo de alimento fue el mismo en todos los grupos (Cuadro 6), similares al visto anteriormente en el grupo con 9.625×10^3 OEEEm. En cuanto a la clasificación de las lesiones macroscópicas en los tratamientos desafiados vacunados y no vacunados, no superaron el 1+ en la escala de Johnson y Reid (1970), y desaparecieron rápidamente las lesiones (Figura 6). Finalmente, el día de mayor eliminación

de ooquistes en el primer experimento ocurrió a los 7 dpi y en la segunda prueba fue al día 9; mientras tanto el número de ooquistes excretados del primer experimento fue superior, en comparación al grupo positivo de este segundo experimento (31,519 vs 3,560 ooquistes /g de heces) (Cuadro 4 y 8; Figura 5 y 7). Al observar el comportamiento de todas estas variables, principalmente en el testigo positivo se puede concluir que la virulencia de la cepa de este segundo experimento fue menor a la utilizada en la primera prueba (Jenkins et al., 2017).

El consumo de pigmento fue otra variable que mostró comportamiento diferente, aparentemente fue menor el consumo en los tratamientos del experimento 2, al compararlos con los tratamientos del experimento 1. Esta diferencia es debido al aporte de xantofilas naturales de *Tagetes erecta* en la dieta; en la segunda prueba, solo se aportó pigmento natural en la fase de finalización, mientras que en la fase de iniciador y crecimiento, el pigmento provenía del maíz amarillo el cual solo aporta 20 ppm de xantofilas (Cuca et al., 1963), en cuanto al experimento 1 el aporte de xantofilas naturales se dio durante la fase de crecimiento y finalización, por lo tanto la concentración final de pigmento consumido fue mayor (100 ppm vs 85.5 ppm).

Hablando del tratamiento con coccidiostato, fue el que tuvo el mejor desempeño, sin embargo, al observar el número de ooquistes excretado a los 7 y 9 días post-inoculación, se puede ver un aumento en la eliminación de ooquistes entre un día y otro (Cuadro 8 y Figura 7), cuando se debió mantener al menos por debajo de los demás grupos. Esta situación puede deberse a que se ha visto que algunos coccidiostatos funcionan mejor contra cierto tipo de coccidias, en el caso de salinomicina el efecto que tiene contra *E. maxima* no ha sido tan efectivo (Folz et al., 1988; Conway et al., 1995; Ahaotu et al., 2013; Barrios et al., 2017). Ahora se sabe que todos los coccidiostatos ionoforos a pesar de que tienen mecanismos de acción iguales, su especificidad es diferente, debido a que sus diferentes moléculas funcionan a pHs distintos (Gonzalo, 2020).

Salinomicina debido a sus propiedades fisico-químicas tiene una mejor absorción a pHs ácidos ya que es considerado un ácido débil (Hansen et al., 2009; Bak et al., 2013; Bohn et al., 2013). El pH de duodeno oscila entre 5.5 a 6.2, mientras que yeyuno se encuentra entre 5.8 a 6.9, por lo tanto, debido a su naturaleza, salinomicina ejercerá un mejor desempeño a nivel de duodeno. No se debe olvidar que una infección por coccidias disminuirá el pH intestinal progresivamente, *E. maxima* lo disminuye aproximadamente en 0.3 puntos en duodeno y 0.5

puntos en yeyuno hasta los 5 dpi (Ruff & Reid, 1975) por lo tanto duodeno tendrá un ambiente ligeramente más ácido que yeyuno provocando que salinomicina tenga una mejor función en la parte inicial del intestino. Sumado a lo anterior la solubilidad de salinomicina es de 53mg/L a un pH de 5 y hasta de 294 mg/L a pH de 7, sin embargo, las formas no ionizadas (parte activa de salinomicina), son menores a pH que se acerquen a la neutralidad, por lo que es otro factor que afecta actividad como coccidiostato contra *E. maxima* en intestino medio (Bohn et al., 2013).

No solo las propiedades fisicoquímicas del coccidiostato pudieron afectar la efectividad de salinomicina contra *E. maxima*; de hecho la presencia de T-2 perjudican la efectividad de ciertos coccidiostato (Ványi et al., 1989; Varga & Ványi, 1992) y, aunque no se ha documentado su efecto contra salinomicina, sigue existiendo esta posibilidad. Por lo tanto, todos estos factores pueden estar relacionados con la presencia de una mayor eliminación de ooquistes al día 9 post-inoculación en el grupo con coccidiostato.

Son 5 los puntos que se deben de tomar en cuenta para la evaluación de una vacuna anticoccidial: mortalidad, ganancia de peso, lesiones macroscópicas en intestino, tasa de eliminación de ooquistes e índice anticoccidial (Song et al., 2015). De la prueba realizada los resultados fueron los siguientes:

1. Mortalidad. Se menciona que después de la administración de una vacuna, no necesariamente debe ser completamente protectora pero podría disminuir la morbilidad y mortalidad (Bottje et al., 2013). En el estudio realizado, no se observó mortalidad en ninguno de los tratamientos, pero hubo mayor morbilidad en las aves vacunadas y el testigo positivo, que en las aves tratadas con coccidiostato. No obstante, la morbilidad también pudo estar relacionada con la posible inmunosupresión causada por las micotoxinas encontradas en el alimento.
2. Ganancia de peso. No hubo diferencia en ganancia de peso entre los grupos vacunados y el grupo infectado (Cuadro 5), resultados similares obtenidos por Shivaramaiah y col. (2010) y Song y col. (2015) quienes probaron una vacuna con dos epítomos (TRAP y CD154). Indicando que no hubo mayor o menor protección sobre el intestino con o sin la aplicación de la vacuna.
3. Lesiones macroscópicas. Hubo lesiones clasificadas como 1+ en la escala de Johnson y Reid (1970) en los tratamientos vacunados y el tratamiento desafiado con *E. maxima*, mientras que

el tratamiento con coccidiostato no presentó ninguna lesión. Aparentemente la vacuna en sus diferentes concentraciones no mostró una protección tan efectiva, al compararlo con el tratamiento testigo no desafiado y el tratamiento con coccidiostato. Sin embargo, Shivaramaiah y col. (2010) y Song y col. (2015) quienes obtuvieron lesiones con el mismo grado de clasificación, mencionan que en la mayoría de las situaciones, la clasificación de lesiones no es un buen indicador de la protección de la vacuna (R. B. Williams & Catchpole, 2000). En algunas ocasiones la inmunopatología en los pollos de engorde vacunados causa interferencia con la capacidad de determinar con precisión los puntajes de las lesiones. De hecho, lo que se puede observar cómo una lesión en pollitos inmunizados, puede ser el proceso de recuperación y regeneración de tejidos (Shivaramaiah et al., 2010).

El grado de lesión encontrada no provocó disminución de consumo de alimento y ganancia de peso, sin embargo, si afectó la pigmentación en piel, signos relacionados a una coccidiasis, donde se observa que no hay daño de forma evidente en los parámetros productivos, pero si en el amarillamiento de la piel en pollo (Cuadro 7).

4. Tasa de eliminación de ooquistes. El resultado esperado tras una protección vacunal de este tipo, es una reducción en el número de ooquistes excretados, así como de signos clínicos, debido a una correcta interacción entre el antígeno exógeno, (epítomos TRAP y MPP), y las CPA profesionales que expresan a CD40, provocando la unión con su ligando (Kothlow et al., 2008; Staines et al., 2013), desencadenando una cascada de eventos que tendrá el propósito de destruir esporozoitos o merozoitos, evitando la invasión, la reproducción y por consecuencia disminuirá la eliminación de los ooquistes (Lillehoj et al., 2004; Carreno et al., 2009; Rajput et al., 2013). No obstante, en este experimento no se observó esta disminución en el número de ooquistes excretados, entre los grupos vacunados y el testigo positivo, lo que sugiere que la estimulación que tendría que recibir la célula T, no fue realizada o fue evadida.
5. Índice anticoccidial. Es un criterio que se utiliza para medir la eficacia anticoccidial, y clasifican su eficiencia como “buena” a partir de 180 o más puntos, “moderado” a partir de 160 a 179 puntos y “pobre” cuando están por debajo de los 159 puntos (Vanparijs et al., 1989). Los valores obtenidos de los diferentes grupos experimentales se clasificaron como: buenos, al testigo negativo, el tratamiento con coccidiostato y el tratamiento con la vacuna con 50 µg de una mezcla de MPP y TRAP, y pobre para el testigo positivo y el tratamiento con la vacuna con 100 µg de una mezcla de MPP y TRAP (Cuadro 9).

Cuadro 9. Resultados del índice anticoccidial en pollos inoculados con una vacuna guiada por anticuerpos para prevenir la coccidiosis por *E. maxima*.

Tratamiento	% S	%GPR	LI	OI	IA
Mezcla MPP y TRAP (50µg)	100	99.59	3.75	13.4	182.44
Mezcla MPP y TRAP (100µg)	100	81.52	5	22.6	153.96
Coccidiostato	100	99.05	0	9.7	189.37
Testigo positivo**	100	70.54	1.25	40.0	129.29
Testigo negativo F	100	93.01	0	0.6	192.41

%S=porcentaje de supervivencia

% GPR (Ganancia de peso relativa) = ganancia de peso del grupo experimental x100/ganancia de peso del grupo control

Índice de Lesiones (LI)= total de lesiones intestinales en el grupo x10/total de aves en el grupo

Índice de Ooquistes (OI)= Ooquistes en el grupo x 0.4 x 100/el promedio de ooquistes del control

Índice Anticoccidial (IA)= (%S+%GPR) – (LI + OI)

** Sin vacuna desafiado con *E. maxima*

F Sin vacuna no desafiado con *E. maxima*

Con la evaluación de estos cinco puntos, la respuesta protectora de la vacuna no fue completamente efectiva.

Las vacunas basadas en subunidades, proteínas recombinantes y antígenos peptídicos sintéticos pueden tener gran potencial, pero tienden a carecer de inmunogenicidad, no son capaces de provocar una respuestas inmunitarias de amplio espectro en las células T y B del huésped, requieren fuertes adyuvantes para “iniciar” una adecuada respuesta inmune (Lillehoj & Lillehoj, 2000) y no existe agentes de inmunidad adecuados para usar en la industria avícola (Zhang et al., 2012), por lo que al final no se garantiza una buena respuesta inmunológica de tipo humoral.

Una de las causas principales que disminuyen el éxito de la vacuna es la diversidad antigénica que presenta *E. maxima*. Esta diversidad se ha encontrado en diferentes poblaciones de *E. maxima*, se puede expresar mediante un cambio en la capacidad de algunos antígenos para unirse a un MHC en particular (Smith et al., 2002; Soldati et al., 2001). También provoca que una cepa no pueda inducir protección contra otra, debido a que algunas de éstas variantes no funcionan como protectores inmunológicos y plantean una complicación significativa para el diseño y aplicación de vacunas exitosas.

Se han estimado de 5,000 a 10,000 péptidos en el genoma de *Eimeria spp* (M. W. Shirley, 2000), pero solo unos pocos codifican antígenos que son protectores. Por lo que, aunque el epítipo de TRAP es constante en el género de Apicomplexa, no es la única forma que tiene *Eimeria spp.* para facilitar la invasión a los enterocitos. Además se han encontrado polimorfismos sustanciales en genes que codifican antígenos protectores, comprometiendo su uso en vacunas de subunidades (Smith et al., 2002).

La pregunta ahora es ¿hay polimorfismo en los epítipos TRAP y MMP? Hay muchas paradojas con respecto a los organelos secretorios apicomplejos, el principal de ellos es el hecho de que el número y el tipo de organelos varía enormemente entre parásitos y entre diferentes etapas de desarrollo e incluso puede estar ausente. TRAP está altamente conservada en el género de Apicomplexa, sin embargo, los micronemas a los cuales pertenece, pueden variar desde unos pocos (merozoítos y esporozoítos de *Plasmodium*) hasta cientos (merozoítos de *Eimeria spp.*) por célula. Se calcula que hay 5 o más proteasas con la misma función (Soldati et al., 2004), ofreciendo muchas alternativas al invasor. Hasta el momento se han confirmado dos de las proteasas presentes en *E. maxima*, las cuales son MIC2 descubierta en el 2012 (Bottje et al., 2013) y EmMIC7 descubierta en el 2015 (Huang et al., 2015), y en el año 2017 descubrieron otros 6 péptidos candidatos para una vacuna de subunidades, además de TRAP y MMP (Yang et al., 2017). Además, *Eimerias spp.* presenta herramientas que le permiten usar diferentes estructuras de la célula huésped para la invasión, la interrogante está sobre la selección del sitio y un posible mimetismo del antígeno que podría usar el parásito para evitar el sistema inmune y reconocimiento del huésped (Davison et al., 2008), haciendo aún más complicado la elaboración de una vacuna completamente efectiva. Esta nueva información hace más fácil entender el porqué del uso de solo dos epítipos puede no ser efectiva.

La presencia de micotoxinas en el alimento no solo pudo perjudicar la pigmentación de la piel, también existe la probabilidad que haya limitado la función del sistema inmune afectando también la respuesta a la vacunación, incluso la producción de inmunoglobulinas de tipo A y G.

Esto debido a que las micotoxinas intervienen en las vías de señalización MAP quinasa que están implicadas en las respuestas inmunes, al intervenir en esta vía de señalización con la inhibición primaria de la síntesis de proteínas, seguida de una interrupción secundaria de la síntesis de ADN y RNA, debido a la unión de DON y T-2 a los ribosomas (Grenier & Applegate, 2013; Murugesan et al., 2015) la respuesta inmune se deteriora y hacen que el animal no pueda

montar una respuesta inmune eficiente (Murugesan et al., 2015). La ingestión constante a bajos niveles causa inmunodepresión perjudicando también la proliferación de linfocitos T afectando las vacunaciones, por lo que no se reconocerá al antígeno presentado (Grenier et al., 2011; Murugesan et al., 2015), bajando la producción de IgA's debido a la interferencia entre micotoxinas y coccidia al final del periodo de recuperación (Girgis et al., 2008). En cuanto a la presencia de DON en el alimento puede contribuir, a retrasar la respuesta inmunológica por una reducción en el porcentaje o una inhibición en el reclutamiento de células CD4⁺ y CD8⁺ (Murugesan et al., 2015).

Las micotoxinas retrasan la recuperación intestinal por una regulación positiva en citoquinas proinflamatorias, sin embargo, salinomicina activa vías de señalización antiinflamatorias en el intestino de las aves aumentando IL-10 y IL-4, contrarrestando un poco el efecto proinflamatorio (Lee et al., 2013), por lo que probablemente influyo a que no fueran evidentes las lesiones intestinales en el grupo de coccidiostato.

En una infección provocada por coccidias sin intervención de micotoxinas la respuesta humoral que estaría provocando la vacuna probada producirá en su mayoría IgA seguido de IgG, esperando que los anticuerpos reduzcan la invasión de algunas especies de *Eimeria spp* o aumentar la destrucción intraluminal de los esporozoitos, sin embargo, éstos entran tan rápidamente al enterocito (Davison et al., 2008) que la respuesta humoral no es completamente efectiva, demostrado en estudios con pollos bursectomizados desafiados con *E. maxima* (Smith et al., 2002; Shirley et al., 2005;).

Todo lo anteriormente mencionado indica que el producir una respuesta inmune de tipo humoral no es la mejor forma de enfrentar una infección por coccidia.

CONCLUSIÓN

De los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales empleadas se concluye:

- Que el empleo de la vacuna a base de epítomos aislados de *Eimeria maxima* (TRAP y MMP), no generó inmunidad.
- La vacuna aplicada en sus dos presentaciones no ayudo a que mejorara la pigmentación y no afectó de forma negativa los parámetros productivos de los pollos de engorda durante 42 días de edad.
- Se recomienda hacer más pruebas, donde se pueda probar dosis diferentes en la cantidad de inmunógeno, ya que pudo haber un efecto de piso en donde la dosis no fue lo suficiente para que se observara una respuesta a la vacuna.

REFERENCIAS

- 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 Poultry Science Journal*, 67(2), 337–349. <https://doi.org/10.1017/S004393391100033X>
- Ahaotu, E. O., Ademola, A. A., & Okoli, C. I. (2013). Sustainability of Veterinary Drugs against Field Isolates of *E. maxima*. *International Journal of Veterinary Science*, 2(2), 65–67. <https://doi.org/10.1186/s13620-016-0074-5>
- Allen, P. C., & Fetterer, R. H. (2002). Interaction of dietary vitamin E with *Eimeria maxima* infections in chickens. *Poultry Science*, 81(1), 41–48. <https://doi.org/10.1093/ps/81.1.41>
- Allen, Patricia C. (1987). Effect of *Eimeria acervulina* infection on chick (*Gallus domesticus*) high density lipoprotein composition. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 87(2), 313–319. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(87\)90145-3](https://doi.org/10.1016/0305-0491(87)90145-3)
- Allen, Patricia C. (1997). Production of Free Radical Species during *Eimeria maxima* Infections in Chickens. *Poultry Science*, 76(6), 814–821. <https://doi.org/10.1093/ps/76.6.814>
- Allen, Patricia C., Jenkins, M. C., & Miska, K. B. (2005). Cross protection studies with *Eimeria maxima* strains. *Parasitology Research*, 97(3), 179–185. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1423-6>
- Anderson, J. W., Bftu, T., Brown, C., Donald, R., Gurnett, A., Leavitt, P. S., & Thompson, D. (2005). Anticoccidial drugs discovery: approaches toward the identification of novel chemotherapeutic agents. *IXth International Coccidiosis Conference*.
- Aviagen. (2019). Ross 308 Broiler: Nutrition Specifications 2019. *Ross an Aviagen Brand*, 1–10.
- Avila, E., Shimada, A., & Llamas, G. (1990). *Anabólicos y aditivos en la producción pecuaria*.
- Bak, S. A., Hansen, M., Krogh, K. A., Brandt, A., Halling-Sørensen, B., & Björklund, E. (2013). Development and validation of an SPE methodology combined with LC-MS/MS for the determination of four ionophores in aqueous environmental matrices. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 93(14), 1500–1512. <https://doi.org/10.1080/03067319.2013.763250>
- Banerjee, D., & Redman, C. (1983). Biosynthesis of high density lipoprotein by chicken liver: Nature of nascent intracellular high density lipoprotein. *The Journal of Cell Biology*, 96(3), 651–660. <https://doi.org/10.1083/jcb.99.6.1917>
- Barrios, M. A., Da Costa, M., Kimminau, E., Fuller, L., Clark, S., Pesti, G., & Beckstead, R.

- (2017). Relationship Between Broiler Body Weights, *Eimeria maxima* Gross Lesion Scores, and Microscores in Three Anticoccidial Sensitivity Tests . *Avian Diseases*, 61(2), 237–241. <https://doi.org/10.1637/11518-102116-reg.1>
- Barta, J. R., Berghman, L. R., Shivaramaiah, S., Faulkner, O. B., Bielke, L. R., & Hargis, B. M. (2017). Compositions and methods of enhancing immune responses to eimeria or limiting eimeria infection (Patent Núm. WO2014127185 A1.). <https://patents.google.com/patent/US20180169198A1/en>
- Bauernfeind, J. C. (1981). *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors: Technological nutritional application*. (1a ed.). Academic Press.
- Becerril, M. (1988). Evaluación del poder pigmentante de luteína y capsantina en pollo de engorda y gallinas en postura con un colorímetro de reflectancia. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Berry, J. D., Licea, A., Popkov, M., Cortez, X., Fuller, R., Elia, M., Kerwin, L., Kubitz, D., & Barbas, C. F. (2003). Rapid Monoclonal Antibody Generation Via Dendritic Cell Targeting In Vivo. *Hybridoma and Hybridomics*, 22(1), 23–31.
- Bilgili, S., & Hess, J. B. (2010). Problemas de la piel en la canal de pollo: causas y soluciones. *Selecciones Avícolas*, 52(1), 13–18.
- Blake, D. P., & Tomley, F. M. (2014). Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. *Trends in Parasitology*, 30(1), 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.10.003>
- Bletner, J. K., Mitchell, R. P., & Tugwell, R. L. (1966). The effect of *Eimeria maxima* on broiler pigmentation. *Poultry science*, 45(4), 689–694. <https://doi.org/10.3382/ps.0450689>
- Bohn, P., Bak, S. A., Björklund, E., Krogh, K. A., & Hansen, M. (2013). Abiotic degradation of antibiotic ionophores. *Environmental Pollution*, 182, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.06.040>
- Bottje, W., Hargis, B. M., Berghman, L. R., Kwon, Y. M., Cole, K., Cox, M., Layton, S., El-Ashram, S., Barta, J., & Tellez, G. (2013). Compositions and methods of enhancing immune responses (Patent Núm. patent US20110111015.). <https://patents.google.com/patent/US8604178B2/en>
- Bradley, G. K. (2014). Digestión y absorción: los procesos no fermentativos. En *Fisiología Veterinaria* (5a ed., pp. 296–319). EL SEVIER.
- Brambila, S., Nesheim, M. . C., & Hill, F. W. (1961). Effect of trypsin supplementation on the

- utilization by the chick of diets containing raw soybean oil meal. *The Journal of Nutrition*, 75(1), 13–20. <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/75/1/13/4776867>
- Breithaupt, D. E., Weller, P., & Grashorn, M. A. (2003). Quantification of carotenoids in chicken plasma after feeding free or esterified lutein and capsanthin using high-performance liquid chromatography and liquid. *Poultry Science*, 82(3), 395–401. <https://academic.oup.com/ps/article-abstract/82/3/395/1520835>
- Brito, L. D. S., Pereira, E. N., da Silva, A. A., Costa Silva, V. B., & Freitas, F. L. da C. (2014). Experimental Infection with Sporulated Oocysts of *Eimeria maxima* (Apicomplexa: Eimeriidae) in Broiler. *Journal of Veterinary Medicine*, 2014, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/283029>
- Carreno, B. M., Becker-Hapak, M., & Linette, G. P. (2009). CD40 regulates human dendritic cell-derived IL-7 production that, in turn, contributes to CD8+ T-cell antigen-specific expansion. *Immunology and Cell Biology*, 87(2), 167–177. <https://doi.org/10.1038/icb.2008.80>
- Carruthers, V. B., Giddings, O. K., & Sibley, L. D. (1999). Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cellular Microbiology*, 1(3), 225–235.
- Castaneda, M. P., Hirschler, E. M., & Sams, A. R. (2005). Skin pigmentation evaluation in broilers fed naturally and synthetic pigments. *Poultry Science*, 84(1), 143–147.
- Castaneda MP, Hirschler EM, & Sams AR. (2005). Skin pigmentation evaluation in broilers fed natural and synthetic pigments. *Poultry Science*, 84(1), 143–147.
- Chapman, H., 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. *International Journal for Parasitology*, 32(5), 617–629. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751901003629>
- Chapman, H. D. (2011). Perspectivas del control de la coccidiosis. *Actualidad avipecuaria*, 14–16.
- Chapman, H. D. (2005). Perspectives for the control of coccidiosis in poultry by chemotherapy and vaccination. *IXth International Coccidiosis Conference*, 99–103.
- Chapman, H. D., Fernandes, D. L., & Davison, T. F. (1982). A comparison of the effects of infection with *Eimeria maxima* and dietary restriction on weight gain, plasma metabolites and liver glycogen in the immature fowl, gallus domesticus. *Parasitology*, 84(2), 205–213. <https://doi.org/10.1017/S0031182000044772>

- Chen, C. H., Abi-Ghanem, D., Njongmeta, L., Bray, J., Mwangi, W., Waghela, S. D., & Berghman, L. R. (2010). Production and characterization of agonistic monoclonal antibodies against chicken CD40. *Developmental & Comparative Immunology*, *34*(11), 1139–1143. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X10001515>
- Chen, Chang Hsin, Abi-Ghanem, D., Waghela, S. D., Chou, W. K., 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. *Journal of Immunological Methods*, *378*(1–2), 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.02.006>
- Conway, D. P., Guyonnet, V., Michener, S., McDougald, L. R., & Mathis, G. F. (1995). Efficacy of semduramicin and salinomycin against *Eimeria maxima* in a laboratory test using two levels of oocyst inocula. *Poultry science*, *74*(12), 1942–1947. <https://doi.org/10.3382/ps.0741942>
- Conway, D. P., McKenzie, M. E., & Dayton, A. D. (1990). Relationship of coccidial lesion scores and weight gain in infections of *Eimeria acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella* in broilers. *Avian Pathology*, *19*(3), 489–496. <https://doi.org/10.1080/03079459008418702>
- Conway, D. P., Sasai, K., Gaafar, S. M., & Smothers, C. D. (1993). Effects of Different Levels of Oocyst Inocula of *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, and *E. maxima* on Plasma Constituents, Packed Cell Volume, Lesion Scores, and Performance in Chickens. *Avian Diseases*, *37*(1), 118. <https://doi.org/10.2307/1591464>
- Conway, Donal P, & McKenzie, M. E. (2008). *Poultry Coccidiosis: Diagnostic and Testing Procedures* (3a ed.). Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470344620.fmatter>
- Cordero del Campillo, M., & Rojo, V. F. A. (2001). *Parasitología Veterinaria* (2nd ed.). Mc Graw Hill Interamericana.
- Cori, E. (2015). La *Eimeria maxima* como factor clave en la enteritis necrótica. *Avinews*.
- Cortés, C. (2005). Factores que afectan la pigmentación (Asociación Mexicana de Especialistas en Nutrición Animal (ed.)). 1a Mesa de Discusión AMENA sobre Producción de pollo de engorda.
- Cuca, M., Pino, J., & Mendoza, C. (1963). El uso de pigmentos en la alimentación de las aves. *TÉCNICA PECUARIA*, *2*, 36–39. https://scholar.google.com.ec/scholar?q=El+uso+de+pigmentos+en+la+alimentación+de+las+aves&btnG=&hl=es&as_sdt=0,5

- Davison, F., Kaspers, B., & Schat, K. A. (2008). *Avian Immunology* (A. Pr (ed.)).
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *40*(3), 173–289. <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>
- Díaz-Martín, R., & Mondragón-Flores, R. (2017). Organelos de secreción e invasión celular. En *Toxoplasmosis Humana* (pp. 68–89).
- Dubey, J. P., & Jenkins, M. C. (2018). Re-evaluation of the life cycle of *Eimeria maxima* Tyzzer, 1929 in chickens (*Gallus domesticus*). *Parasitology*, *145*(8), 1051–1058. <https://doi.org/10.1017/S0031182017002153>
- Fernando, M. A., & McCraw, B. M. (1973). Mucosal Morphology and Cellular Renewal in the Intestine of Chickens Following a Single Infection of *Eimeria acervulina*. *The Journal of Parasitology*, *59*, 493–501. <https://doi.org/10.2307/3278782>
- Fetterer, R. H., Miska, K. B., Lillehoj, H., & Barfield, R. C. (2007). Serine protease activity in developmental stages of *Eimeria tenella*. *Journal of Parasitology*, *93*(2), 333–340.
- Fitz-Coy, S. H. (1992). Antigenic Variation among Strains of *Eimeria maxima* and *E. tenella* of the Chicken. *Avian Diseases*, *36*, 40–43. <https://doi.org/10.2307/1591712>
- Fletcher, D. L., Papa, C. M., & Tirado, F. X. (1986). The effect of saponification on the broiler coloring capability of marigold extracts. *Poultry Science*, *65*(9), 1708–1714. <https://academic.oup.com/ps/article-abstract/65/9/1708/1592180>
- Folz, S. D., Lee, B. L., Nowakowski, L. H., & Conder, G. A. (1988). Anticoccidial evaluation of halofuginone, lasalocid, maduramicin, monensin and salinomycin. *Veterinary Parasitology*, *28*(1–2), 1–9. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(88\)90013-1](https://doi.org/10.1016/0304-4017(88)90013-1)
- Frade-Negrete, N. J., Hernández-Velasco, X., Fuente-Martínez, B., Quiroz-Pesina, M., Ávila-González, E., & Tellez, G. (2016). Effect of the infection with *Eimeria acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella* on pigment absorption and skin deposition in broiler chickens. *Austral Journal of Veterinary Sciences*, *48*(2), 199–207.
- Freitas, F., Almeida, K., Machado, R., Machado, C., Swan, G. E., Cuthbert, R., Quevedo, M., Green, R. E., Pain, D. J., Bartels, P., Cunningham, A. a, Duncan, N., Meharg, A. a, Oaks, J. L., Parry-Jones, J., Shultz, S., Taggart, M. a, Verdoorn, G., Wolter, K., He, H. (2008). Lipid and glucose metabolism of broilers (*Gallus gallus domesticus*) experimentally infected with *Eimeria acervulina* Tyzzer, 1929 oocysts. *Brazilian Journal of Poultry Science*,

- 10(3), 157–162. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2008000300004>
- Freitas, F. L. da C. (2014). Metabolic alterations in broiler chickens experimentally infected with sporulated oocysts of *Eimeria maxima*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(3), 309–314. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612014057>
- Furr, H. C., & Clark, R. M. (1997). Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 8(7), 364–377.
- Garcia, M. C. (2008). Aditivos. En *Alimentación de las aves*. (pp. 148–149). Universidad Autónoma de Chapingo.
- Girgis, G. N., Sharif, S., Barta, J. R., Boermans, H. J., & Smith, T. K. (2008). Immunomodulatory effects of feed-borne fusarium mycotoxins in chickens infected with coccidia. *Experimental Biology and Medicine*, 233(11), 1411–1420. <https://doi.org/10.3181/0805-RM-173>
- Gonzalo, M. (2020). *Gestion de datos para Lideres de la Industria Avícola*.
- Goodwin, M. A., Brown, J., & Bounous, D. I. (1998). Use of microscopic lesion scores, gross lesion scores and oocyst count scores to detect *Eimeria maxima* in chickens. *Avian Pathology*, 27(4), 405–408. <https://doi.org/10.1080/03079459808419359>
- Grenier, B., & Applegate, T. J. (2013). Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: Meta-analysis of published experiments in animals. *Toxins*, 5(2), 396–430. <https://doi.org/10.3390/toxins5020396>
- Grenier, B., Loureiro-Bracarense, A. P., Lucioli, J., Pacheco, G. D., Cossalter, A. M., Moll, W. D., Schatzmayr, G., & Oswald, I. P. (2011). Individual and combined effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins in piglets. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(5), 761–771. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000402>
- Hansen, M., Krogh, K. A., Brandt, A., Christensen, J. H., & Halling-Sørensen, B. (2009). Fate and antibacterial potency of anticoccidial drugs and their main abiotic degradation products. *Environmental Pollution*, 157(2), 474–480. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.09.022>
- Hatzifoti, C., & Heath, A. W. (2007). CD40-mediated enhancement of immune responses against three forms of influenza vaccine. *Immunology*, 122(1), 98–106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02617.x>
- Haug, A., Williams, R. B., & Larsen, S. (2006). Counting coccidial oocysts in chicken faeces: A comparative study of a standard McMaster technique and a new rapid method.

- Veterinary Parasitology*, 136(3–4), 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.024>
- Hencken, H. (1992). Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. *Poultry Science*, 71(4), 711–717. <https://academic.oup.com/ps/article-abstract/71/4/711/1533755>
- Hernández-Velasco, X., Chapman, H. D., Owens, C. M., Kuttappan, V. A., Fuente-Martínez, B., Menconi, A., Latorre, J. D., Kallapura, G., Bielke, L. R., Rathinam, T., Hargis, B. M., & Tellez, G. (2014). Absorption and deposition of xanthophylls in broilers challenged with three dosages of *Eimeria acervulina* oocysts. *British Poultry Science*, 55(2), 167–173. <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.879095>
- Huang, J., Zhang, Z., Li, M., Song, X., Yan, R., Xu, L., & Li, X. (2015). Immune protection of microneme 7 (EmMIC7) against *Eimeria maxima* challenge in chickens. *Avian Pathology*, 44(5), 392–400. <https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1071780>
- Idris, A. B., Bounous, D. I., Goodwin, M. A., Brown, J., & Krushinskie, E. A. (1997). Quantitative pathology of small intestinal coccidiosis caused by *Eimeria maxima* in young broilers. *Avian Pathology*, 26(4), 731–747. <https://doi.org/10.1080/03079459708419249>
- Ileri-Büyükoğlu, T., & Güldür, T. (2005). Dyslipoproteinemias and their clinical importance in several species of domestic animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA)*, 227(11), 1746–1751.
- INEGI. (2017). Anuario estadístico y geográfico de la Ciudad de México 2017. *Anuario Estadístico y Geográfico de los Estados Unidos Mexicanos*, 506. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2006.04.080>
- Jáuregui, M. E. C., Carrillo, C. M. de la C., & Romo, P.-G. F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61(3), 233–241. <https://doi.org/0004-0622>
- Jenkins, M. C., Dubey, J. P., Miska, K., & Fetterer, R. (2017). Differences in fecundity of *Eimeria maxima* strains exhibiting different levels of pathogenicity in its avian host. *Veterinary Parasitology*, 236, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.01.009>
- Johnson, J., & Reid, W. M. (1970). Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Experimental parasitology*, 28(1), 30–36.
- Juárez, R. M. (2002). Efecto de varios agentes sobre la pigmentación cutánea en pollos de engorda. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Jung, Y. S., Anderson, R. C., Byrd, J. A., Edrington, T. S., Moore, R. W., Callaway, T. R.,

- McReynolds, J., & Nisbet, D. J. (2003). Reduction of *Salmonella Typhimurium* in experimentally challenged broilers by nitrate adaptation and chlorate supplementation in drinking water. *Journal of Food Protection*, 66(4), 660–663. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.4.660>
- Kaiser, P. (2010). Advances in avian immunology-prospects for disease control: A review. *Avian Pathology*, 39(5), 309–324. <https://doi.org/10.1080/03079457.2010.508777>
- Kats, L. M., Cooke, B. M., Coppel, R. L., & Black, C. G. (2008). Protein Trafficking to Apical Organelles of Malaria Parasites – Building an Invasion Machine. *Traffic*, 9, 176–186. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00681.x>
- Kipper, M., Andretta, I., Lehnen, C. R., Lovatto, P. A., & Gonzalez, S. (2013). Meta-analysis of the performance variation in broilers experimentally challenged by *Eimeria spp* . *Veterinary Parasitology*, 196(1–2), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.013>
- Kothlow, S., Morgenroth, I., Tregaskes, C. A., Kaspers, B., & Young, J. R. (2008). CD40 ligand supports the long-term maintenance and differentiation of chicken B cells in culture. *Developmental and Comparative Immunology*, 32(9), 1015–1026. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.01.012>
- Krinsky, N. I. (2001). Carotenoids as antioxidants. *Nutrition*, 17(10), 815–817. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(01\)00651-7](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(01)00651-7)
- Krinsky, N. I., Mayne, S. T., & Sies, H. (2004). Carotenoids in health and disease (D. Marcel (ed.); 1st Editio).
- Kuehl, R. (2001). *Diseño de experimentos*. Principos estadísticos de diseño y análisis de investigación. (2nd ed.). The University of Arizona.
- Larry, R., McDougald, & Steve, H. (2013). Coccidiosis. En *Diseases of Poultry* (pp. 1148–1163). Wiley- Blackwell.
- Lee, K. W., Lillehoj, H. S., Jang, S. I., Lee, S. H., Bautista, D. A., Donald Ritter, G., Lillehoj, E. P., & Siragusa, G. R. (2013). Comparison of live *Eimeria* vaccination with in-feed salinomycin on growth and immune status in broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, 95(1), 110–114. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.02.005>
- Lillehoj, H. S. (2005). Immune response to coccidia. *The IXth International Coccidiosis Conference*.
- Lillehoj, H. S., Dalloul, R. A., & Min, W. (2003). Enhancing intestinal immunity to coccidiosis. *World Poult*, 19(4), 18–21.
- Lillehoj, H. S., & Lillehoj, E. P. (2000). Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal

- immunity and vaccination strategies. *Avian diseases*, 408–425.
https://www.jstor.org/stable/1592556?casa_token=q4te9OZtn9AAAAAA:ZxY7ju-VjzUek0B9mccWJdDh89wWltCmDg6JhEAvMWdDbs6-_ZzuU5ogRrWqExg3OUStF_CMQZqpJo0qvCfI1i9lkeNSOfX04jEaJLIg0wf8UdL6AN3_
- Lillehoj, H. S., Min, W., & Dalloul, R. A. (2004). Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*. *Poultry Science*, 83(4), 611–623.
<https://doi.org/10.1093/ps/83.4.611>
- Liu, G. D., Hou, G. Y., Wang, D. J., Lv, S. J., Zhang, X. Y., Sun, W. P., & Yang, Y. (2008). Skin pigmentation evaluation in broilers fed different levels of natural okra and synthetic pigments. *Journal of Applied Poultry Research*, 17(4), 498–504.
<https://doi.org/10.3382/japr.2008-00058>
- Long, P. L. (1959). A Study of *Eimeria maxima* Tyzzer, 1929, a Coccidium of the Fowl (*Gallus Gallus*). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 53(3), 325–333.
<https://doi.org/10.1080/00034983.1959.11685930>
- 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 Veterinaria Latina*, 6(3), 201–217. <https://europepmc.org/abstract/med/1010500>
- Martínez, G. A. I. (1997). Evaluación de los valores de pigmentación en la piel en la pechuga del pollo de engorda comparandola con otras regiones anatomicas medidas con el colorimetro de reflectancia. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Martinez, P. M., Cortes, C. A., & Avila, G. E. (2004). Evaluation of three pigment levels of marigold petals (*Tagetes erecta*) on skin pigmentation of broiler chicken. *Tec Pecu Mex*, 42(1), 105–111.
- McDonald, V., & Shirley, M. W. (2009). Past and future: Vaccination against *Eimeria*. *Parasitology*, 136(12), 1477–1489. <https://doi.org/10.1017/S0031182009006349>
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007). Pigmentos carotenoides: Consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 57(2), 109–117. <https://doi.org/0004-0622>
- Ménard, R. (2000). The journey of the malaria sporozoite through its hosts : two parasite proteins lead the way. *Microbes and infection*, 2, 633–642.
- Mínguez, M. M. I., Pérez, G. A., & Hornero-Méndez, D. (2005). Pigmentos carotenoides en

- frutas y vegetales: mucho más que simples “colorantes” naturales. *AgroCSIC*.
<http://digital.csic.es/handle/10261/5754>
- Montagne, L., Pluske, J. R., & Hampson, D. J. (2003). A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal Feed Science and Technology*, *108*(1–4), 95–117. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00163-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00163-9)
- Montoya, V. (2015). Efecto de niveles de apo-éster y cantaxantina en dietas de gallina, sobre la coloracion de la yema de huevo y la preferencia del consumidor. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Morahan, B. J., Wang, L., & Coppel, R. L. (2009). No TRAP, no invasion. *Trends in Parasitology*, *25*(2), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.11.004>
- Muñoz-Díaz, J. I., Fuente-Martínez, B., Hernández-Velasco, X., & Ávila-González, E. (2012). Skin pigmentation in broiler chickens fed various levels of metabolizable energy and xanthophylls from *Tagetes erecta*. *Journal of Applied Poultry Research*, *21*, 788–796.
- Murugesan, G. R., Ledoux, D. R., Naehrer, K., Berthiller, F., Applegate, T. J., Grenier, B., Phillips, T. D., & Schatzmayr, G. (2015). Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance , and recent development in mycotoxin counteracting strategies 1. *Poultry Science*, *94*(6), 1298–1315.
- Nogueira, V. A., Nascimento, T., & Vargas, P. (2009). Intoxicação por antibióticos ionóforos em animais. *Pesq. Vet. Bras.*, *29*(3), 191–197.
- Osorio, J. H., & Flórez, J. D. (2011). Diferencias bioquímicas y fisiológicas en el metabolismo de lipoproteínas de aves comerciales. *Biosalud*, *10*(1), 88–98.
- Parker, R. S. (1996). Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *The FASEB Journal*, *10*(5), 542–551.
- Pollock, D., Yun, C.-H., Emará, M. G., Zhu, J. J., Sadjadi, M., Lillehoj, H. S., & Allen, P. C. (2014). Analysis of disease resistance-associated parameters in broiler chickens challenged with *Eimeria maxima*. *Poultry Science*, *79*(5), 619–625. <https://doi.org/10.1093/ps/79.5.619>
- Price, K. R., Guerin, M. T., Newman, L., Hargis, B. M., & Barta, J. R. (2013). Examination of a novel practical poultry management method to enhance the effect of live eimeria vaccination for conventionally housed replacement layer pullets. *International Journal of Poultry Science*, *12*(3), 175–184. <https://doi.org/10.3923/ijps.2013.175.184>

- Rajput, N., Naeem, M., Ali, S., Zhang, J. F., Zhang, L., & Wang, T. (2013). The effect of dietary supplementation with the natural carotenoids curcumin and lutein on broiler pigmentation and immunity. *Poultry Science*, *92*(5), 1177–1185. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02853>
- Ratcliff, R., Day, E., & Hill, J. (1959). Broiler pigmentation as influenced by dietary modifications. *Poultry Science*, *38*(5), 1039–1048. <https://academic.oup.com/ps/article-abstract/38/5/1039/1501371>
- Robson, K. J. H., Dolo, A., Hackford, I. A. N. R., Doumbo, O., Richards, M. B., Keita, M. M., Sidibe, T., Bosman, A., Modiano, D., & Crisanti, A. (1998). Natural polymorphism in the Thrombospondin-Related Adhesive Protein of **Plasmodium falciparum**. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *58*(1), 81–89.
- Rose, M. E., & 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. *Parasitology*, *73*(1), 25–37. <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/immunity-to-coccidiosis-stages-of-the-lifecycle-of-eimeria-maxima-which-induce-and-are-affected-by-the-response-of-the-host/BA97A1109F43FA0AAB2846A75560EC1B>
- Ruff, M. D., & Reid, W. M. (1975). Coccidiosis and Intestinal pH in Chickens. *Avian Diseases*, *19*(1), 52–58.
- Ruff, M. D., Reid, W. M., & Johnson, J. K. (1974). Lowered blood carotenoid levels in chickens infected with coccidia. *Poultry science*, *53*(5), 1801–1809. <https://doi.org/10.3382/ps.0531801>
- Ruff, M. D., & Wilkins, G. C. (1980). Total intestinal absorption of glucose and L-methionine in broilers infected with *Eimeria acervulina*, *E. mivati*, *E. maxima* or *E. brunette*. *Parasitology*, *80*(3), 555–569. <https://doi.org/10.1017/S0031182000001013>
- Schaefer, E. J., Eisenberg, S., & Levy, R. I. (1978). Lipoprotein apoprotein metabolism. *Journal of lipid research*, *19*(6), 667–687. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/211170>
- Shirley, M. W. (2000). The genome of *Eimeria* spp., with special reference to *Eimeria tenella* - A coccidium from the chicken. *International Journal for Parasitology*, *30*(4), 485–493. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00183-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00183-6)
- Shirley, Martin W., Ivens, A., Gruber, A., Madeira, A. M. B. N., Wan, K. L., Dear, P. H., & Tomley, F. M. (2004). The *Eimeria* genome projects: A sequence of events. *Trends in Parasitology*, *20*(5), 199–201. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.02.005>

- Shirley, Martin W., Smith, A. L., & Tomley, F. M. (2005). The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. *Advances in Parasitology*, 60(05), 285–330. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)60005-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)60005-X)
- Shivaramaiah, S., Barta, J. R., Layton, S. . L., Lester, C., Kwon, Y. M., Bregelman, B. M., Hargis, B. M., & Tellez, G. (2010). Development and Evaluation of an D aroA / D htrA Salmonella enteritidis Vector Expressing *Eimeria maxima* TRAP Family Protein EmTFP250 with CD 154 (CD 40L) as Candidate Vaccines against Coccidiosis in Broilers. *International Journal of Poultry Science*, 9(11), 1031–1037.
- Sibley, L. D. (2004). Intracellular Parasite Invasio Strategies. *Cellular Invasions*, 304, 248–253. <https://doi.org/10.1126/science.1094717>
- Sirri, F., Petracci, M., Bianchi, M., & Meluzzi, A. (2010). Survey of skin pigmentation of yellow-skinned broiler chickens. *Poultry Science*, 89(7), 1556–1561. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00623>
- 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. *Infection and Immunity*, 70(5), 2472–2479. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.5.2472-2479.2002>
- Soldati, D., Dubremetz, J. F., & Lebrun, M. (2001). Microneme proteins: Structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 31(12), 1293–1302. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00257-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00257-0)
- Soldati, D., Foth, B. J., & Cowman, A. F. (2004). Molecular and functional aspects of parasite invasion. *Trends in Parasitology*, 20(12), 567–574. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.09.009>
- Song, X., Xu, L., Yan, R., Huang, X., & Li, X. (2015). Construction of *Eimeria tenella* multi-epitope DNA vaccines and their protective efficacies against experimental infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 166(3–4), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.05.005>
- Staines, K., Young, J. R., & Butter, C. (2013). Expression of Chicken DEC205 Reflects the Unique Structure and Function of the Avian Immune System. *PLoS ONE*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051799>
- Stephens, J. F., Kowalski, L. M., & Borst, W. J. (1976). Some Physiological Effects of

- Coccidiosis Caused by *Eimeria maxima* in Young Chickens. *The Journal of Parasitology*, 53(1), 176–179. <https://doi.org/10.2307/3276643>
- Su, S., Miska, K. B., Fetterer, R. H., Jenkins, M. C., & Wong, E. A. (2015). Expression of digestive enzymes and nutrient transporters in *Eimeria*-challenged broilers. *Experimental Parasitology*, 150, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.01.003>
- Sumano, H. L., Ocampo, L. c., & Gutiérrez, L. O. (2015). *Farmacología Veterinaria* (4th ed.). Aranda Salud Animal.
- Teixeira, M., & Meleiro, C. (2008). A new method for analysis of plasma carotenoids in poultry. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia*, 60(6), 1399–1402. http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352008000600014&script=sci_arttext&tIng=es
- Torrubia, D. F. J., Gómez, M. C., Téllez, P. S., & Hauck, R. (2014). Vacunación en la Avicultura. Servet.
- Tregaskes, C. A., Glansbeek, H. L., Gill, A. C., Hunt, L. G., Burnside, J., & Young, J. R. (2005). Conservation of biological properties of the CD40 ligand, CD154 in a non-mammalian vertebrate. *Developmental and Comparative Immunology*, 29(4), 361–374. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.09.001>
- Tunio, M. T., Yang, S., Chen, Z., Zubair, M., Qiu, J., Zhao, Y., Chen, G., Chow, Y., & Chen, A. (2013). Effect of pigments with different origins on pigmentation and performance of broilers. *Pakistan Journal of Zoology*, 45(6), 1715–1725.
- Turk, D. E. (1981). Coccidial infections and iron absorption. *Poultry science*, 60(2), 323–326.
- Tyler, J. S., Treeck, M., & Boothroyd, J. C. (2011). Focus on the ringleader : the role of AMA1 in apicomplexan invasion and replication. *Trends in Parasitology*, 27(9), 410–420. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.04.002>
- van Kooten, C., & Banchereau, J. (1997). Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Current opinion in immunology*, 9(3), 330–337.
- Vanparijs, O., Marsboom, R., & Desplenter, L. (1989). Diclazuril, a new broad spectrum anticoccidial drug in chickens. 1. Dose titration studies and pilot floor pen trials. *Poultry science*, 68(4), 489–495. <https://doi.org/10.3382/ps.0680489>
- Ványi, A., Sályi, G., Majoros, G., Glavits, R., Sándor, G., & Bago, G. (1989). Interaction of T-2 fusariotoxin and monensin in broiler chickens infected with *Coccidia*. *Acta Veterinaria Hungarica*, 37(4), 327–333.

- Varga, I., & Ványi, A. (1992). Interaction of T-2 fusariotoxin with anticoccidial efficacy of lasalocid in chickens. *International Journal for Parasitology*, 22(4), 523–525. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(92\)90154-D](https://doi.org/10.1016/0020-7519(92)90154-D)
- Wallach, M. G., Ashash, U., Michael, A., & Smith, N. C. (2008). Field application of a subunit vaccine against an enteric protozoan disease. *PLoS ONE*, 3(12), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003948>
- Wallach, M., Halabi, A., Pillemer, G., Sar-Shalom, O., Mencher, D., Gilad, M., Bendheim, U., Danforth, H. D., & Augustines, P. C. (1992). Maternal immunization with gametocyte antigens as a means of providing protective immunity against *Eimeria maxima* in chickens. *Infection and Immunity*, 60(5), 2036–2039. <http://iai.asm.org/content/60/5/2036.short>
- 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. *Infection and immunity*, 58(2), 557–562. <http://iai.asm.org/content/58/2/557.short>
- Wang, R. J., Fui, S. X., Miao, C. H., & Feng, D. Y. (2005). Effects of Different Mycotoxin Adsorbents on Performance , Meat Characteristics and Blood Profiles of Avian Broilers Fed Mold Contaminated Corn. *Asian-australasian journal of animal*, 19(1), 72–79.
- Wengelnik, K., Spaccapelo, R., Naitza, S., Robson, K. J. H., Janse, C. J., Bistoni, F., Waters, A. P., & Crisanti, A. (1999). The A-domain and the thrombospondin-related motif of Plasmodium falciparum TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands. *EMBO Journal*, 18(19), 5195–5204. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.19.5195>
- West, S., Crouch, H., Stanley, R., & Skoog, D. A. (2001). *Quimica Analitica* (7a ed.). Mc Graw Hill. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=SIDALC.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=006287>
- Williams, R. B. (1998). Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. *International Journal for Parasitology*, 28(7), 1089–1098. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751998000666>
- Williams, R. B., & Catchpole, J. (2000). A new protocol for a challenge test to assess the efficacy of live anticoccidial vaccines for chickens. *Vaccine*, 18(13), 1178–1185.

[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00387-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00387-4)

- Williams, W. D. (1992). Origin and impact of color on consumer preference for food. *Poultry science*, 71(4), 744–746. <https://doi.org/10.3382/ps.0710744>
- Witcombe, D. M., Ferguson, D. J., Belli, S. I., Wallach, M. G., & Smith, N. C. (2004). *Eimeria maxima* TRAP family protein EmTFP250: subcellular localisation and induction of immune responses by immunisation with a recombinant C-terminal. *International Journal for Parasitology*, 34(7), 861–872. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751904000736>
- Yang, X. C., Li, M. H., Liu, J. H., Ji, Y. H., Li, X. R., Xu, L. X., Yan, R. F., & Song, X. K. (2017). Identification of immune protective genes of *Eimeria maxima* through cDNA expression library screening. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2029-4>
- Yuño, M. M., & Gogorza, L. M. (2008). Coccidiosis aviar : respuesta inmune y mecanismos de control en la industria avícola. *Revista veterinaria*, 19(1), 61–66.
- 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. *Veterinary Parasitology*, 188(3–4), 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.025>
- Zulpo, D. L., Peretti, J., Morteau Ono, L., Longhi, E., Oliveira, M. R., & Guimarães, G. (2007). Pathogenicity and histopathological observations of commercial broiler chicks experimentally infected with isolates of *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *E. maxima*. *Semina: Ciências Agrárias*, 28(1).